

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

David Fernando Colón Morelo

**Avaliação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na susceptibilidade na sepse pediátrica e suas consequências a longo prazo**

Ribeirão Preto – SP

2020

DAVID FERNANDO COLÓN MORELO

**Avaliação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na susceptibilidade na sepse pediátrica e suas consequências a longo prazo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha.

Ribeirão Preto – SP

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Colón, David Fernando

Avaliação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na susceptibilidade na sepse pediátrica e suas consequências a longo prazo. / David Colón; orientador, Fernando de Queiroz Cunha. – 2020

2020.

180 f. : il:30cm

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Palavras chaves:

1. Sepse pediátrica. 2. NETs .3. Imunossupressão. 5. Células T Reguladoras.

Folha de Aprovação

David Fernando Colón Morelo

**Avaliação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na susceptibilidade na sepse pediátrica e suas consequências a longo prazo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Imunologia

**Aprovado em:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Banca examinadora**

---

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha  
FMRP – USP

---

Prof. Dr. João Santana  
FMRP – USP

---

Profa. Dra. Larissa Dias da Cunha  
FMRP – USP

---

Prof. Dr. Mauro Teixeira  
Universidade Federal de Minas Gerais

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia em colaboração com o Centro de Terapia Intensiva do Departamento de Cirurgia e Anatomia, o Centro de Terapia Intensiva Pediátrica do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e no Laboratório do Prof. Bernardo S. Franklin no Institute of Innate Immunity da University of Bonn em Bonn, Alemanha com apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

1. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Processo No.2013/08216-2, concedido ao Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID) e Processo 2016/11405-0, outorgado a David Fernando Colón Morelo;
2. Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE/FAPESP): Processo No. 2018/23079-5, outorgado a David Fernando Colón Morelo;
3. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
4. Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA).

*O SENHOR é o meu pastor, nada me faltará.  
Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas.  
Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome.  
Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás  
comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.  
Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com  
óleo, o meu cálice transborda.  
Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e  
habitarei na casa do Senhor por longos dias.*

*(Davi Rei de Israel, Salmos 23:1-6)*

***Dedicatória***

A minha esposa e amiga Diana, companheira leal, presente imerecido de Deus, que com seu incondicional apoio e amor dividiu comigo cada segundo das minhas angustias, batalhas, derrotas e vitórias durante esta longa jornada de quatro anos. Graças a você consegui me manter firme e certo que a vitória chegaria, te amo.

À minha amada família: os meus pais, Ricardo e Maritza e os meus irmãos Ricardo e Liney, por me apoiar nesta “loucura” de me dedicar à ciência, sendo minha válvula de escape quando sempre precisei. Vocês me despertaram em mim o anelo pela busca do conhecimento;

E aos Professores Fernando Cunha, Diego Torres e Bernardo Franklin, por ter me iniciado no mundo da ciência. Obrigado por me ensinar e orientar nesta jornada;

***Obrigado por tudo!***



***Agradecimientos***

Agradeço inicialmente ao **Prof. Fernando de Queiroz Cunha** pela amizade e orientação, por abrir as portas do laboratório de Inflamação e Dor, me oferecendo todo apoio e infraestrutura para a realização deste trabalho, obrigado por ter me recebido no meu passo pela USP. Obrigado também à **Profa. Ana Paula Carlotti, o Prof. Fabio Carmona, o Prof. Fernando Ramalho** e o *staff* medico da Unidade de Emergência do Hospital das Clinicas de Ribeirão Preto, por seu apoio e ajuda assessoria clinica durante este estudo.

Aos demais professores do LID (**Prof. Thiago e Jose Carlos**) e membros do LID, **Carlos W. Wanderley, Marcelo Franchin, Camila Meireles, Cesar Speck, Raphael Sanches, Fernanda V. Castanheira, Vanessa Borges, Rangel Leal, Alexandre Lopes, Kalil Alves De Lima e Daniele Nascimento**) pela convivência e discussão de resultados nestes quatro anos. Assim mesmo, sou grato aos meus colegas do laboratório, que não realizaram experimentos propriamente neste trabalho, mas contribuíram em grande parte para a minha formação pessoal e profissional

Sou grato aos meus colegas do Institute of Innate Immunity da University of Bonn, o **Prof. Dr. Bernardo, Verena, Damien, Ibrahim, Lucas, Paola, Nathalia e Conny**, pela sua paciência, ensinamentos e acolhimento no seu laboratório, certamente uma experiência divisor de águas para minha vida pessoal e principalmente como cientista, *vielen dank!*

Sou grato especialmente aos meus amigos **Carlos W. Wanderley e Marcelo Franchin** parte importante e corresponsáveis deste trabalho, colaboradores diretos na realização desta tese, por meio de discussões, ensinamento de técnicas, a realização direta de experimentos ao meu lado e principalmente amizade. Publicamos muito nestes últimos quatro anos e espero que nossa parceria perdure.

Grato aos colegas que me deram a oportunidade de trabalhar em colaboração para o desenvolvimento de seus respectivos trabalhos e auxiliaram no meu aprendizado como

pesquisador: **Carlos W. Wanderley, Marcelo Franchin, Fernanda Castanheira, Rafael França, Daniela Nascimento e Carlos Hiroki.**

Obrigado a todos os **Pós-graduandos do Departamento de Imunologia Básica e Aplicada**, pela amizade, discussões durante as disciplinas que cursamos juntos no me passo pela USP, pelos encontros no corredor, pelo curso de inverno que realizamos com sucesso no ano de 2017.

Obrigado a todos os alunos e docentes que fazem parte do **Jornal Club** do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pelas ricas discussões de artigos que contribuíram para minha formação profissional, fortalecendo o olhar crítico e imparcial da literatura científica.

Agradeço a imensa amizade, além do auxílio técnico de: **Marcos Antônio, Ieda Regina, Diva, Ana Kátia, Sérgio Rosa e Tadeu Franco Vieira.**

Aos funcionários dos biotérios: **Júlio, Eliana e Orlando**, pela criação, distribuição e cuidado com os animais utilizados neste estudo.

À **Ana Cristina**, secretária da pós-graduação, não apenas pela competência com que realiza seu trabalho e pelos anos de dedicação à nossa pós-graduação, como também pela amizade e ajuda incondicional.

Aos queridos amigos, aos professores e técnicos do Programa de Imunologia, pelos bons momentos de aprendizado e diversão.

Obrigado aos membros da banca examinadora composta pelos professores: **Prof. Dr. João Santana, Profa. Dra. Larissa Dias da Cunha** e o **Prof. Dr. Mauro Teixeira** por se dispuserem a atender meu pedido quanto à avaliação deste trabalho.

A minha esposa **Diana Quijano** e a toda minha família querida, **meus pais (Ricardo e Maritza), meus irmãos (Ricardo e Liney).**

Agradeço especialmente à **Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA)** pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

**Finalmente, sou imensamente grato ao meu Senhor Jesus, único Deus criador e fonte de toda sabedoria, inteligência e ciência, obrigado meu Deus, meu Senhor, por ter sido porto seguro em todos os momentos de fraqueza e difíceis que passei durante minha jornada, momentos que quase desisti, mas tu estivestes me fortalecendo e levantando, obrigado porque para sempre é a tua misericórdia!**

*“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.*

*Albert Einstein*

***Resumo e Abstract***

## RESUMO

COLÓN, David Fernando. **Avaliação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na susceptibilidade na sepse pediátrica e suas consequências a longo prazo.** 2020. 180 f. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A sepse é uma das principais causas de mortalidade de pacientes hospitalizados no mundo. Clinicamente é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada pela resposta imune desregulada frente uma infecção. Ressalta-se que os recém-nascidos são um grupo etário particularmente susceptível à sepse, apresentando um maior risco de mortalidade quando comparado com a população adulta; contudo, os mecanismos que explicam esta alta susceptibilidade têm sido pouco estudados. Soma-se ao quadro de gravidade da sepse o fato que indivíduos adultos sobreviventes à sepse comumente desenvolvem um quadro de imunossupressão tardia de longa duração, associada com o aumento da susceptibilidade às infecções secundárias, que pode perdurar por até cinco anos. Entretanto, o entendimento das consequências imunes a longo prazo da sepse na população pediátrica tem sido negligenciado. *Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi estudar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na susceptibilidade dos indivíduos recém-nascidos à sepse assim como os mecanismos imuno-moleculares envolvidos nas consequências tardias da sepse em indivíduos recém-nascidos.* Verificamos que, semelhante às observações epidemiológicas referentes à sepse pediátrica, animais recém-nascidos são mais susceptíveis à sepse, quando comparados aos adultos. Demostramos que esta alta susceptibilidade foi decorrente da elevada produção de NETs (*Neutrophils Extracellular Traps*) tanto *in vitro* como *in vivo*, associado como o incremento na expressão da enzima *Padi4* e da citrulinização da histona H3 nos tecidos. Ainda, foi verificado que a degradação sistêmica das NETs, utilizando a rhDNase associada com a terapia antibiótica ou através da inibição farmacológica da enzima Pad4, aumentou significativamente a sobrevivência dos animais sépticos recém-nascidos, a qual esteve associada à redução dos marcadores de inflamação sistêmica e lesões de órgãos vitais. Notavelmente, de maneira translacional, demostramos que pacientes pediátricos exibem maiores concentrações séricas das NETs comparados aos pacientes adultos, sendo estes níveis séricos de NETs correlacionados positivamente com a severidade da sepse pediátrica. No entanto, apesar da alta suscetibilidade à fase aguda da sepse, contrário ao previamente reportado em indivíduos adultos, demostramos que indivíduos recém-nascidos sobreviventes à sepse não desenvolvem imunossupressão tardia. Especificamente, animais recém-nascidos sobreviventes à sepse foram resistentes à infecção secundária induzida com *P. aeruginosa* assim como não apresentaram alterações na imunovigilância tumoral dependente de células T quando comparados aos adultos. Mecanicamente, verificamos que está “resistência” ao desenvolvimento de imunossupressão estava associada com a redução na ativação do eixo IL-33/ILC2, macrófagos do perfil M2/Tregs assim como o alto grau de metilação do DNA nas células epiteliais pulmonares e nas células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de indivíduos recém-nascidos sobreviventes à sepse. Ainda, células Tregs de animais recém-nascidos apresentaram menor estabilidade na expressão de Foxp3. Com o intuito de transpor os nossos resultados para humanos, verificamos pela primeira vez que pacientes pediátricos sobreviventes à sepse não apresentam expansão das células Tregs nem incremento nos níveis séricos da IL-33 quando comparado com os adultos. Em conclusão, demostramos que, embora na fase aguda da sepse, os recém-nascidos são altamente susceptíveis, após o processo séptico, os indivíduos recém-nascidos sobreviventes à sepse são resistentes ao desenvolvimento da disfunção imune de longa duração decorrente da sepse, sugerindo que a imunossupressão decorrente da sepse pode ser um fenômeno dependente da idade.

**Palavras-chave:** Sepse pediátrica, NETs, Imunossupressão e Células T Reguladoras.

## ABSTRACT

COLÓN, David Fernando. **Evaluation of the pathophysiological mechanisms involved in pediatric sepsis susceptibility and its long-term consequences.** 2020. 180 f. Thesis (Doctorate in Applied and Basic Immunology) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Sepsis is one of the leading causes of mortality in hospitalized patients worldwide. Clinically it is defined as a potentially fatal organ dysfunction caused by the dysregulated immune response to infection. It is noteworthy that infants are an age group particularly susceptible to sepsis, presenting a higher risk of mortality when compared to the adult population; Nevertheless, the mechanisms that explain this high susceptibility have been poorly studied. In addition to sepsis severity, adult sepsis survivors commonly develop a long-term immunosuppression associated with the increased susceptibility to secondary infections, which might last for up to five years. Conversely, the investigation of the long-term immune consequences of sepsis in the pediatric population have been neglected. *Hence, the objective of the present study was to study the pathophysiological mechanisms involved in the susceptibility of infant to sepsis as well as the immunomolecular mechanisms involved in the late consequences of sepsis in surviving infant individuals.* We found that, similar to epidemiological observations regarding pediatric sepsis, infant mice are more susceptible to sepsis when compared to adults. Remarkably, we found that this high susceptibility was due to the high production of NETs (*Neutrophils Extracellular Traps*) both *in vitro* and *in vivo*, associated with the increase of *Padi4* expression and histone H3 citrinylation in the tissues. Moreover, it was found that the systemic degradation of NETs, using rhDNase associated with antibiotic therapy or through pharmacological inhibition of the Pad4 enzyme, significantly increased the survival of infant mice to sepsis, which was related with a reduction in systemic inflammation markers and organ damage. Notably, in a translational manner, we found that pediatric patients exhibit higher serum NET concentrations compared to adult patients, and the serum levels of NET were positively correlate with the severity of pediatric sepsis. Nevertheless, despite the high susceptibility to the acute phase of sepsis, unlike previously reported in adult individuals, we demonstrated that sepsis-surviving infant mice do not develop late immunosuppression. Specifically, sepsis-surviving infant mice were resistant to *P. aeruginosa*-induced secondary infection as well as showing no changes in T-cell-dependent tumor immunovigilance when compared to adults. Mechanistically, we found that this “resistance” to the development of immunosuppression was associated with the reduction in the IL-33 / ILC2 axis, M2 / Tregs profile macrophages axis activation as well as the high degree of DNA methylation in pulmonary epithelial cells and TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells of infant surviving mice. Likewise, Tregs cells from infant mice showed less stability in Foxp3 expression. In order to transfer our findings to human settings, we demonstrated that sepsis- surviving pediatric patients did not show Tregs cell expansion or increase in serum IL-33 levels when compared to adults. In conclusion, we have shown that, even though in the acute phase of sepsis, infants are highly susceptible; after the septic process, sepsis-surviving mice are resistant to the development of long-term immune dysfunction resulting from sepsis, suggesting that long-term immunosuppression after to sepsis is an age-dependent phenomenon.

**Keywords: Pediatric sepsis, NETs, Immunosuppression and Regulatory T cells.**



## ***Lista de Esquemas e Tabelas***

<b>Esquema 1.</b> Participação dos neutrófilos na fisiopatologia da sepse.....	36
<b>Esquema 2.</b> Mecanismos de liberação das NETs, de maneira dependente ou independente de ROS.....	37
<b>Esquema 3.</b> Camundongos recém-nascidos sobreviventes à sepse são resistentes à infecção secundária.....	42
<b>Tabela suplementar 1.</b> pD2 da curva de concentração dose-resposta a fenilefrina ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$ mol/L) 6 horas após sepse.....	177
<b>Tabela suplementar 2.</b> Características demográficas e clínicas dos pacientes adultos e pediátricos.....	178
<b>Tabela suplementar 3.</b> Características demográficas e clínicas dos pacientes adultos e pediátricos sobreviventes à sepse.....	179

***Lista de Figuras***

<b>Figura 1.</b> Animais recém-nascidos são mais susceptíveis à sepse.....	72
<b>Figura 2.</b> Animais recém-nascidos são mais susceptíveis ao choque endotóxico induzido pelo LPS...	73
<b>Figura 3.</b> Animais recém-nascidos submetidos à sepse apresentam maior disfunção orgânica.....	74
<b>Figura 4.</b> Neutrófilos de camundongos recém-nascidos apresentam alterações na migração celular <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	77
<b>Figura 5.</b> Neutrófilos de animais recém-nascidos produzem poucas concentrações de espécies reativas.....	78
<b>Figura 6.</b> Produção de NETs (do inglês, <i>Neutrophils extracellular Traps</i> ) por neutrófilos de animais recém-nascidos e adultos.....	81
<b>Figura 7.</b> Animais recém-nascidos liberam mais NETs que os animais adultos.....	82
<b>Figura 8.</b> Animais recém-nascidos apresentam maior expressão de <i>Padi4</i> que animais adultos.....	83
<b>Figura 9.</b> Atividade de DNase do plasma e fagocitose das NETs pelos macrófagos de animais recém-nascidos e adultos é similar.....	84
<b>Figura 10.</b> A degradação das NETs melhora o desfecho da endotoxemia induzida por LPS.....	87
<b>Figura 11.</b> A degradação das NETs reduz os a disfunção orgânica induzida pelo LPS.....	88
<b>Figura 12.</b> A degradação das NETs reduz a citrulinização da histona H3 na endotoxemia induzida por LPS.....	89
<b>Figura 13.</b> A degradação das NETs ou inibição de sua síntese melhora o desfecho da sepse.....	92
<b>Figura 14.</b> A degradação das NETs reduz os a disfunção orgânica induzida pela sepse.....	93
<b>Figura 15.</b> Concentrações séricas das NETs se correlaciona com a severidade da sepse pediátrica.....	95

<b>Figura 16.</b> Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse são resistentes à infecção secundária por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	99
<b>Figura 17.</b> Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não desenvolvem disfunções celulares.....	101
<b>Figura 18.</b> Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam expansão das células TCD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> (Tregs) .....	104
<b>Figura 19.</b> Animais recém-nascidos pós-sépticos não apresentam expansão das células Tregs induzidas e naturais.....	105
<b>Figura 20.</b> As células Tregs de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentam redução na capacidade proliferativa.....	106
<b>Figura 21.</b> Capacidade funcional das células Tregs é similar em animais adultos e recém-nascidos sobreviventes à sepse.....	107
<b>Figura 22.</b> Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentaram menor crescimento tumoral.....	109
<b>Figura 23.</b> Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam alteração na imunovigilância tumoral.....	110
<b>Figura 24.</b> TGF-β1 ativa a via canônica e não-canônica em células T CD4 <sup>+</sup> de animais recém-nascidos.....	113
<b>Figura 25.</b> Células TCD4 <sup>+</sup> de animais recém-nascidos não apresentam alterações na diferenciação para o perfil T regulador.....	114
<b>Figura 26.</b> Animais recém-nascidos apresentam menor manutenção da estabilidade das células Tregs <i>in vitro</i> .....	116
<b>Figura 27.</b> Células T convencionais (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> ) de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentam incremento no perfil de metilação total do DNA.....	118

<b>Figura 28.</b> Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam expansão dos macrófagos do perfil M2.....	121
<b>Figura 29.</b> Macrófagos peritoneais de animais recém-nascidos pós-sépticos não apresentam incremento de marcadores do perfil M2.....	122
<b>Figura 30.</b> Macrófagos de animais recém-nascidos não apresentam comprometimento na polarização para o perfil M2 <i>in vitro</i> .....	124
<b>Figura 31.</b> Macrófagos M2 de animais recém-nascidos não apresentam comprometimento na capacidade funcional <i>in vitro</i> .....	125
<b>Figura 32.</b> Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam aumento na produção de IL-33 e citocinas do tipo 2.....	127
<b>Figura 33.</b> Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam aumento na produção de IL-33 pelas células Lin <sup>-</sup> e a células Alveolares Pulmonares do tipo II (Lin <sup>-</sup> EpCAM <sup>+</sup> ) .....	129
<b>Figura 34.</b> Células Lin <sup>-</sup> de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse possuem um alto perfil de metilação total do DNA.....	131
<b>Figura 35.</b> Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam expansão nas células ILC2 ( <i>Innate Lymphocytes Cells</i> ) .....	133
<b>Figura 36.</b> Pacientes pediátricos sobreviventes à sepse não apresentam expansão das células Tregs.....	136

## ***Lista de Abreviaturas***

BAL	Lavado broncoalveolar
BMDM	Macrófagos derivado da medula óssea
BSA	Albumina derivada de soro bovino
CD	Cluster of differentiation
CCR	Receptor de quimiocinas CC
EDTA	Etilenodiaminotetracético
Foxp3	Fator de transcrição “forkhead Box P3”
GITR	Gene relacionado à família do receptor TNF induzido por glucocorticóide
IFN	Interferon
IL	Interleucina
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
P.a.	Pseudomonas aeruginosa
Log	Logaritmo da função matemática
PBS	Phosphate buffered saline
RPMI	Meio de cultura para células 1640
SBF	Soro bovino fetal
s.c.	Subcutâneo
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
CK-MB	Creatinofosfoquinase MB
BUN	Nitrogênio ureico no sangue
TGF- $\beta$	Fator de crescimento e transformação $\beta$
TNF	Fator de necrose tumoral
Tregs	Células T Reguladoras
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
AEC	Alveolar epithelial cells
ILC2	Type 2 Innate Lymphoid Cells
UTIs	Unidades de terapia intensiva
PRISM	Pediatric Risk of Mortality (PRISM) score
DEREG	Depletion of Regulatory T cells mice
TCR	T Cell Receptor
TLR	Toll-like Receptor
Pad4	Peptidyl arginine deiminase
rh	Recombinant human



***Sumário***

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>33</b>
1.1 Sepses .....	33
1.2 Fisiopatologia da sepsis .....	33
1.3 Neutrófilos e sepsis .....	35
1.4 Sepsis pediátrica .....	38
1.5 Imunossupressão pós-sepsis.....	39
1.5.1 As células T Reguladoras .....	42
1.5.2 As células T Reguladoras e a Imunossupressão pós-sepsis.....	43
1.5.3 O papel do eixo citocinas do tipo 2/macrófagos M2/Tregs .....	44
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
2.1 Objetivo geral .....	47
2.2 Objetivos específicos.....	47
<b>3. MATERIAIS E METODOS</b> .....	<b>50</b>
3.1 Animais .....	50
3.2 Cultura de bactérias .....	50
3.3 Modelo experimental de sepsis e endotoxemia .....	50
3.4 Avaliação do infiltrado neutrofílico nos tecidos .....	51
3.5 Determinação das concentrações de citocinas .....	51
3.6 Avaliação da atividade das enzimas TGO (transaminase glutâmico oxalacética), CK-MB (Creatinofosfoquinase MB), os níveis de BUN (Nitrogênio ureico no sangue) e Creatinina .....	52
3.7 Quimiotaxia <i>in vitro</i> .....	52
3.8 Microscopia Intravital .....	52
3.9 Análise histológica .....	53
3.10 Isolamento de Neutrófilos .....	53

<b>3.11</b>	Determinação das concentrações de óxido nítrico.....	53
<b>3.12</b>	Determinação da produção de espécies reativas .....	54
<b>3.13</b>	Experimentos para avaliar o papel das NETs na susceptibilidade a sepse dos indivíduos recém-nascidos .....	54
<b>3.13.1</b>	Tratamento com rhDNase .....	54
<b>3.13.2</b>	Tratamento com Cl-Amidina .....	54
<b>3.13.3</b>	Quantificação das NETs (cfDNA/MPO) .....	54
<b>3.13.4</b>	Ensaio de atividade de DNase do plasma .....	55
<b>3.13.5</b>	Fagocitose das NETs pelos macrófagos .....	55
<b>3.13.6</b>	Imunofluorescência das NETs .....	56
<b>3.13.7</b>	Western blot da Histona H <sub>3</sub> citrulinada .....	56
<b>3.14</b>	Experimentos para avaliar as consequências da sepse em animais sobreviventes .....	57
<b>3.14.1</b>	Fenotipagem das células Tregs .....	57
<b>3.14.2</b>	Purificação das células T efectoras (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> ) e Tregs (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ) .....	58
<b>3.14.3</b>	Ensaio de supressão <i>in vitro</i> com as células Tregs .....	58
<b>3.14.4</b>	Diferenciação <i>in vitro</i> das células Tregs .....	58
<b>3.14.5</b>	Ensaio de estabilidade das células Tregs .....	58
<b>3.14.6</b>	Infeção secundária intranasal com <i>P. aeruginosa</i> .....	59
<b>3.14.7</b>	Modelo tumoral .....	59
<b>3.14.8</b>	Marcação de Macrófagos M2 em animais sobreviventes à sepse .....	59
<b>3.14.9</b>	Co-cultura de macrófagos com as células TCD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> .....	60
<b>3.14.10</b>	Avaliação da metilação total do DNA .....	61
<b>3.14.11</b>	Isolamento das células Lin- .....	61
<b>3.14.12</b>	Isolamento das células Alveolares Epiteliais .....	61

3.14.13	Imunofenotipagem das células ILC2 (Type 2 Innate Lymphoid Cells) .....	61
3.14.14	Análise de expressão genica .....	62
3.15	Análise de amostras dos pacientes sépticos .....	62
3.15.1	Pacientes .....	62
3.15.2	CrITÉrios de incluso .....	63
3.15.3	CrITÉrios de excluso .....	63
3.15.4	Classificao clinica .....	64
3.15.5	Avaliao da produo das NETs .....	64
3.15.6	Fenotipagem das clulas Tregs .....	64
3.16	Análise estadística .....	64
3.17	Preparo das soluoes e reagentes .....	65
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Experimentos realizados com o modelo experimental de sepse .....</b>	<b>69</b>
4.1.1	Caracterizao das populaoes celulares da resposta imune inata e adaptativa em animais recm-nascidos e adultos .....	69
4.1.2	Obteno e determinao do inoculo de bactrias para a induo da sepse experimental .....	69
4.1.3	Padronizao do modelo de sepse em animais recm-nascidos .....	70
4.1.4	Os neutrfilos de camundongos recm-nascidos apresentam defeitos nos mecanismos de migrao celular e produo de espcies reativas .....	75
4.1.5	A característica da sepse em animais recm-nascidos é a elevada produo de NETs (Neutrophils Extracellular Traps) .....	79
4.1.6	A degradao das NETs melhora o desfecho da endotxia induzida por LPS em animais recm-nascidos .....	85

4.1.7	A degradação das NETs ou a inibição da sua síntese melhora o desfecho da sepse em animais recém-nascidos.....	90
<b>4.2</b>	<b>Experimentos realizados com amostras de pacientes .....</b>	<b>94</b>
4.2.1	Concentração séricas das NETs correlacionam-se com a severidade da sepse pediátrica .....	94
<b>4.3</b>	<b>Experimentos realizados em animais sobreviventes à sepse .....</b>	<b>96</b>
4.3.1	Caracterização dos animais recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse .....	96
4.3.2	Padronização da infecção pulmonar secundária à sepse com <i>P. aeruginosa</i> .....	97
4.3.3	Células T CD4 <sup>+</sup> de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não exibem disfunção celular inata nem adaptativa .....	100
4.3.4	Em animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não ocorre expansão de células Tregs .....	102
4.3.5	Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse possuem menor crescimento tumoral .....	108
4.3.6	Diferenciação <i>in vitro</i> das células Tregs ocorre de maneira independente da idade .....	111
4.3.7	Animais recém-nascidos apresentam menor manutenção da estabilidade das células Tregs <i>in vitro</i> .....	115
4.3.8	Incremento na metilação total do DNA nas células T convencionais de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse.....	117
4.3.9	Os macrófagos de animais recém-nascidos sobreviventes não são polarizados para o perfil M2 <i>in vivo</i> .....	119

4.3.10	Polarização <i>in vitro</i> dos macrófagos M2 ocorre de maneira independente da idade .....	123
4.3.11	Níveis da IL-33 e marcadores de macrófagos polarizados para o perfil M2 não são alterados em animais recém-nascidos sobreviventes à sepse .....	126
4.3.12	Redução na produção de IL-33 nas células Alveolares Eiteliais de animais recém-nascidos sobreviventes .....	128
4.3.13	Células Lin- isoladas de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentam um sustentado perfil de hipermetilação total do DNA .....	130
4.3.14	Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam expansão das células ILC2 (Type 2 Innate Lymphoid Cells) .....	132
4.4	<b>Experimentos realizados com amostras de pacientes sobreviventes à sepse .....</b>	<b>134</b>
4.4.1	Pacientes pediátricos sobreviventes à sepse não apresentam expansão de células Tregs e incremento na produção de IL-33 .....	134
5	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>138</b>
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>153</b>
7	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>156</b>
8	<b>ANEXOS .....</b>	<b>170</b>
8.1	Figura suplementar 1. Caracterização celular em animais recém-nascidos e adultos <i>naives</i>	
8.2	Figura suplementar 2. Padronização da dose de bactéria para a indução da sepse em animais recém-nascidos e adultos	

- 8.3** Figura suplementar 3. Ativação dos neutrófilos e expressão da *Padi4* em pacientes pediátricos
- 8.4** Figura suplementar 4. Recuperação da sepse após o tratamento antibiótico
- 8.5** Figura suplementar 5. Padronização do desafio com *P. aeruginosa* em animais recém-nascidos e adultos
- 8.6** Figura suplementar 6. Caracterização imunofenotípica das populações de macrófagos da cavidade peritoneal de animais recém-nascidos pós-sépticos
- 8.7** Figura suplementar 7. Macrófagos peritoneais pequenos de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentam redução dos marcadores do perfil M2
- 8.8** Tabela suplementar 1. pD2 da curva de concentração dose-resposta e fenilefrina (10-10-10-5 mol/L) 6 horas após sepse
- 8.9** Tabela suplementar 2. Características demográficas e clínicas dos pacientes adultos e pediátricos
- 8.10** Tabela suplementar 3. Características demográficas e clínicas dos pacientes adultos e pediátricos sobreviventes à sepse
- 8.11** Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FMRP

## ***Introdução***



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Sepsé

Sepsé, do grego *septikós* (putrefação de matérias ou tecidos orgânicos) (Majno, 1991), é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção (Cohen, 2002; Singer *et al.*, 2016). Na maioria das vezes em que o hospedeiro é infectado por microrganismos, a resposta inflamatória local é satisfatória para controlar e eliminar os agentes infecciosos. Contudo, quando a resposta não é eficiente, ocorre disseminação dos microrganismos para a circulação, os quais induzem uma resposta inflamatória sistêmica e lesão orgânica levando ao quadro de sepsé. Apesar dos avanços nos estudos sobre a fisiopatologia da sepsé, a incidência da doença aumenta com o passar dos anos (Kumar *et al.*, 2011), decorrendo tanto de infecções bacterianas quanto fúngicas e virais (Vincent *et al.*, 2006; Jean-Baptiste, 2007).

### 1.2 Fisiopatologia da sepsé

A resposta do hospedeiro e as características intrínsecas do microrganismo são fatores importantes para o desenvolvimento da sepsé. Assim, a progressão da sepsé ocorre quando o hospedeiro não consegue conter a infecção primária, por exemplo, pela presença de superantígenos ou quando o microrganismo é resistente à opsonização, à fagocitose ou à terapia antibiótica (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2011). A resposta imune inata na sepsé é facilitada pela ativação de receptores coletivamente denominados de receptores de reconhecimento de padrões ou PRRs (do inglês, *pattern recognition receptors*) encontrados em diversas populações celulares, entre elas macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, sendo uns dos membros mais importantes os receptores do tipo Toll (do inglês, *Toll-like receptors*, TLRs) (Poltorak *et al.*, 1998; Medzhitov, 2007). A resposta destes receptores é altamente dinâmica e pode ser iniciada pelo reconhecimento de estruturas conservadas denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) (Bone *et*

*al.*, 1992; Medzhitov, 2007; Medzhitov *et al.*, 2012) tais como o LPS (lipopolissacarídeo) ou de padrões moleculares associados ao dano (do inglês, DAMPs *damage-associated molecular patterns*) tais como fragmentos de mitocôndria, DNA ou ATP liberado pelos tecidos lesados (Singh e Evans, 2006; Hauser e Otterbein, 2018). A ativação desses receptores, PRRs, desencadeia a produção de citocinas e quimiocinas assim como a síntese de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais, eventos essenciais no recrutamento de outras células para o local da inflamação e o controle dos agentes infecciosos (Johnston *et al.*, 1995; Kubes, 2002; Majewska e Szczepanik, 2006). Contudo, durante a sepse, ocorre uma hiperinflamação resultante da produção de altas concentrações de mediadores pró-inflamatórios que são responsáveis, em parte, pelas alterações fisiopatológicas associadas à sepse, tais como a coagulação vascular disseminada, ativação aberrante das plaquetas, síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, vasodilatação periférica/hipotensão e a hipoperfusão renal (Dinarello, 1997; Singh e Evans, 2006; De Montmollin e Annane, 2011; Surbatovic *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018).

Dentre os mediadores pró-inflamatórios produzidos durante a sepse, destacam-se o fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) e as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-6. Tem sido descrito que a liberação inicial desses mediadores é acompanhada por uma resposta anti-inflamatória compensatória do organismo, através da produção de mediadores anti-inflamatórios, como IL-4, IL-10 e IL-13. Esta produção de citocinas anti-inflamatórias permite a homeostase do sistema imune após o processo infeccioso, porém seu aumento é responsável pela inibição de funções importantes envolvidas no controle imune das infecções (Adib-Conquy e Cavaillon, 2009). Assim, o desequilíbrio da resposta imune em favor da resposta anti-inflamatória pode resultar em um quadro de imunossupressão, o qual falaremos mais adiante. De maneira complementar, a infiltração tissular de células inflamatórias, tais como os neutrófilos, é outro fator importante na fisiopatologia sepse, que através da liberação de citocinas e produção de espécies reativas

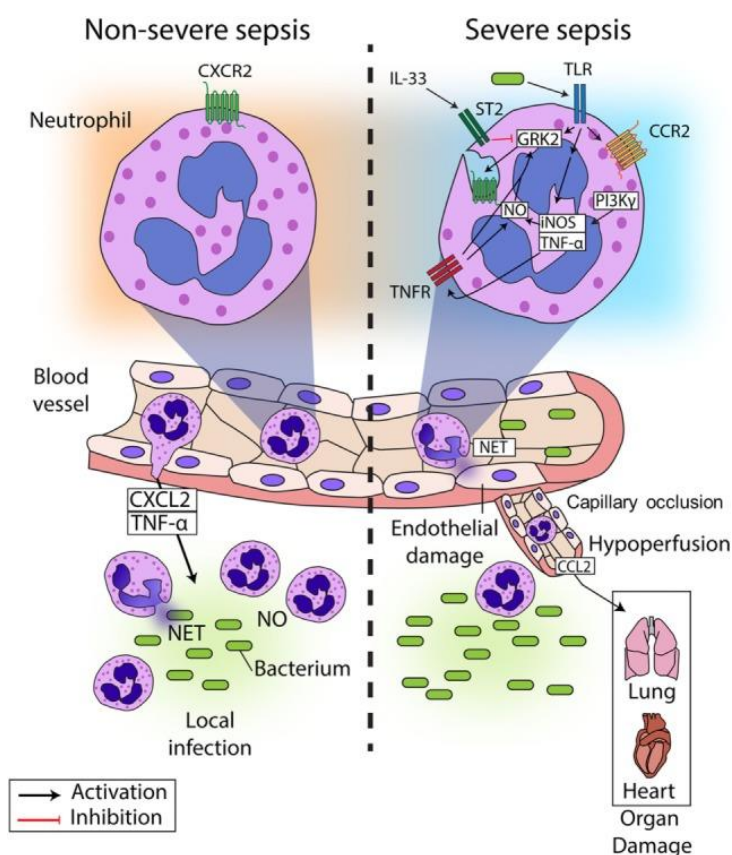
de oxigênio ou nitrogênio contribuem para a disfunção de orgânica, uma das marcas registradas da sepse (do inglês, *Reactive Oxygen/Nitrogen Species*) (Fink, 2002; Brown *et al.*, 2006; Huet *et al.*, 2011; Souto *et al.*, 2011).

### 1.3 Neutrófilos e Sepses

Diversos estudos demonstraram que neutrófilos de animais submetidos à sepse ou ao choque endotoxêmico por LPS apresentam um comprometimento na sua capacidade de migrar para o foco infeccioso, evento denominado de falência da migração de neutrófilos. Dados de nosso grupo demonstraram a importância da sinalização através de TLR2, TLR4 e TLR9 em neutrófilos, para a internalização dos receptores quimiotáticos (Alves-Filho *et al.*, 2006; Alves-Filho *et al.*, 2008; Trevelin *et al.*, 2012) e posterior desenvolvimento da falência na migração. Os mecanismos responsáveis por essa falha na capacidade de migração dos neutrófilos estão associados à internalização de receptores quimiotáticos, como o CXCR2. Esta internalização é consequência da produção excessiva de óxido nítrico (NO), devido a indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). O NO ativa, sequencialmente, a guanilato ciclase e as quinases de receptores ligados à proteína G (GRKs) promovendo a internalização dos receptores (Benjamim *et al.*, 2000; Arraes *et al.*, 2006; Rios-Santos *et al.*, 2007; Paula-Neto *et al.*, 2011). Esses eventos estão diretamente associados à severidade da sepse e ao risco de óbito.

Adicionalmente à expressão diminuída de CXCR2, Souto e colaboradores (2011) demonstraram, em um modelo de sepse induzida por CLP (*Cecal Ligation and Puncture*) em camundongos, que os neutrófilos apresentam maior expressão do receptor CCR2 de maneira dependente de NF- $\kappa$ B, evento que esteve associado com a migração dos neutrófilos para sítios não relacionados à infecção, como coração, pulmões e rins. De maneira interessante, os autores observaram que a inibição farmacológica ou deficiência genética de CCR2 levava à melhora na sobrevivência dos animais. Além disso, como observado em modelos experimentais de sepse, neutrófilos de pacientes sépticos também apresentam uma redução significativa da resposta

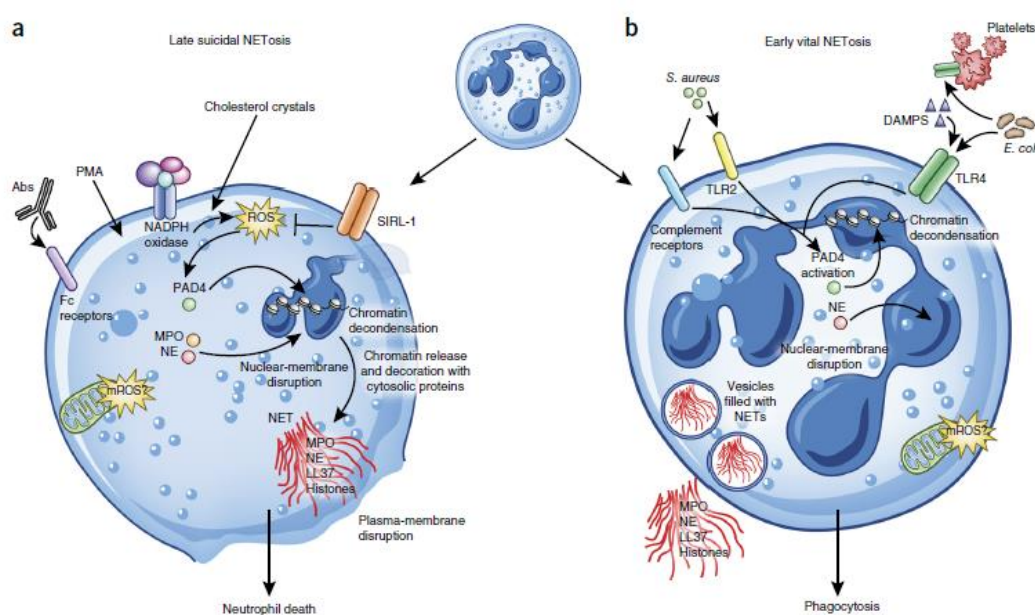
quimiotática *in vitro* induzida por diferentes estímulos, como IL-8, LTB<sub>4</sub> e fMLP (Tavares-Murta *et al.*, 2002). Em suma, a falência da migração de neutrófilos (*in vitro* e *in vivo*) está correlacionada com a perda do controle local da infecção e consequente disseminação bacteriana, gerando uma resposta inflamatória sistêmica seguida da morte do hospedeiro (Benjamin *et al.*, 2000; Tavares-Murta *et al.*, 2002) A participação dos neutrófilos na fisiopatologia da sepse estão resumidos no *Esquema 1*.



**Esquema 1. Participação dos neutrófilos na fisiopatologia da sepse. (Sonego *et al.*, 2016).**

Recentemente, um novo mecanismo efetor dos neutrófilos chamado de armadilhas extracelulares dos neutrófilos ou NETs (do inglês, *Neutrophils Extracellular Traps*, NETs), tem sido reportado (Brinkmann *et al.*, 2004). As NETs são uma parte importante nos mecanismos de defesa inatos e estão associadas com o controle das infecções (Brinkmann *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2007; Bianchi *et al.*, 2009). As NETs são caracterizadas como uma matriz de DNA extracelular complexado com proteínas, tais como MPO ou elastase e histonas, liberadas pelos

neutrófilos para o controle dos fatores de virulência e o *killing* de microrganismos num processo conhecido como NETose (Brinkmann *et al.*, 2004). A NETose é um processo biológico finamente regulado pela enzima Pad4 (do inglês, *Peptidyl arginine deiminase 4*) que pode resultar na liberação das NETs dependente ou independente da morte celular (Li *et al.*, 2010). Especificamente, estímulos tais como PMA ou cristais de colesterol, induzem a liberação tardia das NETs associada com a morte celular através de um mecanismo dependente de ROS (Jorch e Kubes, 2017), ao passo que a ligação de agonistas dos receptores do tipo Toll ou a ativação do TLR4 via plaquetas, induzem a liberação precoce das NETs independente tanto da morte celular como do ROS (Li *et al.*, 2010; Jorch e Kubes, 2017), como apresentado no **esquema 2**.



**Esquema 2. Mecanismos de liberação das NETs, de maneira dependente ou independente de ROS. (Jorch e Kubes, 2017)**

Apesar de que as NETs tem sido consideradas primariamente como um mecanismo protetor contra uma ampla variedade de patógenos, crescentes evidências tem demonstrado a participação das NETs como elemento chave na patogênese da disfunção orgânicas em vários processos patológicos como a artrites reumatoide, a pancreatite aguda e a diabetes (Khandpur

*et al.*, 2013; Merza *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2015). Ainda, no contexto dos adultos, recentemente nosso grupo demonstrou o papel essencial das NETs na indução das lesões orgânicas associadas à sepse (Czaikoski *et al.*, 2016), *no entanto, o papel das NETs na disfunção orgânica e na susceptibilidade associada à sepse em indivíduos recém-nascidos/pediátricos é ainda desconhecido, sendo uns dos objetivos do nosso projeto.*

#### **1.4 Sepse pediátrica**

A sepse é uma das principais causas de morte em pacientes pediátricos no mundo, sendo responsável por mais de 7,5 milhões de mortes anuais (Watson *et al.*, 2003; Kisson *et al.*, 2011; Hartman *et al.*, 2013; Ruth *et al.*, 2014). Os recém-nascidos são particularmente susceptíveis à sepse apresentando um maior risco de mortalidade (Thaver e Zaidi, 2009; Goenka e Kollmann, 2015; Liu *et al.*, 2015; Kan *et al.*, 2016; Wynn, 2016; Shane *et al.*, 2017). Contudo, apesar do alto impacto da sepse na população pediátrica, os mecanismos moleculares e alvos terapêuticos específicos para o seu tratamento continuam pouco esclarecidos. Ainda, experimentalmente, devido às dificuldades técnicas inerentes a modelos experimentais de sepse em animais recém-nascidos, existem poucos trabalhos na literatura acerca deste assunto. O modelo experimental mais amplamente utilizado no estudo de sepse, CLP (do inglês, *Cecal ligation and Puncture*), não é aplicável nestes animais por diversos motivos: incompleta formação da microbiota intestinal; a manipulação excessiva durante a cirurgia que gera alterações de odor e aumenta a chance de rejeição e/ou canibalismo pela mãe e a cirurgia propriamente dita, que é tecnicamente difícil em camundongos muito jovens (Wynn *et al.*, 2007a).

Em relação a alta susceptibilidade dos indivíduos recém-nascidos à sepse, a hipótese prevalente na literatura descreve que o principal responsável é o *status* imaturo do sistema imune de neonatos e crianças (Adkins *et al.*, 2004; Levy, 2007; Prabhudas *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2012). Contudo, um dos achados principais da sepse em indivíduos recém-nascidos é a

exacerbada resposta inflamatória (Zhao *et al.*, 2008). Neste sentido, tem sido demonstrado que células do cordão umbilical, monócitos/macrófagos ou células dendríticas isoladas de indivíduos recém-nascidos produzem maiores concentrações de citocinas pró-inflamatórias após estimulação com LPS quando comparadas a aquelas dos adultos (Angelone *et al.*, 2006; Vanden Eijnden *et al.*, 2006; Caron *et al.*, 2010; Colon *et al.*, 2019). Adicionalmente, durante o choque séptico, células mieloides supressoras neonatais mudam seu *status* inflamatório contribuindo com a resposta hiperinflamatória e o curso fatal da sepse (Heinemann *et al.*, 2017). Portanto, estas evidências demonstram que o reconhecimento dos PAMPs e a montagem da resposta imune inata nos indivíduos recém-nascidos não está comprometida. *Em função disto, nosso trabalho visa estudar os mecanismos imunopatológicos envolvidos na sepse nesta fase da vida.*

### **1.5 Imunossupressão pós-sepse**

Conforme mencionado acima, na fase aguda da sepse, a alta mortalidade está associada com a intensa resposta inflamatória sistêmica com marcada liberação de NETs e disfunção múltipla de órgãos. Nos indivíduos adultos, este quadro de inflamação sistêmica, além de mediar às lesões nos órgãos vitais e o colapso cardiovascular, mais tardiamente pode desencadear um quadro de “imunoparalisia” nos indivíduos sobreviventes, caracterizado pela síntese de diversos mediadores que possuem atividades anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4 e IL-13 (Ward *et al.*, 2008), os quais podem levar ao desenvolvimento de uma condição de imunossupressão, incrementando o risco de desenvolvimento de infecções secundárias por patógenos oportunistas (Meakins *et al.*, 1977; Goldie *et al.*, 1995; Kox *et al.*, 2000; Adib-Conquy e Cavillon, 2009; Otto *et al.*, 2011; Hotchkiss *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014).

A primeira evidência do desenvolvimento da imunossupressão após sepse em adultos foi reportado por Meakins e colaboradores em 1977 (Meakins *et al.*, 1977). Adicionalmente, evidências epidemiológicas indicaram que indivíduos adultos sobreviventes à sepse apresentam

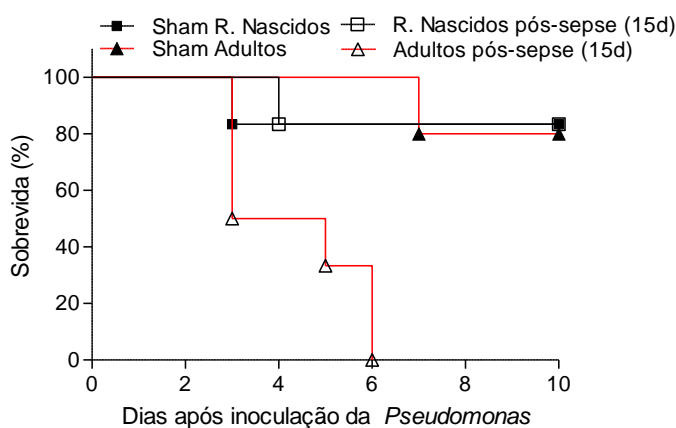
um risco maior de morte nos cinco anos subsequentes, quando comparado com os indivíduos controles (Sasse *et al.*, 1995; Quartin *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2014). Ainda, pacientes sobreviventes à sepse tem maior risco de adquirir uma infecção secundária em até cinco anos após a alta hospitalar (Cuthbertson *et al.*, 2010). Este risco tem sido tipicamente associado com a falha no controle das infecções secundárias, (Hotchkiss *et al.*, 2013), como aquelas causadas por *Candida sp* (Sasse *et al.*, 1995; Otto *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, com o intuito de entender os eventos imunológicos envolvidos no desenvolvimento deste quadro de imunossupressão, foram desenvolvidos modelos experimentais que reproduzem estas observações clínicas crônicas da sepse. Dentre eles, estão os chamados “*two-hit models*” caracterizados pela indução de sepse induzida por infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila* ou *Aspergillus fumigatus*. Usando esses modelos foi demonstrado que animais adultos sobreviventes à sepse apresentam uma maior susceptibilidade às infecções secundárias causadas por diferentes patógenos, tais como, *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* e *L. pneumophila* (Benjamim *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2010; Hoogerwerf *et al.*, 2011; Hotchkiss *et al.*, 2013). Ainda, Muenzer e colaboradores, usando modelos de pneumonia, demonstraram que animais submetidos à sepse 15 dias antes, apresentaram uma taxa de mortalidade de 95%, apresentando maior taxa de apoptoses dos linfócitos B e T e menor concentração plasmática de IL-6 e MCP-1 (Muenzer *et al.*, 2006). Notavelmente, animais adultos sobreviventes à sepse letal apresentam redução na capacidade de montar uma resposta de hipersensibilidade tardia, bem como um comprometimento na resposta imune contra tumores (Venet *et al.*, 2008; Cavassani *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010).

Os mecanismos pelos quais a susceptibilidade às infecções secundárias está aumentada depois da sepse não são totalmente entendidos. No entanto, foi verificado que células do baço de pacientes que morreram de sepse apresentam uma reduzida resposta a diversos estímulos



policlonais. Foi observada uma redução expressiva das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e de moléculas responsáveis pela apresentação do antígeno e ativação de linfócitos, como HLA-DR e CD80, além do aumento da expressão de moléculas como PD-1 (do inglês, *Programmed cell death 1*) e o seu ligante PD-L1. Desta forma, pacientes que morreram de sepse apresentaram disfunções nas células imunes, o que não foi observado nos pacientes que morreram de causas não relacionadas à sepse (Boomer *et al.*, 2011). Ainda, células do sangue periférico de pacientes com sepse grave ou choque séptico apresentaram redução da produção de citocinas pró-inflamatórias após estimulação com LPS (Brunialti *et al.*, 2006). Em suma, estudos clínicos e experimentais sugerem que a susceptibilidade pode ser explicada por três fatores: excessiva produção de mediadores anti-inflamatórios (Vincent *et al.*, 2013), disfunção imune adaptativa (Hotchkiss *et al.*, 2013) e, mais recentemente, expansão de populações celulares específicas, como as células T Reguladoras (Venet *et al.*, 2009; Cavassani *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010) e os macrófagos do tipo II (Nascimento *et al.*, 2017). Dados do nosso grupo de pesquisa sugerem que o grau de severidade da sepse é um fator importante para o desenvolvimento da imunossupressão tardia em indivíduos adultos. Contudo, dados preliminares do nosso grupo indicaram que animais recém-nascidos sobreviventes a sepse, embora tenham apresentado na fase aguda altas concentrações sistêmicas de mediadores inflamatórios e maiores comprometimento tecidual e mortalidade, não desenvolveram o quadro de imunossupressão. Especificamente, demonstramos que camundongos recém-nascidos sobreviventes à sepse e inoculados via intranasal com *P. aeruginosa* 15 ou 30 dias após o episódio séptico, apresentaram uma sobrevida próxima de 80%, enquanto que os adultos apresentaram 0% (*Esquema 3*), sugerindo que a disfunção imune induzida pela sepse pode ser um evento dependente da idade. *Entretanto, o entendimento dos mecanismos envolvidos na relação deste fenômeno biológico com a idade ainda é desconhecido.*



**Esquema 3. Camundongos recém-nascidos sobreviventes à sepse são resistentes à infecção secundária.** Camundongos adultos e recém-nascidos foram infectados via *i.n.* com *P. aeruginosa* 15 dias após a sepse e a sobrevivência foi avaliada diariamente por um período de 10 dias. (Colón DF, 2015)

### 1.5.1 As células T Reguladoras

As células TCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Tregs) desempenham um papel fundamental no processo de tolerância periférica. Elas podem ser classificadas, segundo sua ontogenia, em Tregs naturais ou tímicas, aquelas originadas no timo a partir do processo de tolerância central, e as Tregs periféricas ou extra tímicas, aquelas diferenciadas a partir de células TCD4<sup>+</sup> *naïves* na presença de TGF-β em órgãos linfoides periféricos (Thornton e Shevach, 2000; Mills, 2004; Liu *et al.*, 2011).

A diferenciação fenotípica das células Tregs é regulada tanto por mecanismos moleculares quanto epigenéticos. Neste sentido, estudos recentes têm demonstrado o importante papel da sinalização via TCR (*T Cell Receptor*) (Kretschmer *et al.*, 2005; Mucida *et al.*, 2005; Gottschalk *et al.*, 2010), CD25/IL-2 (Davidson *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008) e da via TGF-βR/TGF-β (Chen *et al.*, 2003; Kretschmer *et al.*, 2005; Mucida *et al.*, 2005) na diferenciação, estabilidade e sobrevivência das células Tregs. Estas vias sinalizam por mecanismos dependentes da ativação das vias intracelulares PI3K/Akt/mTOR (Haxhinasto *et*

*al.*, 2008; Sauer *et al.*, 2008; Delgoffe *et al.*, 2009; Chapman e Chi, 2014) (Bensinger *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2006) e STAT-5/Smad3 (Tone *et al.*, 2008). De maneira complementar, recentes trabalhos têm verificado que a estabilidade da expressão do *Foxp3* associa-se, adicionalmente, com o nível de regulação epigenética nas sequências conservadas não codificantes (CSN) no *locus* do *Foxp3*. Assim, estudos avaliando o *status* de metilação do genoma (Sakaguchi *et al.*, 2014) demonstraram que durante o processo de desenvolvimento das células Tregs ocorrem hipometilações graduais nas regiões CSN1, CNS2 e CNS3 do *Foxp3*. Estas hipometilações podem agir como “*enhancers*”, contribuindo para a expressão estável de genes chaves no desenvolvimento e função das células Tregs, que incluem *Ctla4*, *Il2ra* e *Lkzf4*, além do *Foxp3* (Morikawa e Sakaguchi, 2014).

### 1.5.2 As células T Reguladoras e a Imunossupressão pós-sepse

Embora as células Tregs constituam uma pequena porcentagem da população total de linfócitos T, elas apresentam potentes propriedades imunoreguladoras sobre os mecanismos de ativação celular, estando associadas com as disfunções da resposta imune adaptativa em indivíduos sobreviventes à sepse (Nascimento *et al.*, 2010). Reforçando esta associação, a literatura descreve o aumento da frequência das células Tregs no sangue e baço durante a sepse, tanto em modelos experimentais quanto em pacientes sépticos. Além disso, há uma correlação inversa entre o incremento das células Tregs e a sobrevivência ao longo prazo de indivíduos sobreviventes à sepse (Monneret *et al.*, 2003; Scumpia *et al.*, 2006; Venet *et al.*, 2008; Venet *et al.*, 2009). Corroborando estes achados, nosso grupo demonstrou que animais sobreviventes à sepse apresentam maior frequência de células Tregs no baço, a qual se associou uma maior susceptibilidade à infecção secundária por *L. pneumophila*. A inibição da capacidade supressora das células Tregs, usando o anticorpo anti-DTA-1, reduziu os mecanismos de defesa dos animais e reduziu significativamente a mortalidade dos animais em consequência de uma infecção secundária (Nascimento *et al.*, 2010). Em concordância, o bloqueio da expressão do

*Foxp3* usando iRNA, restaurou a proliferação das células T após a ocorrência da sepse (Venet *et al.*, 2009).

### 1.5.3 O papel do eixo citocinas do tipo 2/macrófagos M2/Tregs

Os macrófagos compreendem uma população heterogênea de células (Liu *et al.*, 2006); sendo que esta heterogeneidade depende, em parte, do estímulo presente no microambiente em que estas células se desenvolveram (Gordon, 2003; Gordon e Martinez, 2010). Nesse sentido, os macrófagos podem ser fenotipicamente polarizados dentro de um espectro de ativação que envolve dois extremos: macrófagos M1 (ou *ativados classicamente*) e macrófagos M2 (ou tipo II, *ativados alternativamente*) (Mantovani *et al.*, 2004; Gordon e Taylor, 2005). Esses dois polos de ativação dos macrófagos não são eventos terminais e sim um contínuo estado funcional destas células que se modifica durante as fases do processo inflamatório, havendo o predomínio de um tipo de macrófago de acordo com o conjunto de citocinas e quimiocinas predominante no microambiente inflamatório (Mantovani *et al.*, 2002; Biswas e Mantovani, 2010). Recentemente grande atenção tem sido dada aos macrófagos do perfil M2. Classicamente, as citocinas do tipo 2 (como a IL-4 e IL-13) promovem a polarização alternativa dos macrófagos. Estas citocinas ligam-se ao complexo do receptor de IL-4 tipo I e II levando a fosforilação de STAT6, o qual é requerido para o desenvolvimento de células Th2 e também macrófagos M2 (Kaplan *et al.*, 1996; Biswas e Mantovani, 2010).

Em adição, outra citocina, a IL-33, tem sido descrita como um elemento importante na polarização de macrófagos M2. A IL-33 é uma citocina pertencente à família da IL-1 que induz produção de diversas citocinas do padrão Th2 (Schmitz *et al.*, 2005). De fato, o ST2, receptor da IL-33, é expresso em células Th2, mas não em células Th1 (Xu *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 2005). De maneira interessante, dados da literatura demonstram o aumento do número de macrófagos M2 em pacientes sépticos (Takahashi *et al.*, 2004; Hotchkiss e Nicholson, 2006). Neste contexto, nosso grupo descreveu pela primeira vez a importância do eixo IL-33/M2/Tregs

na gênese da imunossupressão induzida pela sepse em indivíduos adultos. Especificamente, nós demonstramos que animais  $ST2^{-/-}$  sobreviventes à sepse não desenvolvem imunossupressão, ao passo que o tratamento de animais *selvagens* com IL-33 potencializa o desenvolvimento da imunossupressão. Ainda, a IL-33 liberada durante a sepse ativa as células mieloides inatas do tipo 2 (do inglês, *type-II Innate Lymphoid Cells*, ILC2s) as quais promovem a polarização dos macrófagos para o perfil M2, levando à expansão das células Tregs via IL-10. De maneira adicional, amostras de sangue obtidas de pacientes adultos sobreviventes à sepse, apresentaram incremento nos níveis séricos de IL-33 e IL-10, associados com o incremento na frequência das células Tregs (Nascimento *et al.*, 2017). *Apesar da demonstração dos possíveis mediadores envolvidos na expansão das células Tregs após a sepse, em indivíduos adultos, o papel do eixo de citocinas do tipo 2/M2/Tregs nas consequências tardias durante a sepse pediátrica ainda não tem sido estudada, apresentando-se como um importante objetivo do nosso trabalho.*

***Objetivos***

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo do presente trabalho foi investigar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na susceptibilidade dos indivíduos recém-nascidos à sepse assim como os mecanismos imuno-moleculares envolvidos nas consequências tardias da sepse em indivíduos recém-nascidos.

### **2.2 Objetivos específicos**

#### **2.2.1 Fase I**

**2.2.1.1** Estabelecer o modelo de sepse em animais recém-nascidos;

**2.2.1.2** Avaliar os mecanismos efetores dos neutrófilos de animais recém-nascidos durante a sepse;

**2.2.1.3** Avaliar e caracterizar os mecanismos associados com a produção das NETs (*Neutrophils Extracellular Traps*) em neutrófilos de indivíduos recém-nascidos;

**2.2.1.4** Estudar o papel das NETs no dano orgânico induzido pela sepse em indivíduos recém-nascidos;

#### **2.2.2 Fase II**

**2.2.3** Determinar a frequência das células T Reguladoras, de macrófagos M2 e o perfil de citocinas tipo 2 (IL-4, IL-13, IL-33 e IL-10) em camundongos e humanos, recém-nascidos e adultos, sobreviventes à sepse;

**2.2.4** Avaliar as vias intracelulares (STAT5, Smad3, NFAT e CREB/AFT) envolvidas na diferenciação das células T Reguladoras de camundongos e humanos, recém-nascidos e adultos, sobreviventes à sepse;

**2.2.5** Avaliar as vias intracelulares (receptor MR: CD206, STAT6 e arginase) envolvidas na polarização de macrófagos M2 em camundongos recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse;

- 2.2.6** Avaliar o *status* de ligação de fatores de transcrição (NFAT, Smad3, CREB/AFT e STAT5) nos elementos CNS1, CNS2 e CNS3 no *locus Foxp3* em indivíduos recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse;
- 2.2.7** Avaliar as modificações epigenéticas no *locus Foxp3* em indivíduos recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse.



## ***Materiais e Métodos***

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Camundongos isogênicos recém-nascidos (duas semanas de idade) e adultos (6 semanas de idade) da linhagem C57/BL6 foram utilizados. Todos os animais foram obtidos no Biotério Central do campus da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto, e mantidos ao longo do experimento no Biotério de Experimentação do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, em condições de temperatura de 23-25°C, ciclo de claro/escuro de 12 horas, com acesso livre a água e ração *ad libitum*.

#### **3.2 Cultura de bactérias**

O conteúdo cecal de um animal adulto C57BL/6 foi isolado, filtrado numa gaze estéril cultivado no meio infusão de coração e cérebro (do inglês, *BHI, Brain and Heart Infusion broth*), durante cinco dias, a 37°C. A cultura foi lavada cada 24 horas com PBS por meio de centrifugação (3000 g, 15 minutos, 23°C) e após 5 dias, as bactérias foram aliqüotadas, liofilizadas e congeladas a -20°C até a realização dos experimentos. No momento do experimento, cada aliqüota de bactéria foi descongelada e crescida no meio BHI a 37 °C por 24 horas. Após ser lavada duas vezes com PBS 1x, as bactérias foram suspensas em salina 0,9% estéril e a quantidade de bactérias foi determinada pela avaliação da absorbância a 600nm usando um espectrofotômetro (Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

#### **3.3 Modelo experimental de sepse e endotóxemia**

Um dos objetivos do nosso estudo foi estabelecer um modelo de sepse pediátrica que emulasse a alta susceptibilidade dos pacientes pediátricos a sepse comparado com os adultos. Para isto, animais recém-nascidos e adultos foram inoculados *i.p.* com salina (grupo *Sham*) uma suspensão bacteriana (de  $4 \times 10^7$  UFC/cavidade até  $4 \times 10^8$  UCF/cavidade) (grupo Sético). A sobrevivência foi avaliada diariamente até por 5 dias e ao final deste período os animais remanescentes

foram eutanasiados pela aplicação de Ketamina/Xylazina (>100 mg/kg, *s.c.*) seguida de deslocamento cervical. Para o modelo de endotóxia induzida pelo LPS, os animais receberam uma dose de LPS de 30 mg/kg ou 35mg/kg *i.p.* Após standardização do modelo, a dose de  $2 \times 10^8$  UFC/cavidade foi usada para a indução da sepse nos subsequentes experimentos. Nos experimentos realizados com o uso de antibiótico, os animais foram tratados com Ertapenem sódico *i.p.* (30mg/kg para os adultos e 15 mg/kg para os recém-nascidos) seis horas após indução da sepse e a partir deste momento a cada 12 horas por 3 dias. Biomarcadores para associados a função orgânica foram avaliados periodicamente, bacteremia, carga bacteriana foram avaliados. Adicionalmente, a função dos neutrófilos foi avaliada tanto *in vitro* como *in vivo*.

No modelo de sepse, a bacteremia e carga bacteriana foram avaliados 6 horas após indução da sepse. Brevemente, o sangue (colhidas do seio venoso supraorbitário) ou exsudato da cavidade peritoneal (obtido por meio de lavagem da mesma com PBS estéril contendo 1mM EDTA) foi semeado em placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton (Oxoid Limited, Hampshire, UK) e incubados a 37°C. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi avaliado após 24 horas. Os resultados foram expressos como o logaritmo das UFCs por cavidade peritoneal ou por mililitro de sangue.

### **3.4 Avaliação do infiltrado neutrofílico nos tecidos**

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi usada como índice bioquímico do infiltrado neutrofílico em tecido pulmonar, como previamente descrito (Souza *et al.*, 2001).

### **3.5 Determinação das concentrações de citocinas**

As concentrações de citocinas no soro ou nos homogeneizados de tecidos foi determinada por ELISA, usando anticorpos da marca R&D Systems de acordo com as recomendações do fabricante. A densidade óptica de cada amostra individual foi avaliada a 450

nm usando um espectrofotômetro (SpectraMax 250, Molecular Devices, CA), como previamente descrito (Cunha *et al.*, 2008).

### **3.6 Avaliação da atividade das enzimas TGO (Transaminase glutâmico oxalacética), CK-MB (Creatinofosfoquinase MB), os níveis de BUN (Nitrogênio ureico no sangue) e Creatina**

Os animais foram eutanasiados 6 horas (após indução da sepse) ou 3, 6, 9, ou 18 horas (após inoculação com LPS), respectivamente. Posteriormente, o soro foi coletado para avaliar a função hepática, cardíaca e renal foram realizadas dosagens de TGO, CK-MB, BUN/Creatinina respectivamente. A avaliação das concentrações séricas foi realizado através de um ensaio colorimétrico enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica-Brasil) como previamente descrito (Freitas *et al.*, 2011). Os valores foram expressos em U/L para TGO e CK-MB e mg/dL para o BUN e a Creatinina.

### **3.7 Quimiotaxia *in vitro***

A quimiotaxia foi realizada usando a câmara de quimiotaxia de 48 poços (Neuroprobe, Gaithersburg, MD) como previamente descrito (Alves-Filho *et al.*, 2009). Brevemente, neutrófilos derivados da medula óssea de camundongos adultos (seis semanas de idade) e recém-nascidos (duas semanas de idade) foram colocados para migrar por uma hora para CXCL2 (20 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN) ou meio (RPMI; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

### **3.8 Microscopia Intravital**

Animais recém-nascidos e adultos foram anestesiados com solução de ketamina (100 mg/kg)/xilazina (15 mg/kg) e colocados sobre mesa cirúrgica aquecida a 37°C e acoplada a um microscópio. Foi realizada celiotomia para exposição do mesentério. Os vasos foram focalizados em objetiva 40X, selecionando-se a vênula de diâmetro entre 10-18µm, que pudesse

favorecer a visualização do rolamento e aderência (células fixas ao endotélio) dos leucócitos durante cinco minutos. Os resultados foram expressos em número de leucócitos aderidos por 100m<sup>2</sup> da vênula e número de leucócitos em rolamento/minuto.

### **3.9 Análise histológica**

O pulmão e fígado de camundongos recém-nascidos e adultos foram coletados seis horas ou 18 horas após a indução da sepse ou inoculação com LPS e fixados em formalina 4% (v/v). Os tecidos foram cortados e desidratados em gradientes de etanol e depois incluídos em blocos de parafina para preparação das lâminas, as quais foram coradas com Hematoxilina Eosina (H&E) para avaliação histopatológica.

### **3.10 Isolamento de Neutrófilos**

Os neutrófilos da medula óssea ou circulantes foram isolados pelo do gradiente de densidade do Percoll, como previamente descrito (Souto *et al.*, 2011). Brevemente, dois gradientes de Percoll (72% e 65%) e homogêneos da medula óssea solubilizados em Hanks 1x (HBSS) foram aplicados em tubos de 15 mL. Após centrifugação a 1200 rpm por 30 min a 25°C, a camada celular entre o Percoll 72% e 65% (fração enriquecida com neutrófilos) foi coletada. Posteriormente, os eritrócitos remanescentes foram removidos por lise, e a suspensão celular foi lavada duas vezes com Hanks (Alves-Filho *et al.*, 2009). Finalmente, o *pellet* foi resuspendido em 1 mL de meio RPMI 1640 incompleto (Sigma Chemical Co., SL) e o número de neutrófilos foi avaliado pela contagem em câmara de Neubauer.

### **3.11 Determinação das concentrações de óxido nítrico**

Os neutrófilos ( $2 \times 10^5$  cells/poço) foram isolados como previamente descrito, e estimulados com LPS (10 ng/mL) por 0, 3 e 12 horas a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Para os macrófagos isolados da cavidade peritoneal,  $2 \times 10^5$  cells/poço foram incubadas com LPS (10 ng/mL) por 4

horas. A concentração total de nitrito no sobrenadante da cultura foi determinada pelo método de Griess.

### **3.12 Determinação da produção de espécies reativas**

Os neutrófilos isolados da medula óssea ou macrófagos peritoneais ( $0,25 \times 10^6$  cells/poço) foram incubados com Luminol (125 mM) partículas de Zymosan opsonizadas (20 ng/mL) ou PMA (25 nM). A produção das espécies reativas totais foi avaliada por luminescência usando o FlexStation 3.

### **3.13 Experimentos para avaliar o papel das NETs na susceptibilidade a sepse dos indivíduos recém-nascidos**

#### **3.13.1 Tratamento com rhDNase**

Os animais submetidos a sepse ou endotoxemia induzida pelo LPS foram tratados com salina estéril ou rhDNase (10mg/kg *s.c.*) 10 minutos e 4 horas após e a partir desse momento cada 12 horas, como previamente reportado (Czaikoski *et al.*, 2016). A expressão da *Padi4* e a citrulinização da histona H3 no tecido pulmonar e os neutrófilos circulantes foi determinada 18 horas após inoculação com LPS.

#### **3.13.2 Tratamento com Cl-Amidina**

Os animais recém-nascidos foram tratados com Cl-Amidina (50 mg/kg, *i.p.*), um inibidor da enzima Pad4, 1 hora antes da indução da sepse, como previamente reportado (Biron *et al.*, 2017), na presença ou não de antibiótico (Ertapenem sódico, 15 mg/kg, *i.p.* 6 horas após sepse, e a partir deste ponto cada 12 horas por três dias).

#### **3.13.3 Quantificação das NETs (cfDNA/MPO)**

A quantificação das NETs no sobrenadante das culturas e no soro foi determinada segundo previamente reportado (Luo *et al.*, 2014). Brevemente, micropalacas *black clear-bottom*

foram equilibradas *overnight* pela aplicação de um anticorpo anti-MPO (5 µg/mL; sc-16128-R, Santa Cruz). Após, as amostras de sobrenadante de cultura ou soro foram aplicadas e a quantidade de DNA/MPO nas amostras foi avaliada pelo uso do kit Quant-iT™ PicoGreen® kit (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante. A intensidade da fluorescência foi quantificada usando o FlexStation 3 Microplate Reader (Molecular Devices, CA).

#### **3.13.4 Ensaio de atividade de DNase do plasma**

Os animais recém-nascidos e adultos submetidos à sepse foram eutanasiados 6 horas após infecção e as amostras de plasma foram coletadas. As amostras de plasma foram incubadas com DNAλ (1 µg/mL) por 3 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A quantidade de DNAλ digerida foi quantificada usando o do kit Quant-iT™ PicoGreen® kit (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante. A intensidade da fluorescência foi quantificada usando o FlexStation 3 Microplate Reader (Molecular Devices, CA). A atividade da DNase plasmática foi determinada pelo delta da fluorescência do controle (DNA + PicoGreen) vs. DNA + plasma.

#### **3.13.5 Fagocitose das NETs pelos macrófagos**

Os macrófagos de animais recém-nascidos e adultos foram obtidos da cavidade peritoneal após estimulação com Tioglicolato, como previamente descrito (Rios *et al.*, 2017). As células foram semeadas na concentração de  $3 \times 10^4$  células/mL em 150 µl de meio RPMI com 10% de soro e posteriormente marcadas com Hoechst (5µg/mL). Uma suspensão de NETs isoladas foi obtida segundo reportado previamente (Najmeh *et al.*, 2015). Brevemente, neutrófilos isolados de um animal adulto foram semeados numa placa de cultura e estimulados com PMA (50 nM) por 4 h 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após estimulação, as NETs aderentes foram removidas através de lavagens com PBS gelado. Após passos de centrifugação, o *pellet* de NETs foi ressuspensão em meio de cultura.

As NETs purificadas foram marcadas com SYTOX green (250 nM) e usadas para estimular os macrófagos (numa concentração de NETs de 4 ng/mL) por 4 h. A fagocitose das NETs foi avaliada por *live imaging* no ImageXpress Micro XLS WideField High-Content Analysis System com uma abertura numérica de 0,60 no aumento de 40X. A fluorescência das imagens foram adquiridas usando o canal de DAPI (filtro de excitação de 377/50 nm e emissão de 447/60 nm) e o FITC DAPI (filtro de excitação de 482/35 nm e emissão de 536/40 nm). Após aquisição, as NETs remanescentes foram quantificadas usando o do kit Quant-iT™ PicoGreen® kit (Invitrogen). A intensidade da fluorescência foi quantificada usando o FlexStation 3 Microplate Reader (Molecular Devices, CA).

### **3.13.6 Imunofluorescência das NETs**

Os segmentos de tecidos isolados de animais foram incluídos, e segmentos de 15 µm foram bloqueados e incubados com anticorpo primário anti-Histona H3 citrunilado R17+R2+R8 (1:1000, ab5102, Abcam) e posteriormente corados com os anticorpos secundários. As imagens foram adquiridas usando um microscópio de fluorescência (Leica DMI6000B, Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Para amostras de neutrófilos isolados, as células foram aderidas em lamínulas pre-tratadas com Poly-D-Lysine e estimuladas com PMA (100 ng/mL) ou meio. As lamínulas foram fixadas e coradas com DAPI (Molecular Probes), anticorpo anti-MPO (1:50; sc-16128-R) e anticorpo anti-Histona H4 (1:200, sc-25260), seguido da incubação com os anticorpos secundários (Alexa Flour 594 e Alexa-Flour 488). As imagens foram adquiridas usando o microscópio confocal Leica TCS SP5-AOBS (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

### **3.13.7 Western blot da Histona H3 citrunilada**

As amostras de pulmão de animais terminalmente anestesiados, foram homogeneizadas em tampão de lise contendo uma mistura de inibidores de proteinase (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4;



NP-40 1%; Na-deoxycholate 0.25%; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; PMSF 1 mM; Aprotinin, leupeptin and pepstatin 1 µg/mL). As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e transferidas a membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech). As membranas foram posteriormente bloqueadas e incubadas *overnight* com o anticorpo anti-Histona H3 citrunilado R17+R2+R8 (1:1000, ab5102, Abcam). Após, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário e reveladas usando o reagente de quimiluminescência (Amersham Pharmacia, Biotech) por 1 min. O anticorpo  $\beta$ -actin (1:5000; Sigma Aldrich) foi usado como normalizador (*house-keeping*). As imagens foram adquiridas usando o Scientific Imaging Systems (Image lab™ 3.0 software, Biorad Laboratories, Hercules CA).

### **3.14 Experimentos para avaliar as consequências da sepse em animais sobreviventes**

#### **3.14.1 Fenotipagem das células Tregs**

A fenotipagem de células Tregs foi realizada por citometria de fluxo (FACS). Brevemente, as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de FACS (PBS 1X 2% SBF) e incubadas com os anticorpos monoclonais específicos para CD4 (Clone SK3) ou FoxP3 (Clone PCH101) conjugados com fluorocromos (eBiosciences). Para marcação intracelular com FoxP3, foi utilizado o kit de tampões FoxP3 (Transcription Factor Staining Buffer Set, eBiosciences). As células foram adquiridas em FACSVerse (BD Immunocytometry System, San Jose, USA) e analisadas usando o software Flow Jo (TreeStar). Para a análise das citocinas intracelulares no microambiente tumoral, homogeneizados de tecidos tumorais de animais sobreviventes à sepse foram estimulados com PMA/Ionomicina por 4 horas. A marcação do IFN- $\gamma$  intracelular foi realizada pela incubação com o anticorpo anti-IFN- $\gamma$  específico utilizando o kit de marcação Cytofix/Cytoperm (BD). As células foram adquiridas em FACSVerse (BD Immunocytometry System, San Jose, USA) e analisadas usando o software Flow Jo (TreeStar).

### 3.14.2 Purificação das células T efectoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) e Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>)

As subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> do baço de camundongos C57BL/6 *naive* foram separadas por seleção negativa utilizando o kit comercial CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit, mouse (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), segundo as recomendações do fabricante.

### 3.14.3 Ensaio de supressão *in vitro* com as células Tregs

As células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Tregs) isoladas de animais recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepsis foram isoladas como previamente descrito. Posteriormente, as células foram cultivadas com células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Teff) previamente marcadas com 1 μM Dye Efluor 670 (eBioscience) e posteriormente co-cultivadas na presença de anti-CD3/28 (1 μg/mL e 1 μg/mL, respectivamente), por 72 h. A proliferação celular foi determinada pela diluição do *dye* e analisada por FACS. As células foram adquiridas em FACSVerse (BD Immunocytometry System, San Jose, USA) e analisadas usando o software Flow Jo (TreeStar).

### 3.14.4 Diferenciação *in vitro* das células Tregs

O baço de animais DERE (Depletion of Regulatory T cell, Foxp3-DTR/EGFP) recém-nascidos e adultos foi coletado e as células CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>-</sup> foram isoladas por *sorting* utilizando o citometria FACS Aria e diferenciadas na presença de anti-CD3/CD28 (1 μg/mL e 1 μg/mL, condição Th0) ou anti-CD3/CD28 associado a TGF-β1 (1, 3 ng/mL), condição Tregs, por 72 horas a 37°C. Após 3 dias, a diferenciação foi analisada pela percentagem de células CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>+</sup> compara com o grupo Th0.

### 3.14.5 Ensaio de estabilidade das células Tregs

O baço de animais DERE (Depletion of Regulatory T cell, Foxp3-DTR/EGFP) recém-nascidos e adultos foi coletado e as células CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>-</sup> foram isoladas por *sorting* utilizando o citômetro FACS Aria e posteriormente diferenciadas na presença de anti-

CD3/CD28 (1 $\mu$ g/mL e 1 $\mu$ g/mL, respectivamente) e TGF- $\beta$ 1 (1ng/mL). Após 3 dias, as células com expressão estável de Foxp3 (CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>+</sup>) foram isoladas de ambos os grupos e reestimuladas com anti-CD3/CD28 (1 $\mu$ g/mL) mais TGF-  $\beta$ 1 ou meio de cultura por 48 horas. As células CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>+</sup> foram adquiridas em FACSVerse (BD Immunocytometry System, San Jose, USA) e analisadas usando o software Flow Jo (TreeStar).

#### **3.14.6 Infecção secundária intranasal com *P. aeruginosa***

O isolado clínico de *P. aeruginosa* foi obtido junto ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP) pertencente a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) foram cultivadas como mostrado no *Item Materiais e Métodos 3.2*. A infecção secundária foi feita após os animais serem anestesiados com injeção i.p. de ketamina e xilazina (Sigma-Aldrich, Sant Louis, USA). Um volume de 40 $\mu$ L de suspensão contendo 10<sup>5</sup> UFC/40 $\mu$ L de *P. aeruginosa* foi colocado sobre as narinas e sugado para o interior da cavidade nasal pela própria respiração do animal, mantido sobre a imobilização até completa sucção do volume de suspensão aplicado. A sobrevivência dos animais foi diariamente avaliada por 10 dias.

#### **3.14.7 Modelo tumoral**

Animais recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse foram inoculados *s.c.* com 5 x 10<sup>4</sup> de células B16LucF10. No 7<sup>o</sup> dia após a inoculação, a densidade tumoral foi avaliada pelo IVIS (Xenogen IVIS Spectrum In Vivo Imaging System). No 15<sup>o</sup> dia após a inoculação os animais foram eutanasiados e o tumor foi retirado dos camundongos para análise das células Tregs, TCD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> no microambiente tumoral e no baço. Adicionalmente, o crescimento tumoral foi monitorado desde o dia 0 da inoculação até o dia 15 usando o Paquímetro.

#### **3.14.8 Marcação de Macrófagos M2 em animais sobreviventes à sepse**

No intuito de caracterizar a população de macrófagos com função supressora, foram realizadas marcações desses macrófagos M2 em células recuperadas da cavidade peritoneal, com os seguintes marcadores: F4/80<sup>+</sup> e MR<sup>+</sup> (CD206). Brevemente, uma suspensão celular do lavado peritoneal foi coletada com 3 mL de PBS com EDTA e posteriormente centrifugada a 400 g por 10 minutos. As hemácias foram lisadas por choque hiposmótico utilizando um tampão de lise e uma nova centrifugação foi realizada. Subsequentemente, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS contendo 2 % de soro fetal bovino inativado. As células (1x10<sup>6</sup> células/tubo) foram incubadas com 40 µL de Fc block (bloqueador da porção Fc de imunoglobulinas), um anticorpo proveniente de sobrenadante de hibridoma de anti-CD16/CD32, para evitar ligações inespecíficas, por 20 minutos, a 4 °C. Em seguida, foram adicionados os anticorpos anti-F4/80 (eBioscience) e CD206-MR Alexa Fluor 647 (Ab Serotec) (1,2 µg, anticorpos monoclonais extracelulares), por 30 minutos, a 4 °C. Após a incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS contendo 2 % de soro fetal bovino, centrifugadas a 400 g por 10 minutos e ressuspensas em 80 µL de solução de formaldeído a 1 % em PBS. Após esses procedimentos, as amostras foram adquiridas em FACSVerse (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ). As análises foram realizadas utilizando-se o software Flow Jo (TreeStar), os resultados foram expressos como porcentagem da expressão de marcadores de macrófagos.

### **3.14.9 Co-cultura de macrófagos com células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>**

Os macrófagos derivados da medula (BMDMs) de animais recém-nascidos e adultos, foram estimuladas por 48h com IL-4 (condição M2) ou meio (Condição M0). Ainda, células, células T efectoras TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> isoladas do baço de animais recém-nascidos e adultos foram co-cultivadas com M0 ou M2 na presença de IL-2 e anticorpo anti-CD3 por 72h. Após a incubação, as células T foram marcadas com anticorpo anti-CD4 e anti-Foxp3 e analisadas por citometria de fluxo.

### 3.14.10 Avaliação da metilação total do DNA

As células T convencionais (TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) ou células Lin<sup>-</sup> do baço ou pulmão de animais recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse, respectivamente, foram isoladas e o DNA total foi extraído usando um kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega) segundo as recomendações do fabricante. Após, a assinatura de metilação total do DNA foi avaliada em 100 ng de DNA usando o kit comercial (Imprint Methylated DNA Quantification kit, Sigma-Aldrich), segundo as recomendações do fabricante.

### 3.14.11 Isolamento das células Lin<sup>-</sup>

O tecido pulmonar de animais recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse foi digerido com Liberase TL (0,2 mg/mL, Roche) e DNase I (0,5 mg/mL, Sigma) por 45 minutos a 37°C sobre rotação. As células Lin<sup>-</sup> do tecido pulmonar total foram isoladas por seleção negativa utilizando um kit comercial (Lineage Cell Depletion Kit, Miltenyi), segundo as recomendações do fabricante.

### 3.14.12 Isolamento das células Alveolares Epiteliais

O tecido pulmonar de animais recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse foi digerido com Liberase TL (0,2 mg/mL, Roche) e DNase I (0,5 mg/mL, Sigma) por 45 minutos a 37°C sobre rotação. O Total do tecido pulmonar foi marcado com um anticorpo de linhagem (Lin, anti-mouse CD3 $\epsilon$ , Ly-6G/Ly-6C, CD11b, CD45R/B220, TER-119 PE, Biolegend) e anti-EpCAM por 10 minutos a temperatura ambiente. As células alveolares epiteliais foram isoladas por *sorting* usando o FACS Aria (BD Immunocytometry System, San Jose, USA) (pureza >98%).

### 3.14.13 Imunofenotipagem de células ILC2 (*Type 2 Innate Lymphoid Cells*)

O tecido pulmonar de animais recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse foi digerido com Liberase TL (0,2 mg/mL, Roche) e DNase I (0,5 mg/mL, Sigma) por 45 minutos

a 37°C sobre rotação. O Total do tecido pulmonar foi marcado com um anticorpo de linhagem (Lin, anti-mouse CD3ε, Ly-6G/Ly-6C, CD11b, CD45R/B220, TER-119 PE, Biolegend), anti-CD45 e anti-Sca-1 por 10 minutos a temperatura ambiente. As células ILC2 foram adquiridas em FACSVerse (BD Immunocytometry System, San Jose, USA) e analisadas usando o software Flow Jo (TreeStar). As células ILC2 foram definidas como Lin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> como descritas previamente (Besnard *et al.*, 2015).

#### 3.14.14 Análise de expressão genica

O RNA total de amostras de homogeneizado de tecidos, células de animais recém-nascidos e adultos com sepse ou sobreviventes à sepse ou amostras de pacientes pediátricos foi extraído usando um Kit comercial (RNeasy Mini Kit) ou Trizol segundo as recomendações do fabricante. O RNA total (2 µg para os tecidos ou 500 ng para as células) foi convertido a cDNA usando o kit high-capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystem). Brevemente, o cDNA foi utilizado para avaliar a expressão de genes de interesse por qPCR (método SYBER Green) usando o sistema ViiA7 (Applied Biosystems). A expressão dos genes alvos foi calculada usando o método comparativo para a quantificação relativa após a normalização com o gene endógeno *Gapdh*. A PCR quantitativa foi realizada utilizando os seguintes *primers*: *Pad4*, F-TGACCAATGGATGCAGGACG / R-CTCTGTCCCTCGGGGAGTC; *hPadi4*, F-GGACTGCGAGGATGATG / R- GCTGTCTTGGAACACCAC; *Foxp3*, F-TTCTCCAGGACAGACCACACT / R-GTTGCTGTCTTTCCTGGGTGTA; *Tgfb1*, F – CCTGTCCAAACTAAGGC / R- GGTTTTCTCATAGATGGCG; *Gitr*, F-AAGGTTTCAGAACGGAAGT / R- GGGTCTCCACAGTGGTAC; *Ctla4*, F-TGTTGACACGGGACTGTACCT / R- CGGGCATGGTTCTGGATCA; *Dnmt1*, F-CCTGGCTAAAGTCAAGTCCCT / R- GTGTGTGTTCCGTTCTCCAAG.

### 3.15 Análise de amostras dos pacientes sépticos

#### 3.15.1 Pacientes

Amostras de sangue periférico de 11 pacientes adultos e 15 pacientes pediátricos com sepse foram obtidas nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) pediátrica e de adultos do HCRP da FMRP-USP em, no máximo, 48 horas após o diagnóstico de sepse, com o consentimento dos pais ou responsáveis. Ainda, amostras de sangue periférico de 11 pacientes adultos e 5 pacientes pediátricos sobreviventes à sepse foram obtidas após a alta hospitalar. Todos os pacientes apresentavam critérios clínicos e laboratoriais de sepse (Levy *et al.*, 2003). Os valores do PRISM, PELOD, *score* Inotrópico e as NETs (mg/mL) não apresentaram uma distribuição normal, portanto, eles foram transformados (Log) para aproximarmos a uma distribuição normal, o qual permitiria fazer uma melhor correção evitando o efeito de influência dos *outliers*. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP sob o número 4886/2009. Amostras obtidas de voluntários saudáveis foram incluídas como controles.

### **3.15.2 Critérios de inclusão**

Foram incluídos no presente estudo pacientes internados na unidade de terapia intensiva (UTI) pediátrica e de adultos do HCRP da FMRP-USP com diagnóstico de sepse grave e choque séptico, cujos pais ou responsáveis assim o consentirem.

### **3.15.3 Critérios de Exclusão**

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentaram uma ou mais das condições abaixo:

- I.** Recém-nascidos pré-termo com menos de 28 dias de vida.
- II.** Solicitação dos pais ou responsáveis.
- III.** Contagem de leucócitos abaixo de  $1.500/\text{mm}^3$ .
- IV.** Contagem de neutrófilos abaixo de  $1.000/\text{mm}^3$ .
- V.** Pacientes portadores do vírus HIV (sintomáticos ou assintomáticos).
- VI.** Neoplasias.

VII. Imunossupressão prévia.

VIII. Pacientes sob terapia com glicocorticoides.

#### **3.15.4 Classificação clínica**

Em relação aos pacientes adultos, foram calculados o APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) no momento de internação no CTI para avaliação da gravidade da sepse e o SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), para disfunção de múltiplos órgãos no momento da coleta da amostra (Knaus *et al.*, 1985; Vincent *et al.*, 1996). Para avaliação da sepse em pacientes pediátricos, foram calculados o PRISM (Pediatric Risk of Mortality) para avaliação da gravidade da sepse no momento de internação no CTIP e o PELOD (Pediatric Logistic Organ Dysfunction), para avaliação de disfunção de múltiplos órgãos no dia da coleta (Pollack *et al.*, 1988; Leteurtre *et al.*, 2003).

#### **3.15.5 Avaliação da produção das NETs**

A quantificação das NETs no plasma foi determinada segundo o descrito acima (*Item 3.13.3, Materiais e Métodos*), no máximo 48 horas após da admissão hospitalar.

#### **3.15.6 Fenotipagem das células Tregs**

A fenotipagem das células Tregs no plasma foi determinada segundo o descrito acima (*Item 3.14.1, Materiais e Métodos*) usando os anticorpos anti-Foxp3 e anti-CD4 humanos.

### **3.16 Análise estatística**

A sobrevivência dos animais foi expressa como porcentagem de animais sobreviventes analisadas pelo teste Mantel-Cox logrank ( $X^2$ , *chi-squared*), e as diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ . A contagem de bactérias foi expressa como mediana do Log de UFC e analisada estatisticamente pelo teste Mann-Whitney U. Os demais dados experimentais foram avaliados comparando-se a média dos valores encontrados, por análise de variância (one-way ANOVA) seguida de Teste de Bonferroni, para comparações múltiplas ou teste t-Student



(comparações entre duas amostras) para amostras não pareadas. O número (n) de animais por grupo experimental está descrito nas legendas das figuras. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de média (DPM) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de  $p < 0.05$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.17 Preparo das soluções e reagentes

#### Solução de Anestésico

Ketamina 10% .....	5 ml
Xilazina 2% .....	3 ml
Salina 0,9% .....	42 ml

#### Corante Panótico Rápido (LaborClin)

Panótico rápido n°1: composto por uma solução de triarilmetano a 0.1% 1 minuto.

Panótico rápido n°2: composto por uma solução de xantenos a 0.1% - 1 minuto.

Panótipo rápido n°3: composto por uma solução de tiazinas a 0.1% - 1 minuto.

#### Solução de Tampão Salina-fosfato (PBS) 10X (Solução estoque)

Cloreto de Sódio (NaCl, Merck) .....	80 g
Cloreto de Potássio (KCl, Merck) .....	2 g
Fosfato de Potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Merck), .....	20 g
Água Milli-Q q.s.p. ....	1000 ml

#### PBS 1X (Solução de uso)

PBS 10X .....	100 ml
Água Milli-Q q.s.p. ....	900 ml

Ajustado o pH 7.2, filtrado e estocado a 4 °C.

#### Tampão de lise

Cloreto de Amônio .....	8,02 g
-------------------------	--------

EDTA ..... 0,36 g

Bicarbonato de sódio ..... 0,84 g

Água Milli-Q q.s.p. ....1000 ml

Ajustado o pH 7.2, filtrado e estocado a 4 °C.

#### **Tampão de citometria de fluxo (Tampão de FACS)**

Soro Fetal Bovino inativado (SBF-I, Difco) 2%.....2 ml

PBS 1X q.s.p. ....100 ml

#### **PBS-EDTA (1 mM)**

PBS 1X q.s.p.....100 mL

Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA, Merck) .....37.2 mg

#### **Meio Brain Heart Infussion (BHI)**

Brain Heart Infussion Broth ..... 37 g

Água Milli-Q q.s.p. ....1000 ml

#### **Meio RPMI incompleto**

Hepes (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, Sigma) .....2,38 g

RPMI 1640 (Sigma) ..... 1 frasco (1L)

Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, Synth) .....2,22 g

Água Milli-Q q.s.p.....1000 ml

Ajustado ao pH 7,2, filtrado e estocado a 4 °C.

#### **Meio RPMI completo**

Soro Bovino Fetal inativado (10%)(LifeSciences).....10 ml(10%)

Estreptomicina/penicilina (Sigma) (p /100ml)10mg/mL(10.000UI).....1 ml

Glutamina (p /100ml) ..... 1 ml

Fungizona (p /100ml) 250ug/mL .....120ul

RPMI incompleto q.s.p.....100 ml

Ajustado ao pH 7,2, filtrado e estocado a 4 °C.

**Triton 0,2% pra Fagocitosis e Killing**

Triton 100%..... 200ul

Água Milli-Q q.s.p..... 100ml

**Hanks 10X**

Hanks Estoque

Água Milli-Q q.s.p .....100ml

Ajustado ao pH 7,2, filtrado e estocado a 4 °C.

**Ertapenem 0,05g/mL**Ertapenem estoque .....1g H<sub>2</sub>O

miliQ..... 20ml

Alíquotas de 500uL mantidas a -20°C

**Meio Ágar Muller Hinton (M.M.H.)**

M.M.H. (Difco) .....38 g

Água Milli-Q q.s.p. ....1 l

Autoclavado, plaqueado aproximadamente 22 ml por placa e estocado à 4 °C.

**Tampões utilizados para o ensaio de ELISA****Solução de ligação (coating buffer) pH 8.4**Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, Merk) .....4,2 g

Água de Milli-Q q.s.p. ....500 ml

**Tampão de bloqueio (para ELISA da companhia eBioscience e RD)**

BSA 0,1 %(Sigma) .....0,1 g

PBS 1X q.s.p. .... 100 ml

***Resultados***

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EXPERIMENTOS REALIZADOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE

#### 4.1.1 *Caracterização das populações celulares da resposta imune inata e adaptativa em animais recém-nascidos e adultos*

Análises iniciais foram realizadas para determinar o *status celular* basal dos grupos experimentais (camundongos recém-nascidos e adultos) a serem utilizados durante o projeto. Para isso, as populações celulares efectoras da resposta imune inata no baço, linfonodos e no sangue periférico foram avaliadas. Embora tenha sido verificado diferenças na frequência de macrófagos nos linfonodos, não foram observadas alterações nas frequências de macrófagos, células NK e neutrófilos nos demais tecidos como mostrado na *Figura suplementar 1*. Indicando que as populações celulares em camundongos recém-nascidos e adultos são semelhantes.

#### 4.1.2 *Obtenção e determinação do inóculo de bactérias para indução da sepse experimental*

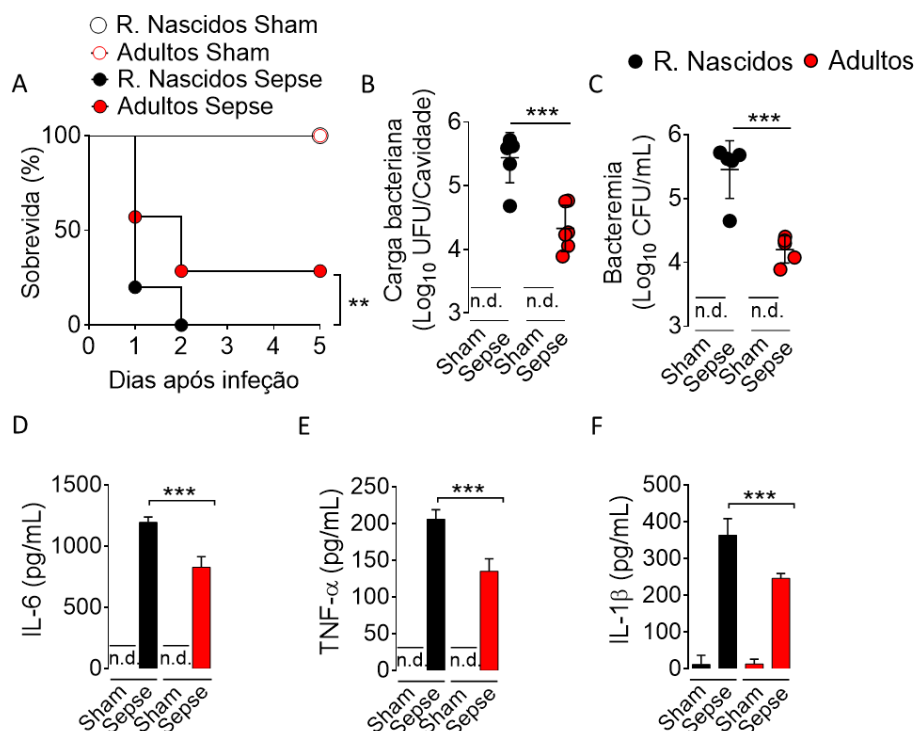
Uma vez feita a caracterização celular em condições homeostáticas, o nosso próximo passo foi estabelecer um modelo de indução de sepse experimental nestes animais. O método escolhido foi administração intraperitoneal de uma suspensão polimicrobiana previamente obtida do ceco de um camundongo adulto C57BL/6, como descrito anteriormente (Materiais e Métodos, item 3.2). A densidade ótica das bactérias isoladas foi correlacionada com o número de unidades formadoras de colônias (UFC) cultivadas em meio Agar Müeller-Hinton (*Figura suplementar 2A*), permitindo o cálculo do número de UFC necessário para a indução da sepse em cada grupo experimental. A clássica coloração de Gram demonstrou que ocorre predomínio de espécies Gram negativas (82%) sobre Gram positivas (16%) na suspensão bacteriana (*Figura suplementar 2A*). Posteriormente, animais recém-nascidos e adultos foram inoculados (*i.p.*) com quantidades diferentes de suspensão bacteriana e a sobrevivência foi determinada

diariamente durante os cinco dias subsequentes. Foi verificado que são necessárias  $2 \times 10^8$  e  $4 \times 10^7$  UFC/cavidade para a indução de sepse letal e subletal, respectivamente, em animais recém-nascidos e adultos (*Figura suplementar 2B*).

#### 4.1.3 Padronização do modelo de sepse em animais recém-nascidos

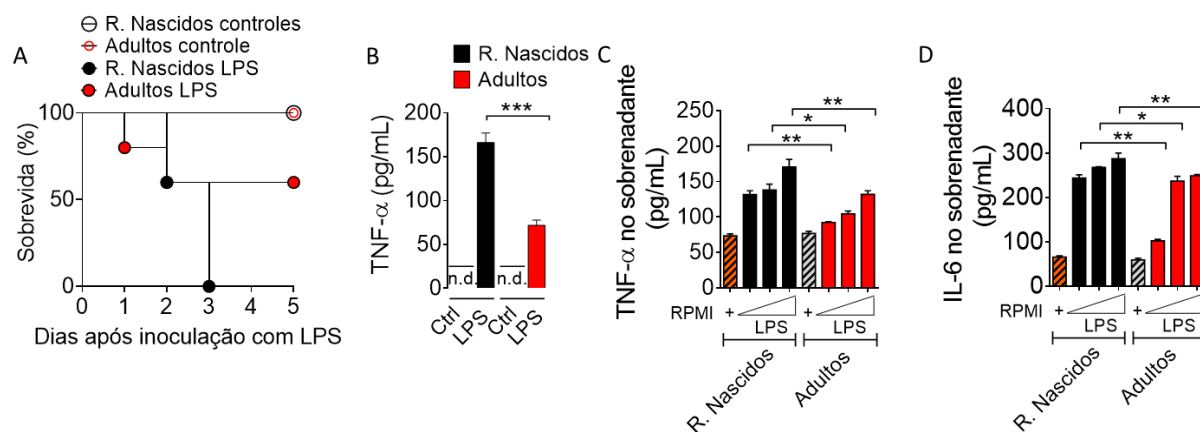
Inicialmente padronizamos um modelo de sepse experimental em camundongos recém-nascidos. Para isto, grupos de camundongos recém-nascidos foram submetidos a injeções por via intraperitoneal de suspensões de bactéria em diferentes concentrações. Em seguida os parâmetros clássicos de mensuração de sepse foram avaliados: sobrevida, bacteremia e marcadores de lesão tecidual. Observamos que animais recém-nascidos apresentaram menor sobrevida comparado aos animais adultos quando inoculados com a mesma quantidade de bactéria ou a mesma carga bacteriana/kg de peso corporal (**Figura 1A & Figura suplementar 2C**). Portanto, para todos os subsequentes experimentos, a dose de  $2 \times 10^8$  UFC/cavidade foi usada para a indução da sepse. Uma vez que o controle da carga bacteriana é fundamental para a melhora na sepse (Sansone, 2001), investigamos o *clearance* bacteriano nos animais recém-nascidos e adultos. Neste sentido, verificamos que os animais recém-nascidos apresentaram menor *clearance* bacteriano tanto local (**Figura 1B**) como sistêmico (**Figura 1C**) e maiores níveis séricos de mediadores pró-inflamatórios, tais como IL-6 (**Figura 1D**), TNF- $\alpha$  (**Figura 1E**) e IL1 $\beta$  (**Figura 1F**) comparado aos adultos. Ainda, comparamos a susceptibilidade dos animais ao choque endotóxico induzido pelo LPS. Foi observado que os animais recém-nascidos apresentaram menor taxa de sobrevida comparado aos adultos quando inoculados com a mesma dose de LPS (30 mg/kg) (**Figura 2A & Figura suplementar 2D**), isto acompanhado com maiores níveis séricos de TNF- $\alpha$  (**Figura 2B**). Notavelmente, macrófagos peritoneais isolados de animais recém-nascidos produziram maiores níveis de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$  e IL-6) comparados aos adultos quando estimulados com doses crescentes de LPS (**Figura 2C & D**).

A ativação acentuada de células efectoras como macrófagos e neutrófilos resulta na produção de altas concentrações de mediadores inflamatórios responsáveis pela maioria das alterações fisiopatológicas observadas na sepse (Dinarello, 1997; Alves-Filho *et al.*, 2006; Singh e Evans, 2006; Alves-Filho *et al.*, 2008; De Montmollin e Annane, 2011). Assim, o nosso próximo objetivo foi avaliar a presença de danos orgânicos em camundongos submetidos à sepse. Nós verificamos que seis horas após sepse, animais recém-nascidos apresentaram um maior dano cardíaco, hepático e renal avaliados pela atividade das enzimas CK-MB, da transaminase glutâmico oxalacética (TGO), do nitrogênio ureico no sangue (BUN) no plasma e da creatinina, respectivamente (**Figura 3A – D**). Ainda, apresentaram menor responsividade vascular (**Figura 3E & Tabela suplementar 1**) e maior infiltrado neutrofílico no pulmão (**Figura 3F**). Além disso, estas alterações bioquímicas foram confirmadas com estudos histopatológicos; esteatose macro e microgoticular foram observadas no tecido hepático e congestão vascular foi verificada nos pulmões (**Figura 3G**). *Estes dados indicam que camundongos recém-nascidos submetidos à sepse são mais susceptíveis que os adultos. Entretanto, essa susceptibilidade não ocorre devido a um déficit na resposta imune, pois diferentemente do esperado, animais recém-nascidos sépticos apresentaram uma alta resposta pró-inflamatória sistêmica.*

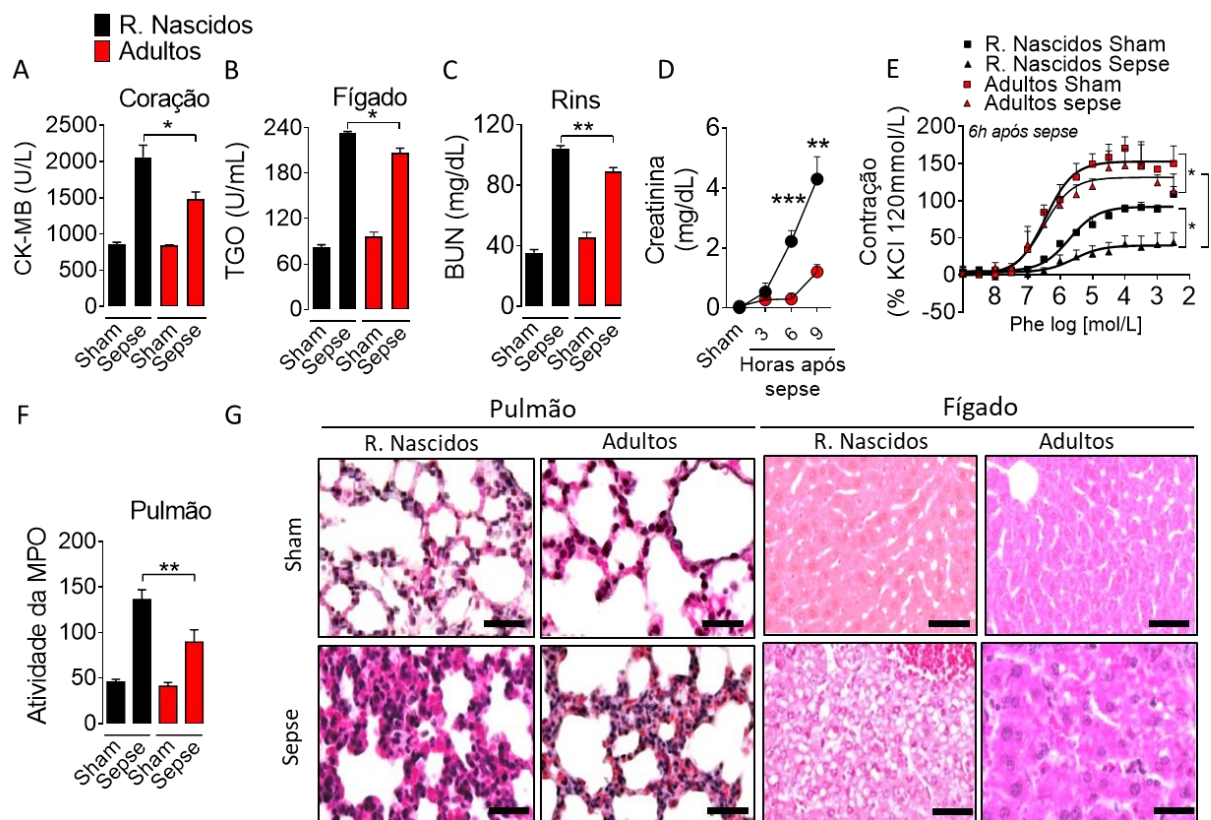


**Figura 1. Animais recém-nascidos são mais suscetíveis à sepse.** (A) animais recém-nascidos e adultos foram inoculados via *i.p.* com uma suspensão bacteriana ( $2 \times 10^8$  CFU/cavidade) e a sobrevivência dos camundongos submetidos à infecção foi avaliada diariamente por um período de cinco dias. A quantidade de bactéria na cavidade peritoneal (B) e no sangue (C) foi avaliada 6 h após a indução da sepse. Concentrações séricas de IL-6 (D), TNF- $\alpha$  (E) e IL-1 $\beta$  (F) foram determinadas por ELISA 6 h após sepse. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM,  $n=5-6$  por grupo e são representativos a 3 experimentos. \*\*\*  $p < 0.001$  (A, Mantel-Cox log-rank test; B-F, one way-ANOVA, Bonferroni's).





**Figura 2. Animais recém-nascidos são mais suscetíveis ao choque endotóxico induzido pelo LPS.** (A) animais recém-nascidos e adultos foram inoculados via *i.p.* com LPS (30 mg/Kg) e a sobrevivência dos camundongos foi avaliada diariamente por um período de cinco dias. (B) as concentrações séricas de TNF- $\alpha$  foram determinadas por ELISA 12h após a inoculação com LPS. Em um experimento separado, macrófagos peritoneais foram isolados de animais recém-nascidos e adultos e estimulados com LPS nas concentrações indicadas por 4 h; as concentrações de TNF- $\alpha$  (C) e IL-6 (D) no sobrenadante da cultura foram determinadas por ELISA. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM,  $n=5-6$  por grupo e são representativos a 3 experimentos. \*  $p<0.05$  \*\*  $p<0.01$  e \*\*\*  $p<0.001$  (A, Mantel-Cox log-rank test; B-D, one way-ANOVA, Bonferroni's).



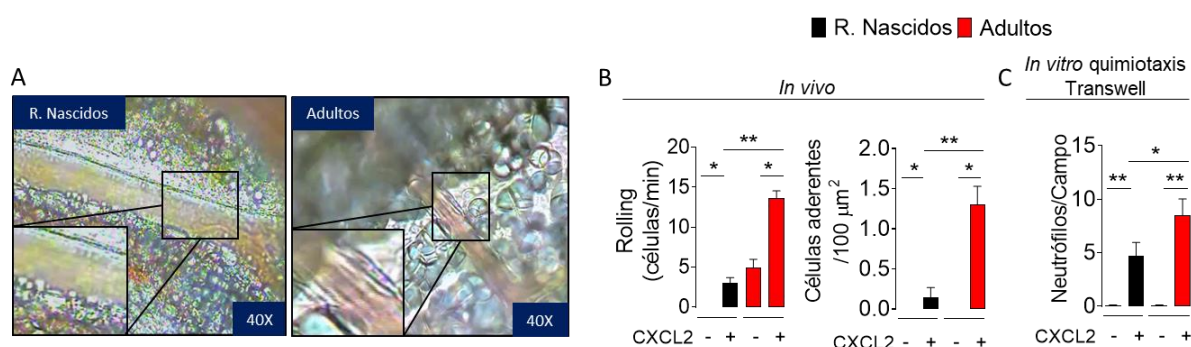
**Figura 3. Animais recém-nascidos submetidos à sepse apresentam maior disfunção orgânica.** Animais recém-nascidos e adultos foram inoculados via *i.p.* com uma suspensão bacteriana ( $2 \times 10^8$  CFU/cavidade) e a atividade enzimática do (A) CK-MB, (B) TGO, (C) BUN e a (D) Creatinina no soro foi verificada 6 h após indução da sepse. (E) ainda, anéis aórticos, na presença de endotélio, foram coletados e após 60 min (período de equilíbrio), curvas de concentração-resposta a Fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $10^{-2}$  mol/L) foram avaliadas. Em experimentos recíprocos, (F) a atividade enzimática do MPO no tecido pulmonar e a análise histopatológica do fígado e pulmões foram avaliadas (G). As imagens representativas de fígado e pulmão são apresentadas, magnificação 20x ou 40x. Barras = 100 µm. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM,  $n=5-6$  por grupo e são representativos a 3 experimentos. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  e \*\*\*  $p<0.001$  (A-D, one way-ANOVA, Bonferroni's; E, % máximo de resposta, one way-ANOVA, Bonferroni's).

#### 4.1.4 *Os neutrófilos de camundongos recém-nascidos apresentam defeitos nos mecanismos de migração celular e produção de espécies reativas*

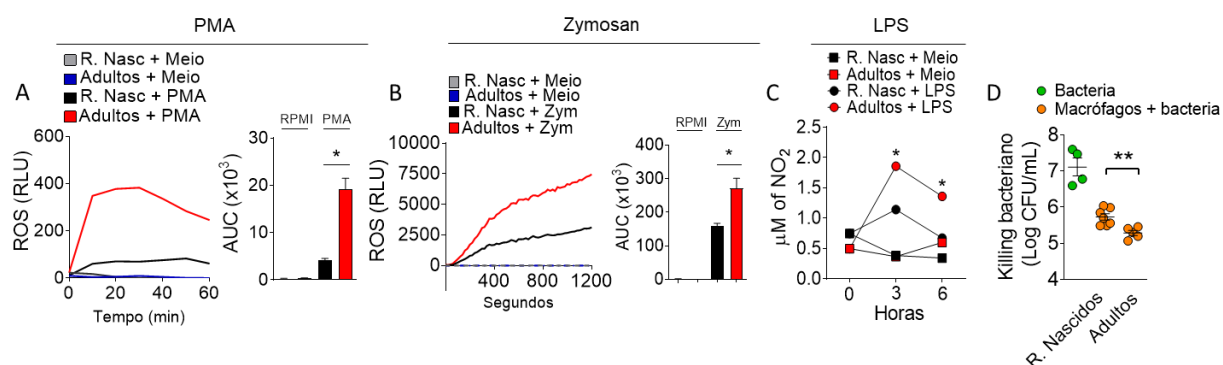
Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleados essenciais no funcionamento do sistema imunológico. Durante uma infecção os neutrófilos são as primeiras células a chegar no foco infeccioso para eliminação dos patógenos (Nathan, 2006). Para isso, os neutrófilos precisam transmigrar do sangue periférico através do endotélio vascular para o local da inflamação. Este processo ocorre em favor de um gradiente de concentração de estímulos quimiotáticos e depende do rolamento, adesão e expressão de selectinas e integrinas na superfície dos neutrófilos e células endoteliais (Langereis, 2013). Neste sentido, nós verificamos que leucócitos de animais recém-nascidos *naives* apresentam uma redução significativa no rolamento e adesão nas vênulas mesentéricas comparado aos adultos (**Figura 4A & B**). De maneira similar ao observado *in vivo*, neutrófilos derivados da medula de animais recém-nascidos apresentaram uma menor capacidade de migração *in vitro* para o gradiente de concentração da quimiocina CXCL2 (**Figura 4C**).

A ativação acentuada das células inflamatórias que resulta na produção e secreção de altas concentrações de mediadores pró-inflamatórios é responsável pela maioria das alterações fisiopatológicas associadas a sepses tais como as lesões teciduais e disfunção de órgãos observadas tanto em pacientes como em modelos experimentais (Dinarello, 1997; Alves-Filho *et al.*, 2006; Singh e Evans, 2006; Alves-Filho *et al.*, 2008; De Montmollin e Annane, 2011). Notavelmente, a infiltração tissular dos neutrófilos é um processo chave na indução da disfunção de órgãos associada à sepsis através da produção de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (do inglês, *Reactive Oxygen/Nitrogen Species*) (Fink, 2002; Huet *et al.*, 2011; Souto *et al.*, 2011). Portanto, o nosso próximo objetivo foi avaliar a produção de espécies reativas (ROS e NO) pelos neutrófilos isolados de animais recém-nascidos e adultos. Foi verificado que, em contraste aos adultos, neutrófilos de animais infantis produziram reduzidas quantidades de

espécies reativas quando estimulação com PMA, Zymosan ou LPS (**Figura 5A – C**). Em concordância com a deficiente produção de espécies reativas observada em animais recém-nascidos, foi verificado que macrófagos de animais recém-nascidos apresentaram reduzida capacidade de *killing* bacteriano (**Figura 5D**). *Coletivamente, os nossos dados indicam que o menor controle da carga bacteriana e consequente susceptibilidade à sepse dos animais recém-nascidos podem estar relacionados com alterações inatas nos mecanismos de migração dos neutrófilos. Ainda, os dados sugerem que o intenso dano orgânico observado nos animais recém-nascidos não é devido a produção de espécies reativas.*



**Figura 4. Neutrófilos de camundongos recém-nascidos apresentam alterações na migração celular *in vivo* e *in vitro*. (A-B).** Animais adultos e recém-nascidos foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg) / xilazina (15 mg/kg) e submetidos ao ensaio de microscopia intravital, como previamente descrito (*vide* Materiais e Métodos 3.8). Depois de identificada uma vênula do mesentério, foi adicionado MIP-2 (30 ng/mL) ou solução salina e foram quantificados o número de leucócitos que rolaram sobre o vaso e o número de leucócitos aderidos ao endotélio, durante cinco minutos. (C) neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos recém-nascidos e adultos foram colocados para migrar por 1 hora a 37°C para o gradiente de CXCL2 (20 ng/mL) na câmara de Boyden. Os dados são apresentados com a média  $\pm$  DPM de seis animais por grupo, \* $p < 0,05$ . (one way-ANOVA, Bonferroni's; D, test t).



**Figura 5. Neutrófilos de animais recém-nascidos produzem poucas concentrações de espécies reativas.** Neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos recém-nascidos e adultos foram estimulados *in vitro* com PMA (100 ng/mL, **A**) ou com partículas de zymosan opsonizadas (20 mg/mL, por 20 min **B**) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), foi avaliada. Paralelamente, neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos recém-nascidos e adultos foram estimulados com LPS (10 ng/mL, **C**) por 0, 3 e 6 h e a produção de óxido nítrico foi avaliada. (**D**) reciprocamente, macrófagos da cavidade peritoneal ( $1 \times 10^6$ ), de animais recém-nascidos e adultos, foram coletados e incubados com bactérias do conteúdo cecal ( $2 \times 10^6$ ) previamente opsonizadas com 10% de soro e incubados por 3 horas a 37°C. Após incubação, as células foram lisadas e semeadas na diluição  $10^{-4}$ . O *killing* fagocítico e apresentado como o logaritmo do UFC/mL. Os dados são apresentados com unidades relativas de fluorescência (RLU, do inglês *Relative Fluorescence Unit*) e Área abaixo da curva (AUC, do inglês *Area Under Curve*) e como a média  $\pm$  DPM de seis animais por grupo,  $*p < 0,05$ . (test t).

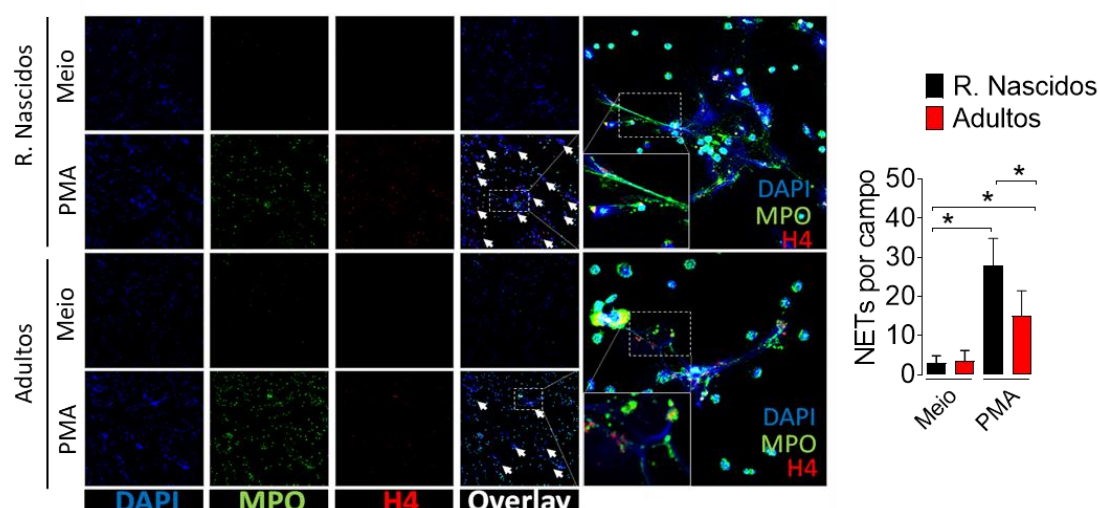
#### 4.1.5 *A característica da sepse em animais recém-nascidos é a elevada produção de NETs (Neutrophils Extracellular Traps)*

Com o intuito de investigar os mecanismos associados ao intenso dano orgânico observado nos animais recém-nascidos durante a sepse, nós avaliamos a produção das NETs (do inglês, *Neutrophils Extracellular Traps*), um novo mecanismo efetor dos neutrófilos (Brinkmann *et al.*, 2004), associado com o do dano orgânico em outros processos patológicos (Khandpur *et al.*, 2013; Merza *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2015). Assim, neutrófilos isolados da medula de animais recém-nascidos e adultos foram estimulados *in vitro* com PMA e a produção das NETs foi avaliada por imunofluorescência. Verificamos que os neutrófilos de animais recém-nascidos apresentaram intensa produção de NETs (DAPI<sup>+</sup>MPO<sup>+</sup>Histone H4<sup>+</sup>) após estimulação, quando comparados aos adultos (**Figura 6**).

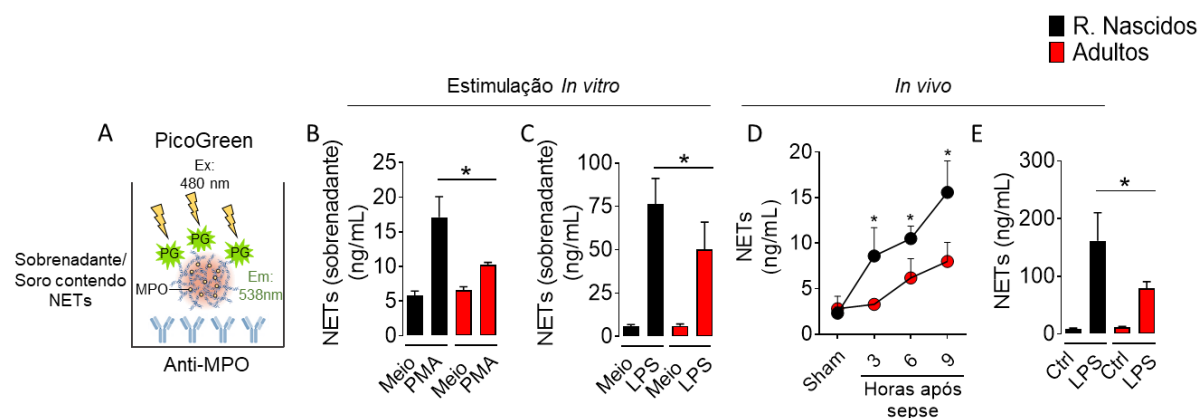
Em seguida, nós quantificamos as NETs usando a formação do complexo MPO (mioeloperoxidase)/DNA como marcador específico das NETs (**Figura 7A**), segundo previamente reportado (Borissoff *et al.*, 2013). Notavelmente, a mieloperoxidase, presente nos grânulos primários ou azurófilos, é um marcador específico dos neutrófilos que durante a NETose liga-se ao DNA neutrofílico. De maneira complementar aos dados de imunofluorescência, nós verificamos que neutrófilos de animais recém-nascidos produziram acentuados níveis de NETs após estimulação com PMA ou LPS em contraste com os adultos (**Figura 7B & C**). Em seguida, avaliamos a produção das NETs *in vivo*. Para isto, animais recém-nascidos e adultos foram submetidos a sepse ou endotoxemia induzida por LPS e a concentração das NETs foi avaliada no soro 6 ou 18 h após, respectivamente. Verificamos que, similar ao observado no modelo *in vitro*, durante a sepse ou a endotoxemia induzida pelo LPS, animais recém-nascidos produziram níveis significativamente maiores de NETs que o observado nos adultos (**Figura 7D & E**).

Com o intuito de entender os mecanismos associados à intensa produção de NETs nos animais recém-nascidos, decidimos avaliar a expressão do gene *Padi4* *in vitro* e *in vivo* (do inglês, *Peptidyl arginine deiminase 4*), o qual está particularmente enriquecido nos neutrófilos e é um ator chave na NETose via descondensação das fibras de cromatina (Li *et al.*, 2010). Nós verificamos que os neutrófilos de animais recém-nascidos apresentaram um aumento significativo na expressão da *Padi4* após estimulação com LPS ou PMA. Ainda, no modelo de endotoxemia induzida pelo LPS, neutrófilos circulantes de animais recém-nascidos apresentaram uma alta expressão da *Padi4* (**Figura 8A – C**). Contudo, a atividade de DNase plasmática e o *clearance* das NETs pelos macrófagos de animais recém-nascidos e adultos foram similares (**Figura 9**). *Coletivamente, estes resultados sugerem que durante a sepse, animais recém-nascidos produzem altas concentrações de NETs. Ainda, constatou-se que essa elevada produção de NETs não está relacionada com a deficiência nos mecanismos de clearance.*

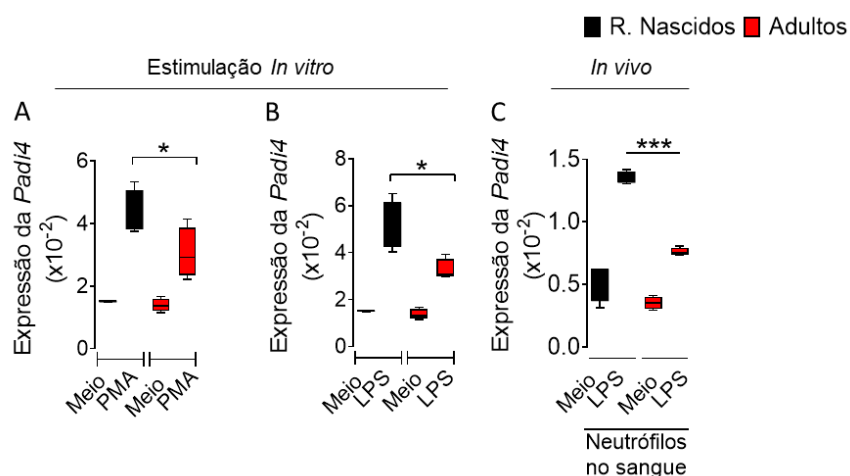




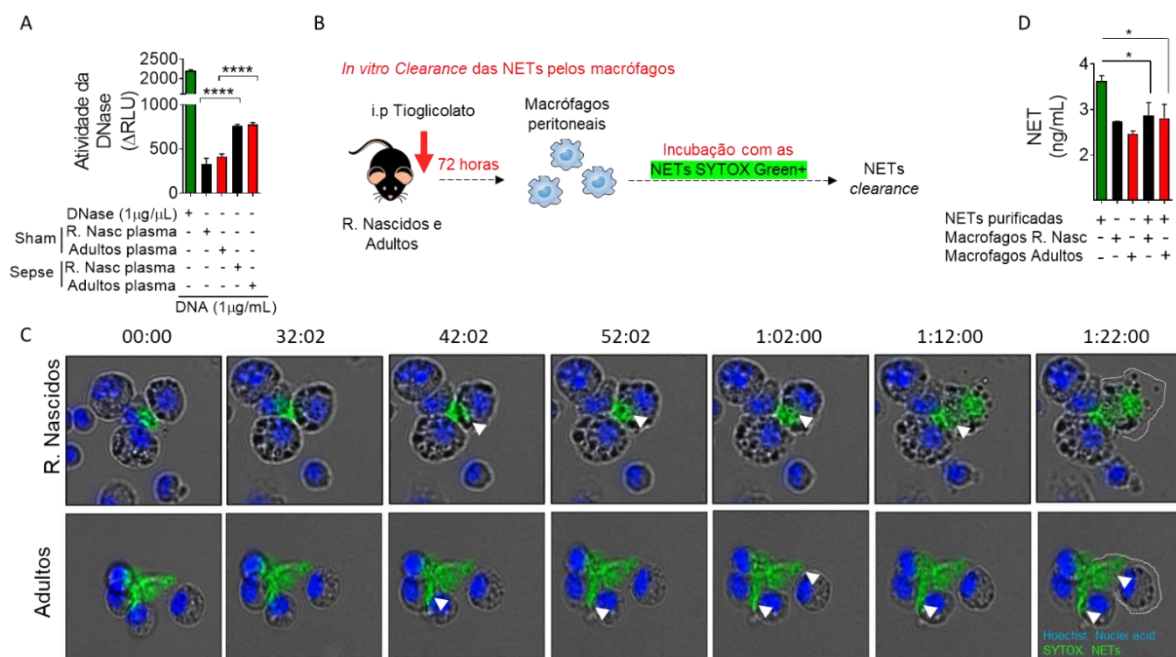
**Figura 6. Produção de NETs (do inglês, *Neutrophils extracellular Traps*) por neutrófilos de animais recém-nascidos e adultos.** Neutrófilos isolados da medula óssea ( $1 \times 10^6$ ) de camundongos recém-nascidos e adultos foram estimulados com PMA (100 ng/mL) por 4 h. Imagens de imunofluorescência representativas da produção de NETs assim como a quantificação de NETs por campo. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM, n=5-6 por grupo e são representativos a 3 experimentos. \*  $p < 0.05$  (one way-ANOVA, Bonferroni's).



**Figura 7. Animais recém-nascidos liberam mais NETs que os animais adultos.** Neutrófilos da medula óssea de camundongos recém-nascidos e adultos foram isolados e a produção de NETs foi avaliada usando o Kit PicoGreen como mostrado no painel A. Após isolamento, os neutrófilos foram estimulados com PMA (100 ng/mL) (B) ou LPS (500 ng/mL) (C) por 4 h e as concentrações das NETs foram avaliadas no sobrenadante da cultura. Paralelamente, animais recém-nascidos e adultos foram submetidos a sepse (D) ou inoculados com LPS (35 mg/kg, *i.p.*) (E) e as concentrações das NETs foram avaliadas no soro 3, 6, e 9 h (sepse) ou 18 h (LPS). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM,  $n=5-6$  por grupo e são representativos a 3 experimentos. \*  $p<0.05$  (one way-ANOVA, Bonferroni's).



**Figura 8. Animais recém-nascidos apresentam maior expressão de *Padi4* que animais adultos.** Neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos recém-nascidos e adultos foram estimulados com PMA (100 ng/mL) (A) ou LPS (500 ng/mL) (B) por 4 h e a expressão do gene *Padi4* foi avaliada por qPCR. Paralelamente, animais recém-nascidos e adultos foram inoculados com LPS (35 mg/kg, *i.p.*) (C) e a expressão do gene *Padi4* foi avaliada nos neutrófilos do sangue periférico 18 h após por qPCR. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM,  $n=5-6$  por grupo e são representativos a 3 experimentos. \*  $p<0.05$  e \*\*\*  $p<0.001$  (one way-ANOVA, Bonferroni's).



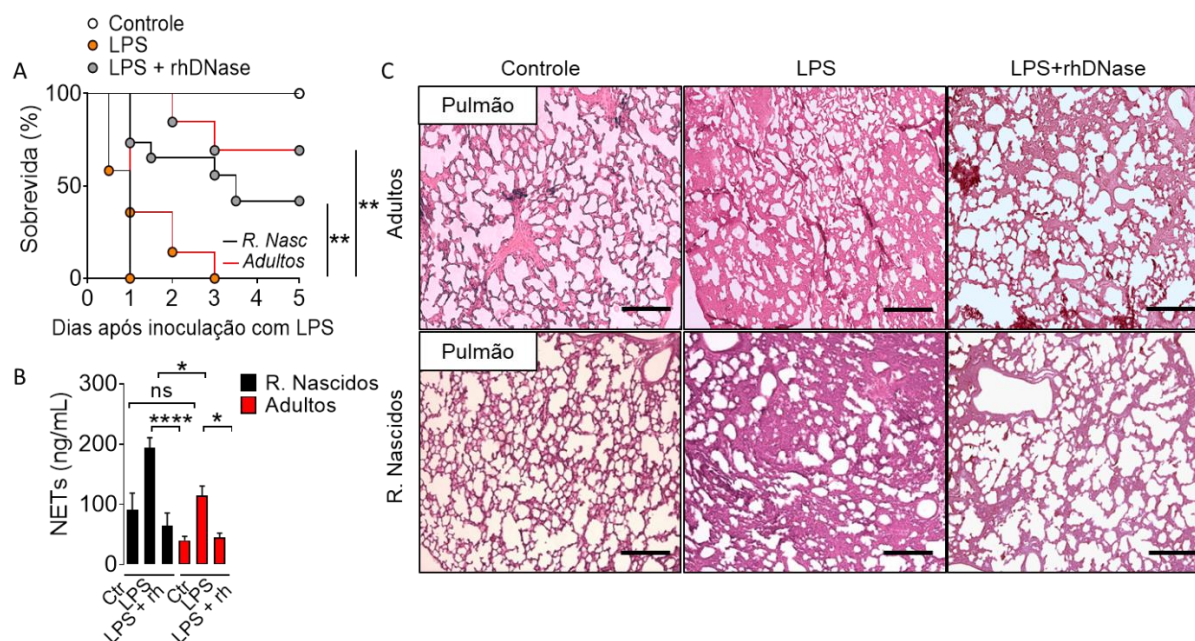
**Figura 9. Atividade de DNase do plasma e fagocitose das NETs pelos macrófagos de animais recém-nascidos e adultos é similar.** Animais submetidos a sepse foram eutanasiados 6 h após infecção e o sangue foi coletado. **(A)** a atividade de DNase do plasma foi avaliada 6 h após sepse (*vide* Materiais e Métodos item 3.13.5). **(B-C)** representação experimental e imagens representativas nos tempos indicados do *clearance* das NETs purificadas (4 ng/mL) e marcadas com SITOX-green pelos macrófagos peritoneais de animais recém-nascidos e adultos. **(D)** avaliação das concentrações remanentes de NETs no sobrenadante da cultura de macrófagos 4 h após incubação com NETs purificadas. Os resultados são apresentados como a media  $\pm$  DPM, n=5-6 por grupo e são representativos a 2 experimentos. \*  $p < 0.05$  e \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (one way-ANOVA, Bonferroni's).

#### 4.1.6 *A degradação das NETs melhora o desfecho da endotóxemia induzida por LPS em animais recém-nascidos*

Considerando o papel das NETs na gênese do dano orgânico em outros processos patológicos (Khandpur *et al.*, 2013; Merza *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2015), nós decidimos avaliar o papel funcional das NETs no contexto fisiopatológico da sepse. Para isto, animais recém-nascidos e adultos inoculados com LPS foram tratados com rhDNase, como previamente reportado (Caudrillier *et al.*, 2012; Hu, 2012; Mcdonald *et al.*, 2012), com o objetivo de degradar o DNA livre e as NETs na fase aguda da endotoxemia. Nós verificamos que os animais inoculados com LPS e não tratados com rhDNase apresentaram sinais clínicos de letargia, piloereção, secreção ocular, taquipnéia e taquicardia, com 100% de mortalidade até três dias após a inoculação. No entanto, os sinais clínicos foram menos intensos após o tratamento com rhDNase. Um significativo aumento na taxa de sobrevivida foi observado no grupo de animais recém-nascidos (aproximadamente 45-60%) (**Figura 10A**). Adicionalmente, a melhora na sobrevivida foi associada com a redução dos níveis séricos das NETs (**Figura 10B**). Como mencionado anteriormente, a mortalidade na sepse é decorrente, na maior parte das vezes, de lesões teciduais capazes de desencadear falência múltipla de órgãos (Doerschuk, 2001). Uma vez que o tratamento com a rhDNase melhorou a sobrevivida dos animais, nosso próximo objetivo foi avaliar se também ocorre redução de danos orgânicos. Nós verificamos que animais endotóxicos tratados com a rhDNase, apresentaram redução nas lesões orgânicas induzidas pelo LPS no pulmão (**Figura 10C**) assim como nos níveis séricos do BUN, CK-MB e TNF- $\alpha$  (**Figura 11**).

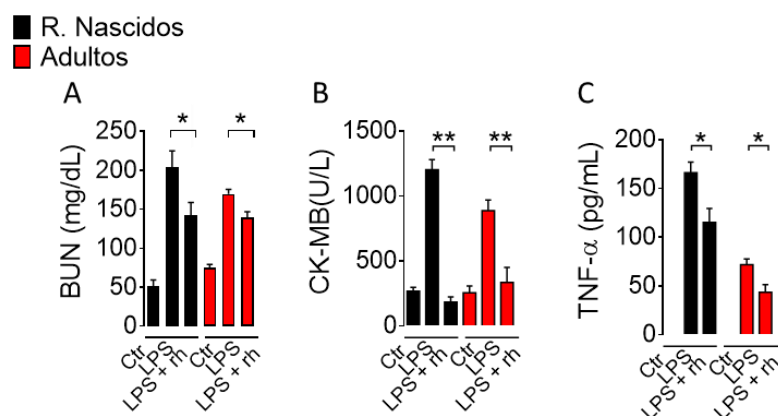
A citrunilação da histona H3 pela enzima Pad4 é um evento importante para a NETose (Nakashima *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). Portanto, com o intuito de entender os mecanismos moleculares envolvidos na elevada produção das NETs nos animais recém-nascidos durante a endotoxemia, nós avaliamos expressão da *Padi4* e a citrunilação da Histona H3 no tecido

pulmonar e renal 18 horas após inoculação do LPS. Nós verificamos um incremento na expressão *Padi4* em ambos os grupos de animais (recém-nascidos e adultos) no tecido pulmonar. Contudo, a expressão da *Padi4* não foi afetada pelo tratamento com a rhDNase (**Figura 12A**), sugerindo que o efeito da rhDNase é *upstream* à expressão da *Padi4*. Por outro lado, observou-se que os animais endotoxêmicos apresentaram um significativo incremento na citrulinilação da histona H3 no tecido pulmonar e renal, o qual foi acentuadamente reduzida após tratamento com rhDNase (**Figura 12B & C**). *Estes dados sugerem que os elevados níveis de NETs poderiam ser responsáveis pela alta susceptibilidade dos animais recém-nascidos à endotoxemia induzida pelo LPS.*



**Figura 10. A degradação das NETs melhora o desfecho da endotóxemia induzida por LPS.**

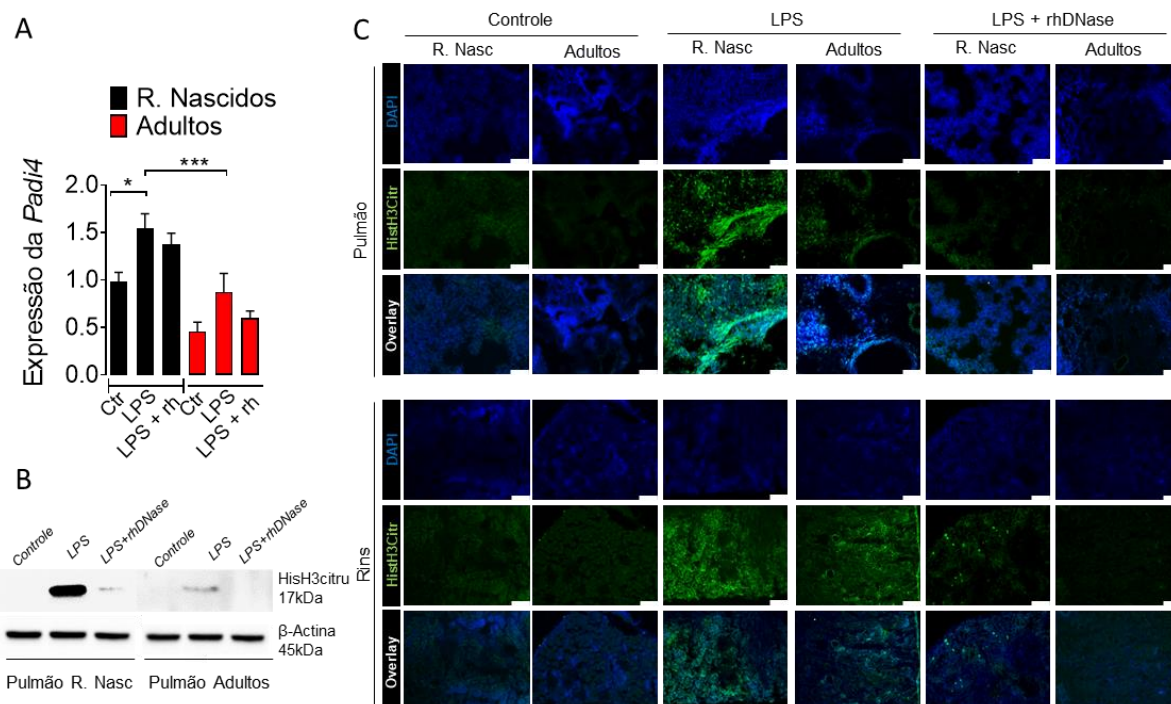
(A) curva de sobrevivência de animais recém-nascidos e adultos inoculados com LPS (35 mg/kg, *i.p.*) e tratados com rhDNase (10 mg/kg *s.c.*) ou salina, e a sobrevivência dos camundongos foi avaliada diariamente por um período de cinco dias. (B) concentrações séricas das NETs em animais 18 h após inoculação com LPS, tratados ou não com rhDNase. (C) imagens histológicas representativas do pulmão de animais recém-nascidos e adultos 18 h após inoculação com LPS, tratados ou não com rhDNase. As imagens são apresentadas na magnificação 10x. Barras = 50 µm. Os resultados são apresentados como a média ± DPM, n=5-6 por grupo e são representativos a 2 experimentos. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$  (A, Mantel-Cox log-rank test; B, one way-ANOVA, Bonferroni's). *rh*:DNase recombinante humana.



**Figura 11. A degradação das NETs reduz os a disfunção orgânica induzida pelo LPS.**

Animais recém-nascidos e adultos foram inoculados com LPS (35 mg/kg, *i.p.*) e tratados com rhDNase (10 mg/kg *s.c.*) ou salina. Atividade enzimática do (A) BUN, (B) CK-MB e os (C) níveis de TNF- $\alpha$  no soro foram verificadas 18 h após inoculação com LPS. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM, n=5-6 por grupo e são representativos a 2 experimentos. \*  $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0.01$  (one way-ANOVA, Bonferroni's)





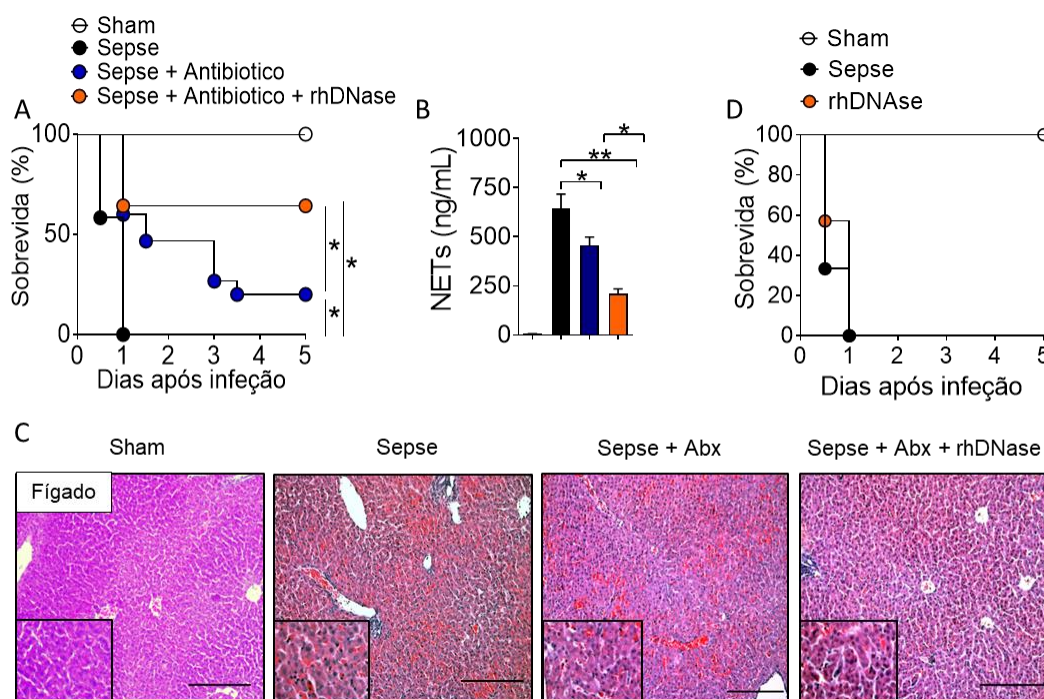
**Figura 12. A degradação das NETs reduz a citrilação da histona H3 na endotóxia induzida por LPS.** Animais recém-nascidos e adultos foram inoculados com LPS (35 mg/kg, *i.p.*) e tratados com rhDNase (10 mg/kg *s.c.*) ou salina. **(A)** expressão gênica da *Padi4* no tecido pulmonar foi verificada 18 h após inoculação com LPS. **(B)** western blot e **(C)** imagens de imunofluorescência representativas da citrilação da histona H3 *Padi4* no tecido pulmonar 18 h após inoculação com LPS. Barras = 50  $\mu$ m. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM, n=5-6 por grupo. \*  $p < 0.05$  e \*\*\*  $p < 0.001$  (one way-ANOVA, Bonferroni's)

#### **4.1.7 A degradação das NETs ou inibição de sua síntese melhora o desfecho da sepse em animais recém-nascidos**

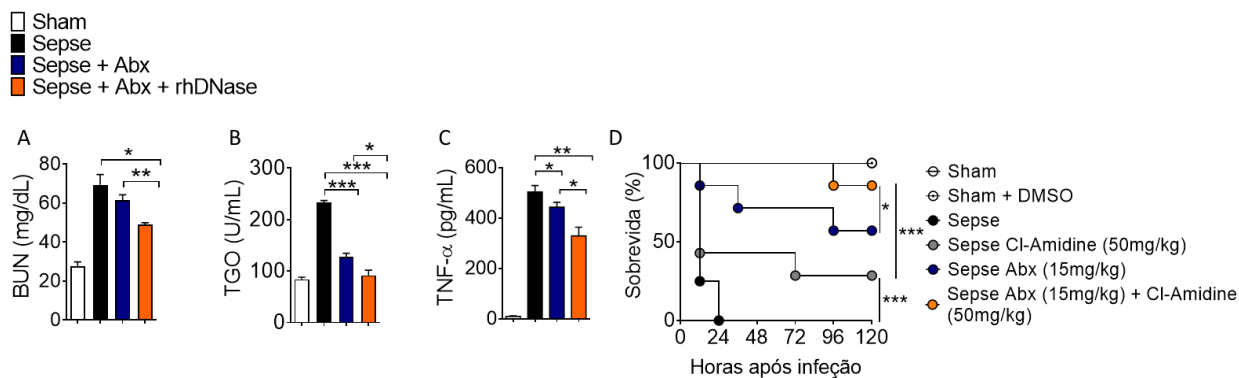
Com o objetivo de transferir nossas observações do modelo de endotóxemia para o modelo experimental de sepse, animais recém-nascidos submetidos a sepse foram tratados com antibiótico (Ertapenem sódico na dose de 15 mg/kg, começando 6 h após indução da sepse e depois cada 12 h por 3 dias) associado ou não a rhDNase. Nós verificamos 100% de mortalidade após 24 h nos animais sépticos não tratados, mas como esperado, os animais tratados com antibiótico apresentaram um significativo incremento na taxa de sobrevivência (aproximadamente 25%). Notavelmente, os sinais clínicos foram menos intensos após o tratamento combinado de antibiótico + rhDNase, manifestando um significativo aumento na taxa de sobrevivência (aproximadamente 55%) quando comparado ao grupo séptico sem antibiótico (**Figura 13A**). Adicionalmente, comparado com o grupo de animais sépticos ou tratados somente com antibiótico, a terapia combinada (antibiótico + rhDNase) esteve associada com a redução nos níveis séricos das NETs, das lesões orgânicas e citocinas pró-inflamatórias (**Figura 13B – C e Figura 14 A-C**). No entanto, a monoterapia com a rhDNase não produziu incremento na taxa de sobrevivência nos animais recém-nascidos (**Figura 13D**).

Desde que a enzima Pad4, é essencial para a NETose (Li *et al.*, 2010), nosso próximo passo foi avaliar o efeito da sua inibição no desfecho da sepse em animais recém-nascidos. Para isto, animais recém-nascidos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico em combinação com a Cl-amidina (inibidor específico da Pad4, 50mg/kg, *i.p.*). Nós verificamos que o tratamento combinado de (antibiótico + Cl-amidina) esteve associado com um significativo incremento da taxa de sobrevivência (aproximadamente 95%) quando comparado ao grupo séptico ou sepse + antibiótico. Em destaque, nós verificamos que a monoterapia com a Cl-amidina esteve associada com o incremento significativo na taxa de sobrevivência nos animais recém-nascidos (aproximadamente 30%) quando comparado ao grupo séptico não tratado

**(Figura 14D).** *Em conjunto, os dados sugerem que o dano orgânico observado nos animais recém-nascidos sépticos está provavelmente associado com o acúmulo de neutrófilos e a elevada produção de NETs nos órgãos.*



**Figura 13. A degradação das NETs ou inibição de sua síntese melhora o desfecho da sepse em animais recém-nascidos.** (A) curva de sobrevivência de animais recém-nascidos submetidos a sepse e tratados com antibiótico (Abx, 15 mg/kg, *i.p.*) ou Abx + rhDNase (10 mg/kg, *s.c.*). (B) concentrações séricas das NETs em animais 6 h após inoculação da sepse, tratados ou não com Abx ou ou Abx + rhDNase. (C) imagens histológicas representativas do fígado de animais recém-nascidos 6 h após inoculação da sepse, tratados ou não com Abx ou ou Abx + rhDNase. As imagens são apresentadas na magnificação 20x e 40x. Barras = 100  $\mu$ m. (D) curva de sobrevivência de animais recém-nascidos submetidos a sepse e tratados com rhDNase (10 mg/kg, *s.c.*). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM, n=5-6 por grupo e são representativos a 2 experimentos. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$  (A e D, Mantel-Cox log-rank test; B, one way-ANOVA, Bonferroni's).



**Figura 14. A degradação das NETs reduz os a disfunção orgânica induzida pela sepse.**

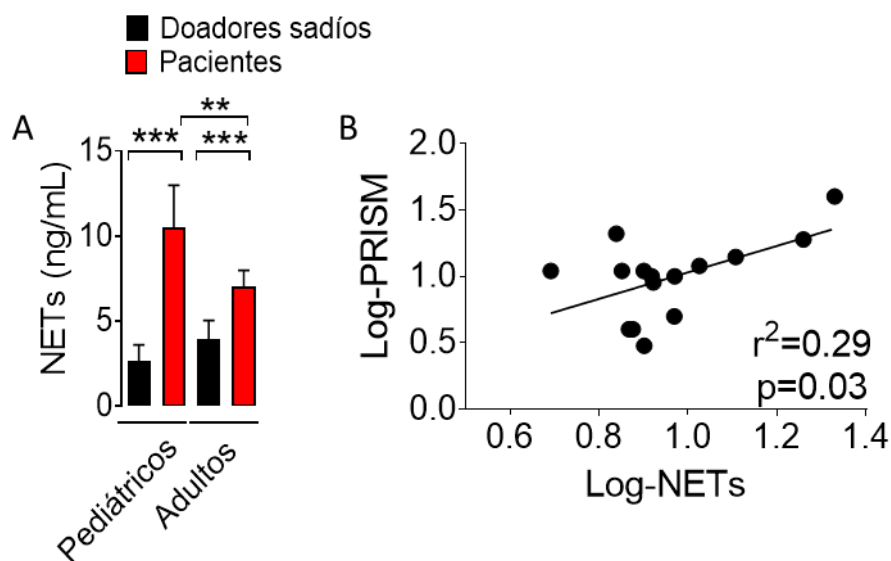
Animais recém-nascidos foram submetidos a sepse e tratados com antibiótico (Abx, 15 mg/kg, *i.p.*) ou Abx + rhDNase (10 mg/kg, *s.c.*). Atividade enzimática do (A) BUN, (B) TGO e os (C) níveis de TNF- $\alpha$  no soro foram verificadas 6 h após indução da sepse. (D) curva de sobrevivência de animais recém-nascidos submetidos a sepse e tratados com antibiótico (Abx, 15 mg/kg, *i.p.*), Cl-Amidine (inibidor da Pad4, 50 mg/kg, *i.p.*) ou Abx + Cl-Amidine. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM, n=5-6 por grupo e são representativos a 2 experimentos. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$  (A – C, one way-ANOVA, Bonferroni's, D, Mantel-Cox log-rank test).

## 4.2 EXPERIMENTOS REALIZADOS COM AMOSTRAS DE PACIENTES

### 4.2.1 *Concentrações séricas das NETs correlacionam-se com a severidade da sepse pediátrica*

Com o intuito de transpor os nossos resultados para humanos, nós avaliamos o perfil de expressão gênica *in silico* de pacientes pediátricos 24 horas após a admissão hospitalar através da análise da base de dados de *microarray* (GEO datasets GSE26378) (Wynn *et al.*, 2011), com foco primário nas assinaturas imunológicas (immuneSigDB). Verificamos o enriquecimento da assinatura gênica similar à da ativação de neutrófilos com LPS, incluindo a *Padi4* (**Figura suplementar 3A & B**). Notavelmente, a expressão da *Padi4* esteve correlacionada com marcadores clássicos de ativação dos neutrófilos, tais como o *S100A9* e a *Il1b* (**Figura suplementar 3C & D**).

Para confirmar os dados *in silico*, amostras de sangue periférico de pacientes pediátricos (n=15) e adultos (n=11) foram coletados 24 h após da admissão hospitalar, com os respectivos controles saudáveis (**Tabela suplementar 2**). Comparado com os controles e com os pacientes adultos, similar ao observado no modelo experimental, pacientes pediátricos apresentaram significativa elevação nos níveis séricos das NETs (**Figura 15A**) assim como na expressão da enzima *Padi4* (**Figura suplementar 3E**). Finalmente, uma correlação positiva foi observada entre os níveis circulantes de NETs e *score* PRISM (**Figura 15B**). *Sugerindo que na fase aguda da sepse, a susceptibilidade dos recém-nascidos está, ao menos em parte, determinada pela alta produção de NETs, potencializado o dano orgânico observado na sepse. Assim, a modulação farmacológica das NETs apresenta-se como uma nova atrativa alternativa terapêutica para o tratamento da sepse pediátrica (Conclusão parcial). No entanto, as consequências crônicas da sepse apresentam-se também como uma importante causa de morte nos indivíduos sobreviventes, portanto, neste momento nosso trabalho abordará as consequências da sobrevivência a sepse em indivíduos recém-nascidos.*



**Figura 15. Concentrações séricas das NETs se correlaciona com a severidade da sepse pediátrica.** Amostras de sangue periférico coletadas de pacientes pediátricos e adultos (n=15 e n=11, respectivamente) 24 h após admissão hospitalar e doadores saudáveis (7 pediátricos e 6 adultos). **(A)** concentrações séricas das NETs em pacientes sépticos (15 pediátricos e 11 adultos) e doadores saudáveis. **(B)** coeficiente de correlação de Spearman entre os níveis séricos de NETs (normalizados como o Log-NETs) e o *score* PRISM (normalizado como o Log-PRISM). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM. \*\* $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$  (A, Kruskal-Wallis unpaired test, B, Spearman correlation).

### 4.3 EXPERIMENTOS REALIZADOS EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE

#### 4.3.1 *Caracterização dos animais recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse*

Com o intuito de investigar os efeitos a longo prazo da sepse na disfunção imune adaptativa, utilizamos o modelo de sepse polimicrobiana letal (90-100% de mortalidade) induzida pela inoculação *i.p.* de bactérias, seguido de tratamento com antibiótico. O protocolo de tratamento com antibiótico nos camundongos sépticos consistiu na administração intraperitoneal de Ertapenem sódico na dose de 30 mg/kg (animais adultos) e 15 mg/kg (animais recém-nascidos). A primeira administração do antibiótico foi realizada seis horas após o início da sepse, sendo o tratamento mantido em intervalos regulares de 12 horas por um período de três dias. Animais sépticos não tratados com antibiótico apresentaram sinais clínicos de letargia, piloereção, secreção ocular, taquipnéia e taquicardia, com 90 a 100% de mortalidade três dias após a infecção. No entanto, os sinais clínicos foram menos intensos após o tratamento com antibiótico (Sepse + Abx). Um significativo aumento na taxa de sobrevivida foi observado em ambos os grupos (aproximadamente 30-40%) (*Figura suplementar 4A*). A melhora na sobrevivida foi associada com a progressiva redução da bacteremia e após 15 dias do tratamento não foram detectadas bactérias no sangue, demonstrando que o tratamento dos animais sépticos com antibiótico controla a infecção (*Figura suplementar 4B*).

Como mencionado anteriormente, a mortalidade na sepse é decorrente, na maior parte das vezes, de lesões teciduais capazes de desencadear falência múltipla de órgãos (Doerschuk, 2001). Uma vez que o tratamento com antibiótico melhora a sobrevivida dos animais por controlar a infecção, nosso próximo objetivo foi avaliar se também ocorre redução de danos orgânicos. Nós verificamos que animais sépticos tratados com antibiótico, apresentaram redução progressiva dos níveis séricos do TGO, atingindo concentrações similares ao observado no plasma dos animais *Sham* no 15º dia após a sepse (*Figura suplementar 4C*) assim como ganho progressivo do peso corporal (*Figura suplementar 4D*). Portanto, em todos os



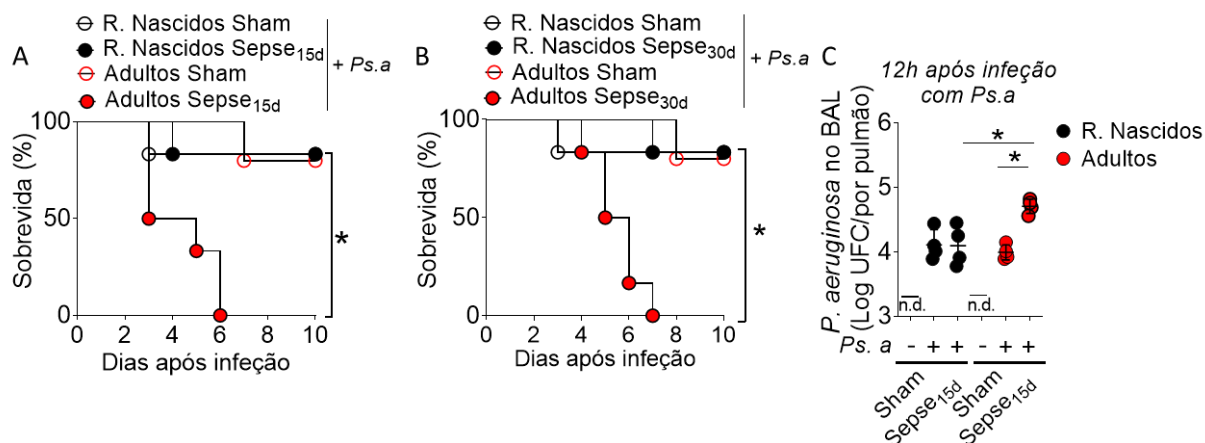
experimentos a seguir, foi utilizado o protocolo de tratamento com antibiótico para estudar as consequências a longo prazo da sepse.

#### **4.3.2 Padronização da infecção pulmonar secundária à sepse com *P. aeruginosa***

A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista adquirido na comunidade e em hospitais, responsável por quadros de pneumonia graves em humanos, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (; Yang *et al.*, 2010). Assim, nós utilizamos este patógeno para estabelecer um modelo de pneumonia em animais recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse e determinar o grau de susceptibilidade à infecção secundária. Para isso, inicialmente padronizamos uma quantidade de bactérias capaz de gerar uma infecção não letal em camundongos *naïves*. Inicialmente, quantificamos a concentração de *P. aeruginosa* por espectrofotometria (**Figura suplementar 5A**) e através da inoculação intranasal em animais *naïves* determinamos a dose subletal, moderada e letal (**Figura suplementar 5B & C**). Nós selecionamos a dose subletal,  $8 \times 10^5$  UFC/40 $\mu$ l e  $2 \times 10^6$  UFC/40 $\mu$ l, para camundongos recém-nascidos e adultos, respectivamente. Nestas doses, 80% dos animais de ambos os grupos sobreviveram. Em seguida, camundongos adultos e recém-nascidos foram submetidos à sepse, e após 15 e 30 dias foram desafiados com a administração de *P. aeruginosa* pela via intranasal.

Consistente com dados do nosso grupo (Nascimento *et al.*, 2010), camundongos adultos sobreviventes à sepse e desafiados nos dias 15 e 30 apresentaram 100% de mortalidade em até seis dias após o desafio. Entretanto, camundongos recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentaram uma marcada resistência ao desafio com *P. aeruginosa*, apresentando uma sobrevivência de 70% até o 10º dia de observação (**Figura 16A & B**). Consistente com a alta resistência à infecção pós-sepse dos camundongos recém-nascidos, não observamos aumento no número de bactérias no lavado broncoalveolar 12 horas após a infecção por *P. aeruginosa*, em contrapartida, animais adultos sobreviventes à sepse apresentaram um aumento significativo da carga bacteriana no lavado broncoalveolar (**Figura 16C**). *Esses dados demonstram que*

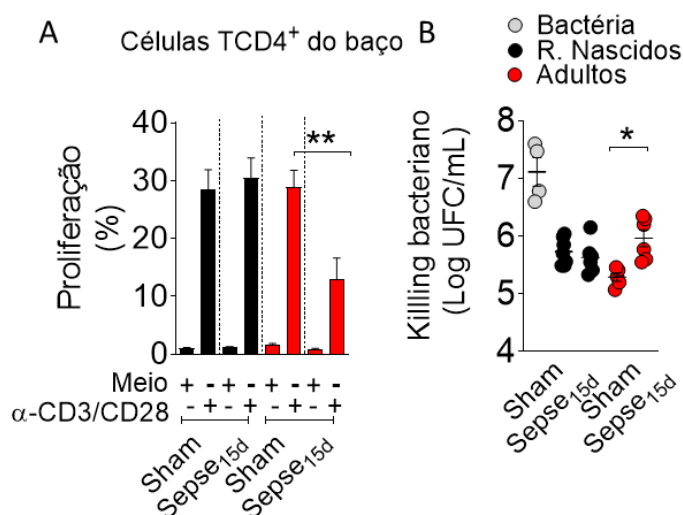
*animais recém-nascidos sobreviventes à sepse são resistentes a infecção secundária induzida pela P. aeruginosa, sugerindo que estes animais não estão imunocomprometidos.*



**Figura 16.** Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse são resistentes à infecção secundária por *Pseudomonas aeruginosa*. Camundongos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. **(A-B)** nos dias 15 e 30 após sepse, os animais recém-nascidos e adultos sobreviventes foram infectados via *i.n.* com  $10^6$  ou  $10^5$  UFCs de *P. aeruginosa* respectivamente. A sobrevivência foi determinada diariamente por um período de 10 dias. **(C)** quantificação da *P. aeruginosa* no lavado broncoalveolar foi avaliada 12 horas após infecção secundária em animais sobreviventes à sepse e nos animais *Sham*. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM,  $n=6-8$  por grupo e são representativos a 3 experimentos. \*  $p<0.05$  (A-B, Mantel-Cox log-rank test, C, one way-ANOVA, Bonferroni's).

### 4.3.3 *Células T CD4<sup>+</sup> de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não exibem disfunção celular inata nem adaptativa*

No intuito de caracterizar a disfunção imune adaptativa e inata nos animais sobreviventes à sepse, a resposta proliferativa das células T CD4<sup>+</sup> foi avaliada 15 dias após a indução da sepse experimental. Assim, as células T CD4<sup>+</sup> isoladas do baço de camundongos adultos e recém-nascidos sobreviventes à sepse foram ativadas *in vitro* na presença de estímulo policlonal (anti-CD3). Verificamos que as células T CD4<sup>+</sup> dos animais recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentaram intensa proliferação após estimulação *in vitro*, efeito oposto ao observado nos adultos (**Figura 17A**). Em seguida, avaliamos o perfil funcional de células apresentadoras de antígeno (APCs) presentes na cavidade peritoneal de ambos os grupos. Para isso macrófagos isolados do peritônio de animais adultos e recém-nascidos sobreviventes à sepse, foram cultivados na presença de bactérias. Observamos que, em contraste com os animais adultos os recém-nascidos pós-sépticos não apresentaram alterações na capacidade de *killing* bacteriano (**Figura 17B**). *Em suma, os dados apresentados demonstram que animais recém-nascidos sobreviventes à sepse são resistentes à infecção secundária e não desenvolvem disfunções inatas e adaptativa.*



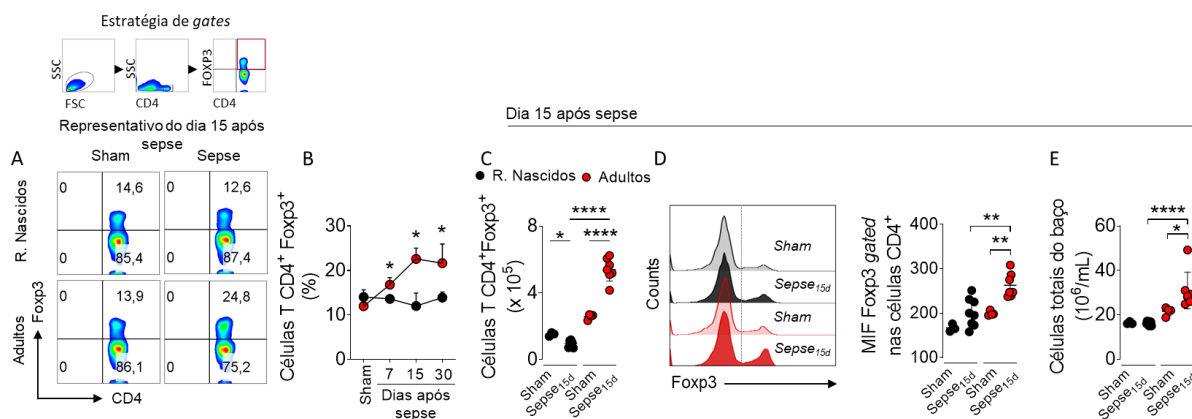
**Figura 17. Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não desenvolvem disfunções celulares.** Camundongos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. No 15º dia após a sepse, **(A)** o baço foi coletado e as células TCD4<sup>+</sup> isoladas e marcadas com 1  $\mu$ M Dye Efluor 670 (eBioscience) por 15 minutos, a 37 °C, lavadas, cultivadas ( $1 \times 10^5$  células por poço) e incubadas com anti-CD3/CD28 (1  $\mu$ g/mL e 1  $\mu$ g/mL, estímulo policlonal), por três dias. **(B)** reciprocamente, os macrófagos da cavidade peritoneal ( $1 \times 10^6$ ), de animais sobreviventes, foram coletados e incubados com bactérias do conteúdo cecal ( $2 \times 10^6$ ) previamente opsonizadas com 10% de soro e incubados por 3 horas a 37°C. Após incubação, as células foram lisadas e semeadas na diluição  $10^{-4}$ . Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM, n=6-8 por grupo e são representativos a 3 experimentos. O *killing* fagocítico como o logaritmo do UFC/mL. \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$  (one way-ANOVA, Bonferroni's).

#### 4.3.4 *Em animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não ocorre expansão de células Tregs*

Considerando a importância das células Tregs no desenvolvimento da imunossupressão em indivíduos adultos sobreviventes à sepse (Benjamim *et al.*, 2003; Cavassani *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2017; Roquilly *et al.*, 2017), o nosso próximo objetivo foi comparar a expansão das células Tregs *in vivo* em animais adultos e recém-nascidos em um curso temporal 7, 15 e 30 dias após a sepse. Foi verificado aumento progressivo na frequência e número absoluto das células Tregs apenas em animais adultos (**Figura 18A – C**). De maneira complementar, identificamos um aumento na expressão do Foxp3 em células CD4<sup>+</sup> assim como o incremento no número total de células no baço dos animais adultos em contraste com os animais recém-nascidos pós-sépticos (**Figura 18D & E**). Ainda, verificamos que a expansão na frequência tanto das células iTregs (células T reguladoras induzidas, CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Neuropilina 1<sup>-</sup>) quanto as nTregs (células T reguladoras naturais, CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Neuropilina 1<sup>+</sup>) ocorre apenas nos animais adultos pós-sépticos (**Figura 19A – C**). Em concordância com a deficiente expansão das células Tregs observada em animais recém-nascidos pós-sépticos, verificamos que células Tregs, T convencionais (T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) e tecido esplênico total de animais recém-nascidos não apresentaram incremento na expressão do gene *foxp3* quando comparados com os adultos (**Figura 19D**). Ainda, verificamos que células TCD4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> de animais recém-nascidos apresentaram acentuada redução da capacidade proliferativa em contraste do observado no grupo *Sham* (**Figura 20A & B**).

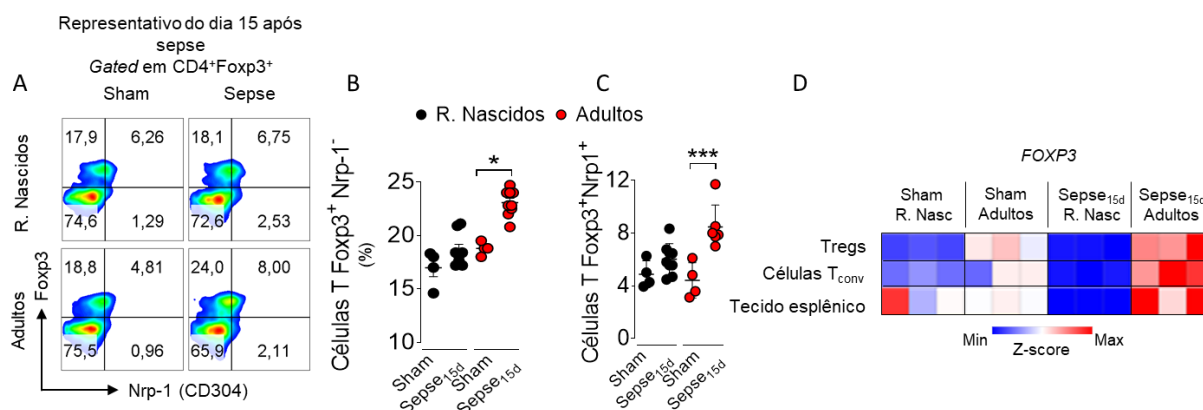
Além do aumento do número de células Tregs, alterações de suas funções podem ser determinantes na geração de quadros de imunossupressão (Cavassani *et al.*, 2010). Portanto, nós decidimos avaliar a capacidade supressora das células Tregs isoladas do baço de camundongos recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse. A partir de ensaios de co-cultura, na proporção de uma célula T efectoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) para cada 4 células Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>),

demonstramos que a capacidade supressora das células Tregs de animais recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse não difere (**Figura 21**). Ressalta-se que neste experimento foram utilizadas uma população purificada de células efetoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), condição experimental que é diferente daquela apresentada previamente na Figura 18A, na qual foi utilizado um *pool* de células T CD4 (CD4 efetora e células Tregs). *Esses dados sugerem que a deficiente expansão e proliferação das células Tregs em camundongos recém-nascidos pode estar associada à resistência ao desenvolvimento da imunossupressão pós-sepse nesse grupo de animais.*

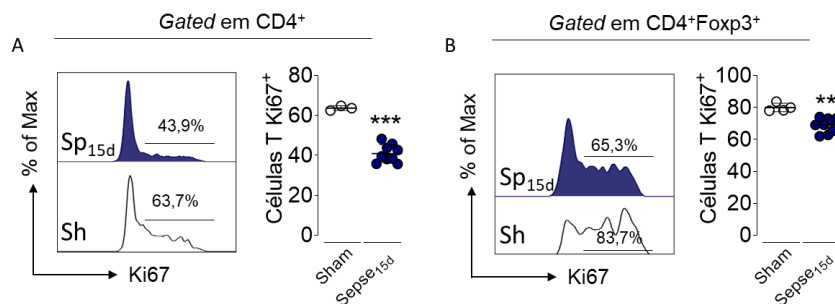


**Figura 18. Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam expansão das células TCD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Tregs).** Camundongos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. No dia 7, 15 e 30 após a sepse, os animais recém-nascidos e adultos foram eutanasiados e o baço foi coletado para avaliar a frequência das células Tregs por FACS. **(A)** estratégia de *gates* e *flow plots* representativos (referente ao dia 15), **(B)** frequência de células Tregs 7, 15 e 30 dias após sepse, **(C)** número absoluto de células Tregs (referente ao dia 15), **(D)** *histograma plots* comparando a expressão do Foxp3 pelo MFI (do inglês, *Mean Fluorescence Intensity*) (referente ao dia 15) nas células CD4<sup>+</sup> avaliada por FACS e **(E)** número de células esplênicas (referente ao dia 15) em animais sobreviventes à sepse. Os resultados são apresentados como a média ± DPM, n=4-8 por grupo. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 e \*\*\* *p*<0.001 (B, t-test; C-E, one way-ANOVA, Bonferroni's).

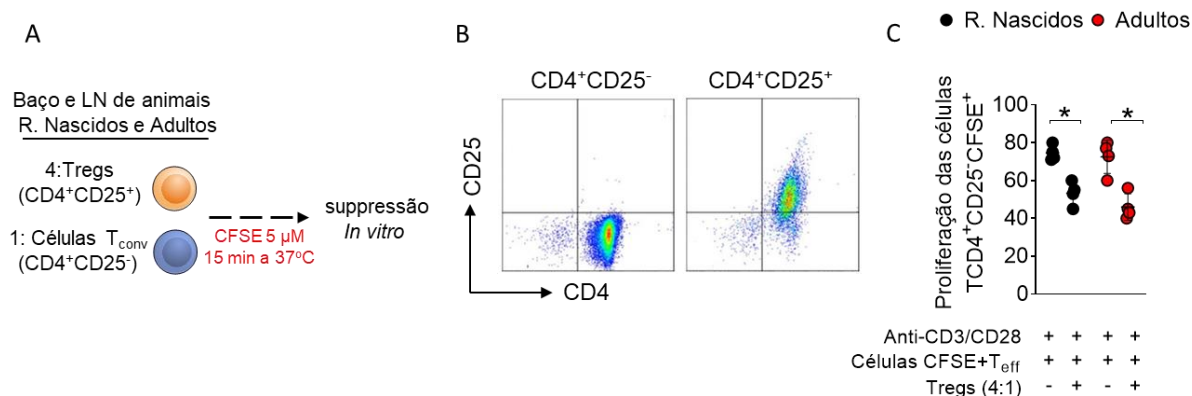




**Figura 19. Animais recém-nascidos pós-sépticos não apresentam expansão das células Tregs induzidas e naturais.** Animais submetidos à sepsis foram tratados com antibiótico por três dias. No dia 15 após a sepsis, os animais recém-nascidos e adultos foram eutanasiados, o baço foi coletado e a frequência das células Tregs naturais e induzidas foram determinadas através da marcação com Neuropilina-1 (NRP1). **(A)** *flow plots* representativos e frequência das células Tregs: **(B)** Tregs induzidas e **(C)** Tregs naturais do baço de animais recém-nascidos e adultos após sepsis avaliadas por FACS. Expressão de mRNA do **(D)** *Foxp3* nas células Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), T convencionais (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) e homogeneizado de baço de animais sobreviventes à sepsis. Os resultados são apresentados como a média ± DPM, n=4-8 por grupo ou *heat map* normalizado pelo Z-score **(D)**. \*\*\*  $p < 0.001$  (B-C, one way-ANOVA, Bonferroni's).



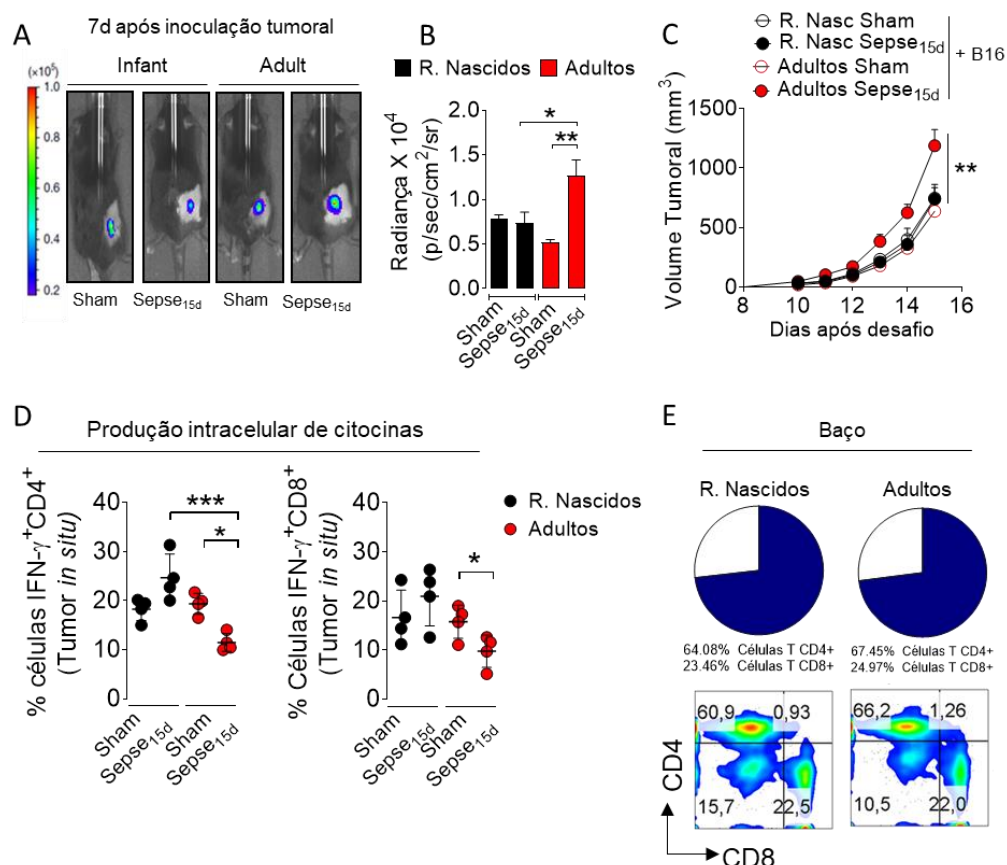
**Figura 20.** As células Tregs de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentam **redução na capacidade proliferativa**. Camundongos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. No dia 15 após a sepse, os animais recém-nascidos e adultos foram eutanasiados, o baço foi coletado e a proliferação das células TCD4<sup>+</sup> e Tregs foi determinada através do marcador de proliferação celular Ki67. *Histograma plots* e frequência de células Ki67<sup>+</sup> no dia 15 após sepse foi avaliada por FACS nas células CD4<sup>+</sup> (A) e CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (B). Os resultados são apresentados como a média ± DPM, n=4-8 por grupo. \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  (t-test)



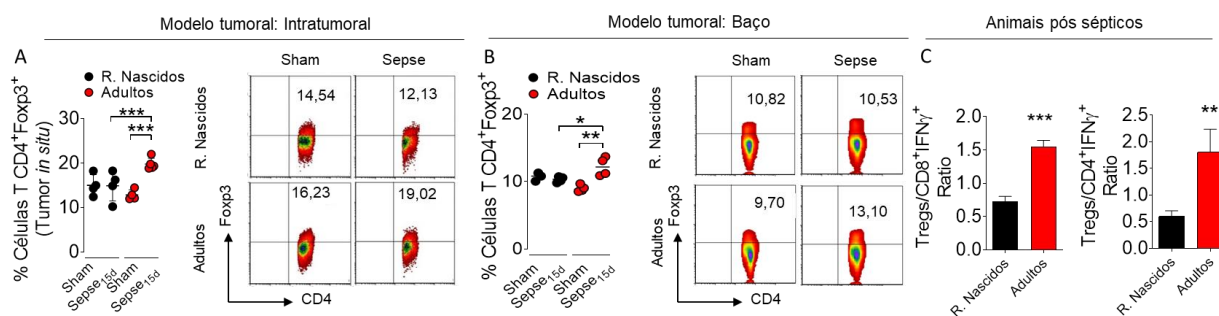
**Figura 21. Capacidade funcional das células Tregs é similar em animais adultos e recém-nascidos sobreviventes à sepse.** Camundongos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. No dia 15 após a sepse, os animais recém-nascidos e adultos sobreviventes foram eutanasiados e as células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Tregs) e TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (T<sub>eff</sub>) foram isoladas do baço e marcadas com 1  $\mu$ M Dye Efluor 670 e posteriormente cultivadas na presença de anti-CD3/28 (1 $\mu$ g/mL e 1 $\mu$ g/mL, respectivamente), por 72 h. **(A)** representação experimental, *flow plots* representativos do isolamento das células T efectoras e Tregs **(B)** e porcentagem de proliferação das células T efectoras **(C)**. Os resultados são apresentados como a media  $\pm$  DPM, n=6-8 por grupo e são representativos a 3 experimentos. \* $p$ <0.05. (A, t-test).

#### **4.3.5 Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse possuem menor crescimento tumoral**

Com o intuito de confirmar nossos achados utilizamos o modelo de tumor baseando-se no reconhecido envolvimento das células Tregs para a progressão tumoral (Kim *et al.*, 2006; Cavassani *et al.*, 2010). Para isso, animais adultos e recém-nascidos sobreviventes à sepse foram injetados com  $5,0 \times 10^4$  células de B16Luc (*s.c.*) e o crescimento tumoral foi monitorado por 15 dias. Os camundongos adultos sobreviventes à sepse apresentaram marcado crescimento tumoral, contudo, os recém-nascidos, apresentaram menor crescimento tumoral (**Figuras 22A – C**). Adicionalmente, nós verificamos uma reduzida frequência de subtipos celulares essenciais para o controle do crescimento tumoral (T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ ) (Beatty e Paterson, 2001; Casares *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007) (**Figura 22D**) nos animais adultos quando comparado com os recém-nascidos. Ainda, essa diminuição não foi devido a diferenças na frequência das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> baço (**Figura 22E**). De maneira complementar, nós verificamos um aumento significativo na frequência das células Tregs tanto no microambiente tumoral como no baço de animais adultos (**Figuras 23A & B**). Finalmente, o menor crescimento tumoral em animais recém-nascidos pós-sépticos foi associado a um aumento da imunidade antitumoral mediada pela redução da razão de células Tregs/CD8 IFN<sup>+</sup> e Tregs/CD4 IFN<sup>+</sup> no microambiente tumoral (**Figuras 23C**). *Coletivamente, esses dados demonstram que animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam comprometimento da resposta imune.*



**Figura 22. Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentaram menor crescimento tumoral.** Camundongos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. No dia 15 após a sepse, os animais sobreviventes foram submetidos a injeção de  $5 \times 10^4$  células de B16LucF10 (s.c). **(A)** densidade tumoral avaliada pelo IVIS e radiança **(B)** em camundongos recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse. **(C)** Avaliação do crescimento tumoral foi realizada com paquímetro. **(D)** frequência das células TCD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> no microambiente tumoral foram avaliadas por FACS. **(E)** frequência de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> no baço avaliada 15 dias após a sepse. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM, n=6-8 por grupo e são representativos a 3 experimentos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  (B-D, one way-ANOVA, Bonferroni's).



**Figura 23. Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam alteração na imuno-vigilância tumoral.** Camundongos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. No dia 15 após transplante tumoral, a frequência de células Tregs no tumor (A) e no baço (B) foram avaliadas por FACS. (C) Razão células Tregs/CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> e Tregs/CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> em animais sobreviventes a sepse. Os resultados são apresentados como a media  $\pm$  DPM, n=6-8 por grupo e são representativos a 3 experimentos. \*\* $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$  (A-B, one way-ANOVA, Bonferroni's; C, t-test).

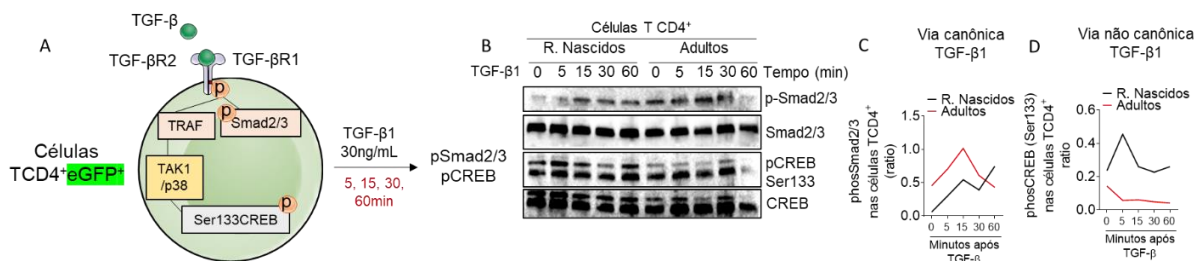
#### 4.3.6 *Diferenciação in vitro das células Tregs ocorre de maneira independente da idade*

Com a finalidade de investigar os mecanismos moleculares pelos quais camundongos recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentam deficiente expansão de células Tregs e consequentemente resistência ao desenvolvimento de imunossupressão, avaliamos as vias intracelulares envolvidas na ativação do receptor TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ R1/2), a capacidade de diferenciação *in vitro* e a expressão de genes essenciais para a diferenciação e ativação das células Tregs de animais adultos e recém-nascidos. Para isso, células CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>-</sup> foram isoladas do baço de animais DEREK (do inglês, *Depletion of Regulatory T cells mice*), no qual o Foxp3 está fusionado com o eGFP (*enhanced green fluorescent protein*), e em seguida foram estimuladas com TGF- $\beta$ 1 (30ng/mL). A cinética de fosforilação do SMAD2/3 e fator de transcrição CREB foi avaliada. Nestas condições, verificamos que a estimulação com o TGF- $\beta$ 1 levou à rápida fosforilação da Smad2/3 (p-Smad2/3) em ambos os grupos, sendo mais acentuada nas células CD4<sup>+</sup> Foxp3GFP<sup>-</sup> oriundas de animais adultos. De maneira complementar, identificamos que a estimulação com TGF- $\beta$ 1 levou à ativação da via não-canônica do receptor de TGF- $\beta$ , evidenciada pela acentuada fosforilação do complexo CREB/ATF (pCREB) (Derynck e Zhang, 2003), nas células CD4<sup>+</sup> Foxp3GFP<sup>-</sup> oriundas de animais recém-nascidos (**Figura 24**).

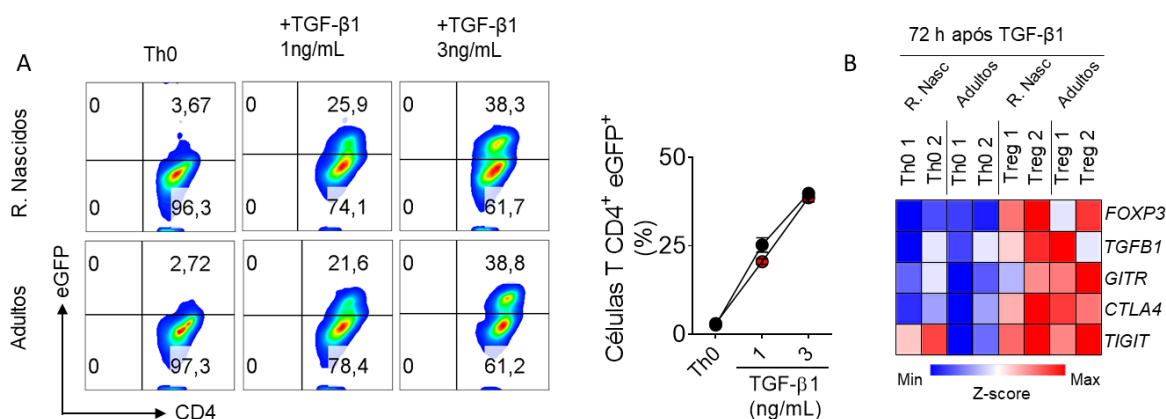
Em seguida, avaliamos as consequências da ativação diferencial da via TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$ R/Smad2/3/CREB/ATF observada nas células CD4<sup>+</sup> isoladas de camundongos recém-nascidos e adultos na diferenciação *in vitro* para o perfil T regulador. Para isso, células CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>-</sup> de animais DEREK recém-nascidos e adultos foram diferenciadas na presença de concentrações crescentes de TGF- $\beta$ 1. Nós verificamos que a diferenciação para o perfil regulador foi semelhante em ambos os grupos (**Figura 25A**). Ainda, por meio de ensaios de expressão gênica não foi observado diferenças no perfil de expressão de genes essenciais para a diferenciação e ativação das células Tregs (*Foxp3*, *Tgfb1*, *Gitr*, *Ctla4* e *Tigit*) entre os

grupos (**Figura 25B**). Dessa forma, apesar de nos experimentos realizados *in vivo* termos identificado uma redução na expansão das células Tregs em recém-nascidos pós-sépticos, *in vitro* constatamos que a resposta à estímulos de diferenciação estão preservados nas células TCD4<sup>+</sup> desses animais. Está aparente contradição, indica que a resistência a imunossupressão observada em recém-nascidos não ocorre devido a um comprometimento da diferenciação de células Tregs, sugerindo o envolvimento de outros mecanismos tais como o comprometimento na manutenção da estabilidade do Foxp3.





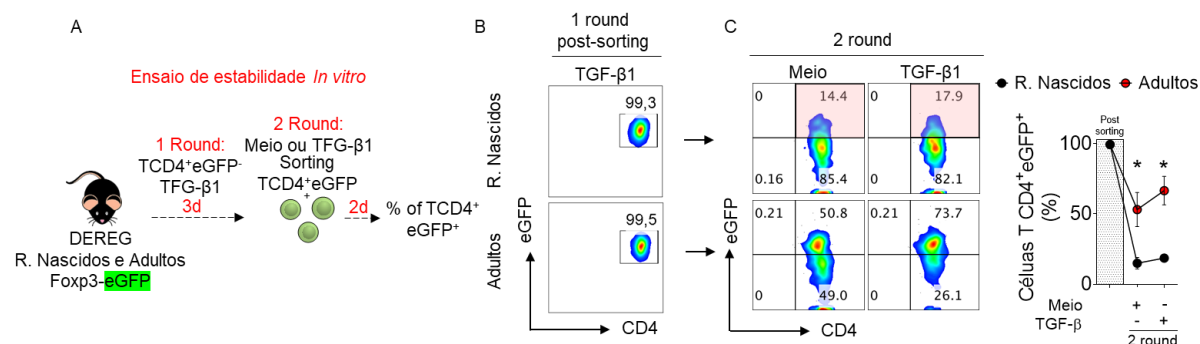
**Figura 24. TGF- $\beta$ 1 ativa a via canônica e não-canônica em células T CD4<sup>+</sup> de animais recém-nascidos.** (A) o baço de animais DEREK (Foxp3-DTR/EGFP) recém-nascidos e adultos foi coletado e as células CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>-</sup> foram isoladas e colocadas em *resting* por 6 horas. Após este tempo, as células foram estimuladas com TGF- $\beta$ 1 (30 ng/mL) nos tempos indicados. (B, C) *immunoblot* representativo da expressão da SMAD2/3 fosforilada (p-SMAD2/3), SMAD2/3 total, CREB/ATF1 fosforilada (pCREB/ATF) e CREB/ATF1 total em lisados de células TCD4<sup>+</sup>eGFP<sup>-</sup> após estimulação com TGF- $\beta$ 1.



**Figura 25. Células TCD4<sup>+</sup> de animais recém-nascidos não apresentam alterações na diferenciação para o perfil T regulador.** O baço de animais DEREK (Foxp3-DTR/EGFP) recém-nascidos e adultos foi coletado e as células CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>-</sup> foram isoladas e diferenciadas na presença de anti-CD3/CD28 (1μg/mL e 1μg/mL, respectivamente) e TGF-β1 (1, 3 ng/mL) por 3 dias a 37°C. **(B)** *flow plots* representativos e frequência de células CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>+</sup>. Expressão de genes essenciais para a diferenciação e ativação das células Tregs, **(A)** *Foxp3*, **(B)** *Tgfb1*, **(C)** *Gitr*, **(D)** *Ctla4* e **(E)** *Tigit* avaliada nos tempos indicados foi determinada por qPCR e apresentada como *heat map* normalizado pelo Z-score. \**p*<0.05 (t-test).

#### **4.3.7 Animais recém-nascidos apresentam menor manutenção da estabilidade das células Tregs *in vitro***

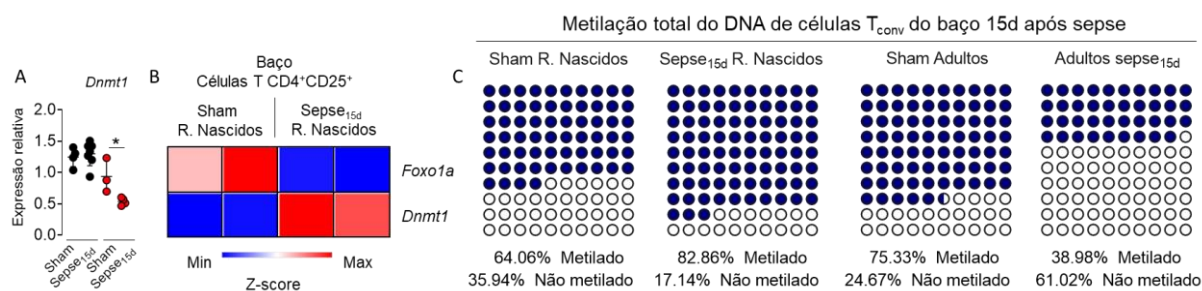
Em um contexto inflamatório, a funcionalidade de células Tregs depende tanto dos seus mecanismos supressores, quanto do número de células mantidas no local (Da Silva Martins e Piccirillo, 2012), no entanto, muitos fatores podem alterar o número de Tregs no local de resposta como, a capacidade de diferenciação deste perfil celular a partir de células T *naïve*, a capacidade migratória destas células, a resistência à morte celular e a estabilidade da expressão do Foxp3 (Li *et al.*, 2015). Os dados anteriores sugerem que a resistência a imunossupressão observada em recém-nascidos não ocorre devido a um comprometimento da diferenciação de células Tregs. Neste sentido, o nosso seguinte objetivo foi investigar a estabilidade das células Tregs por meio da manutenção da expressão do Foxp3. Para isso, células TCD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>-</sup> oriundas de animais DREG recém-nascidos e adultos foram diferenciadas em células Tregs *in vitro*. Após 3 dias, o mesmo número de células com expressão estável de Foxp3 (CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>+</sup>) de ambos os grupos (~100%) foram isoladas e novamente estimuladas com anti-CD3/CD28 mais TGF- $\beta$  ou meio. Após 48 horas do segundo estímulo a frequência de células que expressavam estavelmente o Foxp3 (CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>+</sup>) foi analisada por citometria de fluxo (**Figura 26 A & B**). Nessas condições, verificamos que após o primeiro estímulo cerca de 50% das células Tregs do grupo adulto mantiveram a expressão estável do Foxp3 enquanto que somente 14,4% das Tregs oriundas de recém-nascidos mantiveram esse fenótipo. Além disso, apenas as células dos animais adultos responderam a um segundo estímulo com TGF- $\beta$  aumentando a frequência de células (CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>+</sup>), 73,7% Treg animais adultos vs. 17,9% Tregs animais recém-nascidos (**Figura 26C**). *Estes dados sugerem que as células Tregs de animais recém-nascidos apresentam menor manutenção da estabilidade do Foxp3 e possivelmente esse fenômeno poderia contribuir para a resistência a imunossupressão pós-sepse observada em camundongos recém-nascidos.*



**Figura 26. Animais recém-nascidos apresentam menor manutenção da estabilidade das células Tregs *in vitro*.** (A) O baço de animais DEREG (Foxp3-DTR/EGFP) recém-nascidos e adultos foi coletado e as células CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>-</sup> foram isoladas e diferenciadas na presença de anti-CD3/CD28 (1μg/mL e 1μg/mL, respectivamente) e TGF-β1 (1ng/mL). Após 3 dias, as células com expressão estável de Foxp3 (CD4<sup>+</sup>Foxp3GFP<sup>+</sup>) foram isoladas de ambos os grupos e estimuladas com anti-CD3/CD28 (1μg/mL) mais TGF-β1 ou meio de cultura; (B) *Flow pots* representativos após *sorting* das células CD4<sup>+</sup>eGFP<sup>+</sup>; (C) *flow pots* representativos e frequência de células CD4<sup>+</sup>eGFP<sup>+</sup> avaliada por FACS. \**p*<0.05 (one way-ANOVA, Bonferroni's).

#### 4.3.8 *Incremento na metilação total do DNA nas células T convencionais de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse*

A diferenciação das células T CD4 para o perfil T regulador é finamente regulada tanto por eventos moleculares como epigenéticos. Especificamente, a expressão do Foxp3 é estabilizada pela hipometilação das ilhas CpG nas Sequências não-codificantes conservadas do tipo 2 (do inglês, *Conserved noncoding sequences 2, CNS2*) no locus de Foxp3, também conhecidas como TSDR (do inglês, *Treg-specific demethylated region*) (Feng *et al.*, 2014) (Zheng *et al.*, 2010; Ohkura *et al.*, 2013); processo controlado pelas proteínas do grupo Foxo1a e Tet (do inglês, *ten-eleven translocation proteins*). Ao passo que a regulação negativa da expressão e estabilidade do Foxp3 é controlada pela proteína Dnmt1 (do inglês, *DNA methyltransferases*) (Lee e Lee, 2018). Portanto, nós decidimos avaliar a expressão dos genes *Dnmt1* e *Foxo1a* em animais recém-nascidos sobreviventes à sepse. Foi observado que, em contraste com os adultos, animais recém-nascidos não apresentam mudanças na expressão da *Dnmt1* no tecido esplênico (**Figura 27A**), no entanto quando comparados com o grupo *Sham*, células Tregs isoladas do baço de animais sobreviventes apresentaram significativo incremento na expressão do gene *Dnmt1* associado com a redução na expressão do gene *Foxo1a* (**Figura 27B**). Em concordância com o incremento na expressão do gene *Dnmt1* nas células Tregs, verificamos o incremento na assinatura de metilação total do DNA nas T convencionais (T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) oriundas de animais recém-nascidos pós-sépticos quando comparados com os adultos (**Figura 27C**). *Estes dados sugerem que eventos epigenéticos podem estar envolvidos na menor estabilidade na expressão do Foxp3 assim como na não expansão das células Tregs nos animais recém-nascidos após sepse.*



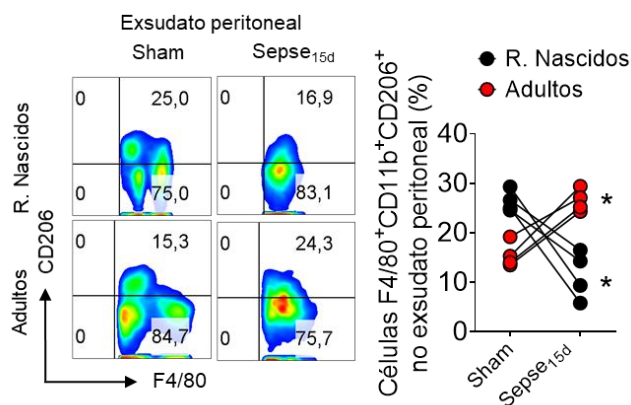
**Figura 27. Células T convencionais (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentam incremento no perfil de metilação total do DNA.** Camundongos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. No dia 15 após a sepse, os animais recém-nascidos e adultos foram eutanasiados e o baço e as células Tregs esplênicas foram isoladas para avaliar a expressão dos genes *Dnmt1* e *Foxo1a*. **(A)** expressão de mRNA de *Dnmt1* no baço e **(B)** expressão de mRNA de *Dnmt1* e *Foxo1a* nas células Tregs determinada por qPCR. Paralelamente, no dia 15 após a sepse, as células T convencionais (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) foram isoladas do baço para avaliar o perfil total de metilação do DNA **(C)** (*vide* Materiais e Métodos 3.14.10). Os resultados são apresentados como % de DNA metilado e não metilado, n=3-8 por grupo. \**p*<0.05 (one way-ANOVA, Bonferroni's).

#### 4.3.9 *Os macrófagos de animais recém-nascidos sobreviventes não são polarizados para o perfil M2 in vivo*

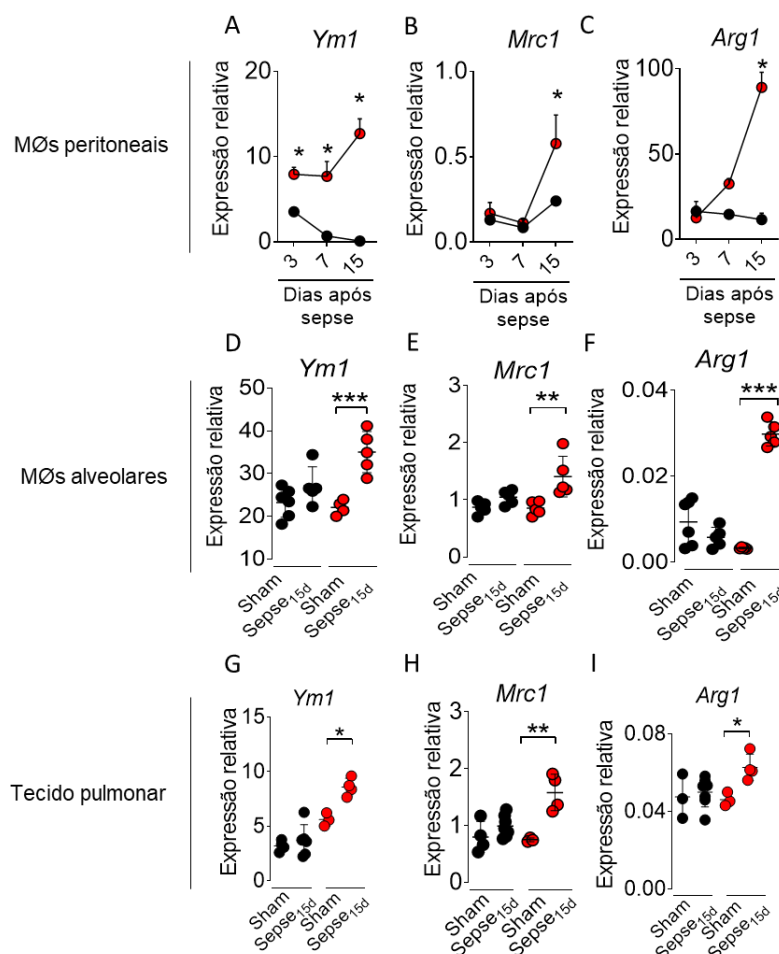
Macrófagos do tipo M2 participam do processo de imunossupressão induzindo a diferenciação de células Tregs no microambiente tumoral e em outras patologias (Cao *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2017). Dessa forma, nós decidimos investigar o efeito da sepse sobre a polarização de macrófagos em recém-nascidos. Foi verificado que animais recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentam baixa frequência dos macrófagos M2 (F4/80<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>) na cavidade peritoneal em contraste aos animais adultos (**Figura 28**). A literatura reporta a coexistência de dois tipos de macrófagos na cavidade peritoneal: os macrófagos peritoneais grandes (LPM, *large peritoneal macrophages*), os quais expressam altos níveis do receptor F4/80 e do MHC-II (*Major Histocompatibility Complex*), correspondendo ao subtipo mais abundante encontrado em condições homeostáticas e os macrófagos peritoneais pequenos (SPM, *small peritoneal macrophages*) os quais apresentam o fenótipo F4/80<sup>low</sup>MHC-II<sup>high</sup> e são gerados a partir de precursores mieloides derivados da medula óssea (Ghosn *et al.*, 2010; Cassado Ados *et al.*, 2015). Neste sentido, nós avaliamos a frequência do marcador CD206 nos subtipos de macrófagos presentes na cavidade peritoneal de camundongos recém-nascidos 15 e 30 dias após a indução da sepse. Identificamos que 15 dias após indução da sepse, ocorre uma acentuada alteração na composição celular da cavidade peritoneal, de fato foi observada uma redução na população de LPMs (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>hi</sup>), mas por outro lado foi identificado um aumento na frequência de SPMs (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>lo</sup>) que passou a ser a população prevalente na cavidade peritoneal aos 15 pós-sepse. No entanto, 30 dias após sepse esse padrão foi invertido e a prevalência de células LPMs foi observada nos animais recém-nascidos pós-sépticos (**Figura suplementar 6**). Vale ressaltar que animais recém-nascidos pós-sépticos apresentaram acentuada redução do marcador CD206<sup>+</sup> nos SMP, e esse fenótipo foi mantido até 30 dias após indução da sepse (**Figura suplementar 7**).

Em seguida, o tecido pulmonar e os macrófagos oriundos do lavado broncoalveolar e peritoneal de animais recém-nascidos e adultos pós-sépticos foram coletados e a expressão gênica de marcadores associados ao perfil de macrófagos M2, *Ym1* (codificando a proteína chitinase-like), *Mrc1* (codificando a o receptor de manose, CD206) e a *Arg1* (codificando a arginase-1), foram avaliados. Verificamos um aumento progressivo na expressão de marcadores M2 nos macrófagos isolados do exsudado peritoneal de animais adultos 3, 7 e 15 dias após a sepse. No entanto, em contraste com o grupo adulto, os animais recém-nascidos apresentaram diminuição progressiva na expressão de marcadores M2 no exsudado peritoneal 3, 7 e 15 dias após a sepse (**Figura 29A - C**). Ainda, nós observamos um aumento significativo na expressão de *Ym1*, *Mrc1* e *Arg1* nos macrófagos alveolares (**Figura 29D - F**) e no homogeneizado pulmonar de animais adultos sobreviventes á sepse (**Figura 29G - I**). Contudo, os animais recém-nascidos não apresentaram mudanças significativas na expressão de marcadores do perfil M2 no tecido pulmonar total e nos macrófagos alveolares (**Figura 29D - I**). *Coletivamente, estes resultados sugerem que a resistência ao desenvolvimento da imunossupressão induzida pela sepse em animais recém-nascidos pode estar relacionada, em parte, a reduzida expansão de macrófagos M2.*





**Figura 28. Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam expansão dos macrófagos do perfil M2.** Camundongos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. No dia 15 após a sepse, os animais recém-nascidos e adultos foram eutanasiados e o lavado peritoneal foi coletado para avaliar a frequência das células F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> (Macrófagos do perfil M2) por FACS. *Flow plots* representativos e frequência de macrófagos do perfil M2. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM, n=4-8 por grupo. \* $p < 0.05$  (one way-ANOVA, Bonferroni's).

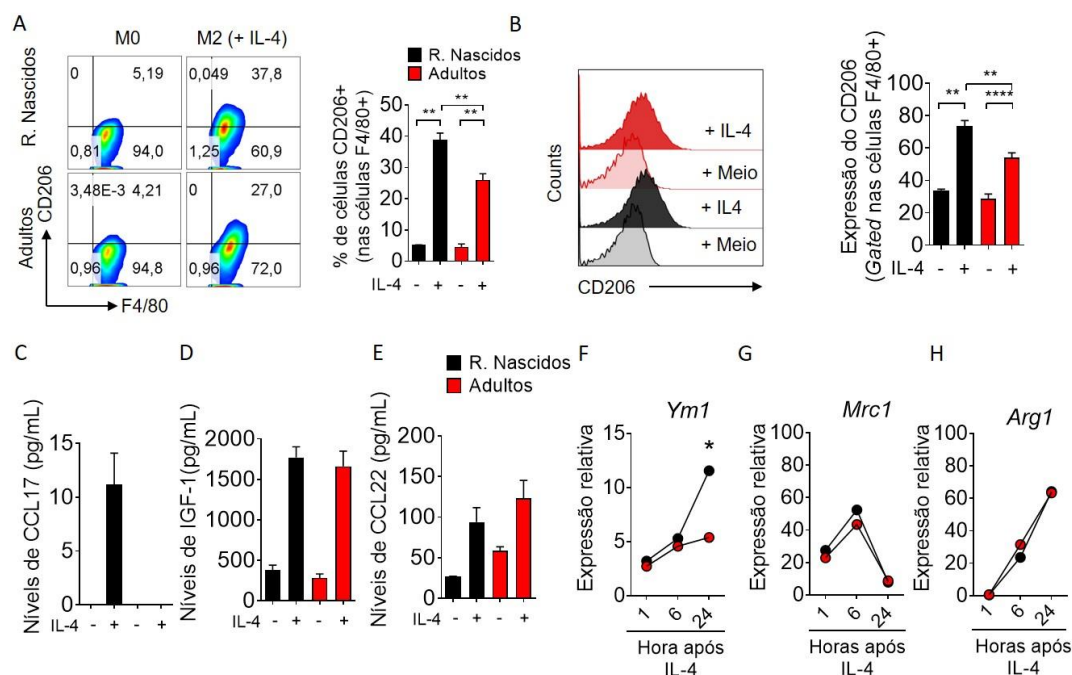


**Figura 29. Macrófagos peritoneais de animais recém-nascidos pós-sépticos não apresentam incremento de marcadores do perfil M2.** Camundongos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. No dia 15 após a sepse, os animais recém-nascidos e adultos foram eutanasiados e o exsudado peritoneal foi coletado. Após 30min de incubação a 37°C, os macrófagos peritoneais (células aderentes) foram coletados e a expressão gênica de marcadores do perfil M2 foi avaliada. Expressão de mRNA de (A) *Ym1*, (B) *Mrc1* e (C) *Arg1* nos macrófagos peritoneais foi determinada por qPCR. Animais recém-nascidos e adultos sobreviventes foram eutanasiados e o lavado bronco-alveolar foi coletado. Após 30min de incubação a 37°C, os macrófagos alveolares (células aderentes) foram coletados e a expressão gênica de marcadores do perfil M2 foi avaliada. Expressão de mRNA de (D) *Ym1*, (E) *Mrc1* e (F) *Arg1* nos macrófagos alveolares foi determinada por qPCR. Reciprocamente, no dia 15 após a sepse, o pulmão de animais sobreviventes à sepse foram eutanasiados foi coletado para avaliar a expressão de mRNA de (A) *Ym1*, (B) *Mrc1* e (C) *Arg1* no tecido pulmonar foi determinada por qPCR. Os resultados são apresentados como a média ± DPM, n=3-8 por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  (A, B e C t-test; D – I, one way-ANOVA, Bonferroni's).

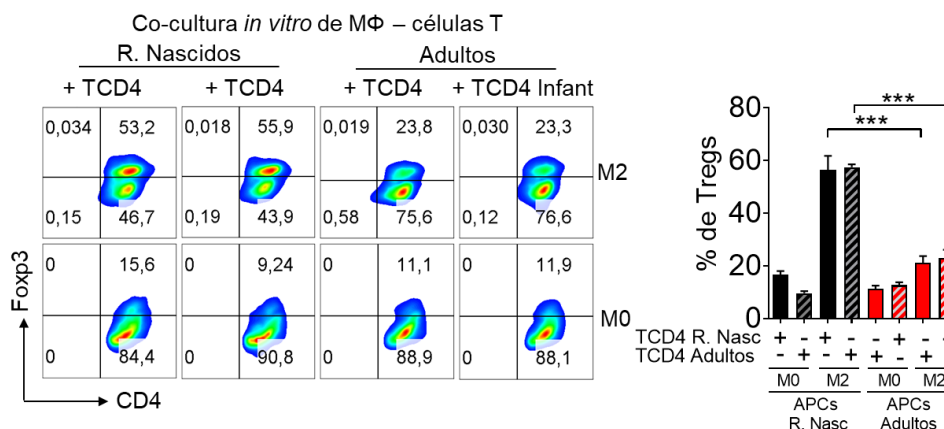
#### 4.3.10 Polarização *in vitro* dos macrófagos M2 ocorre de maneira independente da idade

Com o intuito de entender os mecanismos envolvidos na polarização de macrófagos em animais recém-nascidos sobreviventes a sepse, macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) foram cultivados na presença de IL-4 (M2) ou meio RPMI (M0) por 48h. Nos verificamos que macrófagos de animais recém-nascidos estimulados com IL-4 não possuem comprometimento para a polarização para o perfil M2 (F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>) (**Figura 30 A & B**). Ainda, foi verificado que macrófagos de animais infantis estimulados com IL-4 apresentaram incremento tanto na produção de mediadores (CCL17, IGF-1 e CCL22) como na expressão dos marcadores do perfil de macrófagos M2 (*Ym1*, *Mrc1* e a *Arg1*) em níveis proporcionais aos macrófagos polarizados a partir de células obtidas de animais adultos (**Figura 30 C – H**).

Em seguida, considerando que macrófagos M2 são importantes para diferenciação de células Tregs (Cao *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2017), nós realizamos um ensaio de co-cultura. Para isto, BMDMs de animais *naïves* (macrófagos M0) foram polarizados para M2 (IL-4) e co-cultivados com células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> *naïves* de animais adultos ou de recém-nascidos na presença de IL-2 e anti-CD3. Verificamos que, em contraste com os macrófagos M2 de animais adultos, as células de animais recém-nascidos induziram um aumento na percentagem de células Tregs (**Figura 31**). *Estes resultados sugerem que a polarização e função de macrófagos M2 de animais recém-nascidos não estava comprometida.*



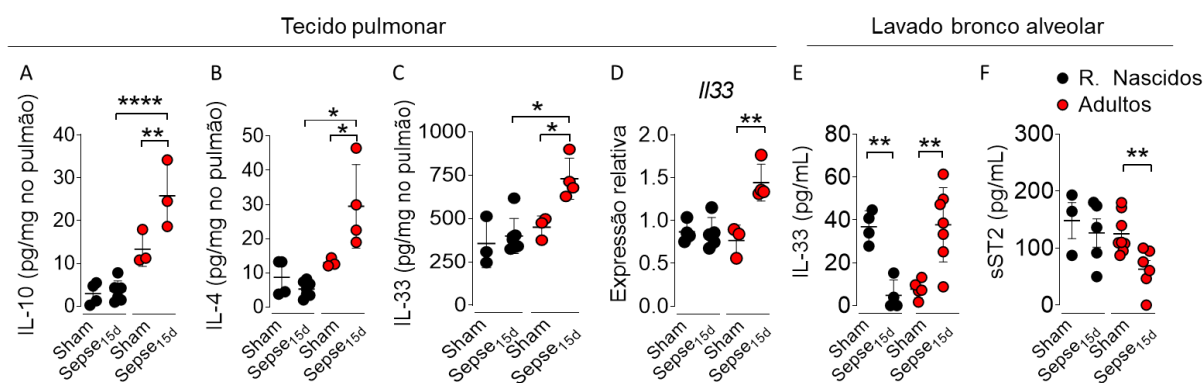
**Figura 30. Macrófagos de animais recém-nascidos não apresentam comprometimento na polarização para o perfil M2 *in vitro*.** Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) de animais recém-nascidos e adultos foram cultivados por 48h com IL-4 (M2) ou meio (M0). (A) *Flow pots* representativos e frequência de células CD206<sup>+</sup> dentro das células F4/80<sup>+</sup> e (B) quantificação e *histograma plots* comparando a expressão do receptor CD206 pelo MFI nos BMDM F4/80<sup>+</sup> incubados após 48h de estimulação como IL-4. Quantificação de marcadores M2 no sobrenadante da cultura (C) CCL17, (D) IGF-1 e (E) CCL22) por ELISA 48h após estimulação com IL-4. Reciprocamente, macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) de animais recém-nascidos e adultos foram cultivados por 48h com IL-4 (M2) ou meio (M0). Expressão de marcadores M2, (F) *Ym1*, (G) *Mrc1* e (H) *Arg1*, avaliada nos tempos indicados foi determinada por qPCR após estimulação com IL-4. Os resultados são apresentados como a media ± DPM, n=3 por grupo e são representativos a 3 experimentos. \*\**p*<0.01 (one way-ANOVA, Bonferroni's).



**Figura 31. Macrófagos M2 de animais recém-nascidos não apresentam comprometimento na capacidade funcional *in vitro*.** BMDM foram cultivados por 48h com IL-4 (M2) ou meio (M0). Células T efetoras TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (T<sub>eff</sub>) isoladas do baço de animais recém-nascidos e adultos foram depois cultivadas com M0 ou M2 na presença de IL-2 e anticorpo anti-CD3 por 96h. A frequência de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> foi analisada por FACS. Os resultados são apresentados como a media ± DPM, n=3 por grupo e são representativos a 3 experimentos. \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (one way-ANOVA, Bonferroni's).

#### **4.3.11 Níveis da IL-33 e marcadores de macrófagos polarizados para o perfil M2 não são alterados em animais recém-nascidos sobreviventes à sepse**

Recentemente nós demonstramos o papel importante do eixo IL-33/macrófagos M2/Treg no estabelecimento da imunossupressão após a sepse em animais adultos (Nascimento *et al.*, 2017). Portanto, num esforço para entender os mecanismos pelos quais animais recém-nascidos sobreviventes à sepse são resistentes ao desenvolvimento de imunossupressão, o tecido pulmonar e o lavado broncoalveolar (BAL do inglês *BronchoAlveolar Lavage*) de animais adultos e infantes foram coletados e as concentrações de IL-33 e de citocinas do perfil 2 como IL-10 e IL-4 foram determinadas. O tecido pulmonar foi selecionado desde que as células epiteliais e endoteliais pulmonares são a principal fonte de IL-33 (Heyen *et al.*, 2016; Cayrol e Girard, 2018). Ainda, avaliamos a expressão gênica da *Il33* e a concentração do receptor solúvel de IL-33 (sST2). Em concordância com nossos dados prévios (Nascimento *et al.*, 2017), verificamos um aumento significativo de citocinas do tipo 2 (IL-10 e IL4) e especialmente de IL-33 no homogeneizado pulmonar (**Figura 32A – C**) e no BAL (**Figura 32E**) de animais adultos sobreviventes à sepse. Ainda, identificamos um incremento na expressão da *Il33* e na produção do sST2 no homogeneizado pulmonar e no BAL nesse grupo de animais, respectivamente (**Figura 32D & F**). No entanto, os animais infantes pós-sépticos não apresentaram mudanças significativas na produção dessas citocinas, assim como na expressão da *Il33* e produção do sST2. Além disso, animais infantes pós-sépticos apresentaram acentuada redução na produção da IL-33 no lavado broncoalveolar (**Figura 32E**). *Coletivamente, estes resultados sugerem que a resistência ao desenvolvimento da imunossupressão induzida pela sepse em animais recém-nascidos pode estar relacionada, em parte, a um comprometimento na produção da IL-33 e citocinas do tipo 2, levando a menor polarização de macrófagos para o perfil M2 e reduzida expansão de células T reguladoras.*

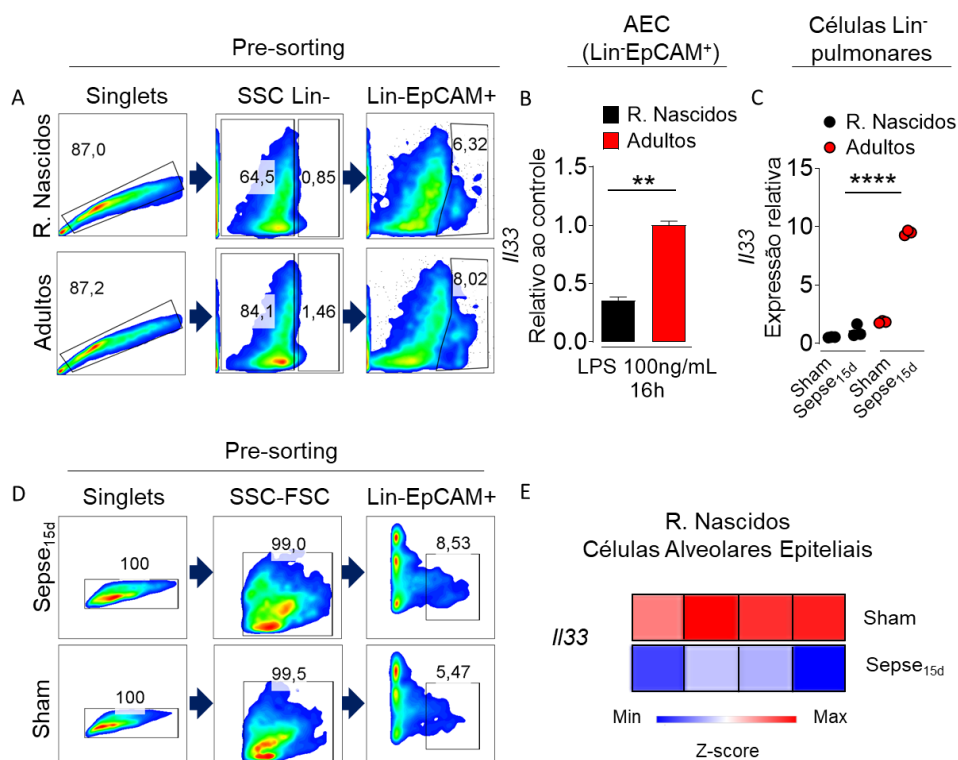


**Figura 32. Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam aumento na produção de IL-33 e citocinas do tipo 2.** Camundongos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. No dia 15 após a sepse, os animais recém-nascidos e adultos foram eutanasiados e o pulmão e o exsudado broncoalveolar foram coletados para avaliar as concentrações de citocinas do tipo 2 e a expressão genica da *I/33*. Concentrações de (A) IL-10, (B) IL-4, (C) IL-33 no tecido pulmonar foi determinado por ELISA. (D) expressão da *I/33* no tecido pulmonar foi determinada por qPCR. Concentrações de (E) IL-33 e (F) sST2 no lavado broncoalveolar foi determinado por ELISA. Os resultados são apresentados como a média ± DPM, n=3-8 por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  (one way-ANOVA, Bonferroni's).

#### 4.3.12 *Redução na produção de IL-33 nas células Alveolares Epiteliais de animais recém-nascidos sobreviventes*

Com o intuito de entender os mecanismos envolvidos na baixa produção de IL-33 em animais recém-nascidos sobreviventes a sepse, nós avaliamos a produção de IL-33 de maneira célula específica. Para isto, células alveolares pulmonares (Lin<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>) isoladas de animais recém-nascidos e adultos *naïves* foram cultivadas na presença de LPS (100 ng/mL) ou meio RPMI por 4 horas. Nós verificamos que após estimulação com LPS, células alveolares pulmonares de animais recém-nascidos, quando comparado aos adultos, não apresentaram aumento na expressão da *Il33* (**Figura 33 A & B**). Ainda, foi constatado um incremento na expressão da *Il33* pelas células Lin<sup>-</sup> (CD3ε<sup>-</sup>Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45R/B220<sup>-</sup>mTer-119<sup>-</sup>) pulmonares apenas nos animais adultos sobreviventes à sepse (células alveolares epiteliais, células endoteliais e células ILC2, principalmente) (**Figura 33C**). Em seguida, considerando que as células alveolares pulmonares são as principais fontes de *Il33* em outros processos patológicos (Byers *et al.*, 2013; Heyen *et al.*, 2016), nós avaliamos expressão de *Il33* em células alveolares pulmonares isoladas de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse. Verificamos que, em contraste com o grupo *Sham*, as células de animais recém-nascidos sobreviventes apresentaram baixa expressão do RNAm da *Il33* (**Figura 33 D & E**). *Coletivamente, estes resultados sugerem que a resistência ao desenvolvimento da imunossupressão pós-sepse em animais recém-nascidos poderia estar relacionada, em parte, a um comprometimento na produção da IL-33.*

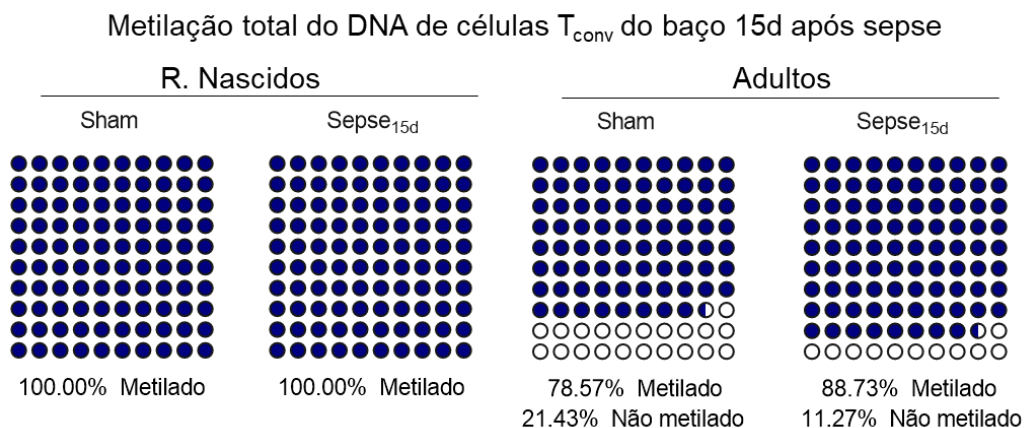




**Figura 33.** Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam aumento na produção de IL-33 pelas células Lin<sup>-</sup> e a células Alveolares Pulmonares do tipo II (Lin<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>). Camundongos adultos e recém-nascidos *naïve* foram eutanasiados e as células alveolares pulmonares do tipo II foram isoladas do pulmão para avaliar a expressão da *Il33* após estimulação com LPS. **(A)** *Flow pots* representativos do *pre-sorting* e **(B)** expressão da *Il33* nas células alveolares pulmonares do tipo II foi determinada por qPCR. Paralelamente, a expressão da *Il33* **(C)** foi determinada por qPCR nas células Lin<sup>-</sup> (CD3ε<sup>-</sup>Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45R/B220<sup>-</sup>mTer-119<sup>-</sup>) isoladas do tecido pulmonar de animais adultos e infantes sobreviventes à sepse. **(D)** *Flow pots* representativos do *pre-sorting* e **(E)** expressão da *Il33* nas células alveolares pulmonares do tipo II isoladas do tecido pulmonar de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse determinada por qPCR e apresentada como *heat map* normalizado pelo Z-score. Os resultados são apresentados como a média ± DPM, n=3-8 por grupo. \**p*<0.05 (B, test t; C, one way-ANOVA, Bonferroni's).

#### ***4.3.13 Células Lin<sup>-</sup> isoladas de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentam um sustentado perfil de hipermetilação total do DNA***

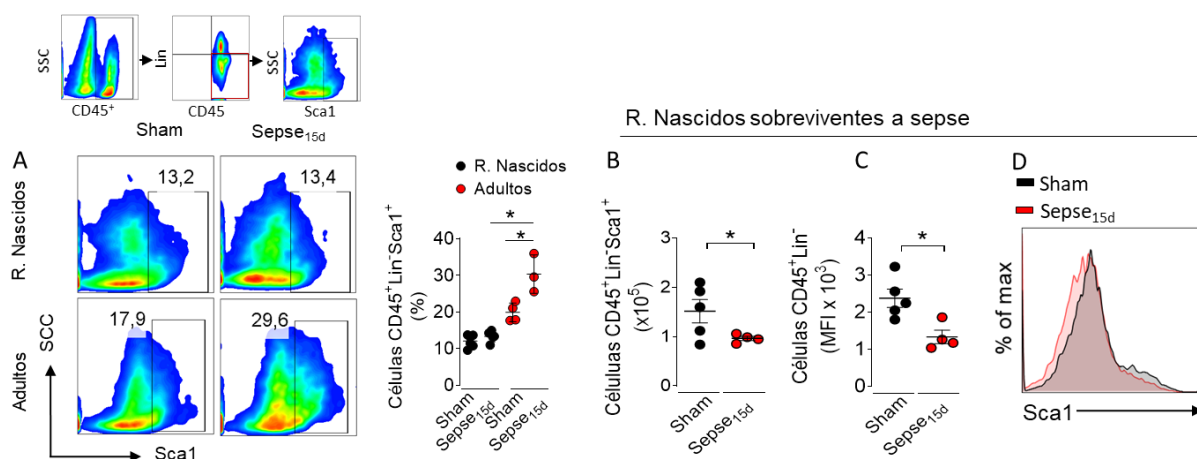
A produção da IL-33 é finamente regulada tanto por eventos moleculares como epigenéticos (Polumuri *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Especificamente, no contexto patológico, a expressão da IL-33 pode ser regulada por eventos de acetilação ou metilação (Zhang *et al.*, 2014; Larouche *et al.*, 2018). Portanto, nós decidimos avaliar o perfil de metilação total do DNA das células Lin<sup>-</sup> pulmonares (CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup>Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45R/B220<sup>-</sup>mTer-119<sup>-</sup>) de animais recém-nascidos e adultos sobreviventes à sepse. Nós verificamos que os animais recém-nascidos sobreviventes apresentaram uma assinatura de hipermetilação total do DNA nas Lin<sup>-</sup> quando comparados com os adultos (**Figura 34**). *Estes dados sugerem que eventos epigenéticos podem estar envolvidos na regulação da produção de IL-33 em animais recém-nascidos sobreviventes à sepse, porém uma análise de metilação no locus específico da IL-33 (ChipSeq) deverá ainda ser realizada.*



**Figura 34. Células  $Lin^-$  de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse possuem um alto perfil de metilação total do DNA.** Camundongos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. No dia 15 após a sepse, os animais recém-nascidos e adultos foram eutanasiados e as células  $Lin^-$  foram isoladas do pulmão para avaliar o perfil total de metilação do DNA (*vide* Materiais e Métodos 3.14.10). Os resultados são apresentados como % de DNA metilado e não metilado, n=3-8 por grupo.

#### **4.3.14 Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam expansão das células ILC2 (Type 2 Innate Lymphoid Cells)**

A IL-33 é um indutor chave da expansão das células ILC2, as quais são uma importante fonte de citocinas do tipo 2 tais como a IL-5 e a IL-13 essenciais para indução do quadro de imunossupressão pós-séptica como previamente demonstrado em animais adultos (Neill *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2011; Monticelli *et al.*, 2011; Salmond *et al.*, 2012; Yasuda *et al.*, 2012). Com o intuito de investigar as consequências sistêmicas do eixo IL-33/ILC2 em animais recém-nascidos sobreviventes à sepse, o tecido pulmonar foi coletado e a frequência e número absoluto das células ILC2 Lin<sup>-</sup>(CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup>Gr-1<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45R/B220<sup>-</sup>mTer-119<sup>-</sup>) CD45<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup> foi avaliado por citometria de fluxo. Neste sentido, nós verificamos incremento na frequência das células ILC2 aos 15 dias após indução da sepse no grupo adulto, no entanto, foi verificado no grupo de animais recém-nascidos uma menor frequência e número absoluto de células ILC2, assim como menor expressão do Sca1 nas células Lin<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> 15 dias após sepse (**Figura 35A – D**). *Esses achados sugerem que o comprometimento na produção da IL-33 observada nos animais recém-nascidos poderia estar afetando a expansão das células ILC2 assim como a produção de citocinas do tipo 2.*



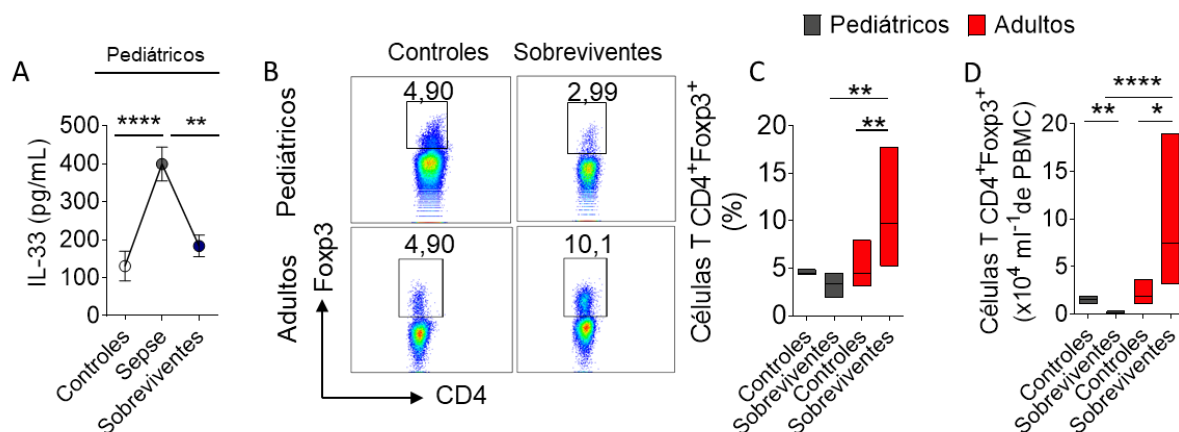
**Figura 35. Animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentam expansão nas células ILC2 (*Innate Lymphocytes Cells*).** Camundongos recém-nascidos e adultos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. No dia 15 e 30 após a sepse, os animais foram eutanasiados e o pulmão foi coletado para avaliar a frequência de células ILC2 por FACS. **(A)** *flow plots* representativos e frequência de células ILC2 no pulmão de animais adultos e recém-nascidos sobreviventes à sepse e no grupo Sham nos tempos indicados. **(B)** número absoluto de células ILC2 e **(C, D)** *histograma plots* comparando a expressão do Sca1 pelo MFI (do inglês, *Mean Fluorescence Intensity*) (referente ao dia 15) nas células CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de animais infantis sobreviventes à sepse. Os resultados são apresentados como a media ± DPM, n=4-5 por grupo. \* $p < 0.05$ , (A, one way-ANOVA, Bonferroni's; B e C, t-test).

## 4.4 EXPERIMENTOS REALIZADOS COM AMOSTRAS DE PACIENTES SOBREVIVENTES À SEPSE

### 4.4.1 *Pacientes pediátricos sobreviventes à sepse não apresentam incremento na produção da IL-33 e expansão de células Tregs*

Os dados experimentais até aqui expostos sugerem que a resistência ao desenvolvimento do quadro de imunossupressão pós-sepse em recém-nascidos está associada ao comprometimento da ativação de vias reguladoras da resposta imune dependentes de IL-33/ILC2/macrófagos M2/Tregs. Dessa forma, com o intuito de transpor os nossos resultados para humanos, avaliamos se em pacientes esse fenômeno se reproduzia. Para isso, as concentrações séricas da IL-33 foram dosadas em amostras de sague periférico de pacientes pediátricos 24 h após admissão hospitalar e em sobreviventes à sepse. Notadamente, verificamos que, comparado aos doadores sadios, os pacientes pediátricos sobreviventes à sepse não apresentaram diferenças significativas nos níveis séricos desta citocina no plasma (**Figura 36A**). Além disso, a frequência das células Tregs circulantes foram avaliadas em amostras de sangue periférico obtidas de pacientes pediátricos (n=5) e adultos (n=11) após a alta hospitalar (sobreviventes à sepse), com os respectivos controles saudáveis (**Tabela suplementar 3**). Nós verificamos o aumento acentuado na frequência e número absoluto das células Tregs em indivíduos adultos sobreviventes à sepse (**Figura 36B – D**) em concordância com dados prévios da literatura (Monneret *et al.*, 2003; Seddiki *et al.*, 2006; Venet *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2017), contudo confirmando os achados observados em animais, pacientes pediátricos sobreviventes à sepse não apresentaram expansão periférica de células Tregs (**Figura 36A – B**). *Coletivamente, nossos dados mostram que embora na fase aguda da sepse, os recém-nascidos são altamente susceptíveis, após o processo séptico, os indivíduos recém-nascidos sobreviventes à sepse são resistentes ao desenvolvimento da disfunção imune decorrente da sepse. Especificamente, nós verificamos a redução na ativação do eixo IL-33/ILC2,*

*Macrófagos M2/Tregs o qual foi associado a um alto grau de metilação do DNA nas células epiteliais pulmonares e células TCD4 de indivíduos recém-nascidos sobreviventes à sepse.*



**Figura 36. Pacientes pediátricos sobreviventes à sepsis não apresentam expansão das células Tregs.** O sangue periférico de pacientes sobreviventes à sepsis e controles saudáveis foi coletado. **(A)** Concentrações de IL-33 determinadas por ELISA 24 h após o diagnóstico de sepsis e em pacientes sobreviventes. **(B)** *Flow pots* representativos, **(C)** frequência e **(D)** número absoluto das células Tregs avaliadas por FACS. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  (Kruskal-Wallis unpaired test).



***Discussão***

## 5. DISCUSSÃO

Os recém-nascidos são um grupo etário particularmente susceptível à sepse apresentando um maior risco de mortalidade (Thaver e Zaidi, 2009; Goenka e Kollmann, 2015; Liu *et al.*, 2015; Kan *et al.*, 2016; Wynn, 2016; Shane *et al.*, 2017). A literatura sugere que o *status* imaturo do sistema imune de neonatos e crianças é o responsável por sua maior susceptibilidade (Adkins *et al.*, 2004; Levy, 2007; Prabhudas *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2012). No entanto, estudos visando ao entendimento detalhado dos mecanismos envolvidos na susceptibilidade dos indivíduos pediátricos à sepse, assim como as consequências imunológicas da sepse em indivíduos recém-nascidos sobreviventes são escassos. Neste sentido, o nosso projeto foi dividido em duas fases: *fase I*, visando ao entendimento dos mecanismos associados à alta susceptibilidade dos indivíduos recém-nascidos à sepse e a *fase II*, visando ao entendimento dos mecanismos imuno-moleculares envolvidos na “resistência” dos indivíduos recém-nascidos sobreviventes à sepse ao desenvolvimento de imunossupressão.

Os nossos dados correspondentes à fase I demonstram que, semelhante às observações epidemiológicas referentes à sepse pediátrica (Watson e Carcillo, 2005), animais recém-nascidos são mais susceptíveis à sepse, quando comparados com os adultos. Notavelmente, verificamos que esta alta susceptibilidade estava associada com a elevada produção de NETs e lesão orgânica nos animais recém-nascidos quando comparados com os animais adultos sépticos. Ainda, a degradação sistêmica das NETs, utilizando rhDNase associada com a terapia antibiótica ou através da inibição farmacológica da enzima Pad4, aumentou a sobrevivência dos animais sépticos recém-nascidos, a qual associou-se com a redução dos marcadores de inflamação sistêmica e lesão de órgãos vitais. De maneira translacional, demonstramos pela primeira vez que, comparado aos pacientes adultos, pacientes pediátricos com sepse exibem maiores concentrações séricas de que se correlacionam positivamente com a severidade da sepse pediátrica.

Em relação com a alta susceptibilidade dos indivíduos recém-nascidos à sepse, a hipótese prevalente na literatura sugere como principal responsável o *status* imaturo do sistema imune de neonatos e crianças (Adkins *et al.*, 2004; Levy, 2007; Prabhudas *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2012). Contudo, no presente trabalho demonstramos que elementos da resposta imune inata estão ativos e contribuem para a alta susceptibilidade à sepse nos recém-nascidos. Foi observado que neutrófilos de animais recém-nascidos ou pacientes pediátricos produzem maiores quantidades de NETs quando comparados aos neutrófilos isolados de adultos após estimulação (PMA ou LPS) *in vitro*. Ainda, os animais recém-nascidos submetidos a sepse e os pacientes pediátricos apresentaram altos níveis séricos de NETs quando comparados aos respectivos controles na idade adulta. Relatos da literatura mostram que neutrófilos isolados de cordão umbilical de neonatos, de recém-nascidos termo (39,1 semanas de idade gestacional) e termo tardio (35 semanas de idade gestacional) falham na produção de NETs quando estimulados com LPS ou PMA (Yost *et al.*, 2009; Lipp *et al.*, 2017). Esta divergência, pode estar associada ao fato dos estudos terem sido conduzidos utilizando neutrófilos isolados do sangue de cordão umbilical ou uso de amostras oriundas de recém-nascidos termo ou termo tardio (34 – 41 semanas de idade gestacional), o qual não representa o sistema imune de uma criança de  $3,52 \pm 5,07$  anos usada no nosso estudo.

Como mencionado previamente, a NETose é um processo finamente controlado que pode ocorrer de maneira dependente ou independente de morte celular. De fato, estímulos tais como PMA ou cristais de colesterol, induzem a liberação tardia das NETs associada com a morte celular de maneira dependente da produção de ROS (Jorch e Kubes, 2017) ao passo que, agonistas dos TLR4/TLR2 ou plaquetas ativadas induzem a liberação precoce das NETs de maneira independente da produção de ROS e morte celular (Li *et al.*, 2010; Pieterse *et al.*, 2016; Jorch e Kubes, 2017). A PAD4 é membro de uma família de enzimas responsáveis pela conversão de resíduos de arginina em citrulina. A citrunilação da histona no DNA pela PAD4

é um dos passos essenciais para a formação e liberação das NETs (Li *et al.*, 2010; Jorch e Kubers, 2017). Em acordo com os nossos achados, em modelo animal tem sido demonstrado que os níveis de expressão e atividade da enzima Pad4 são dependentes da idade, isto é, o pico de expressão/atividade apresenta-se as duas semanas de idade e reduz rapidamente às 6 semanas de idade (Hollingsworth *et al.*, 2018).

As NETs tem sido apontadas como elementos chave na patogênese de várias doenças como a artrites reumatoide, a pancreatites aguda e a diabetes (Khandpur *et al.*, 2013; Merza *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2015). Ainda, foi demonstrado que as NETs podem induzir a liberação de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) pelos macrófagos e células dendríticas, promovendo o acúmulo de neutrófilos nos tecidos, os quais colaboram consequentemente com o incremento na produção de NETs no local (Akk *et al.*, 2016). Evidências crescentes tem postulado as NETs como um atrativo alvo terapêutico para as doenças inflamatórias (Barnado *et al.*, 2016; Saffarzadeh, 2018; Bartneck e Wang, 2019). Neste sentido, para explorar o potencial papel das NETs como alvo terapêutico na sepse pediátrica, animais recém-nascidos submetidos à sepse foram tratados com rhDNase (Alfadornase, usada clinicamente para o tratamento de fibroses cística) e antibióticos. Notavelmente, a terapia combinada foi associada com a redução da inflamação sistêmica, dano orgânico, expressão da *Padi4* e citrulinização da histona H3, o que resultou no incremento da taxa de sobrevivência. Foi verificamos que a monoterapia com CI-Amidina, um inibidor específico da Pad4, reduziu a mortalidade dos animais sépticos, efeito ainda potencializado pela associação com antibiótico terapia. Contudo, verificamos que a monoterapia, somente rhDNase, não foi capaz de atenuar a mortalidade induzida pela sepse nos animais recém-nascidos, provavelmente pelo incremento no grau de infecção desde que as NETs também tem um papel no controle de infecções (Brinkmann *et al.*, 2004; Czaikoski *et al.*, 2016). Estes dados sugerem que as NETs são atores chave na

mortalidade associada à sepse nos recém-nascidos e a sua degradação ou inibição da sua síntese apresentam-se com um atrativo alvo terapêutico.

No contexto clínico, Wang e colaboradores demonstraram que os níveis plasmáticos de histonas (principal componente das NETs) em crianças com sepse é significativamente maior quando comparados aos doadores sadios e correlacionava-se positivamente com a severidade da doença (Wang *et al.*, 2015). Ainda, Zeeleder e colaboradores demonstraram que os níveis séricos de nucleossomas se correlacionam com a severidade da resposta inflamatória e mortalidade em crianças com sepse meningocócica (Zeeleder *et al.*, 2012). As histonas têm sido descritas como um importante mediador de disfunção endotelial, dano orgânico e morte em pacientes sépticos através da amplificação da resposta inflamatória sistêmica e indução de dano orgânico (Xu *et al.*, 2009). Em concordância, no presente estudo verificamos que os níveis séricos das NETs se correlacionam positivamente com a severidade da sepse pediátrica. Dessa forma, os achados da primeira fase do nosso trabalho demonstram que a quantificação dos níveis séricos das NETs pode ser utilizada como indicador precoce da severidade da sepse pediátrica e ainda sugerimos que a modulação farmacológica das NETs pode ser um atrativo alvo terapêutico.

Os dados referentes à fase II do nosso trabalho demonstram que, contrário ao previamente reportado em indivíduos adultos sobreviventes à fase aguda da sepse (Cavassani *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010; Hotchkiss *et al.*, 2013; Nascimento *et al.*, 2017), indivíduos recém-nascidos sobreviventes à sepse não desenvolvem imunossupressão tardia. Especificamente, demonstramos que animais recém-nascidos sobreviventes à sepse foram resistentes à infecção secundária induzida com *P. aeruginosa* assim como apresentam maior “resistência” ao desenvolvimento tumoral quando comparados aos adultos. Notavelmente, nós verificamos que está “resistência” esteve associada com a redução na ativação do eixo IL-33/ILC2, macrófagos do perfil M2/Tregs assim como o alto grau de metilação do DNA nas células epiteliais

---

pulmonares e nas células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de indivíduos recém-nascidos sobreviventes à sepse. De maneira translacional, demonstramos pela primeira vez que pacientes pediátricos sobreviventes à sepse não apresentam expansão das células Tregs nem incremento nos níveis séricos da IL-33 quando comparado com aos adultos.

O desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) durante a sepse é, muitas vezes, acompanhada de uma resposta anti-inflamatória compensatória (CARS, resposta anti-inflamatória compensatória sistêmica), caracterizada pela liberação de um conjunto de citocinas imunoreguladoras (Adib-Conquy e Cavaillon, 2009). O desequilíbrio e o favorecimento da SIRS resultam em lesão tecidual, falência múltipla de órgãos e morte do hospedeiro (Dinarello, 1997). Trabalhos na literatura demonstram o papel da CARS na proteção dos efeitos pró-inflamatórios mediados pela SIRS durante o quadro de sepse, visto que a neutralização de citocinas do tipo 2, como a IL-4, IL-13 e IL-10, aumentam a mortalidade de animais submetidos à sepse (Van Der Poll *et al.*, 1995; Walley *et al.*, 1996). Deste modo, a produção de citocinas do tipo 2 são protetoras na fase efetora da sepse, no entanto, a persistência desta resposta anti-inflamatória pode levar ao desenvolvimento de um quadro de imunossupressão (Kox *et al.*, 2000; Adib-Conquy e Cavaillon, 2009).

Em contraste com a população pediátrica, a imunossupressão associada à sepse em indivíduos adultos tem sido amplamente estudada. Volk e colaboradores, definiram a imunossupressão na sepse nos pacientes adultos com a expressão do HLA-DR abaixo de 30% nos monócitos ou uma produção de TNF- $\alpha$  <200 pg/mL após estimulação do sangue total *ex vivo* com LPS (Volk *et al.*, 1996). Cabe ressaltar, que o incremento da expressão do HLA-DR na superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs) é essencial para a ativação das células T CD4 *naïves*, sendo um evento crítico na iniciação da resposta imune adaptativa (Parihar *et al.*, 2010). Assim, níveis de expressão de HLA-DR menor que 30% por até 5 dias associa-se com 12% na taxa de sobrevivência dos pacientes, por outro lado nos pacientes com níveis

---

de expressão acima do 30% associa-se com uma taxa de 88% de pacientes sobreviventes (Volk *et al.*, 1996; Monneret *et al.*, 2006). Observações similares têm sido reportadas em pacientes pediátricos com MODS (do inglês, *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*). Foi verificado que a expressão do HLD-DR menor que 30% em monócitos de crianças, esteve associada com o desenvolvimento de imunossupressão avaliado pelo incremento de infecções secundárias e óbito. Contudo, os critérios de imunossupressão pediátrica neste estudo foram feitos somente 3, 7, e 14 dias após o diagnóstico clínico do MODS em pacientes ainda internados na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica e não nos pacientes sobreviventes à sepse (após a alta hospitalar, grupo experimental avaliado no nosso trabalho) (Hall *et al.*, 2011).

De maneira notável, a análise longitudinal em pacientes pediátricos não sobreviventes *v.s.* sobreviventes à sepse, demonstram que pacientes pediátricos *sobreviventes* apresentam uma maior produção de TNF- $\alpha$  após estimulação do sangue total *ex vivo* com LPS assim como redução tanto na expressão como na produção de IL-10 (clássica citocina envolvida no desenvolvimento da imunossupressão após sepse (Nascimento *et al.*, 2017)) quando comparado com as crianças *não sobreviventes* (Hall *et al.*, 2007). Ainda, pacientes não sobreviventes à sepse apresentam um alto grau de imunossupressão evidenciada pela marcada pela marcada leucopenia (1000 células /mL, rango de 630 a 3400 células/mL) quando comparado com os *sobreviventes* ou aos doadores saudáveis (Hall *et al.*, 2013). Estes achados sugerem que embora a imunossupressão seja observada em pacientes pediátricos não sobreviventes à sepse, os pacientes sobreviventes (nosso grupo de estudo) não manifestam sinais de imunossupressão, em concordância com os nossos achados. Notavelmente, tem sido amplamente documentado que pacientes adultos sobreviventes à sepse têm maior risco de adquirir uma infecção secundária em até cinco anos após a alta hospitalar (Cuthbertson *et al.*, 2010), no entanto estudos feitos por Morrison e colaboradores ressaltam que a qualidade de vida a longo prazo

---

avaliada pelo critérios do RAHC, *Measure of Function* (MOF), de pacientes pediátricos após seu passo por unidades de terapia intensiva é boa ou normal (Morrison *et al.*, 2002).

Relatos da literatura mostram, inequivocamente, que a imunossupressão induzida pela sepse está associada à disfunção das células T CD4<sup>+</sup>. Hotchkiss e colaboradores tem repetidamente demonstrado que a apoptose assim como comprometimento na produção de citocinas pelos linfócitos é uma característica prevalente da imunossupressão associada à sepse nos indivíduos adultos (Hotchkiss *et al.*, 2005; Hotchkiss e Nicholson, 2006). Ainda, foi demonstrado que as células T CD4<sup>+</sup> apresentam uma diminuição da expressão de CD3ζ, o principal regulador do TCR, acompanhada de uma possível disfunção destes receptores (Scumpia *et al.*, 2007). No contexto pediátrico foi demonstrado em crianças com choque séptico, que as complicações infecciosas estiveram associadas à redução nos níveis de linfócitos, assim como na reduzida capacidade de resposta a estimulação *ex vivo* com estímulos policlonais (Muszynski *et al.*, 2014). Contudo, esses achados refletem o comportamento dos linfócitos na fase aguda da sepse, negligenciando os indivíduos sobreviventes. Neste sentido, nossos achados demonstram que células TCD4 totais isoladas de animais recém-nascidos sobrevivente à sepse são responsivas à ativação policlonal *ex vivo*, sugerindo a recuperação da capacidade funcional quando comparado com os reportes durante a sepse.

No entanto, outros estudos sugerem que as células Tregs sejam responsáveis por este comprometimento das células T CD4<sup>+</sup>, atuando como agentes essenciais no desenvolvimento da imunossupressão associada à sepse nos adultos (Cavassani *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2015). Neste sentido, tem sido observada uma correlação inversa entre o incremento das células Tregs e a sobrevivência em longo prazo de indivíduos adultos sobreviventes à sepse (Monneret *et al.*, 2003; Scumpia *et al.*, 2006; Venet *et al.*, 2008; Venet *et al.*, 2009). Dados de pacientes adultos sugerem que células Tregs resistentes à apoptose



---

podem surgir durante a sepse, isto resultando em um microambiente com predomínio regulador, perpetuando a imunoparalisia (Monneret *et al.*, 2003; Venet *et al.*, 2004; Venet *et al.*, 2009).

No contexto pediátrico, Muszynski e colaboradores não encontraram diferenças na percentagem de células Tregs nos dias um, dois ou sete após o diagnóstico de choque séptico numa coorte de pacientes (< de 18 anos) (Muszynski *et al.*, 2014). Ainda, Timperi e colaboradores não observaram diferenças na população de células Tregs totais no sangue do cordão umbilical numa coorte de pacientes sépticos neonatos quando comparado aos controles saudáveis (idade média de 12 dias), no entanto, os autores verificaram a expansão de um subtipo de células Tregs ativadas (Foxp3<sup>+</sup>, OX40<sup>+</sup>, Helios<sup>+</sup>, CD39<sup>+</sup> e CD120b<sup>+</sup>) a qual correlacionou-se inversamente com a severidade da sepse nos neonatos (Timperi *et al.*, 2016). Ainda no contexto experimental, Wynn e colaboradores, utilizando modelo de *cecal slurry*, verificaram em animais neonatos (cinco a sete dias de idade) o incremento na percentagem das células Tregs no baço 24 horas após a indução da sepse, no entanto avaliações tardias ou nos animais sobreviventes à sepse não foram verificadas (Wynn *et al.*, 2007b). Coletivamente, os estudos no campo da sepse pediátrica visando o entendimento do papel das células Tregs no desenvolvimento da imunossupressão levantam uma dificuldade nas análises que é evidente, a maioria das pesquisas foram conduzidas utilizando o sangue de cordão umbilical, o qual não representa o sistema imune de uma criança de 3,78 anos (usada no nosso estudo), assim com a inclusão de pacientes pediátricos na fase aguda da sepse ou com choque séptico, ou a utilização de animais neonatos (<7 dias de idade). Contudo, até este momento, não haviam estudos conduzidos em pacientes pediátricos ou em modelos experimentais com camundongos recém-nascidos após a resolução da sepse. Portanto, aqui, nós avaliamos o papel das células Tregs em pacientes pediátricos sobreviventes à sepse. Nós verificamos a redução tanto no número absoluto como na proliferação das células Tregs em indivíduos recém-nascidos sobreviventes

à sepse (camundongos e pacientes), fato mostrado pela primeira vez no contexto da sepse pediátrica.

Como podemos explicar a redução no número das células Tregs no indivíduos recém-nascidos após a sepse? A diferenciação fenotípica das células Tregs é finamente regulada tanto por mecanismos moleculares quanto epigenéticos. Assim, os importante papeis da sinalização via TCR (*T Cell Receptor*) (Kretschmer *et al.*, 2005; Mucida *et al.*, 2005; Gottschalk *et al.*, 2010), CD25/IL-2 (Davidson *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008), TGF- $\beta$ R/TGF- $\beta$  (Chen *et al.*, 2003; Kretschmer *et al.*, 2005; Mucida *et al.*, 2005) assim como as modificações epigenética nas sequências conservadas não codificantes (CSN) no locus do *Foxp3* (Morikawa e Sakaguchi, 2014), tem se mostrado essenciais na diferenciação, estabilidade e sobrevivência das células Tregs.

No contexto pediátrico, estudos funcionais *in vitro* com células Tregs de animais recém-nascidos são escassos. Contudo, Wang e colaboradores, demonstraram que independentemente do tipo de estímulo e sem a adição exógena de TGF- $\beta$ , as células TCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> isoladas do timo ou do baço de camundongos neonatos (3 dias de idade) possuem uma maior capacidade de diferenciação para o perfil T regulador que aquelas dos adultos (8 semanas de idade), 70% de diferenciação dos neonatos *v.s.* 10% dos adultos. No entanto, a alta capacidade de diferenciação das células TCD4<sup>+</sup> dos camundongos neonatos é dependente da idade. Isto é, células T CD4<sup>+</sup> oriundas de animais com *duas semanas de idade* apresentaram a mesma capacidade de diferenciação para o perfil T regulador quando comparadas aos animais adultos (Wang *et al.*, 2010). De maneira similar nós verificamos que, células TCD4<sup>+</sup> oriundas de animais recém-nascidos (duas semanas de idade) apresentam a mesma capacidade que as dos adultos para se diferenciar no perfil T regulador.

A regulação epigenética, especialmente a metilação do DNA, possui um papel essencial na regulação da expressão do *Foxp3* (Josefowicz *et al.*, 2012; Ohkura *et al.*, 2012). De maneira

interessante, a análise de imunoprecipitação da cromatina de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de animais adultos pós-sépticos, revelam o incremento na acetilação da histona 3 na lisina 9 (H3K9ac), assim como incremento na expressão do gene codificante para a histona acetiltransferase Kat2a, um mecanismo associado com o incremento na acetilação das células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Cavassani *et al.*, 2010), sugerindo que a acetilação nos lócus *Foxp3* faz permissiva a sua expressão, guiando o incremento das células Tregs após sepse nos indivíduos adultos (Carson *et al.*, 2011). Ainda, a expressão do *Foxp3* é estabilizada pela hipometilação das ilhas CpG nas Sequências não-codificantes conservadas do tipo 2 (do inglês, *Conserved noncoding sequences 2, CNS2*) no lócus de *Foxp3* também conhecidas como TSDR (do inglês, *Treg-specific demethylated region*) (Feng *et al.*, 2014) (Zheng *et al.*, 2010; Ohkura *et al.*, 2013) um processo controlado pelas proteínas do grupo Foxo1a e Tet (do inglês, *ten-eleven translocation proteins*). Ao passo que a regulação negativa da estabilidade do Foxp3 é controlada pela proteína Dnmt1 (do inglês, *DNA (cytosine-5) -methyltransferase 1*) (Lee e Lee, 2018). Notavelmente, verificamos que células Tregs de animais recém-nascidos apresentam menor manutenção na estabilidade do Foxp3 que estava associada com o incremento na expressão do gene *Dnmt1*, nas células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de animais recém-nascidos pós-sépticos. Estes dados sugerem que é plausível que modificações epigenéticas possam estar envolvidas na menor estabilidade na expressão do Foxp3 desencadeando a falha na expansão de células Tregs em indivíduos recém-nascidos sobreviventes à sepse, no entanto, as modificações específicas no Foxp3 deverão ser analisadas mais finamente por meio de ensaios de ChIP-seq ou ATAC-seq.

As citocinas do perfil do tipo 2, são importantes moduladores da resposta anti-inflamatória na sepse. Matasukawa e colaboradores demonstraram que os níveis endógenos de IL-13 protegem os animais da letalidade induzida pela sepse (CLP) através da regulação negativa na produção de citocinas pró-inflamatórias; de fato a neutralização da IL-13 resulta no aumento da mortalidade na sepse (Matsukawa *et al.*, 2000). Na sepse pediátrica, Nicoletti e

colaborares demonstraram que o tratamento exógeno com IL-13 previne a letalidade induzida pela endotoxemia via redução nos níveis sistêmicos de TNF- $\alpha$  (Nicoletti *et al.*, 1997). De maneira similar, o incremento na mortalidade foi demonstrado também pela neutralização da IL-10, isto atribuído ao incremento da resposta inflamatória e dano tecidual (Van Der Poll *et al.*, 1995; Walley *et al.*, 1996). Ainda, na fase aguda da sepse, foi demonstrado que o tratamento exógeno com IL-33, uma citocina produzida por fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais durante infecções ou dano tecidual, resulta na melhora da sobrevivência na sepse via incremento da migração dos neutrófilos (Alves-Filho *et al.*, 2010). Incrementos nos níveis de IL-33 em amostras de sangue do cordão umbilical tem sido propostos como marcador prognóstico de mortalidade precoce na sepse neonatal (Halil *et al.*, 2018).

A IL-33 pode agir como principal indutora da produção de diversas citocinas do padrão Th2 (Schmitz *et al.*, 2005). De fato, o ST2, receptor da IL-33, é expresso em células Th2, mas não em células Th1, assim como nos macrófagos ativados (Xu *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 2005; Shimosato *et al.*, 2010). Tem sido demonstrado que animais adultos sobreviventes à sepse apresentam quantidades elevadas de citocinas do tipo 2 (IL-4 e IL-10), um processo orquestrado pelo efeito da IL-33 (Benjamim *et al.*, 2003; Delano *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2017). Contudo, nossos dados demonstram que no contexto pediátrico, em termos da expressão da IL-33, as consequências da sepse diferem dos adultos. De fato, no presente estudo, não observamos incremento nas concentrações de IL-33 ou de citocinas do tipo 2 (IL-10 e IL-4) nos animais recém-nascidos ou nos pacientes pediátricos sobreviventes à sepse. Embora, estudos mostrando o papel das citocinas do tipo 2, especialmente a IL-33, em indivíduos pediátricos sobreviventes à sepse sejam escassos, nossos dados estão de acordo com os resultados apresentados por Hall e colaboradores, os quais demonstram que comparado com crianças não sobreviventes à sepse, as crianças sobreviventes apresentam significativa redução nos níveis séricos de IL-10, sendo equivalentes aos doadores saudáveis (Hall *et al.*, 2007). Notavelmente, os níveis de IL-33 e IL-13

em amostras de aspirado nasal declinam rapidamente na fase de recuperação em crianças infectadas pelo Vírus Sincicial Respiratório quando comparadas com a fase aguda da infecção (Saravia *et al.*, 2015).

A IL-33 pode ser constitutivamente produzida por células não hematopoiéticas, tais com as células epiteliais no tecido pulmonar (Liew *et al.*, 2010; Smith, 2010). De fato, as células do epitélio pulmonar, especialmente alveolares pulmonares do tipo II (Lin<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>), tem sido caracterizadas como as principais produtoras agudas e tardias de IL-33 (Byers *et al.*, 2013; Heyen *et al.*, 2016). Tendo isto em conta, nós avaliamos a produção da IL-33 pelas células do epitélio pulmonar em animais sobreviventes à sepse. Verificamos que as células pulmonares epiteliais (Lin<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>) de animais recém-nascidos sobreviventes a sepse apresentam menor expressão de *Il33* quando comparado ao grupo não séptico. Ainda, as células Lin<sup>-</sup> de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse não apresentaram mudanças no perfil de expressão de IL-33 antes ou depois da sepse, em contraste aos adultos nos quais foi observado um incremento significativo. Esses achados sugerem que possivelmente as células pulmonares epiteliais dos recém-nascidos tem a produção de IL-33 regulada negativamente após a sepse.

Eventos epigenéticos tem sido demonstrados importantes na regulação da expressão da IL-33 em outros modelos (Polumuri *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Especificamente, Zhang e colaboradores demonstraram que a expressão da IL-33 é completamente reduzida através da inibição farmacológica da enzima histona deacetilase (HDCA), efeito não observado em outras citocinas com a IL-1 (Zhang *et al.*, 2014). De maneira importante, nós verificamos que os animais recém-nascidos sobreviventes a sepse apresentaram uma assinatura de hipermetilação total do DNA nas Lin<sup>-</sup> quando comparados com os adultos, similar ao demonstrado nas células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Estes dados sugerem que modificações epigenéticas na IL-33 nos animais recém-nascidos possam estar envolvidas na redução da ativação do eixo citocinas tipo2/IL-33, no entanto, essas modificações deverão ser analisadas mais refinadamente por meio de ensaios

---

de ChIP-seq assim como a reversão farmacológica no perfil de metilação, utilizando 5-Aza-2'-Deoxycytidina, podendo assim lançar luz sobre o real papel desse processo na sepse pediátrica.

As citocinas do tipo 2 promovem a diferenciação dos macrófagos para o perfil M2 (Gordon, 2003; Mantovani *et al.*, 2004). Estas citocinas ao se ligar no receptor de IL-4 induzem a fosforilação de STAT6, evento essencial para a polarização dos macrófagos M2 (Biswas e Mantovani, 2010). De maneira complementar, a IL-33 tem se mostrado importante para a polarização dos macrófagos para o perfil M2. Na resposta inflamatória alérgica, foi verificado que animais deficientes para o receptor da IL-33 (ST2) apresentam redução na resposta inflamatória Th2 assim como redução na diferenciação de macrófagos M2 (Kurowska-Stolarska *et al.*, 2008). Ainda, no contexto adulto, recentemente nosso grupo demonstrou o incremento na polarização dos M2 após a sepse; este evento foi dependente de citocinas do tipo 2 e principalmente da IL-33 (Nascimento *et al.*, 2017). Confirmando estas observações, neste trabalho verificamos o incremento tanto na polarização dos macrófagos M2 como na expressão de marcadores M2 na cavidade peritoneal, tecido pulmonar e macrófagos alveolares em animais adultos sobreviventes a sepse, contudo, surpreendentemente isto não foi observado nos animais recém-nascidos.

No contexto pediátrico a polarização dos macrófagos M2 tem sido escassamente estudada. Recentemente, Dreschers e colaboradores demonstraram que, em contraste com os monócitos isolados de sangue periférico de doadores adultos, monócitos isolados do cordão umbilical de neonatos apresentam reduzida capacidade para se diferenciar no perfil M2 quando estimulados com IL-10. Ainda, a expressão de marcadores típicos do perfil M2 (CD16, CD32, CD64 e CD163) não foram expressos adequadamente nos macrófagos do cordão umbilical (Dreschers *et al.*, 2019). Contudo, Schneider e colaboradores demonstraram que monócitos isolados do cordão umbilical de neonatos saudáveis se diferenciam de maneira similar para o perfil M2 quando comparados aos adultos (Schneider *et al.*, 2018). Experimentalmente,

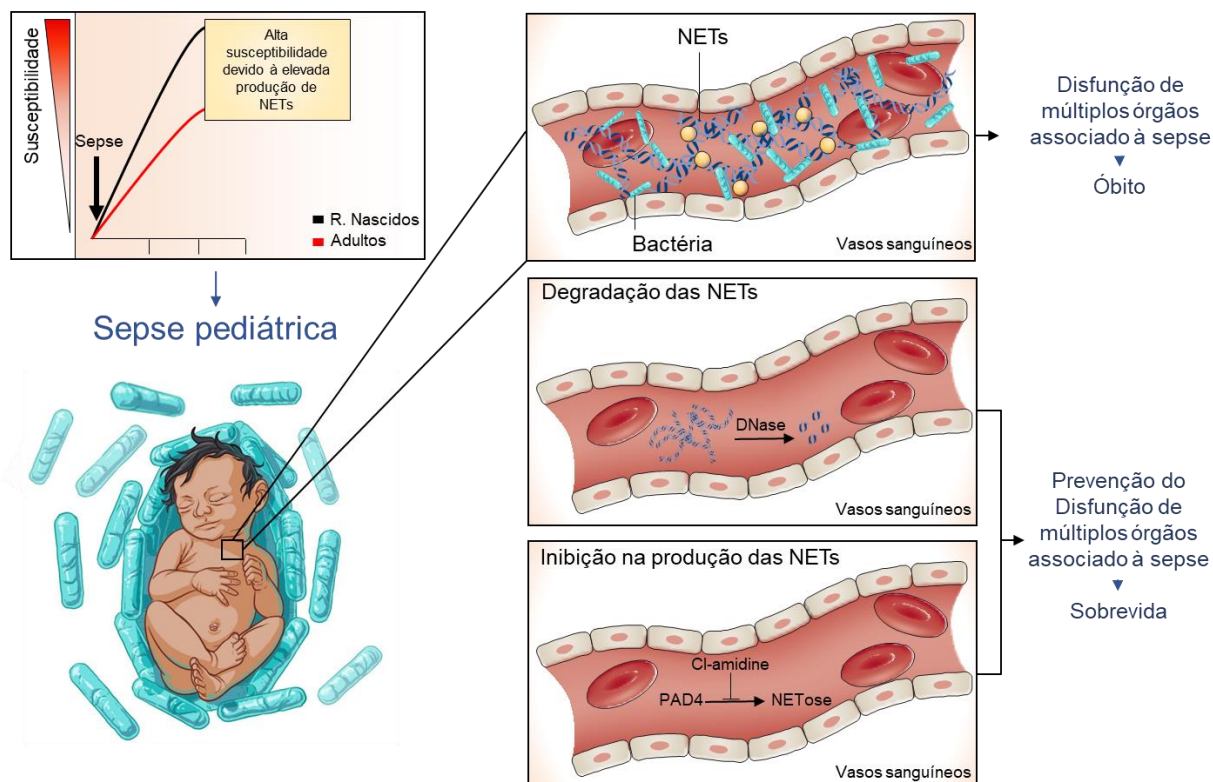
---

Winterberg e colaboradores demonstraram que macrófagos peritoneais isolados de animais recém-nascidos (< 24 horas de vida) apresentam redução na expressão de marcadores de ativação tais como F4/80, MHC-II, CD80 e CD86 após a estimulação com LPS, quando comparados aos adultos (6 semanas de idade) (Winterberg *et al.*, 2015). No entanto, no nosso presente trabalho, não observamos alterações na diferenciação *in vitro* dos macrófagos de animais recém-nascidos para o perfil M2 quando comparados aos adultos. Esta discrepância na literatura pode ser explicada pelo uso de animais com diferentes idades (<4 dias, 7 dias ou duas semanas de idade), assim como o uso de diferentes estímulos (IL-10 ou IL-4) e diferentes fontes celulares para a polarização (em humanos, sangue de cordão umbilical ou sangue periférico; em animais, macrófagos peritoneais ou macrófagos derivados da medula). Contudo, os nossos dados demonstram que eventos *upstream* aos macrófagos, tais como a redução na produção da IL-33 pelas células epiteliais pulmonares ou alterações epigenéticas na IL-33, podem ser os responsáveis pela resistência ao desenvolvimento de imunossupressão nos recém-nascidos após sepse. Ainda, como também discutido por Saravia e colaboradores no modelo de infecção pulmonar com RSV (Saravia *et al.*, 2015), nossos dados sugerem que a idade é um fator importante na regulação da expressão da IL-33.

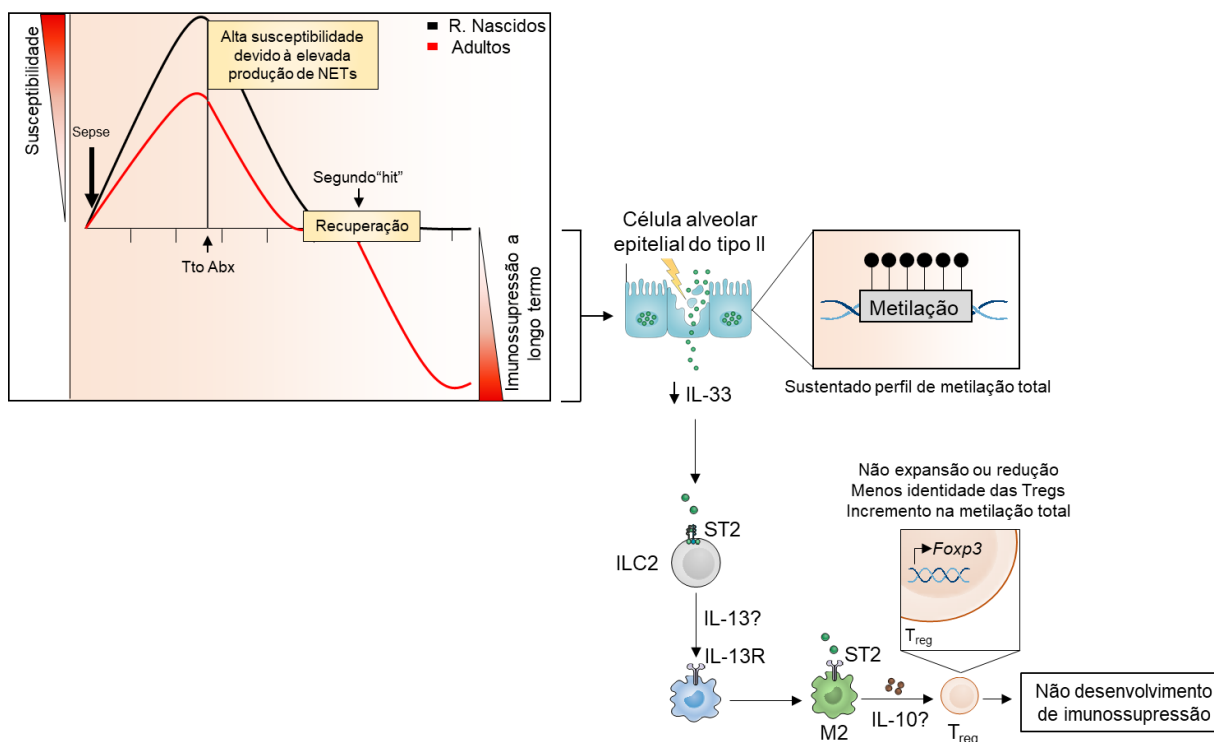
***Conclusão***



## 6. CONCLUSÃO

COLÓN ET AL., *Critical Care*, 2019

**Conclusão parcial:** Na fase aguda da sepsis, a susceptibilidade dos recém-nascidos está, ao menos em parte, determinada pela alta produção de NETs, as quais potenciam o dano orgânico observado. Assim, a modulação farmacológica das NETs apresenta-se como uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da sepsis pediátrica (Colon *et al.*, 2019).



**Conclusão final: Conclusão 2:** Os indivíduos recém-nascidos sobreviventes à sepse são resistentes ao desenvolvimento da disfunção imune decorrente da sepse devido à redução na ativação do eixo IL-33/ILC2, Macrófagos do perfil M2/Tregs assim como o alto grau de metilação do DNA nas células epiteliais pulmonares e células TCD4 de indivíduos recém-nascidos sobreviventes à sepse. Em conjunto os dados sugerem que a imunossupressão decorrente a longo termo na sepse é um fenômeno dependente da idade. Estes achados em recém-nascidos abrem uma nova possibilidade para o estudo da imunossupressão induzida pela sepse assim como potenciais alvos terapêuticos para o controle das consequências da sepse em indivíduos adultos (*Manuscrito em preparação*).

## ***Referências Bibliográficas***

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- . **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, n. 4, p. 388-416, Feb 15 ISSN 1073-449X (Print)  
1073-449X (Linking).
- ADIB-CONQUY, M.; CAVAILLON, J. M. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. **Thromb Haemost**, v. 101, n. 1, p. 36-47, Jan 2009. ISSN 0340-6245 (Print)
- ADKINS, B.; LECLERC, C.; MARSHALL-CLARKE, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 553-64, Jul 2004. ISSN 1474-1733 (Print)
- AKK, A.; SPRINGER, L. E.; PHAM, C. T. Neutrophil Extracellular Traps Enhance Early Inflammatory Response in Sendai Virus-Induced Asthma Phenotype. **Front Immunol**, v. 7, p. 325, 2016. ISSN 1664-3224 (Linking).
- ALVES-FILHO, J. C. et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med**, v. 34, n. 2, p. 461-70, Feb 2006. ISSN 0090-3493 (Print)
- ALVES-FILHO, J. C. et al. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v. 30 Suppl 1, p. 3-9, Oct 2008. ISSN 1540-0514 (Electronic)
- 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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 10, p. 4018-23, Mar 10 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic)
- ALVES-FILHO, J. C. et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nat Med**, v. 16, n. 6, p. 708-12, Jun 2010. ISSN 1546-170X (Electronic)
- ANGELONE, D. F. et al. Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo. **Pediatr Res**, v. 60, n. 2, p. 205-9, Aug 2006. ISSN 0031-3998 (Print)
- ARRAES, S. M. et al. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 2906-13, Nov 1 2006. ISSN 0006-4971 (Print)
- BARNADO, A.; CROFFORD, L. J.; OATES, J. C. At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases. **J Leukoc Biol**, v. 99, n. 2, p. 265-78, Feb 2016. ISSN 1938-3673 (Electronic)
- BARTNECK, M.; WANG, J. Therapeutic Targeting of Neutrophil Granulocytes in Inflammatory Liver Disease. **Front Immunol**, v. 10, p. 2257, 2019. ISSN 1664-3224 (Electronic)
- BEATTY, G.; PATERSON, Y. IFN-gamma-dependent inhibition of tumor angiogenesis by tumor-infiltrating CD4+ T cells requires tumor responsiveness to IFN-gamma. **J Immunol**, v. 166, n. 4, p. 2276-82, Feb 15 2001. ISSN 0022-1767 (Print)
- BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J Infect Dis**, v. 182, n. 1, p. 214-23, Jul 2000. ISSN 0022-1899 (Print)
- BENJAMIM, C. F. et al. Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. **Am J Pathol**, v. 163, n. 6, p. 2605-17, Dec 2003. ISSN 0002-9440 (Print)
- BENSINGER, S. J. et al. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. **J Immunol**, v. 172, n. 9, p. 5287-96, May 1 2004. ISSN 0022-1767 (Print)
- BESNARD, A. G. et al. IL-33-mediated protection against experimental cerebral malaria is linked to induction of type 2 innate lymphoid cells, M2 macrophages and regulatory T cells. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 2, p. e1004607, Feb 2015. ISSN 1553-7374 (Electronic)

- BIANCHI, M. et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. **Blood**, v. 114, n. 13, p. 2619-22, Sep 24 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic)
- BIRON, B. M. et al. Cl-Amidine Prevents Histone 3 Citrullination and Neutrophil Extracellular Trap Formation, and Improves Survival in a Murine Sepsis Model. **J Innate Immun**, v. 9, n. 1, p. 22-32, 2017. ISSN 1662-8128 (Electronic)
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol**, v. 11, n. 10, p. 889-96, Oct 2010. ISSN 1529-2916 (Electronic)
- BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-55, Jun 1992. ISSN 0012-3692 (Print)
- BOOMER, J. S. et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. **JAMA**, v. 306, n. 23, p. 2594-605, Dec 21 2011. ISSN 1538-3598 (Electronic)
- BORISSOFF, J. I. et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 33, n. 8, p. 2032-2040, Aug 2013. ISSN 1524-4636 (Electronic)
- BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 5 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic)
- BROWN, K. A. et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 157-69, Jul 8 2006. ISSN 1474-547X (Electronic)
- BRUNIALTI, M. K. et al. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. **Shock**, v. 25, n. 4, p. 351-7, Apr 2006. ISSN 1073-2322 (Print)
- BYERS, D. E. et al. Long-term IL-33-producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease. **J Clin Invest**, v. 123, n. 9, p. 3967-82, Sep 2013. ISSN 1558-8238 (Electronic)
- CAO, C. et al. The role of regulatory T cells in immune dysfunction during sepsis. **World J Emerg Med**, v. 6, n. 1, p. 5-9, 2015. ISSN 1920-8642 (Print).
- CAO, Q. et al. IL-10/TGF-beta-modified macrophages induce regulatory T cells and protect against adriamycin nephrosis. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, n. 6, p. 933-42, Jun 2010. ISSN 1533-3450 (Electronic)
- CARON, J. E. et al. Multiplex analysis of toll-like receptor-stimulated neonatal cytokine response. **Neonatology**, v. 97, n. 3, p. 266-73, 2010. ISSN 1661-7819 (Electronic)
- CARSON, W. F. et al. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. **Epigenetics**, v. 6, n. 3, p. 273-83, Mar 2011. ISSN 1559-2308 (Electronic)
- CASARES, N. et al. CD4+/CD25+ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4+ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination. **J Immunol**, v. 171, n. 11, p. 5931-9, Dec 1 2003. ISSN 0022-1767 (Print)
- CASSADO ADOS, A.; D'IMPERIO LIMA, M. R.; BORTOLUCI, K. R. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. **Front Immunol**, v. 6, p. 225, 2015. ISSN 1664-3224 (Print)
- CAUDRILLIER, A. et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. **J Clin Invest**, v. 122, n. 7, p. 2661-71, Jul 2012. ISSN 1558-8238 (Electronic)
- CAVASSANI, K. A. et al. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. **Blood**, v. 115, n. 22, p. 4403-11, Jun 3 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic)

- CAYROL, C.; GIRARD, J. P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. **Immunol Rev**, v. 281, n. 1, p. 154-168, Jan 2018. ISSN 1600-065X (Electronic)
- CHANG, Y. J. et al. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. **Nat Immunol**, v. 12, n. 7, p. 631-8, May 29 2011. ISSN 1529-2916 (Electronic)
- CHAPMAN, N. M.; CHI, H. mTOR Links Environmental Signals to T Cell Fate Decisions. **Front Immunol**, v. 5, p. 686, 2014. ISSN 1664-3224 (Electronic)
- CHEN, W. et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J Exp Med**, v. 198, n. 12, p. 1875-86, Dec 15 2003. ISSN 0022-1007 (Print)
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885-91, Dec 19-26 2002. ISSN 0028-0836 (Print)
- COLON, D. F. et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. **Crit Care**, v. 23, n. 1, p. 113, Apr 8 2019. ISSN 1466-609X (Electronic)
- CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 4, p. 824-32, Apr 2008. ISSN 0741-5400 (Print)
- CUTHBERTSON, B. H. et al. Quality of life in the five years after intensive care: a cohort study. **Crit Care**, v. 14, n. 1, p. R6, 2010. ISSN 1466-609X (Electronic)
- CZAIKOSKI, P. G. et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0148142, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic)
- DA SILVA MARTINS, M.; PICCIRILLO, C. A. Functional stability of Foxp3+ regulatory T cells. **Trends Mol Med**, v. 18, n. 8, p. 454-62, Aug 2012. ISSN 1471-499X (Electronic)
- DAVIDSON, T. S. et al. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. **J Immunol**, v. 178, n. 7, p. 4022-6, Apr 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print)
- DE MONTMOLLIN, E.; ANNANE, D. Year in review 2010: Critical Care--Multiple organ dysfunction and sepsis. **Crit Care**, v. 15, n. 6, p. 236, 2011. ISSN 1466-609X (Electronic)
- DELANO, M. J. et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)/CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. **J Exp Med**, v. 204, n. 6, p. 1463-74, Jun 11 2007. ISSN 0022-1007 (Print)
- DELGOFFE, G. M. et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. **Immunity**, v. 30, n. 6, p. 832-44, Jun 19 2009. ISSN 1097-4180 (Electronic)
- DERYNCK, R.; ZHANG, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. **Nature**, v. 425, n. 6958, p. 577-84, Oct 9 2003. ISSN 1476-4687 (Electronic)
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, v. 112, n. 6 Suppl, p. 321S-329S, Dec 1997. ISSN 0012-3692 (Print)
- DOERSCHUK, C. M. Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. **Microcirculation**, v. 8, n. 2, p. 71-88, Apr 2001. ISSN 1073-9688 (Print)
- DRESCHERS, S. et al. Impaired cellular energy metabolism in cord blood macrophages contributes to abortive response toward inflammatory threats. **Nat Commun**, v. 10, n. 1, p. 1685, Apr 11 2019. ISSN 2041-1723 (Electronic)
- FENG, Y. et al. Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the Foxp3 locus. **Cell**, v. 158, n. 4, p. 749-63, Aug 14 2014. ISSN 1097-4172 (Electronic)

- FINK, M. P. Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 5, n. 2, p. 167-74, Mar 2002. ISSN 1363-1950 (Print)
- FREITAS, A. et al. Divergent role of heme oxygenase inhibition in the pathogenesis of sepsis. **Shock**, v. 35, n. 6, p. 550-9, Jun 2011. ISSN 1540-0514 (Electronic)
- FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol**, v. 176, n. 2, p. 231-41, Jan 15 2007. ISSN 0021-9525 (Print)
- GHOSN, E. E. et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 6, p. 2568-73, Feb 9 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)
- GOENKA, A.; KOLLMANN, T. R. Development of immunity in early life. **J Infect**, v. 71 Suppl 1, p. S112-20, Jun 2015. ISSN 1532-2742 (Electronic)
- GOLDIE, A. S. et al. Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The Sepsis Intervention Group. **JAMA**, v. 274, n. 2, p. 172-7, Jul 12 1995. ISSN 0098-7484 (Print)
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003. ISSN 1474-1733 (Print)
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, May 28 2010. ISSN 1097-4180 (Electronic)
- GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 12, p. 953-64, Dec 2005. ISSN 1474-1733 (Print)
- GOTTSCHALK, R. A.; CORSE, E.; ALLISON, J. P. TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. **J Exp Med**, v. 207, n. 8, p. 1701-11, Aug 2 2010. ISSN 1540-9538 (Electronic)
- GUO, F. et al. CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naive CD4 T cells. **J Immunol**, v. 181, n. 4, p. 2285-91, Aug 15 2008. ISSN 1550-6606 (Electronic)
- HALIL, H. et al. Serum Interleukin-33 as a Biomarker in Predicting Neonatal Sepsis in Premature Infants. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 21, n. 7, p. 510-515, 2018. ISSN 1875-5402 (Electronic)
- HALL, M. W. et al. Monocyte mRNA phenotype and adverse outcomes from pediatric multiple organ dysfunction syndrome. **Pediatr Res**, v. 62, n. 5, p. 597-603, Nov 2007. ISSN 0031-3998 (Print)
- HALL, M. W. et al. Innate immune function and mortality in critically ill children with influenza: a multicenter study. **Crit Care Med**, v. 41, n. 1, p. 224-36, Jan 2013. ISSN 1530-0293 (Electronic)
- HALL, M. W. et al. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. **Intensive Care Med**, v. 37, n. 3, p. 525-32, Mar 2011. ISSN 1432-1238 (Electronic)
- HARTMAN, M. E. et al. Trends in the epidemiology of pediatric severe sepsis\*. **Pediatr Crit Care Med**, v. 14, n. 7, p. 686-93, Sep 2013. ISSN 1529-7535 (Print)
- HAUSER, C. J.; OTTERBEIN, L. E. Danger signals from mitochondrial DAMPS in trauma and post-injury sepsis. **Eur J Trauma Emerg Surg**, v. 44, n. 3, p. 317-324, Jun 2018. ISSN 1863-9941 (Electronic)
- HAXHINASTO, S.; MATHIS, D.; BENOIST, C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. **J Exp Med**, v. 205, n. 3, p. 565-74, Mar 17 2008. ISSN 1540-9538 (Electronic)

- HEINEMANN, A. S. et al. In neonates S100A8/S100A9 alarmins prevent the expansion of a specific inflammatory monocyte population promoting septic shock. **FASEB J**, v. 31, n. 3, p. 1153-1164, Mar 2017. ISSN 1530-6860 (Electronic)
- HEYEN, L. et al. Lung epithelium is the major source of IL-33 and is regulated by IL-33-dependent and IL-33-independent mechanisms in pulmonary cryptococcosis. **Pathog Dis**, v. 74, n. 7, Oct 2016. ISSN 2049-632X (Electronic)
- HOLLINGSWORTH, T. J. et al. Murine Retinal Citrullination Declines With Age and is Mainly Dependent on Peptidyl Arginine Deiminase 4 (PAD4). **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 59, n. 10, p. 3808-3815, Aug 1 2018. ISSN 1552-5783 (Electronic)
- HOOGERWERF, J. J. et al. Loss of suppression of tumorigenicity 2 (ST2) gene reverses sepsis-induced inhibition of lung host defense in mice. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 183, n. 7, p. 932-40, Apr 2011. ISSN 1535-4970.
- HOTCHKISS, R. S.; COOPERSMITH, C. M.; KARL, I. E. Prevention of lymphocyte apoptosis--a potential treatment of sepsis? **Clin Infect Dis**, v. 41 Suppl 7, p. S465-9, Nov 15 2005. ISSN 1537-6591 (Electronic)
- HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 12, p. 862-74, Dec 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic)
- HOTCHKISS, R. S.; NICHOLSON, D. W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 11, p. 813-22, Nov 2006. ISSN 1474-1733 (Print)
- HU, Y. Isolation of human and mouse neutrophils ex vivo and in vitro. **Methods Mol Biol**, v. 844, p. 101-13, 2012. ISSN 1940-6029 (Electronic)
- HUET, O. et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 16, p. 1986-95, 2011. ISSN 1093-4715 (Electronic)
- JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. **J Intensive Care Med**, v. 22, n. 2, p. 63-72, Mar-Apr 2007. ISSN 0885-0666 (Print)
- JOHNSTON, J. A. et al. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 19, p. 8705-9, Sep 12 1995. ISSN 0027-8424 (Print)
- JORCH, S. K.; KUBES, P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. **Nat Med**, v. 23, n. 3, p. 279-287, Mar 07 2017. ISSN 1546-170X (Electronic)
- JOSEFOWICZ, S. Z.; LU, L. F.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 531-64, 2012. ISSN 1545-3278 (Electronic)
- KAN, B.; RAZZAGHIAN, H. R.; LAVOIE, P. M. An Immunological Perspective on Neonatal Sepsis. **Trends Mol Med**, v. 22, n. 4, p. 290-302, Apr 2016. ISSN 1471-499X (Electronic)
- KAPLAN, M. H. et al. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. **Immunity**, v. 4, n. 3, p. 313-9, Mar 1996. ISSN 1074-7613 (Print)
- KHANDPUR, R. et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 178, p. 178ra40, Mar 27 2013. ISSN 1946-6242 (Electronic)
- KIM, R. et al. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. **Cancer Res**, v. 66, n. 11, p. 5527-36, Jun 1 2006. ISSN 0008-5472 (Print)
- KISSOON, N. et al. World Federation of Pediatric Intensive Care and Critical Care Societies: Global Sepsis Initiative. **Pediatr Crit Care Med**, v. 12, n. 5, p. 494-503, Sep 2011. ISSN 1529-7535 (Print)



- KNAUS, W. A. et al. APACHE II: a severity of disease classification system. **Crit Care Med**, v. 13, n. 10, p. 818-29, Oct 1985. ISSN 0090-3493 (Print)
- KOX, W. J. et al. Immunomodulatory therapies in sepsis. **Intensive Care Med**, v. 26 Suppl 1, p. S124-8, 2000. ISSN 0342-4642 (Print)
- KRETSCHMER, K. et al. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. **Nat Immunol**, v. 6, n. 12, p. 1219-27, Dec 2005. ISSN 1529-2908 (Print)
- KUBES, P. The complexities of leukocyte recruitment. **Semin Immunol**, v. 14, n. 2, p. 65-72, Apr 2002. ISSN 1044-5323 (Print)
- KUMAR, G. et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). **Chest**, v. 140, n. 5, p. 1223-31, Nov 2011. ISSN 1931-3543 (Electronic)
- KUROWSKA-STOLARSKA, M. et al. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. **J Immunol**, v. 181, n. 7, p. 4780-90, Oct 1 2008. ISSN 1550-6606 (Electronic)
- LANGEREIS, J. D. Neutrophil integrin affinity regulation in adhesion, migration, and bacterial clearance. **Cell Adh Migr**, v. 7, n. 6, p. 476-81, Nov-Dec 2013. ISSN 1933-6926 (Electronic)
- LAROUCHE, M. et al. Methylation profiles of IL33 and CCL26 in bronchial epithelial cells are associated with asthma. **Epigenomics**, v. 10, n. 12, p. 1555-1568, Dec 2018. ISSN 1750-192X (Electronic)
- LEE, W.; LEE, G. R. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. **Exp Mol Med**, v. 50, n. 3, p. e456, Mar 9 2018. ISSN 2092-6413 (Electronic)
- LETEURTRE, S. et al. Validation of the paediatric logistic organ dysfunction (PELOD) score: prospective, observational, multicentre study. **Lancet**, v. 362, n. 9379, p. 192-7, Jul 19 2003. ISSN 1474-547X (Electronic)
- LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med**, v. 31, n. 4, p. 1250-6, Apr 2003. ISSN 0090-3493 (Print)
- LEVY, O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 5, p. 379-90, May 2007. ISSN 1474-1733 (Print)
- LI, P. et al. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. **J Exp Med**, v. 207, n. 9, p. 1853-62, Aug 30 2010. ISSN 1540-9538 (Electronic)
- LI, Z. et al. FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation. **Cell Mol Immunol**, v. 12, n. 5, p. 558-65, Sep 2015. ISSN 2042-0226 (Electronic)
- LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 2, p. 103-10, Feb 2010. ISSN 1474-1741 (Electronic)
- LIPP, P. et al. Less Neutrophil Extracellular Trap Formation in Term Newborns than in Adults. **Neonatology**, v. 111, n. 2, p. 182-188, 2017. ISSN 1661-7819 (Electronic)
- LIU, G. et al. Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4+CD25+ T cells in mice. **Immunol Cell Biol**, v. 89, n. 1, p. 130-42, Jan 2011. ISSN 1440-1711 (Electronic)
- LIU, G. et al. The macrophage heterogeneity: difference between mouse peritoneal exudate and splenic F4/80+ macrophages. **J Cell Physiol**, v. 209, n. 2, p. 341-52, Nov 2006. ISSN 0021-9541 (Print)
- LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. **Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 430-40, Jan 31 2015. ISSN 1474-547X (Electronic)

- LUO, L. et al. Proinflammatory role of neutrophil extracellular traps in abdominal sepsis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 307, n. 7, p. L586-96, Oct 1 2014. ISSN 1522-1504 (Electronic)
- MAJEWSKA, M.; SZCZEPANIK, M. [The role of Toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation]. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 60, p. 52-63, 2006. ISSN 1732-2693 (Electronic)
- MAJNO, G. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). **J Infect Dis**, v. 163, n. 5, p. 937-45, May 1991. ISSN 0022-1899 (Print)
- MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 677-86, Dec 2004. ISSN 1471-4906 (Print)
- MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol**, v. 23, n. 11, p. 549-55, Nov 2002. ISSN 1471-4906 (Print)
- MATSUKAWA, A. et al. Expression and contribution of endogenous IL-13 in an experimental model of sepsis. **J Immunol**, v. 164, n. 5, p. 2738-44, Mar 1 2000. ISSN 0022-1767 (Print)
- MCDONALD, B. et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 3, p. 324-33, Sep 13 2012. ISSN 1934-6069 (Electronic)
- MEAKINS, J. L. et al. Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. **Ann Surg**, v. 186, n. 3, p. 241-50, Sep 1977. ISSN 0003-4932 (Print)
- MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819-26, Oct 18 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic)
- MEDZHITOV, R.; SCHNEIDER, D. S.; SOARES, M. P. Disease tolerance as a defense strategy. **Science**, v. 335, n. 6071, p. 936-41, Feb 24 2012. ISSN 1095-9203 (Electronic)
- MERZA, M. et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Trypsin Activation, Inflammation, and Tissue Damage in Mice With Severe Acute Pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 149, n. 7, p. 1920-1931 e8, Dec 2015. ISSN 1528-0012 (Electronic)
- MILLS, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 11, p. 841-55, Nov 2004. ISSN 1474-1733 (Print)
- MONNERET, G. et al. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. **Crit Care Med**, v. 31, n. 7, p. 2068-71, Jul 2003. ISSN 0090-3493 (Print)
- MONNERET, G. et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. **Intensive Care Med**, v. 32, n. 8, p. 1175-83, Aug 2006. ISSN 0342-4642 (Print)
- MONTICELLI, L. A. et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. **Nat Immunol**, v. 12, n. 11, p. 1045-54, Nov 2011. ISSN 1529-2916 (Electronic)
- MORIKAWA, H.; SAKAGUCHI, S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. **Immunol Rev**, v. 259, n. 1, p. 192-205, May 2014. ISSN 1600-065X (Electronic)
- MORRISON, A. L. et al. Quality of life of survivors of pediatric intensive care. **Pediatr Crit Care Med**, v. 3, n. 1, p. 1-5, Jan 2002. ISSN 1529-7535 (Print)
- MUCIDA, D. et al. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **J Clin Invest**, v. 115, n. 7, p. 1923-33, Jul 2005. ISSN 0021-9738 (Print)

- MUENZER, J. T. et al. Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis. **Shock**, v. 26, n. 6, p. 565-70, Dec 2006. ISSN 1073-2322 (Print)
- MUSZYNSKI, J. A. et al. Early adaptive immune suppression in children with septic shock: a prospective observational study. **Crit Care**, v. 18, n. 4, p. R145, Jul 8 2014. ISSN 1466-609X (Electronic)
- NAJMEH, S. et al. Simplified Human Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Isolation and Handling. **J Vis Exp**, n. 98, Apr 16 2015. ISSN 1940-087X (Electronic)
- NAKASHIMA, K.; HAGIWARA, T.; YAMADA, M. Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. **J Biol Chem**, v. 277, n. 51, p. 49562-8, Dec 20 2002. ISSN 0021-9258 (Print)
- NASCIMENTO, D. C. et al. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. **Crit Care Med**, v. 38, n. 8, p. 1718-25, Aug 2010. ISSN 1530-0293 (Electronic)
- NASCIMENTO, D. C. et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. **Nat Commun**, v. 8, p. 14919, Apr 04 2017. ISSN 2041-1723 (Electronic)
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 3, p. 173-82, Mar 2006. ISSN 1474-1733 (Print)
- NEILL, D. R. et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1367-70, Apr 29 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic)
- NICOLETTI, F. et al. Prevention of endotoxin-induced lethality in neonatal mice by interleukin-13. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 6, p. 1580-3, Jun 1997. ISSN 0014-2980 (Print)
- OHKURA, N. et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. **Immunity**, v. 37, n. 5, p. 785-99, Nov 16 2012. ISSN 1097-4180 (Electronic)
- OHKURA, N.; KITAGAWA, Y.; SAKAGUCHI, S. Development and maintenance of regulatory T cells. **Immunity**, v. 38, n. 3, p. 414-23, Mar 21 2013. ISSN 1097-4180 (Electronic)
- OTTO, G. P. et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. **Crit Care**, v. 15, n. 4, p. R183, 2011. ISSN 1466-609X (Electronic)
- PARIHAR, A.; EUBANK, T. D.; DOSEFF, A. I. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. **J Innate Immun**, v. 2, n. 3, p. 204-15, 2010. ISSN 1662-8128 (Electronic)
- PAULA-NETO, H. A. et al. Inhibition of guanylyl cyclase restores neutrophil migration and maintains bactericidal activity increasing survival in sepsis. **Shock**, v. 35, n. 1, p. 17-27, Jan 2011. ISSN 1540-0514 (Electronic)
- PIETERSE, E. et al. Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. **Front Immunol**, v. 7, p. 484, 2016. ISSN 1664-3224 (Print)
- POLLACK, M. M.; RUTTIMANN, U. E.; GETSON, P. R. Pediatric risk of mortality (PRISM) score. **Crit Care Med**, v. 16, n. 11, p. 1110-6, Nov 1988. ISSN 0090-3493 (Print)
- POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-8, Dec 11 1998. ISSN 0036-8075 (Print)
- POLUMURI, S. K. et al. Transcriptional regulation of murine IL-33 by TLR and non-TLR agonists. **J Immunol**, v. 189, n. 1, p. 50-60, Jul 1 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic)

- PRABHUDAS, M. et al. Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. **Nat Immunol**, v. 12, n. 3, p. 189-94, Mar 2011. ISSN 1529-2916 (Electronic)
- QUARTIN, A. A. et al. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. **JAMA**, v. 277, n. 13, p. 1058-63, Apr 2 1997. ISSN 0098-7484 (Print)
- RIOS-SANTOS, F. et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 175, n. 5, p. 490-7, Mar 1 2007. ISSN 1073-449X (Print)
- RIOS, F. J.; TOUYZ, R. M.; MONTEZANO, A. C. Isolation and Differentiation of Murine Macrophages. **Methods Mol Biol**, v. 1527, p. 297-309, 2017. ISSN 1940-6029 (Electronic)
- ROQUILLY, A. et al. Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. **Immunity**, v. 47, n. 1, p. 135-147 e5, Jul 18 2017. ISSN 1097-4180 (Electronic)
- RUTH, A. et al. Pediatric severe sepsis: current trends and outcomes from the Pediatric Health Information Systems database. **Pediatr Crit Care Med**, v. 15, n. 9, p. 828-38, Nov 2014. ISSN 1529-7535 (Print)
- SAFFARZADEH, M. Neutrophil Extracellular Traps as a Drug Target to Counteract Chronic and Acute Inflammation. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 19, n. 15, p. 1196-1202, 2018. ISSN 1873-4316 (Electronic)
- SALMOND, R. J. et al. IL-33 induces innate lymphoid cell-mediated airway inflammation by activating mammalian target of rapamycin. **J Allergy Clin Immunol**, v. 130, n. 5, p. 1159-1166 e6, Nov 2012. ISSN 1097-6825 (Electronic)
- SANSONETTI, P. Phagocytosis of bacterial pathogens: implications in the host response. **Semin Immunol**, v. 13, n. 6, p. 381-90, Dec 2001. ISSN 1044-5323 (Print)
- SARAVIA, J. et al. Respiratory Syncytial Virus Disease Is Mediated by Age-Variable IL-33. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 10, p. e1005217, Oct 2015. ISSN 1553-7374 (Electronic)
- SASSE, K. C. et al. Long-term survival after intensive care unit admission with sepsis. **Crit Care Med**, v. 23, n. 6, p. 1040-7, Jun 1995. ISSN 0090-3493 (Print)
- SAUER, S. et al. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 22, p. 7797-802, Jun 3 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic)
- SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479-90, Nov 2005. ISSN 1074-7613 (Print)
- SCHNEIDER, A. et al. IRF5 Is a Key Regulator of Macrophage Response to Lipopolysaccharide in Newborns. **Front Immunol**, v. 9, p. 1597, 2018. ISSN 1664-3224 (Print)
- SCUMPIA, P. O. et al. Treatment with GITR agonistic antibody corrects adaptive immune dysfunction in sepsis. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3673-81, Nov 15 2007. ISSN 0006-4971 (Print)
- SCUMPIA, P. O. et al. Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. **J Immunol**, v. 177, n. 11, p. 7943-9, Dec 1 2006. ISSN 0022-1767 (Print)
- SEDDIKI, N. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. **J Exp Med**, v. 203, n. 7, p. 1693-700, Jul 10 2006. ISSN 0022-1007 (Print)
- SHANE, A. L.; SANCHEZ, P. J.; STOLL, B. J. Neonatal sepsis. **Lancet**, Apr 20 2017. ISSN 1474-547X (Electronic)

- SHARMA, A. A. et al. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. **Clin Immunol**, v. 145, n. 1, p. 61-8, Oct 2012. ISSN 1521-7035 (Electronic)
- SHIMOSATO, T. et al. CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 394, n. 1, p. 81-6, Mar 26 2010. ISSN 1090-2104 (Electronic)
- SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801-10, Feb 23 2016. ISSN 1538-3598 (Electronic)
- SINGH, S.; EVANS, T. W. Organ dysfunction during sepsis. **Intensive Care Med**, v. 32, n. 3, p. 349-60, Mar 2006. ISSN 0342-4642 (Print)
- SMITH, D. E. IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma. **Clin Exp Allergy**, v. 40, n. 2, p. 200-8, Feb 2010. ISSN 1365-2222 (Electronic)
- SONEGO, F. et al. Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. **Front Immunol**, v. 7, p. 155, 2016. ISSN 1664-3224 (Print)
- SONG, A. et al. Cooperation between CD4 and CD8 T cells for anti-tumor activity is enhanced by OX40 signals. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 5, p. 1224-32, May 2007. ISSN 0014-2980 (Print)
- SOUTO, F. O. et al. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 183, n. 2, p. 234-42, Jan 15 2011. ISSN 1535-4970 (Electronic)
- SOUZA, D. G. et al. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **Br J Pharmacol**, v. 134, n. 5, p. 985-94, Nov 2001. ISSN 0007-1188 (Print)
- STEARNS-KUROSAWA, D. J. et al. The pathogenesis of sepsis. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 19-48, 2011. ISSN 1553-4014 (Electronic)
- SURBATOVIC, M. et al. Immunoinflammatory response in critically ill patients: severe sepsis and/or trauma. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 362793, 2013. ISSN 1466-1861 (Electronic)
- TAKAHASHI, H. et al. Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial infections. **Crit Care Med**, v. 32, n. 9, p. 1879-85, Sep 2004. ISSN 0090-3493 (Print)
- TAVARES-MURTA, B. M. et al. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. **Crit Care Med**, v. 30, n. 5, p. 1056-61, May 2002. ISSN 0090-3493 (Print)
- THAVER, D.; ZAIDI, A. K. Burden of neonatal infections in developing countries: a review of evidence from community-based studies. **Pediatr Infect Dis J**, v. 28, n. 1 Suppl, p. S3-9, Jan 2009. ISSN 0891-3668 (Print)
- THORNTON, A. M.; SHEVACH, E. M. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. **J Immunol**, v. 164, n. 1, p. 183-90, Jan 1 2000. ISSN 0022-1767 (Print)
- TIMPERI, E. et al. Expansion of activated regulatory T cells inversely correlates with clinical severity in septic neonates. **J Allergy Clin Immunol**, v. 137, n. 5, p. 1617-1620 e6, May 2016. ISSN 1097-6825 (Electronic)
- TONE, Y. et al. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. **Nat Immunol**, v. 9, n. 2, p. 194-202, Feb 2008. ISSN 1529-2916 (Electronic)
- TREVELIN, S. C. et al. Toll-like receptor 9 activation in neutrophils impairs chemotaxis and reduces sepsis outcome. **Crit Care Med**, v. 40, n. 9, p. 2631-7, Sep 2012. ISSN 1530-0293 (Electronic)

- VAN DER POLL, T. et al. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **J Immunol**, v. 155, n. 11, p. 5397-401, Dec 1 1995. ISSN 0022-1767 (Print)
- VANDEN EIJNDEN, S. et al. Preferential production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) heterodimer by dendritic cells from human newborns. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 1, p. 21-6, Jan 2006. ISSN 0014-2980 (Print)
- VENET, F. et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. **Intensive Care Med**, v. 35, n. 4, p. 678-86, Apr 2009. ISSN 1432-1238 (Electronic)
- VENET, F. et al. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 3, p. 523-35, Mar 2008. ISSN 0741-5400 (Print)
- VENET, F. et al. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. **Crit Care Med**, v. 32, n. 11, p. 2329-31, Nov 2004. ISSN 0090-3493 (Print)
- VINCENT, J. L. et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. **Intensive Care Med**, v. 22, n. 7, p. 707-10, Jul 1996. ISSN 0342-4642 (Print)
- VINCENT, J. L. et al. Sepsis definitions: time for change. **Lancet**, v. 381, n. 9868, p. 774-5, Mar 2 2013. ISSN 1474-547X (Electronic)
- VINCENT, J. L. et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. **Crit Care Med**, v. 34, n. 2, p. 344-53, Feb 2006. ISSN 0090-3493 (Print)
- VOLK, H. D. et al. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. **Intensive Care Med**, v. 22 Suppl 4, p. S474-81, Oct 1996. ISSN 0342-4642 (Print)
- WALLEY, K. R. et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. **Infect Immun**, v. 64, n. 11, p. 4733-8, Nov 1996. ISSN 0019-9567 (Print)
- WALSH, P. T. et al. PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4+ CD25+ Tregs. **J Clin Invest**, v. 116, n. 9, p. 2521-31, Sep 2006. ISSN 0021-9738 (Print)
- WANG, F. et al. Heparin defends against the toxicity of circulating histones in sepsis. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 20, p. 1259-70, Jun 1 2015. ISSN 1093-4715 (Electronic)
- WANG, G. et al. "Default" generation of neonatal regulatory T cells. **J Immunol**, v. 185, n. 1, p. 71-8, Jul 1 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic)
- WANG, T. et al. Subsequent infections in survivors of sepsis: epidemiology and outcomes. **J Intensive Care Med**, v. 29, n. 2, p. 87-95, 2014 Mar-Apr 2014. ISSN 1525-1489.
- WANG, Y. et al. Platelet activation and antiplatelet therapy in sepsis: A narrative review. **Thromb Res**, v. 166, p. 28-36, Jun 2018. ISSN 1879-2472 (Electronic)
- WANG, Y. et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. **Science**, v. 306, n. 5694, p. 279-83, Oct 08 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic)
- WARD, N. S.; CASSERLY, B.; AYALA, A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. **Clin Chest Med**, v. 29, n. 4, p. 617-25, viii, Dec 2008. ISSN 1557-8216 (Electronic)
- WATSON, R. S.; CARCILLO, J. A. Scope and epidemiology of pediatric sepsis. **Pediatr Crit Care Med**, v. 6, n. 3 Suppl, p. S3-5, May 2005. ISSN 1529-7535 (Print)

- WATSON, R. S. et al. The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 167, n. 5, p. 695-701, Mar 1 2003. ISSN 1073-449X (Print)
- WINTERBERG, T. et al. Distinct phenotypic features of neonatal murine macrophages. **Eur J Immunol**, v. 45, n. 1, p. 214-24, Jan 2015. ISSN 1521-4141 (Electronic)
- WONG, S. L. et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. **Nat Med**, v. 21, n. 7, p. 815-9, Jul 2015. ISSN 1546-170X (Electronic)
- WYNN, J. L. Defining neonatal sepsis. **Curr Opin Pediatr**, v. 28, n. 2, p. 135-40, Apr 2016. ISSN 1531-698X (Electronic)
- WYNN, J. L. et al. The influence of developmental age on the early transcriptomic response of children with septic shock. **Mol Med**, v. 17, n. 11-12, p. 1146-56, 2011. ISSN 1528-3658 (Electronic)
- WYNN, J. L. et al. Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis. **Shock**, v. 28, n. 6, p. 675-683, Dec 2007a. ISSN 1073-2322 (Print)
- WYNN, J. L. et al. Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis. **Shock**, v. 28, n. 6, p. 675-683, Dec 2007b. ISSN 1073-2322 (Print)
- XU, D. et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. **J Exp Med**, v. 187, n. 5, p. 787-94, Mar 2 1998. ISSN 0022-1007 (Print)
- XU, J. et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. **Nat Med**, v. 15, n. 11, p. 1318-21, Nov 2009. ISSN 1546-170X (Electronic)
- YANG, Z. et al. Mast cells mobilize myeloid-derived suppressor cells and Treg cells in tumor microenvironment via IL-17 pathway in murine hepatocarcinoma model. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8922, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)
- YASUDA, K. et al. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 9, p. 3451-6, Feb 28 2012. ISSN 1091-6490 (Electronic)
- YOST, C. C. et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6419-27, Jun 18 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic)
- ZEERLEDER, S. et al. Circulating nucleosomes and severity of illness in children suffering from meningococcal sepsis treated with protein C. **Crit Care Med**, v. 40, n. 12, p. 3224-9, Dec 2012. ISSN 1530-0293 (Electronic)
- ZHANG, F. et al. Expression of IL-33 and its epigenetic regulation in Multiple Sclerosis. **Ann Clin Transl Neurol**, v. 1, n. 5, p. 307-318, May 1 2014. ISSN 2328-9503 (Print)
- ZHAO, J. et al. Hyper innate responses in neonates lead to increased morbidity and mortality after infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 21, p. 7528-33, May 27 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic)
- ZHENG, S. G. et al. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. **J Immunol**, v. 178, n. 4, p. 2018-27, Feb 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print)
- ZHENG, Y. et al. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. **Nature**, v. 463, n. 7282, p. 808-12, Feb 11 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic)

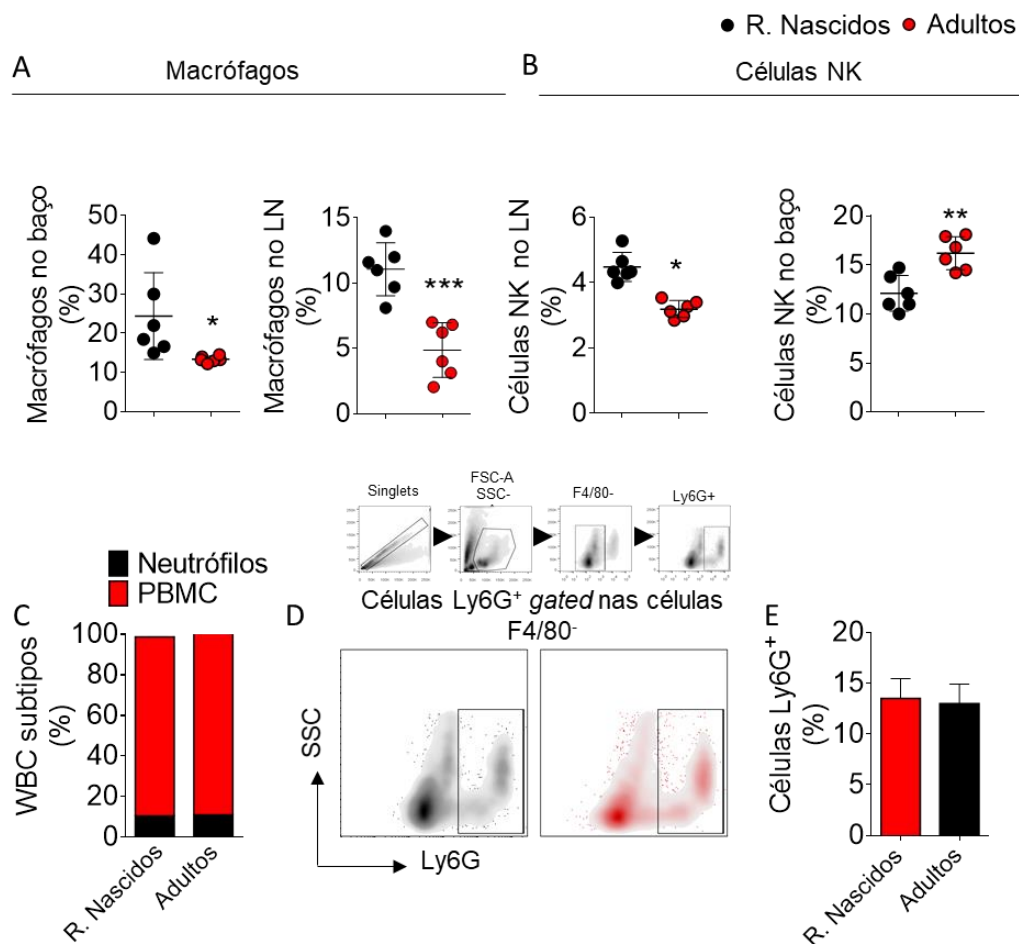






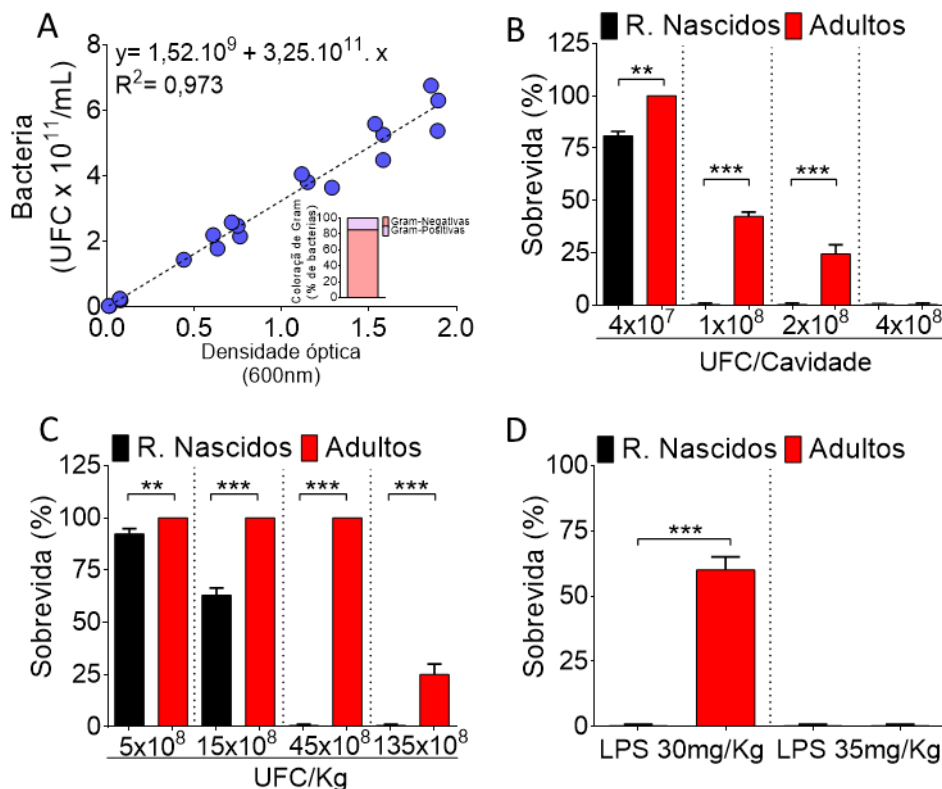
## 8. ANEXOS

## 8.1 Figura suplementar 1. Caracterização celular em animais recém-nascidos e adultos naives.



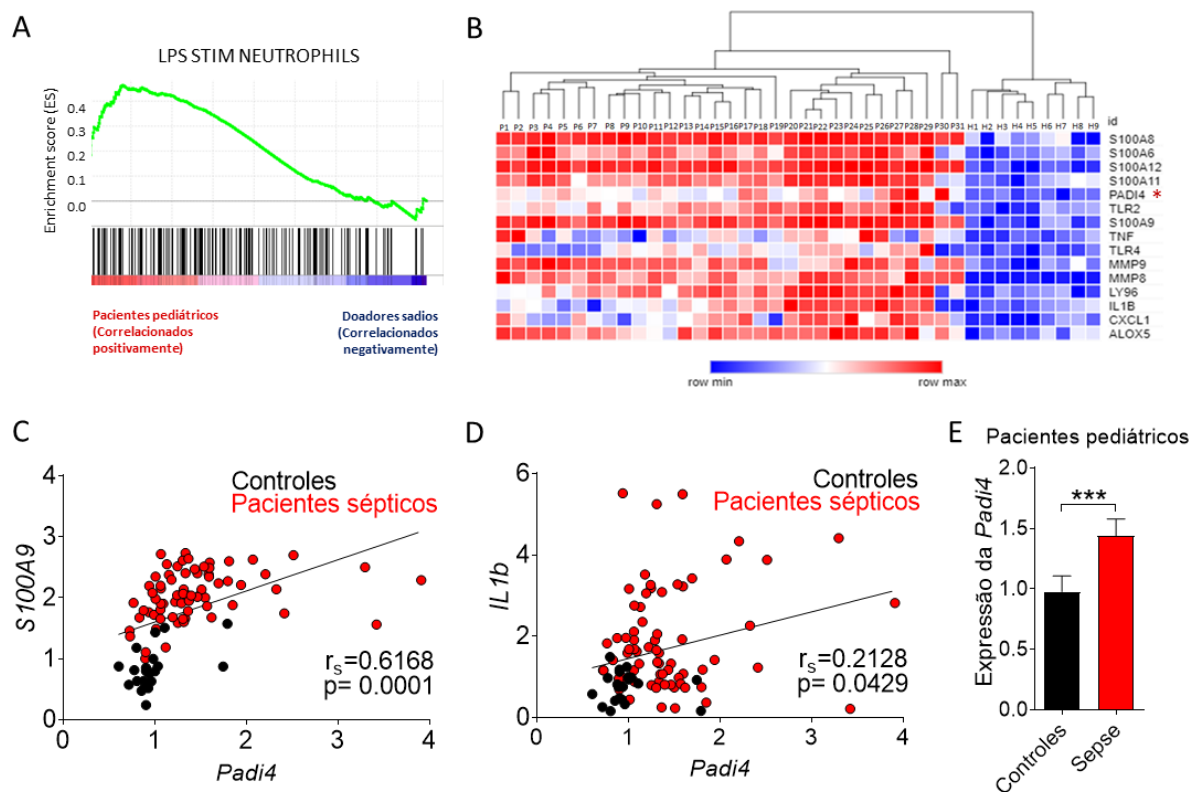
Animais recém-nascidos e adultos foram eutanasiados e a frequência de macrófagos (**A**) e células NK (**B**) no baço e linfonodos foi avaliada por FACS. Reciprocamente, (**C**) a frequência leucócitos no sangue periférico (do inglês, *White Blood Cells*) de animais recém-nascidos e adultos. (**D-E**) *Flow plots* representativos e frequência de neutrófilos (F4/80<sup>-</sup>Ly6G<sup>+</sup>) em animais recém-nascidos e adultos. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM, n=5-6 por grupo e são representativos a 2 experimentos.

## 8.2 Figura suplementar 2. Padronização da dose de bactéria para a indução da sepse em animais recém-nascidos e adultos.



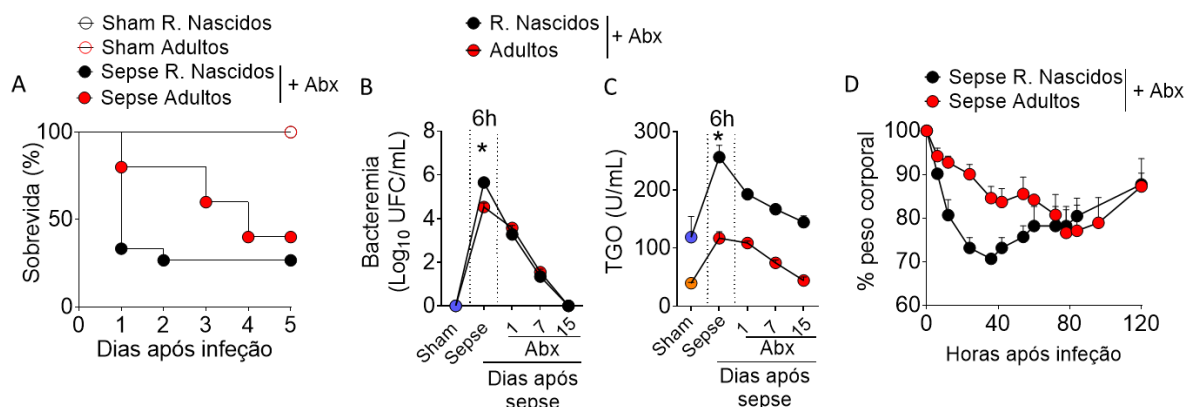
O conteúdo cecal de um camundongo adulto, 6 semanas de idade, C57BL/6 foi removido por laparotomia e as bactérias foram cultivadas em BHI durante cinco dias, a 37°C. Após diluições seriadas, as bactérias foram quantificadas por espectrofotometria a 600nm. **(A)** Relação entre concentração de bactérias por mililitro (UFC/mL) / densidade ótica e a caracterização das bactérias presentes no inóculo por coloração de Gram. Cálculo da concentração de bactérias inoculadas por animal: UFC/ml: #Colônias x Fator de diluição x Volume de inóculo. Animais recém-nascidos e adultos foram inoculados via intraperitoneal (i.p) com diferentes doses de bactéria tanto por cavidade como por peso de animal: UFC/Cavidade **(B)** ou UFC/Kg **(C)** e a sobrevivência dos camundongos submetidos à infecção foi avaliada diariamente por um período de cinco dias. Paralelamente, os animais foram inoculados via i.p com diferentes doses de LPS (mg/Kg, **D**) e a sobrevivência foi verificada por 5 dias. A média do peso dos animais recém-nascidos e adultos foi 10 g e 20 g respectivamente. Os resultados são apresentados como a média ± DPM, n=5-6 por grupo e são representativos a 3 experimentos. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (B-D, Mantel-Cox log-rank test).

### 8.3 Figura suplementar 3. Ativação dos neutrófilos e expressão da *Padi4* em pacientes pediátricos.



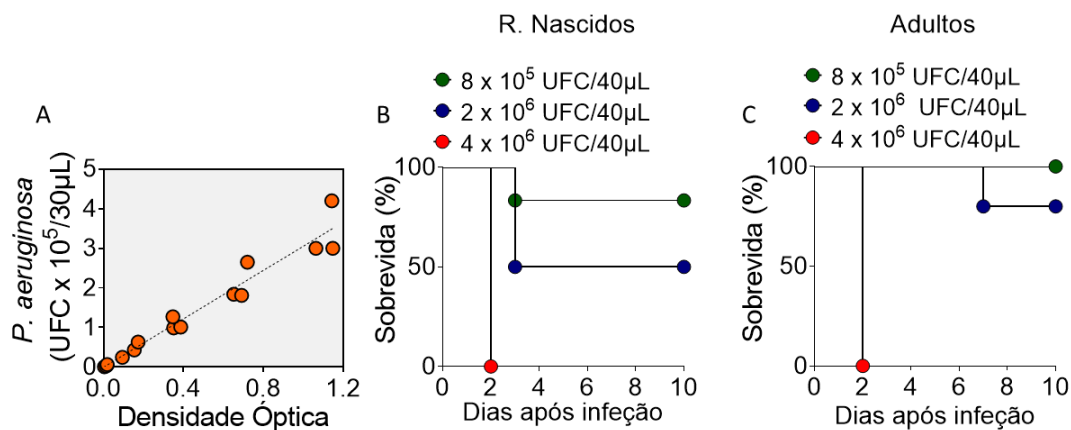
Análise de enriquecimento de grupos de genes (do inglês, *Gene set enrichment analysis*, GSEA) do perfil de expressão de pacientes pediátricos (GSE26378) 24 h após a admissão hospitalar comparada com os doadores saudáveis. **(A)** os genes enriquecidos relacionados à ativação dos neutrófilos. A linha verde representa o *score* de enriquecimento (ES) para cada grupo de genes. **(B)** *heatmap* mostrando os principais genes relacionados com a ativação dos neutrófilos entre os quais está presente a *Padi4*. **(C-D)** coeficiente de correlação de Spearman entre a expressão da *Padi4* e marcadores de ativação dos neutrófilos tais como: *S100a9* e *Il1b*. **(E)** expressão da *Padi4* em amostras de sangue periférico coletadas de pacientes pediátricos 24 h (n=15) após admissão hospitalar e doadores saudáveis (n=7).

#### 8.4 Figura suplementar 4. Recuperação da sepse após o tratamento antibiótico.



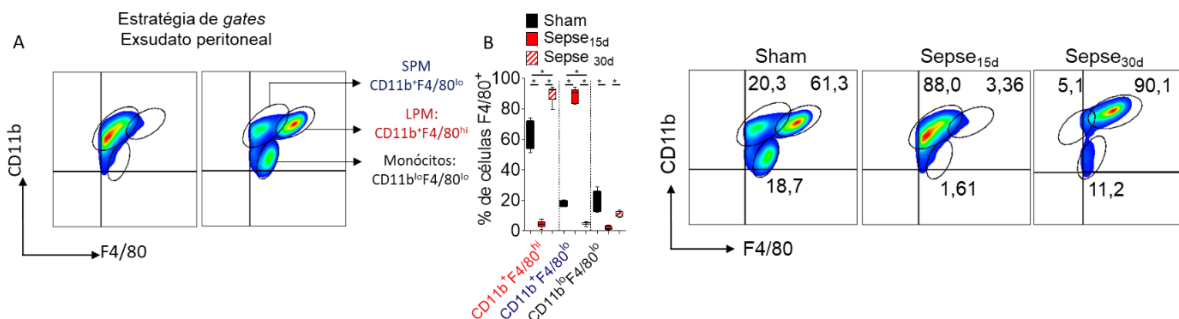
Animais recém-nascidos e adultos foram injetados (*i.p.*) com uma suspensão ( $2 \times 10^8$  UFC/cavidade). **(A)** animais foram tratados (*i.p.*) com antibiótico (Ertapenem, 30 mg/kg, animais adultos) e 15 mg/kg (animais recém-nascidos) 6 h após a infecção. O tratamento foi mantido em intervalos de 12 horas, durante três dias e a sobrevivência foi avaliada por 5 dias. Quantidade de bactéria no sangue (logaritmo de UFC/mL) **(B)** e a atividade enzimática do TGO em animais recém-nascidos e adultos **(C)** foram analisadas no 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias após a sepse em camundongos tratados ou não com antibiótico. **(D)** A massa corpórea dos animais adultos e recém-nascidos submetidos à sepse foi avaliada a cada seis horas, por cinco dias e expressa como a porcentagem de perda de peso corporal. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM, representativos a 3 experimentos. \*  $p < 0.05$  (C-D, one way-ANOVA, Bonferroni's; A, Mantel-Cox log-rank test).

### 8.5 Figura suplementar 5. Padronização do desafio com *P. aeruginosa* em animais recém-nascidos e adultos.



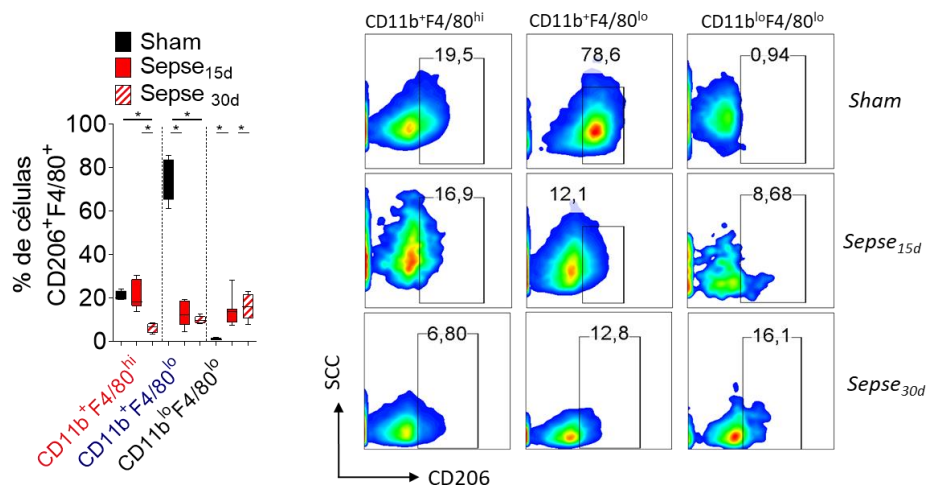
(A) Amostra de *P. aeruginosa* foi cultivada em BHI durante cinco dias, a 37°C. Após diluições seriadas, a bactéria foi quantificada por espectrofotometria a 600nm. (A) Relação entre concentração de bactérias por mililitro (UFC/mL) / densidade ótica. (B-C) animais adultos e recém-nascidos foram infectados intranasalmente (i.n) com diferentes concentrações de *P. aeruginosa*. A sobrevivência dos camundongos submetidos à infecção (i.n) foi avaliada diariamente por um período de cinco dias. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM, n=5-6 por grupo e são representativos de 3 experimentos.

### 8.6 Figura suplementar 6. Caracterização imunofenotípica das populações de macrófagos da cavidade peritoneal de animais recém-nascidos pós-sépticos.



Camundongos recém-nascidos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. Após tratamento os animais foram eutanasiados e as células peritoneais foram coletadas nos tempos indicados para avaliar a frequência das células F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> por FACS. **(A)** estratégia de *gates*, frequência de subpopulações de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> e *flow plots* representativos **(B)** da cavidade peritoneal 15 e 30 dias após sepse. Os resultados são apresentados como a média ± DPM, n=3-8 por grupo e são representativos a 3 experimentos. \* $p < 0.05$  (one way-ANOVA, Bonferroni's).

**8.7 Figura suplementar 7. Macrófagos peritoneais pequenos de animais recém-nascidos sobreviventes à sepse apresentam redução dos marcadores do perfil M2.**



Camundongos recém-nascidos submetidos à sepse foram tratados com antibiótico por três dias. Após tratamento os animais foram eutanasiados e as células peritoneais foram coletadas nos tempos indicados para avaliar a frequência das células F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> por FACS. Frequência de células CD206<sup>+</sup> nas subpopulações de células F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> da cavidade peritoneal e *flow plots* representativos dos 15 e 30 dias após sepse. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DPM, n=3-8 por grupo e são representativos a 3 experimentos. \* $p < 0.05$  (one way-ANOVA, Bonferroni's).



**8.8 Tabela suplementar 1. pD<sub>2</sub> da curva de concentração dose-resposta a fenilefrina (10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> mol/L) 6 horas após sepse.**

Grupos	pD <sub>2</sub> 6 h após sepse
R. Nascidos Sham	5.84 ± 0.03
R. Nascidos Sepse	5.17 ± 0.33 <sup>#,*</sup>
Adultos Sham	6.85 ± 0.08
Adultos Sepse	6.2 ± 0.14 <sup>&amp;</sup>

Os resultados são mostrados como a media ± DPM, n=5-6 por grupo e são representativos a 3 experimentos. <sup>#</sup>*p*<0.05 Infant septic vs. Infant Sham; <sup>&</sup>*p*<0.05 Adult Septic vs. Adult Sham; <sup>\*</sup>*p*<0.05 Infant Septic vs. Adult Septic (% of maximum response, one way-ANOVA, Bonferroni's).

\* pD<sub>2</sub> = -log (EC<sub>50</sub>), EC<sub>50</sub>: Half maximal effective concentration.

**8.9 Tabela suplementar 2.** Características demográficas e clínicas dos pacientes adultos e pediátricos

Características	Pediátricos (n=15)	Adultos (n=11)
Idade (anos) – meia (SEM)	3.52 ( $\pm$ 5.07)	60.33 ( $\pm$ 22)
Feminino – n (%)	8 (53.3)	4 (28.5)
APACHE II – meia (SEM)	N/A	13.8 ( $\pm$ 6.91)
SOFA – meia (SEM)	N/A	6.93 ( $\pm$ 3.30)
PRISM – meia (SEM)	9.18 ( $\pm$ 4.68)	N/A
PELOD – meia (SEM)	9.45( $\pm$ 6.48)	N/A
Score inotrópico	20.8 ( $\pm$ 17.21)	N/A

**SOFA**, Sequential Organ Failure Assessment. **APACHE**, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation. **PRISM**, Pediatric Risk of Mortality. **PELOD**, Pediatric Logistic Organ Dysfunction.

**8.10 Tabela suplementar 3. Características demográficas e clínicas dos pacientes adultos e pediátricos sobreviventes à sepse**

<b>Características</b>	<b>Pediátricos (n=5)</b>	<b>Adultos (n=11)</b>
<b>Idade (anos) – meia (SEM)</b>	3.78 ( $\pm$ 4.59)	60.2 ( $\pm$ 12.83)
<b>Feminino – n (%)</b>	2 (40)	4 (36.4)
<b>APACHE II – meia (SEM)</b>	N/A	17.72 ( $\pm$ 9.73)
<b>SOFA – meia (SEM)</b>	N/A	9.81 ( $\pm$ 4.87)
<b>PRISM – meia (SEM)</b>	5.4 ( $\pm$ 2.87)	N/A
<b>PELOD – meia (SEM)</b>	4.8 ( $\pm$ 5.21)	N/A
<b>Score inotrópico</b>	9.8 ( $\pm$ 6.46)	N/A

## 8.11 Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FMRP

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	
www.hcrp.fmrp.usp.br		
Ribeirão Preto, 07 de julho de 2009		
Ofício n° 2140/2009 CEP/MGV		
<b>Prezados Senhores,</b>		
O trabalho intitulado <b>"AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE IMUNOSSUPRESSÃO PÓS-SEPSIS NO PERÍODO PEDIÁTRICO E PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS NESTE PROCESSO"</b> foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 290ª Reunião Ordinária realizada em 06/07/2009 e enquadrado na categoria: <b>APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> , de acordo com o Processo HCRP n° 4886/2009.		
<i>Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução n° 196/96 CNS/MS.</i>		
<u>Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.</u>		
Atenciosamente.		
 <b>DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA</b> Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP		
Ilustríssimos Senhores <b>WALTER MIGUEL TURATO</b> <b>PROF. DR. JOÃO SANTANA DA SILVA (Orientador)</b> Depto. de Bioquímica e Imunologia – FMRP-USP		
Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEPICONEP nº 4 Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP		