Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

**SOCS1: um regulador negativo da reprogramação metabólica e da
inflamação sistêmica durante a sepse experimental**

Annie Rocio Piñeros Alvarez

Ribeirão Preto – SP

2017

Annie Rocio Piñeros Alvarez

**SOCS1: um regulador negativo da reprogramação metabólica e da
inflamação sistêmica durante a sepse experimental**

Versão corrigida

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

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Farias Alves-Filho

Ribeirão Preto-SP

Brasil

2017

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.

Annie Rocio Piñeros Alvarez

FICHA CATALOGRÁFICA

Piñeros, Annie Rocio.

SOCS1: um regulador negativo da reprogramação metabólica e da inflamação sistêmica durante a sepse experimental. Annie Rocio Piñeros Alvarez; Orientador Prof. Dr. José Carlos Farias Alves-Filho, Co-orientador Prof. Dr. Carlos Henrique Serezani. Ribeirão Preto - São Paulo, 2017. 147 f.: il.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ciências. Área de concentração Imunologia Básica e Aplicada - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo. 2017

Orientador: Dr. Prof. José Carlos Farias Alves-Filho

Palavras chaves:

1. Sepse. 2. Socs1. 3. STAT3. 4. Metabolismo da glicose. 5. Macrófagos. 6. Resposta inflamatória exacerbada.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Annie Rocio Piñeros Alvarez

SOCS1: um regulador negativo da reprogramação metabólica e da inflamação sistêmica durante a sepse experimental

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

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Instituição: FMRP-USP Assinatura:_____

Prof. Dr. João Santana da Silva

Instituição: FMRP-USP Assinatura:_____

Prof. Dr. Antônio Pazin Filho

Instituição: FMRP-USP Assinatura:_____

Prof. Dr. Fernando Spiller

Instituição: Assinatura:_____

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

Instituição: Assinatura:_____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e dor, localizado no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Laboratório do Prof. Dr. Carlos Henrique Serezani na Indiana University, School of Medicine - Indianapolis, nos Estados Unidos com o apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

1. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Número de processo 99999.003387/2015-01;
2. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Temático (2011/19670-0), CEPID (2013/08216-2), Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias – CRID (2013/08216-2);
3. Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA);
4. National Institutes of Health Grants (NIH HL-103777; R01HL124159-01);
5. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Dedicatória

A Deus pelas oportunidades, por me cuidar e me ajudar a alcançar os objetivos almejados. Por trazer os meus caminhos, pela sabedoria, ensinamentos de cada dia e o amor.

Aos meus pais Juan Ignacio e Ana Isabel, fonte de inspiração, de dedicação e de honestidade, a quem devo tudo o que eu sou, por me apoiar, pelo amor e a entrega incondicional

Aos meus amados sobrinhos Dani, Laura, Juanca, Sami, Juanf fonte de puro amor e de ternura.

Aos meus irmãos pela confiança, o carinho e pelo exemplo de honestidade e dedicação.

Ao meu amado noivo Yusuf pelo amor, o apoio e por me ensinar que “everything is about focus”.

Agradecimientos

Gostaria agradecer a meu orientador o **Prof. Dr. José Carlos Farias Alves-Filho** por abrir as portas de seu laboratório, por seus conselhos, sua supervisão, pelas oportunidades e por me permitir crescer no seu laboratório e contribuir em minha formação profissional durante quatro excelentes anos. Também gostaria de agradecer ao meu co-orientador o **Prof. Dr. Henrique Serezani** por abrir as portas do seu laboratório em Indianópolis. Por todo o suporte, conselhos, paciência e a motivação em dois anos de muito aprendizado profissional e pessoal. Também gostaria de lhe agradecer por tudo o apoio e infra-estrutura para a realização deste trabalho. Obrigada professores porque seus ensinamentos contribuíram na minha formação pessoal e profissional.

Ao **Prof. Dr. Fernando Cunha e Thiago Cunha** pelas discussões científicas e pelo apoio e infra-estrutura para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. João Santana da Silva** pela oportunidade e pela confiança ao me receber no programa.

Ao coordenador do programa o **Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi**.

Aos professores membros da banca avaliadora da dissertação pela disponibilidade e sugestões.

Sou grata aos meus colegas de laboratório **Daniele Nascimento, Nicky Glosson-Byers, Raphael Gomes Ferreira, Paulo Henrique Melo, Stephanie Brandt**, por sua paciência, dedicação, ensinamentos de técnicas, assim como de português e de inglês. Pelas discussões que contribuíram diretamente no meu trabalho e na minha formação profissional. Sou imensamente grata pelo carinho e a amizade oferecida.

A **Soujuan Wang e Brian Paul McCarthy**, pelo auxílio nos experimentos realizados e pelo entusiasmo com que sempre me ajudaram.

À **Prof. Dr. Paul Territo** pelo apoio na realização dos experimentos com MRSA bioluminescente.

Grata aos meus amigos e colegas de laboratório **Daniele Nascimento, Raphael Gomes Ferreira, Paulo Henrique Melo, André Saraiva e Wendy Rios** por toda a ajuda nas correções da minha tese de doutorado.

A meus colegas de laboratório, **Flavio Protásio, André Saraiva, João Paulo Mesquita, Douglas Prado, Paula Viacava, Eduardo Damasceno, Bruno Marcel, Leticia e Talita Perdigão** porque colaboraram em diversas atividades durante o desenvolvimento de meu trabalho. E pela amizade e o carinho oferecido.

Obrigada aos meus colegas dos laboratórios de Dor e Inflamação, pelas contribuições na minha formação pessoal e profissional: **Miriam Fonseca, David Ferreira, Caio Abner, Marcela Davoli, Raphael Sanches Peres, Fernanda Castanheira, María Claudia da Silva, Jhimmy Talbot, Alexandre Kanashiro, Guilherme Rabelo de Sousa, David Colon, Joana Gasperazzo, Vanessa Borges, Carlos Hiroki, Rangel Leal, Raphaela Guimaraes, Alexandre Lopes, Paula Barbim.**

Agradeço o auxílio técnico de: **Diva Amábile, Ana Kátia dos Santos, Sérgio Roberto Rosa, Giuliana Bertozzi, Marquinhos, Denise Brufato Ferraz, Ieda Regina dos Santos, Vagner Jesus.**

Obrigada as bioteristas pelo cuidado com os animais: **Maria Inês Nemoto e Orlando.**

Aos secretários **Ana Cristine S. Ferreira e Ronaldo S. Campanini** pelo auxílio e atenção ao nosso programa de pós-graduação.

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (**FMRP**) pela infraestrutura utilizada.

Aos funcionários **Júlio Anselmo Siqueira, Dener Salviano dos Reis** e a **Cristina** do Centro de Criação de Camundongos Especiais e do Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela disponibilização de animais.

À **CAPES, FAPESP, FAEPA, CRID, AIRTD e NIH** pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer ao meu pai **Juan Ignacio** e a minha mãe **Ana Isabel**, pelo amor, a amizade, a confiança, pela fortaleza, pelos ensinamentos e pelo apoio incondicional mesmo de longe. Eles tem sido fundamentais na minha jornada. Sou grata aos meus irmãos **Mercy, Juan, Hugo e Johana** por tudo o amor. Aos meus lindos sobrinhos **Daniela, Laura, Juan Camilo, Samuel e Juan Felipe** que são uma das minhas fontes de amor e ternura.

Também gostaria de agradecer ao meu noivo, amigo e amor **Yusuf Khan**, por tudo o apoio, paciência, ensinamentos, experiências, pelos conselhos e o amor.

Por fim, gostaria de agradecer a Deus por tudo, pelos caminhos, pelas grandes oportunidades, por me permitir fazer meu Doutorado, por me trazer para este lindo país, onde tive a oportunidade de conhecer uma família maravilhosa, colegas e amigos para a vida toda. Sou imensamente grata a Deus pelas grandes experiências, pelos ensinamentos em cada passo e por todas as benças. Obrigada Deus!

Learning is the beginning of wealth. Searching and learning is where the miracle process all begins.

The great breakthrough in your life comes when you realize that you can learn anything you need to learn to accomplish any goal that you set for yourself.

This means there are no limits on what you can be, have or do.

Albert Einstein

Resumo

PIÑEROS, A. R. SOCS1: um regulador negativo da reprogramação metabólica e da inflamação sistêmica durante a sepse experimental. 2017, 147F. Tese (Doutorado) – Departamento de Imunologia Básica e Aplicada. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Sepsis é uma disfunção de órgãos causada por uma resposta desregulada do hospedeiro em decorrência de uma infecção e que eventualmente leva a morte. A identificação de moléculas que minimizem este processo pode fornecer alvos terapêuticos para prevenir a falência de órgãos durante a sepse. O supressor de sinalização de citocinas 1 (SOCS1) é conhecido por regular negativamente a sinalização de receptores de citocinas e de receptores do tipo Toll (TLRs). No entanto, os alvos celulares e mecanismos moleculares envolvidos nas ações de SOCS1 durante a sepse são desconhecidos. Para determinar o papel de SOCS1 durante a sepse polimicrobiana, camundongos C57BL/6 foram tratados com um peptídeo inibidor do domínio KIR (*kinase inhibitor region*) do SOCS1 (iKIR) e submetidos à CLP (ligação e perfusão do ceco). O tratamento com iKIR aumentou a mortalidade, a carga bacteriana e a produção de citocinas inflamatórias induzida pela CLP. Além disso, observou-se que animais deficientes de SOCS1 nas células mielóides (SOCS1^{Δmyel}) também tiveram aumento na carga bacteriana e na produção de citocinas próinflamatórias, quando comparados com camundongos SOCS1^{fl}. O aumento na susceptibilidade a sepse foi acompanhado pelo aumento da via glicolítica nas células peritoneais e no pulmão desses animais. Assim, foi observado aumento da produção de ácido láctico e da expressão de enzimas glicolíticas como hexoquinase-1 (*Hk1*), lactato desidrogenase A (*Ldha*) e o transportador de glicose 1 (*Glut-1*) em camundongos sépticos tratados com iKIR ou SOCS1^{Δmyel}. A expressão desses genes da via glicolítica foi dependente da via de ativação STAT3/HIF-1 α . O tratamento com 2-deoxiglicose (inibidor da via glicolítica) diminuiu a susceptibilidade à sepse em camundongos tratados com iKIR. Estes resultados indicam um papel até agora desconhecido de SOCS1, como um regulador de reprogramação metabólica que reduz a resposta inflamatória exacerbada e o dano de órgãos durante a sepse.

Palavras chave: 1. Sepse. 2. Socs1. 3. STAT3. 4. Metabolismo da glicose. 5. Macrófagos. 6. Resposta inflamatória exacerbada.

Abstract

PIÑEROS, A. R. SOCS1: negative regulator of metabolic reprogramming and systemic inflammation during experimental sepsis. 2017, 147F. Tese (Doutorado) – Department of Basic and Applied Immunology. Medical School of Ribeirão Preto. University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Sepsis is a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. Identification of pleiotropic molecular brakes might provide therapeutic targets to prevent organ failure during sepsis. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) is known to negatively regulate signaling by cytokine and Toll-like receptors (TLRs). However, the cellular targets and molecular mechanisms involved in SOCS1 actions during sepsis are unknown. To address this in a cecal ligation puncture (CLP) model of sepsis, we treated C57BL/6 mice with an antagonist peptide (iKIR) that blocks the kinase inhibitory region (KIR) domain of SOCS1 and prevents its actions. iKIR treatment increased mortality, bacterial burden and inflammatory cytokine production induced after CLP. We also found that myeloid cell-specific SOCS1 deletion (SOCS1^{Δmyel}) rendered mice more susceptible to sepsis, shown by higher bacterial loads and inflammatory cytokines than SOCS1^{fl} littermate control mice. O aumento na susceptibilidade a sepse foi acompanhado pelo aumento da via glicolítica nas células peritoneais e pulmão desses animais. These effects were accompanied by increase of glycolysis function in peritoneal cells and lung of SOCS1^{Δmyel}. Thus, it was observed increased expression of the glycolytic enzymes, hexokinase-1 (*Hk1*), lactate dehydrogenase A (*Ldha*), and glucose transporter 1 (*Glut-1*) in iKIR-treated or SOCS1^{Δmyel} septic mice. These events were dependent on the activation of STAT3/HIF-1 α pathway. Blocking glycolysis with 2-deoxyglucose ameliorated the increased susceptibility to sepsis in iKIR-treated CLP mice. Together, we unveiled a heretofore unknown role of SOCS1 as a regulator of metabolic reprogramming that reduces overwhelming inflammatory response and organ damage during sepsis.

Keywords: 1. Sepsis. 2. Socs1. 3. STAT3. 4. Glycolysis metabolism. 5. Macrophages. 6. Exacerbated inflammatory response.

Lista de abreviaturas

2-DG	2-Deoxiglicose
ALT	Alanina aminotransferase
ASK	citocina de regulação do sinal de apoptose
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
CFU	do inglês <i>colony forming unit</i>
ChIP	do inglês <i>Chromatin immunoprecipitation</i>
CK-MB	Creatine quinase-MB
CLP	Ligação e perfuração do ceco
cre	Enzima cre recombinase
CT	<i>do inglês Cycle Threshold</i>
CXCL2	quimiocina ligante 2 (motivo C-X-C)
CXCR2	receptor de quimiocina CXCL2
DAMP	Padrão molecular associado ao dano

DLIT	do inglês <i>Diffuse Light Imaging Tomography</i>
EAE	encefalomielite autoimune
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
fl	Flox
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
G	do inglês <i>Gauge</i>
Glut1	Transportador de glicose 1
h	Hora
H&E	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
hCD4	CD4 humano
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) – tampão
HIF-1 α	do inglês <i>Hypoxia inducible factor 1 alpha</i>
Hk1	Hexoquinase 1
i.p.	Intraperitoneal

i.v.	Intravenoso
IFN- γ	Interferon- gama
iKIR	inibidor do domínio KIR do SOCS1
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de IL-1
IL-1 β	Interleucina-1 β
JAK2	do inglês <i>Janus kinase 2</i>
Kg	Quilograma
KIR	do inglês <i>Quinase Inhibitory Region</i>
L	Litro
Ldha	Lactato deidrogenase A
LPS	Lipopolissacarídeo derivado de <i>E. coli</i> cepa O157
LysM	do inglês <i>Lysozyme M</i>
MAL	Gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 - MyD88

MAPKs	Proteína quinases ativadas por mitógenos
MCT4	Do inglês <i>Monocarboxylate transporter 4</i>
mg	Miligrama
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade principal II
mL	Mililitro
MPO	Mieloperoxidase
MRSA	do inglês <i>Methicillin resistant- Staphylococcus aureus</i>
mTOR	do inglês <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MyD88	do inglês <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	NAD no estado reduzido
NET	do inglês <i>neutrophil extracellular trap</i>
NF-κB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico

PAMP	Padrão molecular associado à patógeno
PBS	Solução salina tamponada fosfatada
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFK	Fosfofructoquinase
PKM2	Piruvato quinase M2
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas derivadas de oxigênio
RT-PCR	do inglês <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>
SOCS1	do inglês <i>Suppressor of Signaling Cytokine 1</i>
SOCS1 ^{Δmyel}	Animais deficientes de SOCS1 na célula mieloide
STAT1	do inglês <i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT3	do inglês <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TLR	Receptores do tipo Toll

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa

WT do inglês *Wildtype*

μg Micrograma

μL Microlitro

Lista de figuras

Figura 1. Aumento da expressão de Socs1 durante a sepse. _____	71
Figura 2. Inibição de SOCS1 aumenta a susceptibilidade a sepse polimicrobiana. _____	73
Figura 3. Aumento da liberação sistêmica de citocinas proinflamatórias em animais sépticos tratados com iKIR. _____	75
Figura 4. SOCS1 inibe a resposta inflamatória pulmonar durante a sepse. _____	77
Figura 5. Aumento do dano tecidual em animais sépticos tratados com iKIR. _____	79
Figura 6. Inibição de SOCS1 aumenta a carga bacteriana durante a sepse. _____	81
Figura 7. Diminuição da migração de neutrófilos em animais sépticos tratados com iKIR. _____	83
Figura 8. Tratamento com iKIR aumenta a susceptibilidade a sepse induzida por MRSA. _____	85
Figura 9. Aumento da carga bacteriana em animais Socs1 ^{Δmyel} sépticos. _____	88
Figura 10. Aumento da resposta inflamatória sistêmica e pulmonar em camundongos Socs1 ^{Δmyel} sépticos. _____	90
Figura 11. Inibição de SOCS1 induz aumento na expressão e ativação de STAT3. _____	92
Figura 12. SOCS1 tem um efeito protetor durante a sepse inibindo a ativação de STAT3. _____	94
Figura 13. SOCS1 regula negativamente a expressão de HIF-1α e de genes associados a via glicolítica. _____	97
Figura 14. Deficiência de Socs1 na célula mieloide aumenta a expressão de genes associados a via glicolítica. _____	98
Figura 15. Deficiência de Socs1 aumenta a expressão de genes associados a via glicolítica no pulmão de camundongos sépticos. _____	100
Figura 16. Deficiência de Socs1 em macrófagos estimulados com LPS exacerba a produção de citocinas e aumenta a expressão de genes associados a via glicolítica. _____	102
Figura 17. Deficiência de SOCS1 aumenta a ativação da via STAT3/HIF-1α/Glicólise em macrófagos estimulados com LPS. _____	105
Figura 18. Aumento da via glicolítica induz maior susceptibilidade a sepse em camundongos tratados com iKIR. _____	107

Lista de tabelas

Tabela 1. Sequência de primers para genotipagem de animais $Socs1^{\Delta myel}$	55
Tabela 2. Sequência de peptídeos.	56
Tabela 3. Sequência de primers utilizados para avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real.	64

Sumário

Abstract.....	16
1. Introdução	33
2. Hipótese	49
3. Objetivos	51
Objetivo geral:	52
Objetivos específicos:.....	52
4. Material e métodos.....	53
3.1 Animais.....	54
3.2 Modelos experimentais.....	55
3.2.1 Modelo de sepse polimicrobiana	55
3.2.2 Tratamento com inibidor de domínio KIR do SOCS1 (iKIR)	56
3.2.3 Tratamento com STATTIC	57
3.2.4 Tratamento com 2-deoxi-D-glicose (2-DG)	57
3.3 Análise e quantificação de MRSA bioluminescente.....	58
3.4 Quantificação de bactérias	60
3.5 Determinação de migração de neutrófilos	60
3.6 Avaliação proteica por Western Blot	60
3.7 Extração de RNA e avaliação da expressão de genes por RT-PCR	61
3.8 Dosagem de citocinas e nitrito.....	64
3.9 Dosagem de lactato.....	64
3.10 Parâmetros bioquímicos	64
3.11 Análise histopatológica	65
3.12 Ensaio de atividade da mieloperoxidase (MPO)	65
3.13 Cultura de macrófagos	66
3.13.1 Infecção com MRSA.....	66
3.13.2 Cultura de macrófagos para ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) ou expressão gênica por qPCR	66
3.14 Ensaio de imunoprecipitacao de cromatina (ChIP).....	66
3.15 Análise de resultados	67
5. Resultados	69

4.1. Expressão de Socs1 em pacientes sépticos e em modelo experimental de sepse polimicrobiana.....	70
4.2. Inibição farmacológica de SOCS1 aumenta a susceptibilidade a sepse polimicrobiana	72
4.3. Aumento da resposta inflamatória em camundongos sépticos tratados com iKIR.....	74
4.4. SOCS1 previne a inflamação pulmonar induzida durante a sepse.....	76
4.5. Inibição de SOCS1 aumenta o dano tecidual em camundongos sépticos tratados com iKIR.....	78
4.6. Inibição farmacológica de SOCS1 aumenta a carga bacteriana durante a sepse80	
4.7. Inibição farmacológica de SOCS1 diminuiu o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais sépticos.....	82
4.8. Inibição farmacológica de SOCS1 aumenta a susceptibilidade à sepse causada por MRSA	84
4.9. Deficiência de Socs1 em células mieloides aumenta a susceptibilidade a sepse polimicrobiana.....	87
4.10. Deficiência de SOCS1 na célula mielóide exacerba a resposta inflamatória sistêmica e pulmonar	89
4.11. Inibição farmacológica de SOCS1 aumenta a ativação de STAT3 durante a sepse.....	91
4.12. SOCS1 controla a ativação de STAT3 e diminui a mortalidade em animais sépticos.....	93
4.13. SOCS1 inibe a expressão de genes associados a via glicolítica durante a sepse 96	
4.14. Deficiência de SOCS1 nas células mieloides inibe a expressão de genes associados a via glicolítica em animais sépticos	98
4.15. SOCS1 inibe a expressão de genes associados a via glicolítica no pulmão de camundongos sépticos	99
4.16. Ausência de SOCS1 aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de genes da via glicolítica em macrófagos estimulados com LPS	
101	
4.17. STAT3 induz a expressão de Hif-1 α em macrófagos SOCS1 Δ myel ..	104
4.18. SOCS1 inibe a via glicolítica para prevenir uma resposta inflamatória exacerbada durante a sepse	106
6. Discussão.....	109
7. Conclusões	122

8. Apêndice	124
9. Referências	127

1. Introdução

1.1. Definições consenso de sepse

A sepse é definida como uma disfunção de órgãos causada por uma resposta desregulada do hospedeiro a infecção e que pode levar a morte (Singer *et al.*, 2016). A conferência de 2016 entre a *Society of Critical Care Medicine* e o *European Society of Intensive Care Medicine* estabeleceram novas definições de sepse, fornecendo parâmetros fisiológicos detalhados para categorizar o paciente com sepse (Singer *et al.*, 2016). O uso desses termos auxiliaria médicos e pesquisadores no rápido diagnóstico e tratamento dos pacientes, no desenvolvimento de terapias, assim como na geração de reportes epidemiológicos más precisos de incidência e mortalidade da sepse. Segue algumas definições consenso estabelecidas (Singer *et al.*, 2016):

- 1.1.1. *Disfunção de órgãos*: Definida como um aumento sequencial na falha de órgãos (Sequential [Sepsis-related] organ failure assesment, SOFA), associado com infecção e com mortalidade maior de 10%.
- 1.1.2. *Choque séptico*: Definida como um subconjunto de sepse associado com anormalidades metabólicas, celulares, circulatórias que geram um alto risco de mortalidade, comparado com pacientes somente com sepse. Pacientes com choque séptico requerem do uso de vasopressores e apresentam uma taxa de mortalidade maior que 40%.

1.2. Considerações gerais sobre sepse

A sepse pode ser originada por infecções por fungos, bactérias ou vírus, sendo a infecção bacteriana a causa mais comum (Vincent *et al.*, 2013). De acordo com um estudo realizado por Beale e colaboradores, de 12.881 pacientes com sepse, 41,4% dos casos foram causados por infecção com bactéria Gram-negativa, 32,4% por Gram-positiva e 8,7% por fungos (Beale *et al.*, 2009; Bhan *et al.*, 2016). Sendo que as principais causas da infecção foram de origem abdominal, urinário ou sanguíneo (Beale *et al.*, 2009; Bhan *et al.*, 2016). Na América do Norte são reportados 700.000 casos de sepse a cada ano, com uma taxa de mortalidade de

20 a 50%, dependendo da gravidade da sepse (Jawad *et al.*, 2012; Dellinger, 2013; Deutschman e Tracey, 2014). No Brasil, considerado um país de renda média, a taxa de mortalidade associada a sepse aumentou de 9,77% a 16,46%, entre 2002 e 2010 (Taniguchi *et al.*, 2014). No entanto, o número de casos de sepse no país é desconhecido (Ilas, 2015; Fleischmann *et al.*, 2016). A sepse representa um dos maiores custos no sistema de saúde pública, com gastos no valor de 16,7 bilhões de dólares por ano (Taniguchi *et al.*, 2014). A sepse é um desafio para os cientistas e para o mundo moderno, e a necessidade de conhecimento dos mecanismos envolvidos na patologia precisam ser elucidados.

Atualmente não existe um tratamento efetivo para tratar sepse (Bhan *et al.*, 2016), no entanto, nos estados iniciais, os pacientes são tratados com antibióticos, estimuladores imunes e antitoxinas para eliminar a infecção existente (Bernard e Bernard, 2012; Bhan *et al.*, 2016). Com a progressão da doença, os pacientes são tratados com anti-inflamatórios, anticoagulantes, antioxidantes ou antagonistas de citocinas pró-inflamatórias (Bernard e Bernard, 2012). Apesar do tratamento com antibióticos de amplo espectro, os pacientes sucumbem pela disfunção múltipla de órgãos, gerada pela excessiva inflamação (Medzhitov, 2013; Hotchkiss, 2016).

Existem seis tipos comuns de disfunção observadas na sepse: neurológica (alteração do *status* mental), pulmonar (hipoxemia), cardiovascular (choque), renal (oligúria e aumento da concentração de creatinina), hematológica (diminuição na contagem de plaquetas) e hepática (Hiperbilirrubinemia) (Hotchkiss, 2016). Atualmente existe um score clínico conhecido como SOFA (*Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment*), o qual representa a disfunção de órgãos observada na sepse (Singer *et al.*, 2016). Os principais órgãos afetados durante a sepse são o pulmão e o rim (Ricci *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2013; Hotchkiss, 2016). Raios X do pulmão de pacientes com sepse, por exemplo, mostram derrame pleural que gera dano na captação de oxigênio e na eliminação de CO₂ (Hotchkiss, 2016). Estudos prévios também demonstram que a falha na recuperação da função renal em pacientes sépticos pode ser letal (Ricci *et al.*, 2011; White *et al.*, 2013).

Assim, mais estudos são necessários para encontrar estratégias que permitam reduzir o efeito negativo da resposta inflamatória no tecido do hospedeiro.

1.3. Resposta imune durante a sepse: participação das células mieloides

As células do sistema imune expressam vários receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como receptores do tipo *Toll* (TLR), receptores do tipo RIG (RLRs), e receptores de complemento, entre outros (Rittirsch *et al.*, 2008; Bhan *et al.*, 2016; Hotchkiss, 2016). Esses receptores são ativados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (Bhan *et al.*, 2016; Hotchkiss, 2016). A ativação conjunta de PRRs resulta na fosforilação e ativação de vários fatores de transcrição, tais como: proteína quinase ativada por mitógeno (MAPKs), *Janus kinase* (JAKs), transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) e, o factor nuclear- κ B (NF- κ B) (Bhan *et al.*, 2016; Hotchkiss, 2016). Em conjunto, a ativação desses fatores resulta na produção de citocinas próinflamatórias como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e, IL-6, assim como na produção de quimiocinas que regulam a migração de neutrófilos como, a quimiocina ligante 2 (motivo C-X-C) ou CXCL2 e/ou CXCL1, também conhecida como KC (Sônego *et al.*, 2016). A ativação dessas vias inflamatórias leva a mudanças no endotélio vascular de um estado natural anticoagulante para um estado procoagulante (Levi e Van Der Poll, 2010; Parikh, 2013). Esse estado procoagulante está caracterizado pela deposição de fibrina, formação de *neutrophil extracellular trap* e dano endotelial (Aird, 2003; Levi e Van Der Poll, 2010; Hotchkiss, 2016).

Durante a sepse, a exposição prolongada a DAMPs e PAMPs leva a uma excessiva estimulação das células do sistema imune, resultando na produção exacerbada de citocinas proinflamatórias. Dessa forma, uma resposta que deveria ser protetora e de defesa contra o patógeno, se transforma em uma resposta descontrolada que leva ao dano tecidual e eventualmente, a morte do hospedeiro (Rittirsch, 2008).

1.3.1. Macrófagos: papel durante a resposta imune na sepse

Os macrófagos são os sentinelas do sistema imune e são fundamentais no reconhecimento de produtos microbianos durante a sepse (Nathan e Ding, 2010; Bhan *et al.*, 2016). Na fase inicial da sepse, macrófagos produzem TNF e IL-1 β em resposta à ativação de PRRs (Nathan e Ding, 2010; Bhan *et al.*, 2016). A produção de TNF é importante para a ativação autócrina e de outros tipos celulares, como neutrófilos e células endoteliais (Bhan *et al.*, 2016). A ativação celular permite a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-12 (Schulte *et al.*, 2013), assim como a produção de componentes microbicidas, como espécies reativas do oxigênio (ROS), lisozimas e proteínas catiónicas (Schulte *et al.*, 2013; Bhan *et al.*, 2016). Em conjunto, esses produtos celulares atuam controlando o crescimento do microorganismo (Schulte *et al.*, 2013). No entanto, a liberação desses mediadores inflamatórios por parte dos macrófagos também contribui com a exacerbação da resposta inflamatória e a falência múltipla de órgãos observada na sepse (Kopydlowski *et al.*, 1999).

Além da produção de mediadores pró-inflamatórios, os macrófagos também participam da fase anti-inflamatória observada na sepse (Ellaban *et al.*, 2004). Durante a sepse, a exposição prolongada ou excessiva a endotoxinas como o lipopolisacarídeo (LPS), leva aos macrófagos a um estado não responsivo, quando estimulados novamente com LPS (Cavaillon e Adib-Conquy, 2006). Esse estado é conhecido como tolerância a endotoxina e é caracterizado pela diminuição na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e aumento na produção de IL-10 e IL-1RA (Cavaillon e Adib-Conquy, 2006; Porta *et al.*, 2009). Após a inflamação, a ativação dessa resposta anti-inflamatória é importante para a restauração da homeostase do tecido (Ellaban *et al.*, 2004; Cavaillon e Adib-Conquy, 2006). No entanto, um estado prolongado de tolerância leva ao desenvolvimento do quadro de imunossupressão observado na sepse, o qual aumenta a susceptibilidade a infecções oportunistas (Ellaban *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2010). Embora, os macrófagos são fundamentais durante a resposta imune na sepse, mais estudos são necessários para elucidar quais os

fatores que levam a uma produção exacerbada de mediadores inflamatórios durante a sepse.

1.3.2. O papel dos neutrófilos durante a sepse

Os neutrófilos são leucócitos formados na médula óssea e são liberados na forma madura no sangue (Sônego *et al.*, 2016). Essas células são cruciais na fagocitose de microrganismos e são recrutadas para o sítio da infecção em resposta a mediadores quimiotáticos (Bhan *et al.*, 2016). Os neutrófilos possuem um poderoso arsenal de substâncias microbidas como enzimas proteolíticas, ROS e espécies reativas do nitrogênio que degradam os patógenos internalizados (Mantovani *et al.*, 2011; Nauseef e Borregaard, 2014). Esses leucócitos são fundamentais no controle da infecção bacteriana ou por fungos (Ermer *et al.*, 2009), e como demonstrado por Robertson e colaboradores, camundongos tratados com anticorpo para depletar neutrófilos foram mais susceptíveis à infecção com *Staphylococcus aureus* e apresentaram uma menor taxa de sobrevivência (Robertson *et al.*, 2008). Estudos experimentais e clínicos também demonstraram que a deficiência de neutrófilos aumenta a susceptibilidade a infecções fúngicas e bacterianas (Brown *et al.*, 2006; Bouma *et al.*, 2010; Nesher e Rolston, 2014; Swamydas *et al.*, 2016).

A migração de neutrófilos para o local da infecção é fundamental para o controle do patógeno (Freitas *et al.*, 2009; Spiller *et al.*, 2011; Bhan *et al.*, 2016). Estudos anteriores demonstraram que o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção é mediado, principalmente, por CXCR2/CXCL2 ou CXCL1 (Zhang *et al.*, 1994; Mantovani *et al.*, 2006; Kobayashi, 2008; Jin *et al.*, 2014), no entanto, sabe-se que os neutrófilos circulantes de camundongos submetidos a sepse grave apresentam aumento na internalização do receptor CXCR2 (Rios-Santos *et al.*, 2007; Alves-Filho *et al.*, 2010). Essa internalização do receptor é induzida pela prolongada ou repetida exposição a ligantes de TLRs que leva a falha na migração de neutrófilos para o local da infecção (Arraes *et al.*, 2006; Rios-Santos *et al.*, 2007; Alves-Filho *et al.*, 2009; Trevelin *et al.*, 2012). Dessa forma, a ausência de

neutrófilos no local inicial da infecção leva ao aumento no crescimento e a dispersão sistêmica da bactéria (Alves-Filho *et al.*, 2008).

Além do seu papel protetor durante a sepse, os neutrófilos também podem apresentar funções deletérias. A resposta inflamatória sistêmica gerada na sepse induz ativação de neutrófilos na circulação que podem ocluir o lúmen e induzir isquemia (Brown *et al.*, 2006; Rittirsch *et al.*, 2008). Além disso, durante a sepse, os neutrófilos podem migrar para órgãos vitais e produzir enzimas de ação lítica e citocinas próinflamatórias que levam ao dano tecidual e a disfunção de órgãos (Zhang *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 2006; Rittirsch *et al.*, 2008; Sônego *et al.*, 2016). CCR2 é um receptor de quimiocina presente nos neutrófilos, que medeia o processo de migração dessas células para órgãos vitais (Souto *et al.*, 2011). Estudos prévios no nosso grupo demonstraram que neutrófilos de pacientes e de camundongos com sepse apresentaram um aumento na expressão do receptor CCR2 (Speyer *et al.*, 2004; Souto *et al.*, 2011). Além disso, foi demonstrado que existe uma correlação positiva entre a expressão de CCR2 em neutrófilos de pacientes e a gravidade da sepse (Souto *et al.*, 2011). Assim, o bloqueio farmacológico do CCR2 diminuiu o dano tecidual e aumentou a taxa de sobrevivência em animais submetidos a sepse grave (Souto *et al.*, 2011). Mais estudos são necessários para entender quais os fatores envolvidos no aumento do dano tecidual, com o objetivo de aumentar as taxas de sobrevivência durante a sepse.

1.4. Considerações gerais sobre SOCS1

Como mencionado anteriormente a resposta imune durante a sepse envolve a ativação de vários receptores como TLRs e receptores de citocinas, que por sua vez leva a ativação de fatores de transcrição como STAT1, STAT3 e NF- κ B. Esses fatores induzem a expressão do supressor da sinalização de citocinas 1 (SOCS1), o qual é uma proteína que regula negativamente a ativação dessas vias próinflamatórias (**Esquema 1**) (Fujimoto e Naka, 2010; Sachithanandan *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2015). O SOCS1 tem três domínios funcionais: região inibidora quinase (KIR), domínio SH2 (Src homologia 2) e o SOCS *box* (**Esquema 2**) (Ahmed *et al.*, 2015). Cada domínio do SOCS1 tem

atividade inibitória ou de ligação à proteínas alvo e/ou recrutamento do complexo ubiquitina-proteassoma para degradação da proteína alvo de inibição. O domínio KIR do SOCS1 funciona como um pseudo substrato que inibe a ativação de STAT1 e STAT3 mediada pela Janus quinase 2 (JAK2) (**Esquema 1**). O KIR inibe a ativação das moléculas STATs, através de duas vias: inibindo a autofosforilação da JAK2, ou inibindo a fosforilação dos STATs mediada pela JAK2 (Takahashi *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2015). Por outro lado, o domínio SH2 liga-se diretamente ao *loop* de ativação da JAK2 bloqueando assim a ativação de STATs (Trenigove e Ward, 2013; Ahmed *et al.*, 2015). Já o domínio SOCS *box* atua em conjunto com proteínas da via ubiquitina-proteassoma para a degradação de proteínas alvo, entre eles a JAK2. Assim, o SOCS *box* recruta as proteínas elongina B, C e a *Cullin5*, que são fundamentais para a formação do complexo E3 ubiquitina ligase (**Esquema 2**) (Mansell *et al.*, 2006; Fujimoto e Naka, 2010; Ahmed *et al.*, 2015).

A expressão de SOCS1 é induzida por vários mediadores inflamatórios como TNF, IL-6 e IFN- γ (Naka *et al.*, 1997; Song e Shuai, 1998; Morita *et al.*, 2000), assim como pelos ligantes de TLR, tais como LPS e CpG (**Esquema 1**) (Mosteckí *et al.*, 2005; Yoshimura *et al.*, 2007). No entanto, SOCS1 atua como um *feedback* negativo regulando as vias de ativação induzidas por esses mediadores inflamatórios. Assim, a via de NF- κ B é inibida por ligação e degradação da subunidade p65 por meio do sistema ubiquitina-proteassoma (Ryo *et al.*, 2003). No entanto, SOCS1 também pode bloquear a fosforilação de p65 dependente de MAL (gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 - MyD88), inibindo, dessa forma, a ativação do NF- κ B (Mansell *et al.*, 2006). Outros estudos também demonstraram que SOCS1 inibe a expressão de MyD88 e impede a ativação de NF- κ B mediada por TLR e IL-1R (Serezani *et al.*, 2011). Em resumo, SOCS1 é um potente regulador negativo da ativação de vias inflamatórias.

Esquema 1. Vias de sinalização reguladas por SOCS1.

A resposta imune durante a sepse envolve a ativação de vários receptores como TLRs e receptores de citocinas, que por sua vez levam a ativação de fatores de transcrição como STAT1, STAT3 e NF-κB. Esses fatores induzem a expressão do supressor da sinalização de citocinas 1 (SOCS1), o qual é uma proteína que regula negativamente a ativação dessas vias pró-inflamatórias (Figura modificada de *Nature Reviews Immunology*, Volume 3, 2003, doi:10.1038/nri1226).

Esquema 2. Estrutura de SOCS1. (A) SOCS1 tem três domínios: domínio KIR, SH2 e SOCS *box*.

1.4.1. SOCS1 e doenças inflamatórias

SOCS1 tem um papel essencial na modulação da resposta imune. Estudos iniciais em camundongos deficientes de Socs1 (*Socs1*^{-/-}) demonstraram que esses animais desenvolvem uma doença autoimune mediada por células T que é letal nas primeiras três semanas de vida (Naka *et al.*, 1998; Starr *et al.*, 1998). Estudos posteriores demonstraram que o desenvolvimento dessa condição autoimune é mediada por IFN- γ , pois camundongos duplo *knockout*, IFN- γ ^{-/-} *Socs1*^{-/-} ou tratados com anticorpo anti-IFN γ , não desenvolvem a doença (Alexander *et al.*, 1999; Metcalf *et al.*, 2002).

Estudos clínicos também demonstraram a importância de SOCS1 na regulação da resposta imunológica, pois foi observado que a expressão de SOCS1 é reduzida em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, colite ulcerativa e artrite (Isomäki *et al.*, 2007; Ramírez-Vélez *et al.*, 2012; Pathak *et al.*, 2015). Modelos experimentais de doenças inflamatórias como artrite e inflamação pulmonar também tem demonstrado uma relação inversa entre a expressão de SOCS1 e a exacerbação da doença (Egan *et al.*, 2003; Nakashima *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro*, utilizando macrófagos e células dendríticas, tem demonstrado que a deficiência de SOCS1 leva ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a ligantes de TLR (Kinjyo *et al.*, 2002; Hanada *et al.*, 2003). A importância de SOCS1 na regulação da resposta inflamatória foi também observada em modelo experimental de choque endotóxico, no qual camundongos deficientes de Socs1 foram mais susceptíveis ao choque induzido por LPS, apresentando maior necrose no rim e uma elevada taxa de mortalidade, em relação aos animais WT (Kinjyo *et al.*, 2002). Esse aumento da susceptibilidade foi associado com um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e uma diminuição na tolerância a endotoxina (Kinjyo *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2002; Fujimoto e Naka, 2010). No entanto, o papel e os mecanismos subjacentes à regulação de SOCS1 na sepse polimicrobiana ainda precisam ser estudados.

1.5. Metabolismo da glicose

Sinais do microambiente regulam a atividade metabólica da célula para compensar suas necessidades energéticas (O'Neill *et al.*, 2016). Assim, durante os processos de crescimento, proliferação ou mesmo durante o estado de repouso, diferentes vias metabólicas são ativadas para adequação às novas funções celulares. Existem seis vias metabólicas que são cruciais para a sobrevivência e crescimento celular: via glicolítica, ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), pentoses fosfato, oxidação de ácidos graxos, síntese de ácidos graxos e a via dos aminoácidos (O'Neill *et al.*, 2016).

A via glicolítica ou glicólise é o processo que transforma a glicose em piruvato (Galván-Peña e O'Neill, 2014) (**Esquema 3**). A glicólise fornece ATP (adenosina trifosfato) para a célula e outros intermediários para o funcionamento de outras vias metabólicas como o ciclo TCA e as pentoses fosfato (O'Neill *et al.*, 2016). O processo começa com a captação de glicose extracelular, através de transportadores presentes na superfície celular como o transportador de glicose 1 (Glut1) (Freemerman *et al.*, 2014; Galván-Peña e O'Neill, 2014) (**Esquema 3**).

Existem várias enzimas que são fundamentais para continuar o processo, como a Hexoquinase (HK), piruvato quinase M2 (PKM2) e a lactato deidrogenase A (LDHA), entre outras (Galván-Peña e O'Neill, 2014; Arts *et al.*, 2017). A HK-1 é a primeira enzima da via que fosforila a glicose em glicose-6-fosfato, para evitar sua saída da célula (Wilson, 2003). A PKM2 catalisa a conversão de fosfoenolpiruvato (PEP) em piruvato (Luo e Semenza, 2012). A Ldha, por sua vez, reduz o piruvato em lactato, evitando assim a entrada do piruvato no TCA (Kelly e O'Neill, 2015). Finalmente, o transportador de lactato, MCT4, transporta o lactato para o exterior da célula, evitando seu acúmulo intracelular (Jamal Uddin *et al.*, 2016).

A glicólise é uma via que normalmente acontece em condições anaeróbicas e é relativamente ineficiente na produção de ATP. Enquanto a glicólise produz 2 moléculas de ATP a partir de uma molécula de glicose, o ciclo de TCA produz 36 moléculas de ATP a partir de uma de glicose (Arts *et al.*, 2017). No entanto, a glicólise é uma via rápida de gerar energia e pode ser potencializada por meio de estímulos como ligantes de TLR ou citocinas (Yang *et al.*, 2014; Bhan *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2016; Arts *et al.*, 2017). Além disso, a glicólise é fundamental para a geração de intermediários de vias anabólicas que favorecem a proliferação celular e a geração de cofactores de enzimas, como o NADH (O'Neill *et al.*, 2016; Arts *et al.*, 2017).

Esquema 3. Via glicolítica.

A glicose extracelular é transportada para o interior da célula através de transportadores presentes na superfície celular como o transportador de glicose 1 (Glut1). Uma vez no interior da célula, a glicose é fosforilada pela HK para formar glicose-6-bifosfato, a qual pode continuar na via glicolítica ou ser direccionada, como substrato, para a via das pentoses fosfato. Várias enzimas glicolíticas medeiam o metabolismo da glicose-6-fosfato até a formação de piruvato. Durante

esse processo são produzidas 2 moléculas de ATP e NADH que será utilizado em vias anabólicas. O piruvato pode continuar no TCA na mitocondria ou ser metabolizado pela LDHA para formar lactato, o qual é exportado através do transportador de lactato, MCT4.

1.5.1. Glicólise e macrófagos

Recentes estudos tem mostrado que o fenótipo e o estado de ativação das células do sistema imune está correlacionado com um perfil metabólico específico (Dang *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2016; O'Neill *et al.*, 2016; O'Neill e Pearce, 2016). Assim, vários estímulos como citocinas, ligantes de PRRs ou mesmo hipoxia induzem mudanças metabólicas nas células que permitem sua adaptação à nova demanda energética (Shi *et al.*, 2011; Tannahill *et al.*, 2013; Galván-Peña e O'Neill, 2014; O'Neill *et al.*, 2016).

Os macrófagos em estado de repouso utilizam a β -oxidação e o metabolismo oxidativo para gerar ATP. Já em condições de ativação, hiperinflamação ou proliferação celular, a célula gera energia utilizando a via glicolítica, mesmo em condições de normoxia (*Warburg effect*) (Dang *et al.*, 2011; Tannahill *et al.*, 2013). Ligantes de PRRs, citocinas e receptores de antígeno são fatores chaves na ativação da via glicolítica, a qual é necessária para gerar uma potente atividade microbicida e a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β (O'Neill e Hardie, 2013; Tannahill *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Bhan *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2016; Arts *et al.*, 2017).

Mudanças metabólicas em resposta a estímulos extracelulares são conhecidas como reprogramação metabólica (O'Neill e Pearce, 2016). Essa reprogramação está intimamente associada à polarização dos macrófagos, assim a glicólise (tipicamente induzida por LPS / IFN- γ) é um condutor do fenótipo pró-inflamatório (Tannahill *et al.*, 2013; Shirai *et al.*, 2016), enquanto a fosforilação oxidativa (induzida por IL-4 / IL-13) desencadeia macrófagos anti-inflamatórios e processos de resolução da inflamação (Vats *et al.*, 2006; Rodríguez-Prados *et al.*, 2010; O'Neill e Hardie, 2013; Tannahill *et al.*, 2013).

O fator indutível por hipoxia 1 (HIF-1 α) é a principal molécula responsável pelo controle transcricional de genes da via glicolítica (**Esquema 4**) (Shi *et al.*, 2011; Luo e Semenza, 2012). Vários fatores aumentam a estabilidade do HIF-1 α , entre eles condições de hipóxia e o succinato (Shi *et al.*, 2011; Tannahill *et al.*, 2013),

entanto que a sua expressão é induzida pelo fator de transcrição STAT3 (Dang *et al.*, 2011). Considerando que SOCS1 é um regulador negativo da ativação de STAT3, é plausível se pensar que SOCS1 também possa controlar a ativação da via glicolítica. No entanto, o papel de SOCS1 na regulação da via STAT3/HIF-1 α /glicólise e o mecanismo específico envolvido na regulação de SOCS1 durante a sepse polimicrobiana ainda precisam ser determinados.

Esquema 4. HIF-1 α é o principal fator de transcrição responsável pelo controle transcricional de genes da via glicolítica.

Vários fatores aumentam a estabilidade do HIF-1 α , entre eles condições de hipóxia e o succinato, entanto que a sua expressão é induzida pelo fator de transcrição STAT3.

2. *Hipótese*

A regulação negativa da resposta inflamatória mediada por SOCS1 tem sido observada em vários modelos de doenças inflamatórias. Uma das principais vias reguladas por SOCS1 é a via de sinalização de STAT3. No entanto o papel de SOCS1 durante a sepse experimental tem sido pouco estudado. Nossa hipótese é que durante a sepse, SOCS1 controla a resposta inflamatória exacerbada e o crescimento bacteriano, a través da regulação negativa da ativação da via de STAT3. Sabe-se que STAT3 é um medidor da ativação de mediadores proinflamatórios como HIF-1 α , o qual induz a ativação da via glicolítica e a produção de IL-1 β . Considerando que SOCS1 é um regulador negativo da ativação de STAT3, nossa hipótese é que SOCS1 também possa controlar a ativação da via glicolítica e a produção de IL-1 β durante a sepse experimental.

3. Objetivos

Objetivo geral:

- Investigar a participação de SOCS1 na resposta inflamatória durante a sepse experimental.

Objetivos específicos:

- II. Avaliar a expressão de SOCS1 em um modelo experimental de sepse polimicrobiana;
- III. Investigar o envolvimento de SOCS1 no controle da resposta inflamatória exacerbada e na mortalidade durante a sepse experimental;
- IV. Avaliar o papel de SOCS1 no desenvolvimento de falência de órgãos observado durante a sepse;
- V. Entender os mecanismos pelos quais SOCS1 controla a resposta inflamatória sistêmica durante a sepse.

4. Material e métodos

3.1 Animais

Camundongos isogênicos C57BL/6 com 21 g de peso e machos foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e do Centro de recursos para animais do *Laboratory Animal Resource Center (LARC)* da *Indiana University School of Medicine* em Indianapolis. Para determinar o papel de SOCS1 especificamente na célula mieloide, camundongos Socs1^{fl} provenientes do Dr. Warren Alexander (*Walter and Eliza Hall Institute*) (Chong *et al.*, 2003), foram cruzados com animais C57BL/6 LysM^{cre/cre} (Laboratório Jackson). Os camundongos Socs1^{fl} foram gerados pela inserção do gene Socs1 flanqueado pelas sequências flox e, na região 3' foi adicionado o gene *reporter* CD4 humano (hCD4). Esse gene contém uma mutação F43I que evita sua ligação ao MHC-II e a sinalização do CD4. Uma vez acontece a deleção de SOCS1 mediada pela enzima cre, o gene hCD4 é expresso no lugar de SOCS1 (Chong *et al.*, 2003). Assim, a deleção de SOCS1 na célula mieloide foi confirmada pela expressão do gene *reporter* hCD4 como previamente descrito (Chong *et al.*, 2003). Os animais portando a deleção de SOCS1 especificamente em células mieloides foram denominados SOCS1^{Δmyel}. Os *primers* utilizados na genotipagem dos animais SOCS1^{Δmyel} estão descritos na **Tabela 1**. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da *Indiana University School of Medicine* (Protocolo 10500 e 10886), e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolo nº 136-2016).

Gene	Sequência
<i>Socs1 huCD4F</i>	GAT ACA GTG GAA CTG ACC TG
<i>Socs1 huCD4R</i>	TTA CCC CTT GGA CTC CTA CA
<i>WT cre</i>	TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC
<i>Mutante cre</i>	CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG
<i>Comum cre</i>	CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC

Tabela 1. Sequência de primers para genotipagem de animais *Socs1*^{Δmyel}

3.2 Modelos experimentais

3.2.1 Modelo de sepse polimicrobiana

Para induzir sepse polimicrobiana, os animais foram submetidos ao modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP) originalmente descrito por Baker e colaboradores (Baker *et al.*, 1983) com algumas modificações. Resumidamente, os camundongos foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e realizada uma incisão mediana de aproximadamente 1 cm no abdômen anterior a fim de expor o ceco. Este foi ligado com um fio de algodão, abaixo da válvula ileocecal, onde foram feitas duas perfurações com uma agulha estéril de 21G para induzir a sepse moderada, isto é, com 50% de mortalidade (Ferreira *et al.*, 2014). Em seguida, o ceco foi pressionado sutilmente para certificar a saída das fezes através dos orifícios e recolocado de volta no abdômen e a incisão foi suturada. Todos os animais receberam 1 mL de salina subcutânea logo após a cirurgia para

evitar desidratação e colocados na presença de luz. Em média, após 60 minutos da cirurgia, os animais já estavam recuperados do efeito do anestésico.

3.2.2 Tratamento com inibidor de domínio KIR do SOCS1 (iKIR)

Para realização dos experimentos, camundongos C57BL/6 foram tratados 24 h e 1 h antes da CLP com inibidor do domínio KIR do SOCS1 (**Esquema 2**) (iKIR, GenScript USA Inc.), na dose de 50 µg/animal/intraperitoneal (i.p.) (Jager *et al.*, 2011). O grupo controle foi tratado com peptídeo controle (GenScript USA Inc.). A sequência de peptídeos iKIR e controle estão na **Tabela 2**. Ambos os peptídeos tem um grupo lipofílico (palmitoil) na região N terminal para facilitar a entrada na célula (Waiboci *et al.*, 2007). Para avaliar a sobrevivência, os animais foram monitorados a cada 12 h durante 10 dias e após esse prazo, os animais sobreviventes foram sacrificados de acordo com as normas sobre uso de animais de experimentação de laboratório. Os fluidos e órgãos de camundongos sépticos foram coletados para avaliação da produção de citocinas, expressão de genes, quantificação da carga bacteriana, e migração de neutrófilos na cavidade peritoneal, 18 h após a cirurgia.

Nome do peptídeo	Sequência
iKIR	DTHF <u>R</u> TF <u>R</u> SHSDYRRI
Controle	DTHF <u>A</u> TF <u>A</u> SHSDYRRI

Tabela 2. Sequência de peptídeos.

3.2.3 Tratamento com STATTIC

STATTIC é uma molécula pequena não peptídica ($C_8H_5NO_4S$) que inibe a ativação de STAT3 (Schust *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2014). Para a realização de experimentos de sobrevivência, camundongos C57BL/6 foram tratados 24 h e 1 h antes da CLP e uma vez por dia durante 3 dias com STATTIC, na dose de 10 mg/Kg, i.p. (Santa Cruz Botechnologies, Dallas, TX USA) (Schust *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2014) (**Esquema 5**). Os animais também foram tratados com iKIR como descrito no item 3.2.2. Para a avaliação da produção de citocinas e carga bacteriana os camundongos foram sacrificados 18 após a CLP.

Esquema 5. Tratamento com STATTIC.

Camundongos C57BL/6 foram tratados com STATTIC (10 mg/Kg, i.p.) 24 h e 1 h antes da CLP e uma vez por dia durante 3 dias. Os animais também foram tratados com o peptídeo inibidor iKIR (50 µg/mouse/i.p.) 24 h e 1 h antes da cirurgia.

3.2.4 Tratamento com 2-deoxi-D-glicose (2-DG)

Camundongos C57BL/6 foram tratados diariamente durante 4 dias e 1 h antes da CLP com 2-DG, um inibidor da hexoquinase (EMD, Millipore Corp., Billerica, MA USA), na dose de 0,5 g/Kg pela via i.p. (Cheong *et al.*, 2011) (**Esquema 6**). Os animais também foram tratados com iKIR como descrito no item

3.2.2. Para a avaliação da produção de citocinas e carga bacteriana os camundongos foram sacrificados 18 após a CLP.

Esquema 6. Tratamento com 2-DG.

Camundongos C57BL/6 foram tratados com 2-DG (0,5 g/Kg, i.p.) uma vez por dia durante 4 dias e 1 h antes da CLP. Os animais também foram tratados com o peptídeo inibidor iKIR (50 µg/mouse/i.p.) 24 h e 1 h antes da cirurgia.

3.2.5 Modelo experimental de sepse induzida por Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

MRSA é uma bactéria comum na população e que causa infecções de pele e de tecidos moles (Guo et al., 2013) e em algumas condições mais graves pode causar sepse (Castaldo e Yang, 2007). Com o objetivo de induzir sepse bacteriana, foi utilizado uma cepa de MRSA bioluminescente (Guo et al., 2013). Camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR 24 h e 1 h antes da infecção com MRSA (2×10^8 CFU/200 µL of PBS, via intraperitoneal).

3.3 Análise e quantificação de MRSA bioluminescente

Camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR 24 h e 1 h antes da infecção com MRSA, como descrito no item **3.2.5**. Após 24 h da infecção, os animais foram anestesiados com 4-5% de isoflurano (e oxigênio), posicionados no

aparelho *in vivo imaging system (IVIS) SpectrumCT* (PerkinElmer, Waltham, MA) e mantidos com 2-3% isoflurano (e oxigênio). Imagens bioluminescentes planares (2D) foram coletadas com a seguinte configuração em cada ponto de tempo: t: 30 s integration; campo de visão 24,4 mm; Não filtro; F stop 1; factor binninh 8. Para permitir a Tomografia de imagens de luz difusa (DLIT) associada com a emissão bioluminescente, uma série de imagens foram coletadas com a seguinte configuração: 120 s integração; campo de visao 13,1 mm; Nao filtro; F stop 1; e factor binning 16 a 560, 580, 600, 620, e 640 nm. Logo após, foram coletadas imagens de tomografia computadorizada calibrada (CT), para permitir a visualização da superfície e a densidade do tecido, utilizando os seguintes parâmetros: 50 ms de exposição; 720 projeções; 1 mA corrente de tubo; 50 kVp voltagem de tubo; 120 µm Filtro de cobre; fator de binning 4. As imagens foram reconstruídas utilizando filtro de retroprojeção, produzindo uma resolução final isotropica de 0,015 mm. Em todos os casos, as imagens foram adquiridas, reconstruídas e fusionadas utilizando LivingImage (v4.3.1.0.15890, PerkinElmer, Waltham, MA). Para análise planar, as imagens foram importadas para LivingImage, segmentadas via métodos semi-automáticos e o fluxo de fotões (p/s) quantificado para todos os tecidos. Para o DLIT/CT, as imagens foram importadas para Analyze 12,0 (AnalyzeDirect, Stilwell, KS), utilizando o umbral baseado na região de crescimento, e o volume dos pulmões computado de acordo com a seguinte fórmula:

$$V(i) = \sum_{j=1}^a \sum_{k=1}^b \sum_{l=1}^c O_{Map}(i, j, k, l) * \mu(j, k, l) \quad (1)$$

Onde V , i , j , k , l , a , b , c , O_{Map} , e μ são o volume da região “ i^{th} ”, índice de mapa de objetos “ j^{th} ”, índice de mapa de objetos “ k^{th} ”, índice de mapa de objetos, “ l^{th} ”, número total de voxels de linha “ a ”, “ b ” número total de coluna de voxels, número total de fatias “ c ”, mapa do objeto, e dimensões em milímetros do voxel.

3.4 Quantificação de bactérias

Para a quantificação de bactérias presentes na circulação os animais foram anestesiados e o sangue coletado por punção no coração. Para quantificação da bactéria presente no lavado peritoneal, os animais foram sacrificados com dose letal de anestésico e o peritонеo foi lavado com 2 mL de PBS contendo 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma, St Louis, MO USA). Todo o procedimento foi realizado em condições estéreis. Foram realizadas diluições seriais do sangue (1:10; 1:100; 1:1.000) contendo anticoagulante e do lavado peritoneal (1:1.000; 1:10.000; 1:100.000). Foram semeados 10 µL de cada diluição em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Mich). As placas foram incubadas por 18 h a 37°C e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi quantificado. Os resultados foram expressos como Log de CFU/mL de sangue ou de lavado peritoneal.

3.5 Determinação de migração de neutrófilos

Para a quantificação de neutrófilos presentes no lavado peritoneal, o peritонеo foi lavado com uma solução de PBS/EDTA, 18 h após a CLP. A contagem total de leucócitos foi realizada utilizando uma camera de Neubauer. Para a contagem diferencial, as células foram centrifugadas e colocadas em lâminas com o auxílio de uma citocentrífuga, 500 rpm, 7 minutos (Cytospin 3; Shandon®). Após a centrifugação as células foram fixadas e coradas utilizando Corante Panótico Rápido, de acordo com as indicações do fabricante (Merz & Dade). Os resultados foram expressos como número de neutrófilos presentes no lavado peritoneal x 10⁶/cavidade.

3.6 Avaliação proteica por Western Blot

O ensaio de Western blot foi realizado como descrito em por Kim e colaboradores (Kim *et al.*, 2011). Em resumo, o pulmão de animais submetidos à sepse ou controle foi homogeneizado em uma solução tamponada contendo inibidor de protease. O lisado obtido foi centrifugado a 12,000 x g por 10 minutos a

4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração da proteína pelo método colorimétrico, empregando o reagente Bradford (Sigma Aldrich). Cinquenta microgramas da proteína foram incubadas com tampão de amostra (Bio-Rad laboratories, Inc., CA, USA) na proporção de 1:1 e incubadas a 96 °C durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulosa. Após a transferência, as membranas foram incubadas com a solução de bloqueio (5% leite desnatado) durante 1 h a temperatura ambiente. Após 1 h, as membranas foram lavadas e incubadas *overnight* a 4 °C com os anticorpos anti-SOCS1, STAT3, STAT3 fosforilado, STAT1, STAT1 fosforilado ou Hexoquinase 1 (Cell signaling) ou anti- β -actina (Sigma, St Louis, MO USA). Após o período de incubação, a membrana foi lavada novamente e incubada com anticorpo secundário conjugado a enzima peroxidase, HRP (*Horseradish peroxidase*) (Santa Cruz) durante 1 h a temperatura ambiente. A ligação da proteína com o anticorpo específico foi visualizada com o sistema de detecção ECL (Amersham) e sujeito a análise de densitometria.

3.7 *Extração de RNA e avaliação da expressão de genes por RT-PCR*

A extração do RNA foi realizada utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, CA USA) e kit para extração de RNA (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 700 μ L de Trizol foram adicionados nas amostras de pulmão ou células do lavado peritoneal, seguido de agitação por 30 segundos na presença de 140 μ L de clorofórmio (Sigma, St Louis, MO USA). Posteriormente, os tubos foram centrifugados (12.000 xg, 15 min) e a fase aquosa foi transferida para um tubo novo, onde foi acrescentado 400 μ L de isopropanol. Para diminuir a contaminação por fenol, as amostras foram lavadas com 800 μ L de solução de etanol 75% em água livre de RNases (Sigma, St Louis, MO USA). Após as lavagens, os tubos foram deixados à temperatura ambiente durante 15 minutos para secagem das amostras. Em seguida, 20 μ L (para amostras de lavado peritoneal) ou 40 μ L (para amostra de pulmão) de água livre de RNases foram adicionados aos tubos. A concentração de RNA total foi quantificada através de

leitura em espectrofotômetro utilizando o filtro de 260 nm. As amostras de RNA foram armazenadas a -20°C até a confecção do DNA complementar (cDNA). A fita de cDNA foi sintetizada através de transcrição reversa (RT-PCR) com o kit iScript cDNA. As amostras foram incubadas durante 5 minutos a 25°C , seguido de 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C . Posteriormente, as amostras foram incubadas a 4°C por 10 minutos.

O cDNA obtido no passo anterior foi utilizado para a quantificação da expressão dos genes de interesse (*Socs1*, *Hif-1 α* , *Stat3*, *Myd88*, *Hexoquinase 1*, *Glut1*, *Ldha*, *Mct4*) e do gene de expressão constitutiva, *β -actina*, por PCR em tempo real. Resumidamente, 10 μL do cDNA foram acrescentados com 5 μL de SYBR® Green PCR Master Mix cDNA (Bio-Rad laboratories, Inc., CA, USA), 0,5 μL de cada par de primer (10 μM - Integrated DNA Technologies) e 4 μL de água livre de nucleases. As condições para amplificação dos genes de interesse foram as seguintes: primeiramente, uma fase inicial de incubação do cDNA a 50°C durante 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um processo de desnaturação a 95°C durante 10 minutos. Após esse período, as amostras passaram por 40 ciclos contendo fase de desnaturação a 95°C durante 15 segundos, seguida de fase de anelamento a 58°C por 30 segundos e, finalmente, uma fase de extensão da fita de cDNA a 72°C por 30 segundos. As reações e análises foram realizadas no aparelho CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad laboratories, Inc., CA, USA). Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*Cycle Threshold* – ou ciclo limiar). O CT é o ponto que indica o número de ciclos onde a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. A fórmula utilizada para análise dos resultados foi $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$, na qual $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct controle}$ e $\Delta\text{Ct} = \text{CT gene alvo} - \text{CT gene de referência endógeno } (\beta\text{-Actina})$. As sequências dos *primers* avaliados encontram-se na **Tabela 3**.

GENE	TIPO DE PRIMER	SEQUÊNCIA 5' --> 3'
<i>β-Actina</i>	Sense	GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG
	Antisense	GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG
<i>Socs1</i>	Sense	CAG AAA AAT GAA GCC AGA GAC C
	Antisense	ATT CCA CTC CTA CCT CTC CAT
<i>Stat3</i>	Sense	AGT CTC GAA GGT GAT CAG GT
	Antisense	GTT CAA GCA CCT GAC CCT TAG
<i>Hif-1α</i>	Sense	CCG TCA TCT GTT AGC ACC AT
	Antisense	GCT CAC CAT CAG TTA TTT ACG TG
<i>Glut1</i>	Sense	ATG GAT CCC AGC AGC AAG
	Antisense	CCA GTG TTA TAG CCG AAC TGC
<i>Hk1</i>	Sense	CAG TAG GAC TCG GAA ATT CGT T
	Antisense	GCT GCC TTC TTA TGT TCG GA
<i>Ldha</i>	Sense	CCC TTG AGT TTG TCT TCC CAT GA

	Antisense	CTC CCC AGA ACA AGA TTA CAG T
--	-----------	-------------------------------

Tabela 3. Sequência de *primers* utilizados para avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real.

3.8 Dosagem de citocinas e nítrito

As quantificações de IL-6, IL-1 β , TNF, e KC (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) foram realizadas no soro, lavado peritoneal e homogenato de pulmão de animais sépticos 18 h após a CLP. A quantificação dos níveis destas citocinas foi realizada por método imunoenzimático (ELISA), conforme descrito pelo fabricante. O nítrito foi determinado utilizando a reação de Griess (Serezani *et al.*, 2011).

3.9 Dosagem de lactato

As concentrações de lactato foram quantificadas no lavado peritoneal de camundongos sépticos, utilizando o kit de Lactato colorimétrico (Biovision, CA, USA), de acordo com as indicações do fabricante.

3.10 Parâmetros bioquímicos

As amostras de soro de animais sépticos foram enviadas para o *Translation Core in the Center for Diabetes and Metabolic Disease* na Indiana University School of Medicine, para a dosagem da atividade das enzimas alanina (ALT) e aspartato (AST) aminotransferase. Outros parâmetros bioquímicos utilizados como marcadores de lesão ou disfunção de múltiplos órgãos foram também avaliados no soro de camundongos 18 h após a CLP: a disfunção renal e cardíaca foram avaliadas pela quantificação dos níveis séricos de uréia e a isoenzima creatina quinase MB (CK-MB). A quantificação desses parâmetros bioquímicos foram feitas utilizando um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, Brasil).

3.11 Análise histopatológica

Os pulmões de animais sépticos foram coletados para análise histopatológica. O lóbulo direito superior foi armazenado em tampão de fosfato contendo 37% de formaldeído (pH=7.0), e posteriormente, foi realizada a inclusão em parafina para a confecção das lâminas. Os cortes histológicos do pulmão foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e as imagens coradas com H&E foram fotografadas usando uma camera Infinity 1 acoplada a um microscópio Nikon Eclipse Ci, utilizando o aumento de 200X.

3.12 Ensaio de atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para a quantificação do acúmulo pulmonar de neutrófilos, os pulmões foram isolados de animais sépticos, após 18 h da CLP e processados para determinar a atividade mieloperoxidase como previamente descrito (Alves-Filho *et al.*, 2006). Resumidamente, os animais foram sacrificados por dose letal de anestésico e o pulmão perfundido com 10 mL de PBS gelado. Os pulmões foram colectados em um tubo contendo 300 µL de tampão gelado, pH 4,7 (Tampão 1 - NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,012 M) e posteriormente homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador (Pollytron). As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem de citocinas e o *pellet* foi ressuspenso em tampão NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) (Tampão 2) e novamente homogeneizado. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 13.000 xg por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 3, 5 e 50 µL do sobrenadante do pulmão foram colocados em placas de 96 poços para o ensaio de mieloperoxidase. Em cada poço foram adicionadas 25 µL de TMB (Thermo Fisher Scientific Inc.) e as placas foram incubadas por 5 min a 37 °C. A seguir a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1 x 10⁵ neutrófilos/ poço/ 50 µL). A curva padrão de neutrófilos foi obtida da cavidade peritoneal de camundongos, 6 horas após injeção com carragenina e diluídos seriadamente em NaPO₄ 0,08 M. Foi

determinada a absorbância em leitor de ELISA (Spectra Max 250; Molecular Devices) no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos por pulmão.

3.13 Cultura de macrófagos

Camundongos C57BL/6, Socs1^{fl} e Socs1^{Δmyel} foram injectados com 2 mL de 3% de tioglicolato. Quatro dias após a injeção, o peritoneo dos animais foi lavado com PBS contendo 1 mM de EDTA para coletar as células peritoneais.

3.13.1 Infecção com MRSA

Macrófagos ($1,5 \times 10^6$) foram incubados a 37°C, 5% de CO₂ durante 30 minutos para adesão em placa de 24 poços com fundo chato. Após esse tempo, as células foram tratadas com 10 μM de iKIR durante 30 minutos. Após o periodo de incubação, as células foram infectadas com MRSA (MOI 1:1) durante 1 h, lisadas e avaliadas por wetern blot a expressão de STAT1 e STAT1 fosforilado.

3.13.2 Cultura de macrófagos para ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) ou expressão gênica por qPCR

Macrófagos ($1,5 \times 10^6$) foram incubados a 37°C, 5% de CO₂ durante 30 minutos para adesão em placa de 24 poços com fundo chato. Após esse tempo, as células foram estimuladas com LPS 100 ng/mL, durante 24 h. O sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas e as células foram armazenadas em TRizol para quantificação da expressão gênica ou utilizadas para o ensaio de ChIP.

3.14 Ensaio de imunoprecipitacao de cromatina (ChIP)

O ensaio de ChIP foi realizado utilizando o SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP kit (magnetic beads) de acordo com as indicações do fabricante (Cell Signaling Technology). Resumidamente, as células foram fixadas em formaldehido e lisadas, a cromatina foi fragmentada utilizando nuclease micrococcal e sonicada (UP100H;Hielsher) para obter fragmentos de DNA com aproximadamente 150 - 900 bp. A imunoprecipitação da cromatina foi realizada com anticorpos validados para

ChIP comercializados pela Cell Signaling (STAT3 and HIF-1 α) e beads magnéticas associadas a Proteína G, específicas para ChIP. A cromatina foi separada das beads utilizando buffer de eluição de acordo com as indicações do fabricante (Cell Signaling). O DNA foi purificado utilizando colunas *spin*, e as amostras obtidas foram utilizadas para quantificação dos genes *Hk1* e *Hif-1 α* por PCR em tempo real.

Primers utilizados para ChIP: *Hk1*, Sense, 5' TGA ACT CTG ACA GGC TGT GG -3' e antisense, 5' - AAA CTA GGC TTC ACA GA -3. *Hif-1 α* , Sense 5' - GAG ACT TCC CTT GTT GTG TAG - 3' e antisense 5' - CTT ACT CCT TAG CTG CGT GGC - 3' (Dang *et al.*, 2011).

3.15 Análise de resultados

Para a realização da análise estatística, utilizamos o programa StatSoft, Inc. (2004) STATISTICA (data analysis software system), version 7, Tulsa, OK, USA. Para análise com dois grupos experimentais, inicialmente, foi realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk, seguido do teste de Levene's para avaliar homogeneidade de variâncias. Os experimentos cujos dados foram positivos para ambos os testes foram analisados utilizando o teste t de Student, para amostras não pareadas. Os dados que não passaram no teste de normalidade ou no teste de Levene's foram transformados utilizando a função $\log_{10}$ e analisados novamente. Uma vez transformados, os dados que foram negativos para um ou para os dois testes foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney.

Os experimentos com mais de dois grupos, também foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e ao teste de Levene's de igualdade de variâncias. Os experimentos cujos dados passaram nos dois testes foram analisados utilizando análise de variância de uma via (ANOVA), *one way*, seguida pelo teste de Bonferroni. Os dados que não passaram em nenhum dos testes anteriores foram transformados utilizando a função $\log_{10}$ e analisados novamente. Para os dados transformados que não passaram nos dois testes foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal Wallis com análise de médias.

Os dados de sobrevida dos animais foram expressos como porcentagem de animais sobreviventes. As diferenças estatísticas entre as curvas de sobrevida foram avaliadas utilizando o teste Mantel-Cox logrank (X^2). Os dados (com exceção da curva de sobrevida) foram expressos em gráficos de ponto como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O número amostral foi representado na legenda de cada figura, variando de três a oito animais, sendo os experimentos repetidos de duas a três vezes. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

5. Resultados

4.1. Expressão de *Socs1* em pacientes sépticos e em modelo experimental de sepse polimicrobiana

Estudos reportados na literatura tem mostrado que SOCS1 controla a produção exacerbada de citocinas durante o choque endotóxico (Kinjyo *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2002). No entanto, o papel de SOCS1 durante a sepse polimicrobiana ainda não foi elucidado. Dados depositados na base de dados *Gene Expression Omnibus* (Accession # GSE66099), foram analisados no nosso grupo e demonstram que sangue de pacientes pediátricos diagnosticados com choque séptico, 24 h após o diagnóstico, apresentavam um aumento na expressão de *Socs1*, quando comparados com pacientes saudáveis (**Figura 1A**). Em seguida, foi avaliada a expressão de *Socs1* em um modelo experimental de sepse. Camundongos C57BL/6 foram submetidos a CLP e 18 h após a cirurgia foi avaliada a expressão de *Socs1* em células peritoneais. Observou-se que houve um aumento significativo da expressão de *Socs1* em camundongos sépticos, em relação ao grupo naive (**Figura 1B**).

Figura 1. Aumento da expressão de *Socs1* durante a sepse.

(A) Expressão de *Socs1* em células de sangue periférica de pacientes pediátricos, 24 h após o diagnóstico de choque séptico (Resultado prévio do nosso laboratório). (B) Camundongos C57BL/6 foram submetidos a CLP e 18 h após a cirurgia foi avaliada a expressão de *Socs1* nas células peritoneais por qPCR. N = 8 camundongos/grupo, 3 experimentos independentes, *t test*, *Mann Whitney test*. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

4.2. Inibição farmacológica de SOCS1 aumenta a susceptibilidade a sepse polimicrobiana

Peptídeos miméticos ou antagonistas de SOCS1 tem sido desenvolvidos para avaliar a função de SOCS1 durante a resposta imune (Ahmed *et al.*, 2015). Inicialmente, foi avaliada a capacidade do inibidor de KIR (iKIR) em bloquear a função de SOCS1, visto através da expressão de STAT1 fosforilado. Para isso macrófagos peritoneais foram tratados com 10 μ m de iKIR 30 minutos antes da infecção com *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA). Após 1 h de infecção, a fosforilação de STAT1 (pSTAT1) foi avaliada por western blot. Macrófagos que foram previamente tratados com iKIR e posteriormente infectados com MRSA, tiveram uma maior expressão da fosforilação de STAT1, comparados com os macrófagos infectados e tratados com peptídeo control (**Figura 2A**). Não foram observadas diferenças na expressão de STAT1 total (tSTAT1) entre os macrófagos tratados com peptídeo controle e iKIR (**Figura 2A**).

Estudos prévios tem demonstrado que a ausência de SOCS1 leva ao aumento da susceptibilidade ao choque endotóxico induzido pelo LPS (Kinjyo *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2002). Para avaliar o papel de SOCS1 durante a sepse, camundongos C57BL/6 foram tratados com 50 μ g/mouse de iKIR, 24 h e 1 h antes da CLP. Nossa hipótese foi que a ausência da função de SOCS1 em animais sépticos teria um efeito deletêneo na sepse, aumentando a gravidade da mesma. Foi observado que animais sépticos tratados com iKIR tiveram um aumento na mortalidade, em relação ao grupo séptico tratado com peptídeo control (**Figura 2B**). Em conjunto, esses resultados indicam que SOCS1 poderia ter um papel crucial na resistência à sepse polimicrobiana.

Figura 2. Inibição de SOCS1 aumenta a susceptibilidade a sepse polimicrobiana.

(A) Macrófagos de camundongos C57BL/6 foram tratados com inibidor do domínio KIR do SOCS1 (iKIR) ou peptídeo controle, na concentração de 10 μ M durante 30 minutos e em seguida infectados com MRSA durante 1 h. A expressão de STAT1 fosforilado (pSTAT1) e STAT1 total (tSTAT1) foi avaliada por western blot. **(B)** Camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR, 24 h e 1 h antes da indução de sepse por CLP. Os animais foram monitorados duas vezes por dia e a sobrevivência avaliada durante 10 dias. N = 10 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes, para análise estatística foi utilizado *log-rank (Mantel-Cox) test*. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

4.3. Aumento da resposta inflamatória em camundongos sépticos tratados com iKIR

Prévios estudos demonstraram que a ausência de SOCS1 leva a um aumento na produção de citocinas próinflamatórias durante o choque endotóxico induzido por LPS (Kinjyo *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2002). Para determinar se na ausência de SOCS1, os camundongos sépticos teriam uma exacerbação da resposta inflamatória sistêmica, foi avaliada a produção de citocinas no soro de animais sépticos tratados com iKIR. Observou-se um aumento na produção de IL-6 e IL-1 β no soro de animais sépticos, comparados com animais naive (**Figura 3A-B**). Além disso, foi observado que camundongos sépticos tratados com iKIR, tiveram um aumento significativo na produção de IL-6, IL-1 β e TNF- α , quando comparados com animais sépticos tratados com o peptídeo control (**Figura 3A-C**). Em conjunto, esses resultados mostram que a ausência de SOCS1 leva ao aumento da resposta inflamatória sistêmica durante a sepse.

Figura 3. Aumento da liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias em animais sépticos tratados com iKIR.

Camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR e submetidos a CLP, como descrito na **Figura 2**. IL-6 (**A**), IL-1 β (**B**) e TNF- α (**C**), foram quantificados no soro 18 h após a cirurgia por ELISA. N = 3-7 camundongos/grupo, 3 experimentos independentes, *one way ANOVA* seguido por *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Dados apresentados como média $\pm$ EPM.

* $p < 0,05$, animais sépticos vs naíve.

$p < 0,05$, animais sépticos tratados com iKIR vs naíve.

& $p < 0,05$, animais sépticos tratados com iKIR vs sépticos tratados com peptídeo controle.

4.4. SOCS1 previne a inflamação pulmonar induzida durante a sepse

A inflamação sistêmica induzida pela sepse pode afetar vários órgãos, tais como pulmão, fígado, rim e coração (Bosmann e Ward, 2013; White *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Nossa hipótese foi que a inibição de SOCS1 durante a sepse poderia causar aumento na inflamação pulmonar. Inicialmente, foi avaliado a expressão de SOCS1 no pulmão de camundongos sépticos. Foi observado um aumento na expressão de SOCS1 em animais sépticos, quando comparados com o grupo naive (**Figura 4A**). Em seguida, foi avaliada se a inibição de SOCS1 durante a sepse aumentaria a inflamação pulmonar. Estudos prévios tem demonstrado que SOCS1 regula negativamente a expressão de MyD88, que por sua vez induz a síntese de mediadores inflamatórios como IL-6 e KC (De Filippo *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015). Para avaliar o papel de SOCS1 na inflamação pulmonar, camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR e submetidos a CLP como descrito anteriormente. Após 18 h da cirurgia foi avaliada a expressão de *Myd88* no pulmão. Foi observado que houve aumento na expressão de *Myd88* nos animais sépticos tratados com iKIR, comparado com o grupo séptico tratado com peptídeo controle (**Figura 4B**). Em seguida, foi avaliada a concentração de citocinas no homogenato de pulmão. Observou-se aumento significativo na produção de IL-6 e KC no grupo séptico tratado com iKIR (**Figura 4C-D**). Análise da atividade da mieloperoxidase (MPO), mostrou aumento na atividade da enzima, sugerindo um aumento do infiltrado de neutrófilos no pulmão desses animais (**Figura 4E**). Em conjunto, esses resultados mostram que a inibição farmacológica de SOCS1 induz um aumento na resposta inflamatória pulmonar durante a sepse.

Figura 4. SOCS1 inibe a resposta inflamatória pulmonar durante a sepse.

(A) Expressão de *Socs1* no pulmão de camundongos sépticos, 18 h após CLP. Camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR como descrito na **Figura 2**. Após 18 h da cirurgia, os pulmões foram isolados e a expressão de *MyD88* foi avaliada por qPCR (B). A concentração de IL-6 (C) e KC (D) foi avaliada no homogenato de pulmão por ELISA. (E) A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi avaliada pelo ensaio de MPO. N = 4-9 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes, *Unpaired t Test*. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

4.5. *Inibição de SOCS1 aumenta o dano tecidual em camundongos sépticos tratados com iKIR*

Em seguida, foi avaliado se na ausência de SOCS1 haveria aumento de dano tecidual em outros órgãos como o fígado, coração e rim. Para isso, camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR como descrito anteriormente. Após 18 h da cirurgia, foram avaliadas as enzimas AST e ALT, as quais são comumente utilizadas como indicador de dano hepático. Foi observado que houve uma maior produção de AST e ALT no soro de camundongos sépticos tratados com iKIR, comparados com animais tratados com peptídeo controle (**Figura 5A e B**). Além disso, foi observado que o grupo tratado teve aumento nas concentrações da enzima CK-MB e nas concentrações de ureia no soro, os quais são indicadores de lesão cardíaca e renal, respectivamente (**Figura 5C e D**). Em conjunto, esses resultados sugerem que a ausência de SOCS1 leva ao aumento de dano tecidual durante a sepse.

Figura 5. Aumento do dano tecidual em animais sépticos tratados com iKIR.

Camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR e submetidos a CLP, como descrito na **Figura 2**. Após 18 h, foram quantificadas os marcadores de dano tecidual AST (**A**), ALT (**B**), CK-MB (**C**) e ureia (**D**) no soro de animais sépticos e tratados. N = 3-4 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes, *Unpaired t Test*. Dados apresentados como média ± EPM. &p<0,05

4.6. Inibição farmacológica de SOCS1 aumenta a carga bacteriana durante a sepse

Os resultados até agora mostram que a inibição de SOCS1 aumenta a taxa de mortalidade, a resposta inflamatória e o dano tecidual de camundongos sépticos. Em seguida, foi questionado se o aumento da susceptibilidade a sepse, estaria também associado com aumento do crescimento bacteriano. Assim, camundongos C57BL/6 tratados com iKIR, 24 h e 1 h antes da CLP foram sacrificados 18 h após a cirurgia e avaliada a carga bacteriana na cavidade peritoneal e no sangue. Foi observado que animais sépticos tratados com iKIR apresentaram aumento na carga bacteriana, na cavidade peritoneal e no sangue, em relação ao grupo séptico tratado com peptídeo controle (**Figura 6A e B**).

Figura 6. Inibição de SOCS1 aumenta a carga bacteriana durante a sepse.

Camundongos C57BL/6 foram tratados como descrito na **Figura 2**, foram sacrificados 18 h após CLP e a carga bacteriana foi quantificada no lavado peritoneal (LP) (**A**) e no sangue (**B**). N = 5 camundongos/grupo, 3 experimentos independentes, *t test*, *Mann Whitney test*. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. &p<0,05.

4.7. Inibição farmacológica de SOCS1 diminuiu o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais sépticos

Estudos prévios do nosso grupo tem mostrado que os neutrófilos são células cruciais no controle do crescimento bacteriano durante a sepse (Alves-Filho *et al.*, 2006; Alves-Filho *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2009). Para avaliar se a inibição de SOCS1 afeta a migração de neutrófilos para o local da infecção e isso levaria ao aumento do crescimento bacteriano, a frequência e número de neutrófilos foi quantificada na cavidade peritoneal. Inicialmente, foi observado que animais sépticos tratados com iKIR apresentaram uma diminuição na contagem de células totais na cavidade peritoneal, em relação ao grupo séptico tratado com o peptídeo controle (**Figura 7A**). Em seguida, foi quantificada a população de neutrófilos. Foi observado uma diminuição significativa no número total e na frequência de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal do grupo séptico tratado com iKIR (**Figura 7B e C**). Em conjunto, esses resultados sugerem que na ausência de SOCS1 há uma falha na migração de neutrófilos que leva ao aumento do crescimento bacteriano e a exacerbação da sepse.

Figura 7. Diminuição da migração de neutrófilos em animais sépticos tratados com iKIR.

Camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR como descrito na **Figura 2**. **(A)** Células totais, **(B)** número e **(C)** frequência de neutrófilos na cavidade peiritoneal de camundongos sépticos tratados com iKIR foi avaliada 18 h após a CLP por contagem diferencial. N = 4 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes, *Unpaired t Test*. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

4.8. Inibição farmacológica de SOCS1 aumenta a susceptibilidade à sepse causada por MRSA

MRSA é um patógeno humano comum na população que causa infecções de pele e de tecidos blandos (Knox *et al.*, 2015). Estudos demonstram que as infecções por MRSA são uma causa comum de sepse (Castaldo e Yang, 2007). Utilizando o modelo de sepse induzido por infecção intraperitoneal com MRSA, foi avaliado o papel de SOCS1 na sepse bacteriana. Nossa hipótese é que independente do modelo de sepse, a inibição de SOCS1 resultaria em aumento da susceptibilidade à sepse. Animais C57BL/6 previamente tratados com iKIR foram infectados com MRSA bioluminescente pela via intraperitoneal. Após 24 h da infecção, foi avaliada a disseminação de MRSA com o auxílio do *IVIS SpectrumCT*. Camundongos tratados com iKIR tiveram aumento na disseminação bacteriana 24 h após a infecção (**Figura 8A e B**). Além disso, foi observado que houve um aumento do sinal bioluminescente na região do rim. Para melhor entender o papel de SOCS1 na fisiopatologia da sepse, o rim de camundongos infectados com MRSA foi isolado e avaliado o crescimento bacteriano por quantificação de bioluminiscência. Foi observado que o tratamento com iKIR aumentou o sinal de bioluminiscência no rim dos animais infectados, em relação ao grupo tratado com o peptídeo controle (**Figura 8C e D**). Esses resultados mostram que independente do modelo de sepse, SOCS1 tem um papel fundamental no controle da disseminação e do crescimento bacteriano durante a sepse.

Figura 8. Tratamento com iKIR aumenta a susceptibilidade a sepsé induzida por MRSA.

Animais C57BL/6 foram tratados com iKIR 24 h e 1 h antes da infecção com 2×10^8 MRSA bioluminescente pela via intraperitoneal. **(A)** Imagens representativas da dispersão de MRSA 24 h após a infecção. **(B)** Quantificação da carga bacteriana

utilizando o sistema de detecção de bioluminescência do IVIS. **(C)** DLIT representativo de MRSA no rim de animais 24 h após a infecção com MRSA. **(D)** Quantificação de MRSA bioluminescente no rim. N = 5-6 camundongos/grupo, *Unpaired t Test*. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.
Relative fluorescence unit (RFU). Photons flux / second (p/s)

4.9. Deficiência de *Socs1* em células mieloides aumenta a susceptibilidade a sepse polimicrobiana

Neutrófilos e macrófagos são células cruciais na resposta imune durante a sepse (Alves-Filho *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2009; Bhan *et al.*, 2016). No entanto, a falha na migração de neutrófilos durante o tratamento com iKIR, sugere que o aumento na susceptibilidade a sepse poderia ser dependente de macrófagos, os quais são as células primeiras células em contacto com o patógeno. Para avaliar se ausência de SOCS1 nos macrófagos aumenta a susceptibilidade a sepse, foram gerados camundongos deficientes de SOCS1 na célula mioide (*Socs1* ^{Δ myel}). Para isso, camundongos *Socs1*^{fl} e *LysM*^{cre/cre} foram cruzados e, antes de cada experimento, os animais foram genotipados. Como descrito previamente (Chong *et al.*, 2003), a expressão do gene *reporter* humano CD4 (*hCD4*) foi utilizada como um indicador de recombinação mediada pela enzima cre e de deleção de SOCS1 (**Figura 9A**).

Macrófagos infectados com *S. aureus* apresentam aumento na fosforilação de STAT1 (Parker e Prince, 2012). Para confirmar se houve deleção do gene *Socs1* em células mieloides, macrófagos *Socs1* ^{Δ myel} foram infectados com MRSA e após 1 h foi avaliada a expressão de pSTAT1 por western blot. Inicialmente, foi observado que macrófagos *Socs1*^{fl} infectados com MRSA tiveram aumento na expressão de pSTAT1, quando comparados aos macrófagos não infectados (NI). Além disso, foi observado que houve um aumento maior na expressão de pSTAT1 em macrófagos *Socs1* ^{Δ myel} infectados, em relação com macrófagos *Socs1*^{fl} infectados (**Figura 9B**). Esses resultados confirmaram mais uma vez a deficiência de SOCS1 em macrófagos *Socs1* ^{Δ myel}, leva ao aumento da ativação de STAT1.

Em seguida, foi avaliado o papel de SOCS1 na célula mioide durante a sepse polimicrobiana. Para isso, animais *Socs1* ^{Δ myel} e *Socs1*^{fl} foram submetidos a CLP e após 18 h, foi quantificada a carga bacteriana. Foi observado um aumento no crescimento bacteriano em camundongos *Socs1* ^{Δ myel} sépticos, comparados com seu respectivo grupo control (*Socs1*^{fl} séptico) (**Figura 9C**). Em conjunto, esses

4.10. Deficiência de SOCS1 na célula mieloide exacerba a resposta inflamatória sistêmica e pulmonar

Os resultados apresentados até agora demonstram que a inibição ou a ausência de SOCS1 aumenta a susceptibilidade a sepse. Em seguida foi avaliado se a deficiência de SOCS1 na célula mieloide, também aumentaria a resposta inflamatória sistêmica durante a sepse. Para isso, camundongos *Socs1* ^{Δ myel} foram submetidos a CLP e após 18 h avaliada a produção de citocinas pró-inflamatórias. Observou-se um aumento na produção de IL-6 e TNF- α no soro de animais *Socs1* ^{Δ myel} sépticos, em relação ao grupo *Socs1*^{fl} séptico (**Figura 10A-B**). Além disso, observou-se aumento no infiltrado inflamatório pulmonar de animais *Socs1* ^{Δ myel} sépticos, comparados com o grupo *Socs1*^{fl} séptico (**Figura 10C**). Coletivamente, esses resultados demonstram que a deficiência de SOCS1 nas células mieloides induz a exacerbação da resposta inflamatória sistêmica e pulmonar durante a sepse.

Figura 10. Aumento da resposta inflamatória sistêmica e pulmonar em camundongos Socs1^{Δmyel} sépticos.

Animais Socs1^{Δmyel} foram submetidos à CLP e 18 h da cirurgia, o soro dos animais foram coletados e utilizados para a quantificação de IL-6 (**A**) e TNF-α (**B**). Os pulmões de animais sépticos foram coletados e processados para a confecção de lâminas histopatológicas. (**C**) As fotomicrografias de seções de pulmão corados com Hematoxilina e Eosina são mostradas em aumento de 100X. N = 4-8 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes, *one way ANOVA* seguido por *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Dados expressos como média ± EPM.

*p<0,05, grupo Socs1^{fl} séptico vs Naive.

#p<0,05, grupo Socs1^{Δmyel} séptico vs Naive.

&p<0,05, grupo Socs1^{Δmyel} séptico vs Socs1^{fl} séptico.

4.11. Inibição farmacológica de SOCS1 aumenta a ativação de STAT3 durante a sepse

SOCS1 é um conhecido inibidor da ativação de STAT1 e STAT3 (Takahashi *et al.*, 2011). Inicialmente, foi avaliado se na ausência de SOCS1, haveria um aumento na ativação de STAT3 e isso levaria a um aumento da resposta inflamatória sistêmica durante a sepse. Foi observado aumento na expressão de *Stat3* em animais sépticos tratados com iKIR, comparados aos animais sépticos tratados com o peptídeo controle (**Figura 11A**). Similares resultados foram observados nos animais sépticos deficientes de SOCS1 na célula mieloide, quando comparados com seu respectivo grupo controle (**Figura 11B**). Em seguida, foi avaliada a ativação de STAT3, vista como a expressão da proteína fosforilada por western blot (**Figura 11C**). Camundongos sépticos apresentaram aumento da fosforilação de STAT3 quando comparados com animais naive (**Figura 11C**). Interessantemente, animais tratados com inibidor de SOCS1 apresentaram aumento significativo da ativação de STAT3, quando comparados com os animais sépticos tratados com o peptídeo controle (**Figura 11C**).

Figura 11. Inibição de SOCS1 induz aumento na expressão e ativação de STAT3.

Camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR e submetidos a CLP, como descrito na **Figura 2**. **(A)** Após 18 h da cirurgia, a expressão de *Stat3* foi avaliada em células peritoneais por qPCR. N = 3 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes, one way ANOVA seguido por Bonferroni's Multiple Comparison Test. **(B)** Camundongos *Socs1*^{Δmyel} e *Socs1*^{fl} foram submetidos a CLP e 18 h após a cirurgia, a expressão de *Stat3* foi avaliada em células peritoneais por qPCR. N = 9-10 camundongos/grupo, *Unpaired t Test*. **(C)** Imunoblot e quantificação de pSTAT3 e STAT3 em animais sépticos tratados com iKIR. N = 3-4 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes, *one way ANOVA* seguido por *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Dados apresentados como média ± EPM.

*p<0,05, animais sépticos vs naive.

#p<0,05, animais sépticos tratados com iKIR vs grupo naive.

&p<0,05 animais sépticos tratados com iKIR vs sépticos tratados com peptídeo controle ou grupo *Socs1*^{Δmyel} séptico vs *Socs1*^{fl} séptico.

4.12. SOCS1 controla a ativação de STAT3 e diminui a mortalidade em animais sépticos

Para determinar se aumento na ativação de STAT3 nos animais sépticos tratados com iKIR, leva ao aumento da gravidade da sepse, camundogos C57BL/6 que foram tratados com iKIR, foram também tratados com um conhecido inibidor da ativação de STAT3 (STATTIC) (Schust *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2014). Os animais foram tratados com STATTIC, 24 h e 1 h antes da cirurgia e, posteriormente uma vez ao dia por 3 dias (**Figura 12A**). Inibição farmacológica da ativação de STAT3 diminuiu a mortalidade de animais iKIR sépticos, comparados com o grupo séptico somente tratado com iKIR (**Figura 12B**). Esse aumento na sobrevida também foi associado com diminuição do crescimento da bactéria no lavado peritoneal (**Figura 12C**). Coletivamente, esses resultados sugerem que SOCS1 tem um papel protetor na sepse, através do controle da excessiva ativação de STAT3. Essa regulação negativa mediada por SOCS1 leva a diminuição na carga bacteriana e aumento da sobrevida durante a sepse.

Figura 12. SOCS1 tem um efeito protetor durante a sepse inibindo a ativação de STAT3.

(A) Camundongos C57BL/6 foram tratados com STATTIC, 24 h e 1 h antes da CLP e durante 3 dias após a cirurgia. Os animais também foram tratados com iKIR como previamente descrito (**Figura 2**). (B) Sobrevida e (C) contagem de bactéria no peritônio de animais sépticos tratados com STATTIC e iKIR. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM.

PAINEL B: N = 7-8 camundongos/grupo, 1 experimento, para análise estatística foi utilizado *log-rank (Mantel-Cox) test*.

PAINEL C: N = 3-4 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes, *one way ANOVA* seguido por *Bonferroni's Multiple Comparison Test*.

* $p < 0,05$, animais sépticos vs naive.

$p < 0,05$, animais sépticos tratados com iKIR vs grupo naive.

& $p < 0,05$ animais sépticos tratados com iKIR vs sépticos tratados com peptídeo controle.

% $p < 0,05$ séptico tratado com iKIR e STATTIC vs séptico tratado somente com iKIR.

4.13. SOCS1 inibe a expressão de genes associados a via glicolítica durante a sepse

STAT3 é um fator de transcrição que induz a expressão de HIF-1 α (Dang *et al.*, 2011). HIF-1 α , por sua vez, regula positivamente a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo da glicólise (Shi *et al.*, 2011). Considerando que animais deficientes de SOCS1 apresentaram aumento na ativação de STAT3, nossa hipótese foi que o tratamento com iKIR, levaria a um aumento de HIF-1 α e portanto, um aumento na expressão de genes da via glicolítica durante a sepse. Camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR e submetidos a CLP como previamente descrito. Após 18 h da cirurgia, células do lavado peritoneal foram isoladas e a expressão de genes quantificada. Foi observado que houve aumento da expressão de *Hif-1 α* e dos genes *Glut1* e *Ldha*, no grupo séptico tratado com iKIR, quando comparado ao grupo tratado com peptídeo controle (**Figura 13A e B**). Em seguida foi avaliada a produção de lactato na cavidade peritoneal, o qual tem sido usado como um indicador de ativação da via glicolítica (O'Neill e Hardie, 2013; Yang *et al.*, 2014). Animais sépticos tratados com iKIR apresentaram aumento na produção de lactato no exudado peritoneal, quando comparados com animais sépticos tratados com o peptídeo controle (**Figura 13C**). Além disso foi avaliada a expressão gênica e proteica da hexoquinase, uma enzima fundamental no metabolismo da glicólise (Wilson, 2003). Animais sépticos tratados com iKIR apresentaram aumento significativo da expressão gênica (**Figura 13D**) e proteica dessa enzima (**Figura 13E e F**), quando comparado com o grupo tratado com peptídeo controle. Em conjunto, esses resultados sugerem que durante a sepse, SOCS1 atua como um regulador negativo da via glicolítica, provavelmente através do controle da excessiva ativação de STAT3.

Figura 13. SOCS1 regula negativamente a expressão de HIF-1 α e de genes associados a via glicolítica.

Camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR e submetidos a CLP como na **Figura 2**. Após 18 h, a expressão de *Hif-1 α* (**A**), *Glut1* e *Ldha* (**B**) foi avaliada nas células peritoneais por qPCR. (**C**) Quantificação de lactato no exudado peritoneal. (**D**) Expressão de *Hk1* nas células da cavidade peritoneal foi avaliada por qPCR. (**E**) Imunoblot de HK-1 e (**F**) quantificação da expressão da proteína em relação a β -actina. N = 3-7 camundongos/grupo, *Unpaired t Test*. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. [&]p<0,05

4.14. Deficiência de SOCS1 nas células mieloides inibe a expressão de genes associados a via glicolítica em animais sépticos

A inibição farmacológica de SOCS1 induziu aumento na expressão de *Hif-1 α* e de genes da via glicolítica. Em seguida, foi avaliado se a deficiência de SOCS1 na célula mioide também aumentaria a expressão desses genes. Foi observado que camundongos *Socs1* ^{Δ myel} sépticos apresentaram aumento na expressão de *Hif-1 α* , *Glut1* e *Ldha*, quando comparados com animais *Socs1*^{fl} sépticos (**Figura 14A-C**).

Figura 14. Deficiência de *Socs1* na célula mioide aumenta a expressão de genes associados a via glicolítica.

Camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR e submetidos a CLP como na **Figura 2**. Após 18 h, foi avaliada a expressão de (A) *Hif-1 α* , (B) *Glut1* e (C) *Ldha* nas células peritoneais por qPCR. N = 4-13 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes, *t test*, *Mann Whitney test*. Dados expressos como média $\pm$ EPM. &p<0,05.

4.15. SOCS1 inibe a expressão de genes associados a via glicolítica no pulmão de camundongos sépticos

Até agora nossos resultados demonstraram que a inibição ou deficiência de SOCS1 aumenta a inflamação sistêmica e isso está associado com aumento na expressão de genes da via glicolítica no local da infecção primária. Em seguida, foi avaliado se o aumento da inflamação no pulmão também estaria associado com aumento da expressão de genes da via glicolítica nesse órgão. Inicialmente, foi observado que a inibição de SOCS1 aumentou a expressão de *Stat3* no pulmão de camundongos sépticos e esse aumento foi maior que o observado no grupo séptico controle (**Figura 15A**). Além disso, foi observado que a inibição de SOCS1, aumentou significativamente a expressão de *Hif-1 α* , *Ldha* e *Mct4* no pulmão de camundongos sépticos, quando comparados com o grupo séptico tratado com peptídeo controle (**Figura 15B - D**).

Figura 15. Deficiência de Socs1 aumenta a expressão de genes associados a via glicolítica no pulmão de camundongos sépticos.

Camundongos C57BL/6 foram tratados com iKIR e submetidos a CLP como na **Figura 2**. Após 18 h, os pulmões foram homogeneizados e avaliada a expressão de **(A) Hif-1α**, **(B) Glut1**, **(C) Ldha** e, **(D) Mct4** por qPCR. N = 4-7 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes, *one way ANOVA* seguido por *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Dados expressos como média ± EPM.

* $p < 0,05$, animais sépticos vs naive.

$p < 0,05$, animais sépticos tratados com iKIR vs grupo naive.

& $p < 0,05$ animais sépticos tratados com iKIR vs sépticos tratados com peptídeo controle.

4.16. Ausência de SOCS1 aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de genes da via glicolítica em macrófagos estimulados com LPS

Para determinar se na ausência de SOCS1, os macrófagos seriam os responsáveis do aumento na produção de citocinas e as mudanças glicolíticas observadas nesses animais, camundongos *Socs1* ^{Δ myel} foram injectados com tioglicolato e as células da cavidade peritoneal foram isolados 4 dias após a injeção. As células foram plaqueadas e incubadas 30 minutos para aderência. Após a incubação, as células aderidas (macrófagos) foram estimulados com LPS por 24 h. Foi observado que macrófagos *Socs1*^{fl} apresentaram aumento significativo na produção de NO, IL-6 e TNF- α , quando comparados com macrófagos não estimulados (**Figura 16A-C**). Interessantemente, macrófagos deficientes de *Socs1* e estimulados com LPS apresentaram aumento significativo na produção de NO e IL-6, comparados com macrófagos *Socs1*^{fl} estimulados com LPS (**Figura 16A e B**). Não foram observadas diferenças significativas na produção de TNF- α entre os grupos *Socs1*^{fl} e *Socs1* ^{Δ myel} estimulados com LPS (**Figura 16C**). Além disso, foi quantificada a expressão de *Hif-1 α* e *Hk-1* nos macrófagos após o estímulo com LPS. Foi observado que macrófagos deficientes de *Socs1* apresentaram aumento da expressão de *Hif-1 α* ($p > 0.05$) e de *Hk-1* ($p < 0.05$), comparados com macrófagos controles (**Figura 16D-E**). Em conjunto, esses resultados demonstram que a ausência de *Socs1* em macrófagos, leva aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e maior ativação da via glicolítica durante o estímulo com LPS.

Figura 16. Deficiência de Socs1 em macrófagos estimulados com LPS exacerba a produção de citocinas e aumenta a expressão de genes associados a via glicolítica.

Macrófagos elicitados com tioglicolato foram isolados da cavidade peritoneal de animais Socs1^{Δmyel}, cultivados e estimulados durante 24 h com LPS. (A) NO, (B) IL-6 e (C) TNF foram quantificados no sobrenadante de macrófagos após o estímulo. A dosagem de NO foi avaliada por Griess e as citocinas por ELISA.

Expressão de *Hif-1 α* (D) e *Hk-1* (E) foi avaliada por qPCR. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM.

PAINEL A-B: N = 3-4, 2 experimentos independentes, *one way ANOVA* seguido por *Bonferroni's Multiple Comparison Test*.

PAINEL C-D: N = 3-4, 2 experimentos independentes, *Unpaired t test*.

*p<0,05, macrófagos Socs1^{fl} estimulados com LPS vs média.

#p<0,05, macrófagos Socs1 ^{Δ myel} estimulados com LPS vs média.

&p<0,05 macrófagos Socs1^{fl} vs Socs1 ^{Δ myel}, ambos os macrófagos estimulados com LPS.

4.17. STAT3 induz a expressão de Hif-1 α em macrófagos SOCS1 ^{Δ myel}

Para determinar se na ausência de SOCS1, uma maior ativação de STAT3 estaria levando a maior ligação de STAT3 no promotor de *Hif-1 α* e, por sua vez, maior ligação do HIF-1 α em genes associados à via glicolítica, foi realizado o ensaio de ChIP. Para isso, macrófagos peritoneais foram estimulados com 100 ng/mL de LPS. Após o período de estimulação, as células foram fixadas e o DNA processado para realização de ensaio ChIP. Foi observado que macrófagos *Socs1*^{fl}, estimulados com LPS apresentaram um aumento na ligação de STAT3 ao promotor de *Hif-1 α* (**Figura 17A**). Interessantemente, na ausência de SOCS1, macrófagos estimulados com LPS mostraram um aumento significativo dessa ligação, quando comparado com macrófagos *Socs1*^{fl} estimulados com LPS (**Figura 17A**). Além disso, foi observado que o estímulo com LPS também induziu aumento na ligação de HIF-1 α na região promotora da *Hk-1* em macrófagos *Socs1* ^{Δ myel} estimulados com LPS, comparados com *Socs1*^{fl} (**Figura 17B**). Em conjunto, esses resultados indicam que SOCS1 regula negativamente a ativação da via glicolítica no macrófago, bloqueando a ativação da via STAT3/HIF-1 α /glicólise durante a sepse.

Figura 17. Deficiência de SOCS1 aumenta a ativação da via STAT3/HIF-1α/Glicólise em macrófagos estimulados com LPS.

Macrófagos elicitados com tioglicolato foram isolados da cavidade peritoneal de animais *Socs1*^{Δmyel}, cultivados e estimulados durante 24 h com LPS e o ensaio de imunoprecipitação de cromatina foi realizado utilizando anti-STAT3 (A) e anti-HIF-1α (B). O DNA imunoprecipitado foi submetido a amplificação gênica por qPCR utilizando primers específicos para *Hif-1α* (A) ou *Hk-1* (B). N = 3, *one way ANOVA* seguido por *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Os resultados são expressos como média ± EPM.

*p<0,05, macrófagos *Socs1*^{fl} estimulados com LPS vs medio.

#p<0,05, macrófagos *Socs1*^{Δmyel} estimulados com LPS vs medio.

&p<0,05 macrófagos *Socs1*^{fl} vs *Socs1*^{Δmyel}, ambos os macrófagos estimulados com LPS.

4.18. SOCS1 inibe a via glicolítica para prevenir uma resposta inflamatória exacerbada durante a sepse

Macrófagos estimulados com LPS apresentam uma mudança do perfil metabólico, desde a fosforilação oxidativa à glicólise aeróbica (O'Neill e Hardie, 2013). Para determinar se uma exacerbada ativação da glicólise seria crucial no aumento da resposta inflamatória e da taxa de mortalidade de animais deficientes de SOCS1, camundongos C57BL/6 foram tratados com um inibidor competitivo da hexoquinase, 2-deoxiglicose (2-DG). Os animais foram tratados com 2-DG, uma vez por dia durante 4 dias e 1 h antes da CLP. Os animais também receberam iKIR ou peptídeo controle 24 h e 1 h antes a cirurgia (**Figura 18A**). Inicialmente, foi avaliada a produção de lactato no exudado peritoneal de camundongos 18 h após a CLP. Como previamente observado, animais sépticos tratados com iKIR apresentaram aumento na produção de lactato, comparado com o grupo séptico tratado com o peptídeo controle (**Figura 18B**). Animais sépticos que receberam iKIR e 2-DG apresentaram uma diminuição significativa na produção de lactato, comparado com o grupo que só recebeu iKIR (**Figura 18B**). Interessantemente, o tratamento com 2-DG diminuiu o crescimento bacteriano no sangue e na cavidade peritoneal de animais tratados com iKIR (**Figura 18C**). Esse aumento na resistência de animais sépticos tratados com iKIR e 2-DG foi associado com diminuição na produção da citocina proinflamatória IL-1 β (**Figura 18D**). O tratamento com 2-DG não alterou a produção de TNF nos animais sépticos tratados com iKIR, comparados com o grupo séptico somente tratado com iKIR (**Figura 18E**). Em conjunto, esses resultados indicam que durante a sepse, SOCS1 bloqueia a ativação da via STAT3/HIF-1 α /Glicólise e dessa maneira diminui a resposta sistêmica exacerbada e previne o dano de órgãos.

Figura 18. Aumento da via glicolítica induz maior susceptibilidade a sepse em camundongos tratados com iKIR.

(A) Camundongos foram tratados com 2-DG (0,5 g/Kg, i.p.) diariamente durante 4 dias e 1 h antes CLP. Os camundongos também foram tratados com iKIR, 24 h e 1 h antes da cirurgia. Após 18 h da cirurgia foi quantificado os níveis de lactato no exudado peritoneal (B), carga bacteriana no sangue e no lavado peritoneal (C). As concentrações de IL-1 β (D) e TNF (E) no lavado peritoneal foram avaliadas por ELISA. N = 4-8, *one way ANOVA* seguido por *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Dados são expressos como média $\pm$ EPM.

*p<0,05, animais sépticos vs naive.

p<0,05, animais sépticos tratados com iKIR vs grupo naive.

&p<0,05 animais sépticos tratados com iKIR vs sépticos tratados com peptídeo controle.

%p<0,05 Animais sépticos tratados com iKIR e 2DG vs grupo somente tratado com iKIR.

6. Discussão

Durante o desenvolvimento da resposta inflamatória, a ativação de receptores de reconhecimento de patógenos desencadeia eventos seqüenciais que induzem a produção de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-1 β , KC e MIP-2), assim como a produção de moléculas microbidas, tais como enzimas proteolíticas, ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS), as quais são importantes para degradação do patógeno internalizado (Bhan *et al.*, 2016; Hotchkiss, R. S., 2016; Sônego *et al.*, 2016). O desenvolvimento da resposta inflamatória é necessária para controlar a infecção, no entanto, quando exacerbada, essa resposta tem um efeito prejudicial no organismo, causando dano tecidual, falha múltipla de órgãos e eventualmente, a morte (Peña *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2016; Sônego *et al.*, 2016). Assim, a identificação de freios moleculares que possam atuar para controlar a exacerbação da resposta inflamatória poderá fornecer alvos terapêuticos favoráveis para prevenir dano de órgãos e diminuir as morbidades associadas à sepse.

SOCS1 é um inibidor pleiotrópico da resposta inflamatória, pois pode prevenir a ativação de receptores de reconhecimento de patógenos, receptores de citocinas e fatores de crescimento (Kinjyo *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2004; Fenner *et al.*, 2006; Carow *et al.*, 2011; Sachithanandan *et al.*, 2011). Estudos *in vivo* demonstram que a deficiência de SOCS1 leva a exacerbação da resposta inflamatória e uma maior taxa de mortalidade em um modelo de choque endotóxico induzido pelo LPS (Kinjyo *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2002). No entanto, os mecanismos envolvidos na exacerbação da resposta inflamatória em animais sépticos deficientes de SOCS1 ainda não tinham sido estudados. No presente trabalho, demonstramos que: (1) camundongos sépticos tem aumento na expressão de SOCS1 nas células peritoneais e no pulmão; (2) a inibição farmacológica de SOCS1 durante a sepse experimental aumenta a susceptibilidade a sepse, caracterizada por um aumento na carga bacteriana, nos níveis séricos de citocinas próinflamatórias e de marcadores de dano tecidual, e, conseqüentemente, um aumento na taxa de mortalidade; (3) SOCS1 presente nas células mielóides é crucial para regular negativamente a produção exacerbada de citocinas próinflamatórias durante a sepse; (4) SOCS1 regula negativamente a

ativação de STAT3 para diminuir a mortalidade e a carga bacteriana; (5) Inibição farmacológica de SOCS1 leva a uma maior ativação da via STAT3/HIF-1 α /via glicolítica durante a sepse; e (6) A inibição da via glicolítica impede o aumento da carga bacteriana e reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos sépticos tratados com iKIR. Em conjunto esses resultados elucidam um novo mecanismo pelo qual SOCS1 previne a resposta inflamatória e melhora o controle da carga bacteriana e a sobrevivência na sepse polimicrobiana.

Estudos anteriores tem demonstrado que SOCS1 tem um papel crucial no controle da resposta inflamatória, durante o choque induzido por LPS. Já em modelos de sepse polimicrobiana, Chung e colaboradores demonstraram que camundongos deficientes heterozigotos para SOCS1 foram mais susceptíveis a sepse, quando comparados com camundongos WT (Chung *et al.*, 2007). No entanto, esses autores não observaram nenhuma alteração na expressão de SOCS1 no pulmão ou baço, após 24 h da indução de sepse (Chung *et al.*, 2007). No presente trabalho, nós encontramos que houve um aumento da expressão de mRNA para *Socs1* nas células peritoneais e no pulmão de camundongos sépticos 18 h após a indução de CLP. Além disso, resultados prévios no nosso laboratório demonstraram que pacientes com choque séptico tiveram um aumento na expressão de *Socs1*, quando comparados com pacientes controle (dados não publicados). Alterações na expressão de SOCS1 têm sido associadas a vários distúrbios inflamatórios e a gravidade de doenças como lupus, fibrose e doenças inflamatórias intestinais (Yoshida *et al.*, 2004; Chinen *et al.*, 2006; Ramírez-Vélez *et al.*, 2012; Pathak *et al.*, 2015). Contudo, estudos adicionais são necessários para investigar se existe uma correlação entre a expressão de SOCS1 e a gravidade da sepse.

O uso de camundongos deficientes de SOCS1 tem limitado os estudos do papel dessa molécula na resposta imune, uma vez que esses animais desenvolvem doenças autoimunes de forma espontânea (Starr *et al.*, 1998; Alexander *et al.*, 1999; Chong *et al.*, 2005). Assim, é necessário a geração de novas ferramentas para mimetizar ou antagonizar a função de SOCS1 de modo a melhor explorar sua

função durante a resposta imune (Ahmed *et al.*, 2015). No intuito de investigar o papel de SOCS1 na resposta imune, estudos recentes tem utilizado peptídeos que mimetizam ou antagonizam a função dessa molécula. Estudos experimentais de doenças inflamatórias tem demonstrado que os peptídeos miméticos de SOCS1 podem prevenir o desenvolvimento de encefalomielite autoimune (EAE) e controlar o infiltrado de leucócitos em doenças inflamatórias (Mujtaba *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2011; Jager *et al.*, 2011). Já Nakashima e colaboradores utilizando um vector viral de expressão de SOCS1 demonstraram que, o aumento de SOCS1, levou a diminuição na inflamação e na taxa de mortalidade em um modelo murino de inflamação pulmonar (Nakashima *et al.*, 2008). Estes resultados ilustram o potencial terapêutico do uso de SOCS1 no tratamento de doenças inflamatórias. Nosso trabalho, é o primeiro estudo que utilizou os peptídeos com atividade antagonista de SOCS1, com o objetivo de avaliar o papel dessa molécula em modelo experimental de sepse. Utilizando o peptídeo antagonista do domínio KIR de SOCS1, iKIR, nós observamos que a inibição da função de SOCS1 aumentou a susceptibilidade a sepse, visto como um aumento no crescimento bacteriano, dano em múltiplos órgãos (rim, fígado e pulmão) e, em consequência aumento na taxa de mortalidade desses animais. Avançando mais no conhecimento da função de SOCS1 durante a sepse, no presente trabalho foi demonstrado que o SOCS1 presente na célula mieloide é um importante regulador da exacerbação da resposta inflamatória sistêmica observada em camundongos sépticos. No entanto, mais estudos são necessários para determinar se o uso de peptídeos agonistas ou de vetores de expressão de SOCS1 dirigidos para a célula mieloide poderiam ter um efeito terapêutico no controle da exacerbação da resposta inflamatória durante a sepse.

Estruturalmente, SOCS1 é composto por três domínios principais: KIR, SH2 e SOCS *box* (Yoshimura *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2015). Cada domínio tem uma função chave na função regulatória de SOCS1 (Tremgove e Ward, 2013; Ahmed *et al.*, 2015). No entanto, no presente trabalho, foi utilizado o inibidor do domínio KIR (iKIR), pois estudos prévios demonstram que esse domínio tem maior afinidade pelo domínio quinase da JAK2, e a sua ligação a essa enzima inibe completamente

a atividade quinase da JAK2 (Fujimoto e Naka, 2010; Jager *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2015). Além disso, outros estudos tem demonstrado que o tratamento com um peptídeo mimético do KIR é suficiente para limitar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e IL-17), bem como a ativação de STAT3 e STAT1, em modelos experimentais de doenças inflamatórias (Jager *et al.*, 2011; Madonna *et al.*, 2013). Demonstrando assim, que o domínio KIR é fundamental para a função de SOCS1.

Dados clínicos e experimentais demonstram que infecções por MRSA provocam danos a órgãos distantes ao local da infecção e podem causar sepsis (Thakker *et al.*, 1998; Perrone *et al.*, 2012; Sharma-Kuinkel *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014). Para determinar o papel de SOCS1 durante a sepse, nós também utilizamos o modelo de sepse induzido pela infecção peritoneal com MRSA. Similar ao modelo de sepse experimental induzida por CLP, camundongos tratados com o inibidor de KIR foram mais susceptíveis a sepse induzida por MRSA. Além disso, imagens obtidas utilizando o sistema *IVIS* demonstraram que a inibição de KIR leva a maior dispersão da bactéria, sendo os rins, o principal órgão atingido. Esse aumento do crescimento bacteriano no rim foi associado com aumento nos níveis séricos de ureia, indicando assim maior dano renal nos animais sépticos tratados com KIR. Nossos achados estão de acordo com outros estudos, os quais demonstram que a ausência de SOCS1 durante o desenvolvimento de doenças inflamatórias leva ao aumento de dano de órgãos fundamentais como o rim e o fígado (Metcalf *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2004; Chong *et al.*, 2005; Nakashima *et al.*, 2008; Sachithanandan *et al.*, 2011). Assim, SOCS1 é um componente fundamental no controle da exacerbação da resposta inflamatória e do dano tecidual durante a sepse.

Neutrófilos e macrófagos são células fundamentais no controle de infecções bacterianas (Benjamim *et al.*, 2002; Alves-Filho *et al.*, 2010; Trevelin *et al.*, 2012). Estudos prévios demonstram que o aumento da gravidade da sepse está associado com a falha no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e, como consequência, maior crescimento bacteriano (Benjamim *et al.*, 2002; Alves-Filho *et*

al., 2006; Rios-Santos *et al.*, 2007; Alves-Filho *et al.*, 2009). No presente trabalho, foi observado que a inibição de SOCS1 induz uma diminuição no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, culminando com maior crescimento bacteriano e maior susceptibilidade a sepse. No entanto, outros estudos são necessários para entender o exato papel de SOCS1 na migração de neutrófilos para o local da infecção e se a ausência de SOCS1 afecta a capacidade microbicida dessas células.

Os neutrófilos armazenam, no interior de seus grânulos, enzimas e mediadores proinflamatórios que são importantes para sua função microbicida, mas que por outro lado, tem um efeito deletério aos tecidos (Lerman e Kim, 2015; Bhan *et al.*, 2016; Czaikoski *et al.*, 2016; Sônego *et al.*, 2016). Além disso, estudos prévios demonstraram que o aumento da gravidade da sepse está associado com maior infiltrado de neutrófilos em órgãos fundamentais, como o pulmão, e isso leva ao aumento da inflamação no órgão e maior dano tecidual (Alves-Filho *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2006; Sônego *et al.*, 2016). De acordo com os nossos resultados, a inibição farmacológica ou deficiência de SOCS1 na célula mieloide induziu aumento no acúmulo de neutrófilos e maior resposta inflamatória no pulmão de camundongos sépticos. Dados clínicos e experimentais, tem demonstrado que durante a sepse, há um aumento na ativação de neutrófilos na circulação, assim como aumento na expressão do receptor CCR2 (Speyer *et al.*, 2004; Souto *et al.*, 2011). A ativação do CCR2 nos neutrófilos medeia o processo de migração dessas células para órgãos vitais, como os pulmões, e tem sido observado que existe uma correlação positiva entre a expressão de CCR2 e a gravidade da sepse (Souto *et al.*, 2011). No entanto, o papel de SOCS1 na migração de neutrófilos e a expressão de receptores de quimiocinas como CCR2 durante a sepse ainda precisam ser investigados.

Macrófagos são as células sentinelas do sistema imune que tem uma função fundamental no reconhecimento e controle de patógenos (Nathan e Ding, 2010). O papel de SOCS1 nos macrófagos tem sido amplamente estudado e vários trabalhos demonstram que a deficiência de SOCS1 aumenta a produção de citocinas

proinflamatórias após o estímulo com LPS (Kinjyo *et al.*, 2002; Chong *et al.*, 2005; Carow *et al.*, 2011; Sachithanandan *et al.*, 2011). Similarmente, no presente trabalho foi demonstrado que macrófagos deficientes de SOCS1, quando estimulados com LPS, produzem uma maior concentração de IL-6 e NO, quando comparados com macrófagos Socs1^{fl}. Aumento na ativação e produção de citocinas por macrófagos deficientes de SOCS1, tem sido correlacionado com o aumento na ativação de STAT3. No entanto, os mecanismos envolvidos no processo da regulação da resposta inflamatória mediada por SOCS1 durante a sepse, ainda não tinham sido elucidados.

SOCS1 é um regulador negativo da ativação de STAT1 e STAT3, os quais são ativados via LPS para induzir a produção de citocinas próinflamatórias (Peña *et al.*, 2010; Greenhill *et al.*, 2011; Serezani *et al.*, 2011). Estudos na literatura demonstraram um papel prejudicial de STAT1 e STAT3 durante a sepse (Kamezaki *et al.*, 2004; Herzig *et al.*, 2012). Assim, tem sido demonstrado que animais deficientes de STAT1 são mais resistentes a choque séptico e sepse induzida por CLP. Esse aumento na resistência a sepse foi associado com diminuição na produção de citocinas próinflamatórias como TNF, IL6 e MIP2 e um menor dano tecidual (Kamezaki *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2010; Herzig *et al.*, 2012). Na ausência de SOCS1, era de se esperar que animais sépticos apresentassem aumento na ativação de STAT1, que por sua vez, aumentaria a exacerbação da resposta inflamatória. No entanto, camundongos tratados com iKIR e submetidos a sepse, não tiveram aumento na ativação de STAT1. Além disso, os níveis de produção de IFN- γ não foram detectáveis pelos kits convencionais de citocinas (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que a ativação de STAT1 não é o principal condutor do aumento da susceptibilidade a sepse em camundongos tratados com iKIR.

Durante a sepse, tem sido observado um aumento na ativação de STAT3 (Greenhill *et al.*, 2011). No entanto, Matsukawa e colaboradores demonstraram que a deleção de STAT3, especificamente em células mielóides, induz maior mortalidade durante a sepse polimicrobiana e isso foi associado com maior

produção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias e dano múltiplo de órgãos (Matsukawa *et al.*, 2003). Aumento na susceptibilidade a sepse nos animais deficientes de STAT3 foi associado com dano na capacidade microbicida dos leucócitos desses animais (Matsukawa *et al.*, 2003). Um estudo mais recente realizado por Peña e colaboradores demonstrou-se que inibição farmacológica da ativação de STAT3, aumentava a sobrevivência de animais que foram submetidos a choque séptico induzido pelo LPS ou a modelo experimental de sepse polimicrobiana (Peña *et al.*, 2010). O aumento na taxa de sobrevivência foi associado com diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF ou de fatores indutores de dano tecidual como a proteína do grupo 1 de mobilidade alta (HMGB1) (Peña *et al.*, 2010). Similar com o estudo de Peña e colaboradores, no presente trabalho foi observado que a inibição de SOCS1 aumenta a ativação de STAT3 tanto nas células peritoneais, quanto no pulmão de animais sépticos e isso foi associado com maior susceptibilidade a sepse. Além disso, no presente trabalho foi demonstrado que o tratamento com STATTIC, um conhecido inibidor de ativação e translocação nuclear de STAT3 (Schust *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2014; Okada *et al.*, 2015) reduz a mortalidade e a carga bacteriana em camundongos que foram também tratados com inibidor farmacológico de SOCS1. A ativação de STAT3 é mediada por IL-6 e IL-10 (Greenhill *et al.*, 2011). No modelo experimental de sepse polimicrobiana foi demonstrado que camundongos deficientes de SOCS1 ou tratados com iKIR tiveram aumento na produção sistêmica de IL-6 após à CLP. Contudo, ainda precisa ser determinado se o aumento de IL-6 é responsável pela ativação de STAT3 ou se a ativação de STAT3 é o condutor da produção de IL-6 e da exacerbação da resposta inflamatória durante a sepse.

Sabe-se que STAT3 está envolvido na expressão de HIF-1 α , o regulador *master* da expressão de enzimas da via glicolítica (Dang *et al.*, 2011; Kelly e O'Neill, 2015; O'Neill e Pearce, 2016). A glicólise é crucial para o metabolismo de carboidratos. Embora, em sua essência, a glicólise tenha um importante papel metabólico, recentes estudos demonstram que esta via metabólica é um passo essencial envolvido na função de várias células do sistema imune, como a produção de citocinas pró-inflamatórias, fagocitose, proliferação e ativação durante

a infecção (Galván-Peña e O'Neill, 2014; O'Neill *et al.*, 2016). No entanto, a ativação da via glicolítica também tem sido associada com o desenvolvimento ou piora de doenças inflamatórias, tais como encefalomielite, artrite e diabetes (Rodríguez-Prados *et al.*, 2010; Dang *et al.*, 2011; Tannahill *et al.*, 2013). De acordo com nossos resultados, foi observado que o aumento da susceptibilidade a sepse em camundongos tratados com iKIR ou deficientes de SOCS1 está associada com aumento na expressão de genes da via glicolítica e uma elevação nos níveis de lactato no peritônio e pulmões destes animais. Corroborando com estes dados, também encontramos um aumento na ativação da via glicolítica em macrófagos deficientes de SOCS1 e estimulados com LPS.

Nosso próximo passo foi elucidar os mecanismos regulados por SOCS1 que interferem na ativação da via glicolítica. Dados publicados por Dang e colaboradores demonstraram que durante a ativação de linfócitos Th17, STAT3 liga-se na região promotora de *Hif-1 α* e promove a expressão desse gene. Assim, de acordo com os dados de Dang e colaboradores, foi possível hipotetizar que nossos resultados também poderiam envolver uma ativação de *Hif-1 α* induzida por STAT3. Desse modo, foi observado que macrófagos deficientes de SOCS1, quando estimulados com LPS apresentaram um aumento na ligação de STAT3 na região promotora de *Hif-1 α* , assim como aumento na ligação de HIF-1 α na região promotora da *hexokinase 1*. Em conjunto, esses resultados demonstram que durante a sepse, a deficiência de SOCS1 induz aumento na ativação de STAT3 e maior ligação de STAT3 na região promotora de genes da via glicolítica, promovendo assim aumento na expressão dos genes dessa via.

A glicólise é um evento rigorosamente regulado e as moléculas que controlam a expressão e/ou ativação das enzimas que participam desta rota metabólica, proporcionariam alvos potenciais para o controle de doenças autoimunes e de respostas inflamatórias sistêmicas. Sabe-se que a via glicolítica é aumentada em células hiperinflamatórias, entanto que é regulada negativamente em condições de tolerância (Yang *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2016). Durante a sepse, monócitos e macrófagos estão em estado hiperinflamatório (aumento da

produção de citocinas pró-inflamatórias), o qual é associado com aumento da glicólise e a produção de lactato (Yang *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2016; Arts *et al.*, 2017). Do mesmo modo, estudos *in vitro* com macrófagos derivados de medula ósea tem demonstrado que o estímulo com LPS aumenta a expressão de enzimas da via glicolítica e isso contribui com a produção de citocinas como IL-6 e IL-1 β (Tannahill *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2016). No presente trabalho, foi possível observar que a deficiência de SOCS1 no macrófago aumenta a produção de mediadores pró-inflamatórios e isso está associado com maior expressão de *Hif-1 α* com concomitante aumento de genes da via glicolítica como a *Hk-1*.

Recentemente, um estudo demonstrou que a isoforma 1 da HK tem dupla função durante infecções microbianas: ativação do inflamassoma de NLRP3 para promover o processamento de IL-1 β e, também atua como receptor intracelular de reconhecimento de patógenos (Moon *et al.*, 2015). Dado que SOCS1 regula negativamente programas de transcrição envolvidos na expressão de HK1 induzida por HIF-1 α , é plausível supor que SOCS1 também poderia regular negativamente a sinalização de HK1 durante o reconhecimento de PAMPs. No entanto, mais estudos devem ser direcionados para entender o papel de SOCS1 na regulação dessa via.

Um estudo clínico de Cheng e colaboradores demonstraram que durante a fase aguda da sepse, leucócitos apresentam aumento de genes da via glicolítica, sendo que na fase imunotolerante diminui a expressão desses genes (Cheng *et al.*, 2016). Já estudos experimentais, Yang *et al.*, 2014 demonstraram que a inibição farmacológica da piruvato quinase M2 (PKM2), enzima chave da via glicolítica, aumenta a resistência à sepse letal. Esse aumento na resistência a sepse foi associado com diminuição na glicólise e na produção de IL-1 β (Yang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Estes dados sugerem que a regulação da via glicolítica pode representar uma via terapêutica viável no tratamento de doenças inflamatórias. De fato, o presente trabalho demonstrou que o bloqueio de SOCS1 aumenta a via glicolítica e inibição dessa via com 2-DG, diminui a produção de citocinas

proinflamatórias como IL-1 β , permitindo o melhor controle do crescimento bacteriano durante a sepse. Além de SOCS1, estudos prévios tem descrito outros reguladores negativos da reprogramação metabólica que são importantes para o controle da doença inflamatória. O receptor nuclear órfão, ERR- α , é um regulador do metabolismo energético, e é um regulador negativo da inflamação (Villena e Kralli, 2008). Ainda é preciso determinar se existe alguma relação entre o SOCS1 e o ERR- α para a regulação da glicólise.

Em resumo, nossos resultados identificam o SOCS1 como um regulador do metabolismo da glicólise durante a sepse polimicrobiana e indicam o mecanismo pelo qual SOCS1 previne a exacerbação da resposta proinflamatória (**Esquema 7**). A atividade reguladora mediada por SOCS1 previne o dano excessivo ao hospedeiro e aumenta a taxa de sobrevivência durante a sepse. Nossos resultados sugerem que o SOCS1 poderia ser alvo potencial para o desenvolvimento de terapias para o tratamento da síndrome de resposta inflamatória sistêmica.

Esquema 7. SOCS1 regula negativamente a ativação da via STAT3/HIF-1α/Glicólise durante a sepse.

Durante a sepse, a deficiência de SOCS1 no macrófago induz aumento na ativação de STAT3, o qual liga-se na região promotora do HIF-1 α , e promove a sua transcrição. O HIF-1 α , por sua vez, liga-se na região promotora da hexokinase 1, aumentando a transcrição desta e de outras enzimas da via glicolítica. O aumento da via glicolítica leva ao aumento nos níveis de lactato e a uma maior produção de citocinas proinflamatórias como IL-1 β . A exacerbação da resposta inflamatória observada na ausência de SOCS1 leva ao aumento do crescimento e da dispersão da bactéria para órgãos vitais, como o rim e, maior produção de citoquinas e quimiocinas como KC no pulmão. Esse aumento de KC induz maior acúmulo de neutrófilos nesse órgão, levando ao aumento da inflamação pulmonar. A exacerbação da resposta inflamatória na ausência de SOCS1 induz maior dano de órgãos vitais e, em consequência maior susceptibilidade durante a sepse.

7. Conclusões

Nossa trabalho mostra que a inibição farmacológica ou deficiência genética de SOCS1 promove uma exacerbação da resposta inflamatória sistêmica e do dano de órgãos vitais como, rim, coração, pulmão e fígado. Essa regulação da inflamação mediada por SOCS1 permite um maior controle da dispersão e do crescimento bacteriano, aumentando assim a taxa de sobrevivência durante a sepse. Mecanicamente, SOCS1 regula negativamente a ativação de STAT3, o qual é um fator de transcrição crucial para a expressão de HIF-1 α e, esse por sua vez induz a expressão de enzimas da via glicolítica. Sendo assim, nossos resultados nos permitem concluir que o SOCS1 apresenta um papel fundamental no controle da resposta inflamatória sistêmica durante a sepse.

8. Apêndice

FOTOS ORIGINAIS DOS WESTERN BLOT

7.1. hCD4

7.2. pSTAT3

7.3. STAT3

7.4. Hexokinase I

7.5. Actina

9. Referências

AHMED, C. M.; LARKIN, J.; JOHNSON, H. M. SOCS1 Mimetics and Antagonists: A Complementary Approach to Positive and Negative Regulation of Immune Function. **Front Immunol**, v. 6, p. 183, 2015. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25954276> >.

AIRD, W. C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 3765-77, May 2003. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543869> >.

ALEXANDER, W. S. et al. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. **Cell**, v. 98, n. 5, p. 597-608, Sep 1999. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490099> >.

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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424729> >.

_____. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v. 30 Suppl 1, p. 3-9, Oct 2008. ISSN 1540-0514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18704017> >.

_____. 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 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234125> >.

_____. 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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473304> >.

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 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849637> >.

ARTS, R. J. et al. Cellular metabolism of myeloid cells in sepsis. **J Leukoc Biol**, v. 101, n. 1, p. 151-164, Jan 2017. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27272310> >.

BAKER, C. C. et al. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery**, v. 94, n. 2, p. 331-5, Aug 1983. ISSN 0039-6060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6879447> >.

BEALE, R. et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. **Infection**, v. 37, n. 3, p. 222-32, Jun 2009. ISSN 1439-0973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19404580> >.

BENJAMIM, C. F. et al. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infect Immun**, v. 70, n. 7, p. 3602-10, Jul 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065501> >.

BERNARD, A. M.; BERNARD, G. R. The immune response: targets for the treatment of severe sepsis. **Int J Inflam**, v. 2012, p. 697592, 2012. ISSN 2042-0099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23251827> >.

BHAN, C. et al. Role of cellular events in the pathophysiology of sepsis. **Inflamm Res**, v. 65, n. 11, p. 853-868, Nov 2016. ISSN 1420-908X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27392441> >.

BOSMANN, M.; WARD, P. A. The inflammatory response in sepsis. **Trends Immunol**, v. 34, n. 3, p. 129-36, Mar 2013. ISSN 1471-4981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23036432> >.

BOUMA, G. et al. Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function. **Br J Haematol**, v. 151, n. 4, p. 312-26, Nov 2010. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813010> >.

BROWN, K. A. et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 157-69, Jul 2006. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829300> >.

CAROW, B. et al. Silencing suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) in macrophages improves Mycobacterium tuberculosis control in an interferon-gamma (IFN-gamma)-dependent manner. **J Biol Chem**, v. 286, n. 30, p. 26873-87, Jul 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622562> >.

CASTALDO, E. T.; YANG, E. Y. Severe sepsis attributable to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging fatal problem. **Am Surg**, v. 73, n. 7, p. 684-7; discussion 687-8, Jul 2007. ISSN 0003-1348. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17674941> >.

CAVAILLON, J. M.; ADIB-CONQUY, M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. **Crit Care**, v. 10, n. 5, p. 233, 2006. ISSN 1466-609X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17044947> >.

CHENG, S. C. et al. Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. **Nat Immunol**, v. 17, n. 4, p. 406-13, Apr 2016. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26950237> >.

CHEONG, J. H. et al. Dual inhibition of tumor energy pathway by 2-deoxyglucose and metformin is effective against a broad spectrum of preclinical cancer models. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 12, p. 2350-62, Dec 2011. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21992792> >.

CHINEN, T. et al. Suppressor of cytokine signaling-1 regulates inflammatory bowel disease in which both IFN γ and IL-4 are involved. **Gastroenterology**, v. 130, n. 2, p. 373-88, Feb 2006. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472593> >.

CHONG, M. M. et al. Suppressor of cytokine signaling-1 is a critical regulator of interleukin-7-dependent CD8 $^{+}$ T cell differentiation. **Immunity**, v. 18, n. 4, p. 475-87, Apr 2003. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12705851> >.

_____. Suppressor of cytokine signaling-1 in T cells and macrophages is critical for preventing lethal inflammation. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1668-75, Sep 2005. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899915> >.

CHUNG, C. S. et al. SOCS-1 is a central mediator of steroid-increased thymocyte apoptosis and decreased survival following sepsis. **Apoptosis**, v. 12, n. 7, p. 1143-53, Jul 2007. ISSN 1360-8185. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17364147> >.

COLLINS, E. L. et al. Inhibition of SOCS1 $^{-/-}$ lethal autoinflammatory disease correlated to enhanced peripheral Foxp3 $^{+}$ regulatory T cell homeostasis. **J Immunol**, v. 187, n. 5, p. 2666-76, Sep 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21788442> >.

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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26849138> >.

DANG, E. V. et al. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. **Cell**, v. 146, n. 5, p. 772-84, Sep 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871655> >.

DE FILIPPO, K. et al. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. **J Immunol**, v. 180, n. 6, p. 4308-15, Mar 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322244> >.

DELLINGER, R. P. The Surviving Sepsis Campaign: 2013 and beyond. **Chin Med J (Engl)**, v. 126, n. 10, p. 1803-5, 2013. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23673089> >.

DEUTSCHMAN, C. S.; TRACEY, K. J. Sepsis: current dogma and new perspectives. **Immunity**, v. 40, n. 4, p. 463-75, Apr 2014. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24745331> >.

EGAN, P. J. et al. Suppressor of cytokine signaling-1 regulates acute inflammatory arthritis and T cell activation. **J Clin Invest**, v. 111, n. 6, p. 915-24, Mar 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12639998> >.

ELLABAN, E.; BOLGOS, G.; REMICK, D. Selective macrophage suppression during sepsis. **Cell Immunol**, v. 231, n. 1-2, p. 103-11, 2004 Sep-Oct 2004. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15919375> >.

ERMERT, D.; ZYCHLINSKY, A.; URBAN, C. Fungal and bacterial killing by neutrophils. **Methods Mol Biol**, v. 470, p. 293-312, 2009. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19089391> >.

FENNER, J. E. et al. Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity. **Nat Immunol**, v. 7, n. 1, p. 33-9, Jan 2006. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16311601> >.

FERREIRA, A. E. et al. PPAR- γ /IL-10 axis inhibits MyD88 expression and ameliorates murine polymicrobial sepsis. **J Immunol**, v. 192, n. 5, p. 2357-65,

Mar 2014. ISSN 1550-6606. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24489087> >.

FIGUEIREDO, N. et al. Anthracyclines induce DNA damage response-mediated protection against severe sepsis. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 874-84, Nov 2013. ISSN 1097-4180. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184056> >.

FLEISCHMANN, C. et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 193, n. 3, p. 259-72, Feb 2016. ISSN 1535-4970. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26414292> >.

FREEMERMAN, A. J. et al. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. **J Biol Chem**, v. 289, n. 11, p. 7884-96, Mar 2014. ISSN 1083-351X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24492615> >.

FREITAS, A. et al. IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. **J Immunol**, v. 182, n. 12, p. 7846-54, Jun 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19494309> >.

FUJIMOTO, M.; NAKA, T. SOCS1, a Negative Regulator of Cytokine Signals and TLR Responses, in Human Liver Diseases. **Gastroenterol Res Pract**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-630X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20862390> >.

GALVÁN-PEÑA, S.; O'NEILL, L. A. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. **Front Immunol**, v. 5, p. 420, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25228902> >.

GREENHILL, C. J. et al. IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3. **J Immunol**, v. 186, n. 2, p. 1199-208, Jan

2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148800> >.

HAN, Z. et al. Inhibition of STAT3 signaling targets both tumor-initiating and differentiated cell populations in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 18, p. 8416-28, Sep 2014. ISSN 1949-2553. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261365> >.

HANADA, T. et al. Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity. **Immunity**, v. 19, n. 3, p. 437-50, Sep 2003. ISSN 1074-7613. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14499118> >.

HERZIG, D. et al. STAT1-deficient mice are resistant to cecal ligation and puncture-induced septic shock. **Shock**, v. 38, n. 4, p. 395-402, Oct 2012. ISSN 1540-0514. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22777121> >.

HOTCHKISS. **Sepsis and septic shock**. LYLE L. MOLDAWER, S. M. O., KONRAD REINHART, ISAIAH R. TURNBULL AND JEAN-LOUIS VINCENT: NATURE REVIEWS. 2: 1-21 p. 2016.

HOTCHKISS, R. S. **Sepsis and septic shock**. MOLDAWER, L. L. Nature Reviews. Disease primers. 2 2016.

ILAS. Sepse: um problema de saúde pública / Instituto Latino-Americano para Estudos

da Sepse. SEPSE, I. L.-A. P. E. D. Conselho Federal de Medicina: Conselho Federal de Medicina: 90 p. 2015.

ISOMÄKI, P. et al. The expression of SOCS is altered in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 46, n. 10, p. 1538-46, Oct 2007. ISSN 1462-0324. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17726036> >.

JAGER, L. D. et al. The kinase inhibitory region of SOCS-1 is sufficient to inhibit T-helper 17 and other immune functions in experimental allergic encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, v. 232, n. 1-2, p. 108-18, Mar 2011. ISSN 1872-8421. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131060> >.

JAMAL UDDIN, M. et al. IRG1 induced by heme oxygenase-1/carbon monoxide inhibits LPS-mediated sepsis and pro-inflammatory cytokine production. **Cell Mol Immunol**, v. 13, n. 2, p. 170-9, Mar 2016. ISSN 2042-0226. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25640654> >.

JAWAD, I.; LUKŠIĆ, I.; RAFNSSON, S. B. Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. **J Glob Health**, v. 2, n. 1, p. 010404, Jun 2012. ISSN 2047-2986. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23198133> >.

JIN, L. et al. CXCL1 contributes to host defense in polymicrobial sepsis via modulating T cell and neutrophil functions. **J Immunol**, v. 193, n. 7, p. 3549-58, Oct 2014. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25172493> >.

KAMEZAKI, K. et al. The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals. **Int Immunol**, v. 16, n. 8, p. 1173-9, Aug 2004. ISSN 0953-8178. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15226272> >.

KELLY, B.; O'NEILL, L. A. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. **Cell Res**, v. 25, n. 7, p. 771-84, Jul 2015. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26045163> >.

KIM, H. K.; MISSIAKAS, D.; SCHNEEWIND, O. Mouse models for infectious diseases caused by Staphylococcus aureus. **J Immunol Methods**, v. 410, p. 88-99, Aug 2014. ISSN 1872-7905. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769066> >.

KIM, S. H. et al. Distinct protein kinase A anchoring proteins direct prostaglandin E2 modulation of Toll-like receptor signaling in alveolar macrophages. **J Biol Chem**, v. 286, n. 11, p. 8875-83, Mar 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247892> >.

KINJYO, I. et al. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. **Immunity**, v. 17, n. 5, p. 583-91, Nov 2002. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433365> >.

KNOX, J.; UHLEMANN, A. C.; LOWY, F. D. Staphylococcus aureus infections: transmission within households and the community. **Trends Microbiol**, v. 23, n. 7, p. 437-44, Jul 2015. ISSN 1878-4380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25864883> >.

KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Front Biosci**, v. 13, p. 2400-7, Jan 2008. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981721> >.

KOPYDLOWSKI, K. M. et al. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. **J Immunol**, v. 163, n. 3, p. 1537-44, Aug 1999. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415057> >.

LEE, A. J.; CHO, K. J.; KIM, J. H. MyD88-BLT2-dependent cascade contributes to LPS-induced interleukin-6 production in mouse macrophage. **Exp Mol Med**, v. 47, p. e156, Apr 2015. ISSN 2092-6413. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25838003> >.

LERMAN, Y. V.; KIM, M. Neutrophil migration under normal and sepsis conditions. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v. 15, n. 1, p. 19-28, 2015. ISSN 2212-4063. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25567338> >.

LEVI, M.; VAN DER POLL, T. Inflammation and coagulation. **Crit Care Med**, v. 38, n. 2 Suppl, p. S26-34, Feb 2010. ISSN 1530-0293. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083910> >.

LIN, M. H. et al. A novel exopolysaccharide from the biofilm of *Thermus aquaticus* YT-1 induces the immune response through Toll-like receptor 2. **J Biol Chem**, v. 286, n. 20, p. 17736-45, May 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454596> >.

LUO, W.; SEMENZA, G. L. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, n. 11, p. 560-6, Nov 2012. ISSN 1879-3061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22824010> >.

MADONNA, S. et al. Therapeutical potential of a peptide mimicking the SOCS1 kinase inhibitory region in skin immune responses. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 7, p. 1883-95, Jul 2013. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23592500> >.

MANSELL, A. et al. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. **Nat Immunol**, v. 7, n. 2, p. 148-55, Feb 2006. ISSN 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415872> >.

MANTOVANI, A.; BONECCHI, R.; LOCATI, M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 12, p. 907-18, Dec 2006. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124512> >.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-31, Jul 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785456> >.

MATSUKAWA, A. et al. Aberrant inflammation and lethality to septic peritonitis in mice lacking STAT3 in macrophages and neutrophils. **J Immunol**, v. 171, n. 11, p. 6198-205, Dec 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634136> >.

MEDZHITOV, R. Septic shock: on the importance of being tolerant. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 799-800, Nov 2013. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24238335> >.

METCALF, D. et al. Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 2, p. 943-8, Jan 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782537> >.

MOON, J. S. et al. mTORC1-Induced HK1-Dependent Glycolysis Regulates NLRP3 Inflammasome Activation. **Cell Rep**, v. 12, n. 1, p. 102-15, Jul 2015. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26119735> >.

MORITA, Y. et al. Signals transducers and activators of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor-1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) suppresses tumor necrosis factor alpha-induced cell death in fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 10, p. 5405-10, May 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10792035> >.

MOSTECKI, J.; SHOWALTER, B. M.; ROTHMAN, P. B. Early growth response-1 regulates lipopolysaccharide-induced suppressor of cytokine signaling-1 transcription. **J Biol Chem**, v. 280, n. 4, p. 2596-605, Jan 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545275> >.

MUJTABA, M. G. et al. Treatment of mice with the suppressor of cytokine signaling-1 mimetic peptide, tyrosine kinase inhibitor peptide, prevents development of the acute form of experimental allergic encephalomyelitis and induces stable remission in the chronic relapsing/remitting form. **J Immunol**,

v. 175, n. 8, p. 5077-86, Oct 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210611> >.

NAKA, T. et al. Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 26, p. 15577-82, Dec 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861011> >.

_____. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 924-9, Jun 1997. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202127> >.

NAKAGAWA, R. et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. **Immunity**, v. 17, n. 5, p. 677-87, Nov 2002. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433373> >.

NAKASHIMA, T. et al. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits pulmonary inflammation and fibrosis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 121, n. 5, p. 1269-76, May 2008. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18355908> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20543670> >.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-82, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303877> >.

NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nat Immunol**, v. 15, n. 7, p. 602-11, Jul 2014. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24940954> >.

NESHER, L.; ROLSTON, K. V. The current spectrum of infection in cancer patients with chemotherapy related neutropenia. **Infection**, v. 42, n. 1, p. 5-13, Feb 2014. ISSN 1439-0973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23975584> >.

O'NEILL, L. A.; HARDIE, D. G. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 346-55, Jan 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325217> >.

O'NEILL, L. A.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 9, p. 553-65, Sep 2016. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27396447> >.

O'NEILL, L. A.; PEARCE, E. J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. **J Exp Med**, v. 213, n. 1, p. 15-23, Jan 2016. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26694970> >.

OKADA, S. et al. STAT3 signaling contributes to the high effector activities of interleukin-15-derived dendritic cells. **Immunol Cell Biol**, v. 93, n. 5, p. 461-71, 2015 May-Jun 2015. ISSN 1440-1711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25582338> >.

PARIKH, S. M. Dysregulation of the angiopoietin-Tie-2 axis in sepsis and ARDS. **Virulence**, v. 4, n. 6, p. 517-24, Aug 2013. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652985> >.

PARK, J. H. et al. Annexin A5 increases survival in murine sepsis model by inhibiting HMGB1-mediated pro-inflammation and coagulation. **Mol Med**, v. 22, Jul 2016. ISSN 1528-3658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27447360> >.

PARKER, D.; PRINCE, A. Staphylococcus aureus induces type I IFN signaling in dendritic cells via TLR9. **J Immunol**, v. 189, n. 8, p. 4040-6, Oct

2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22962685> >.

PATHAK, S. et al. MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. **Exp Mol Med**, v. 47, p. e164, 2015. ISSN 2092-6413. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25998827> >.

PERRONE, E. E. et al. Mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia-induced intestinal epithelial apoptosis. **Shock**, v. 38, n. 1, p. 68-75, Jul 2012. ISSN 1540-0514. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22592747> >.

PEÑA, G. et al. JAK2 inhibition prevents innate immune responses and rescues animals from sepsis. **J Mol Med (Berl)**, v. 88, n. 8, p. 851-9, Aug 2010. ISSN 1432-1440. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20393690> >.

PORTA, C. et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 35, p. 14978-83, Sep 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706447> >.

RAMÍREZ-VÉLEZ, G. et al. Constitutive phosphorylation of interferon receptor A-associated signaling proteins in systemic lupus erythematosus. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41414, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22859983> >.

RICCI, Z.; POLITO, A.; RONCO, C. The implications and management of septic acute kidney injury. **Nat Rev Nephrol**, v. 7, n. 4, p. 218-25, Apr 2011. ISSN 1759-507X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364519> >.

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 2007. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17138957> >.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 10, p. 776-87, Oct 2008. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802444> >.

ROBERTSON, C. M. et al. Neutrophil depletion causes a fatal defect in murine pulmonary Staphylococcus aureus clearance. **J Surg Res**, v. 150, n. 2, p. 278-85, Dec 2008. ISSN 1095-8673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18621398> >.

RODRÍGUEZ-PRADOS, J. C. et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. **J Immunol**, v. 185, n. 1, p. 605-14, Jul 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498354> >.

RYO, A. et al. Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. **Mol Cell**, v. 12, n. 6, p. 1413-26, Dec 2003. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14690596> >.

SACHITHANANDAN, N. et al. Macrophage deletion of SOCS1 increases sensitivity to LPS and palmitic acid and results in systemic inflammation and hepatic insulin resistance. **Diabetes**, v. 60, n. 8, p. 2023-31, Aug 2011. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646388> >.

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 165974, 2013. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23853427> >.

SCHUST, J. et al. Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. **Chem Biol**, v. 13, n. 11, p. 1235-42, Nov 2006. ISSN 1074-5521. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114005> >.

SEREZANI, C. H. et al. Leukotriene B4 amplifies NF- κ B activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression. **J Clin Invest**, v. 121, n. 2, p. 671-82, Feb 2011. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21206089> >.

SHARMA-KUINKEL, B. K. et al. Host gene expression profiling and in vivo cytokine studies to characterize the role of linezolid and vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) murine sepsis model. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60463, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23565251> >.

SHI, L. Z. et al. HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. **J Exp Med**, v. 208, n. 7, p. 1367-76, Jul 2011. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708926> >.

SHIRAI, T. et al. The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease. **J Exp Med**, v. 213, n. 3, p. 337-54, Mar 2016. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26926996> >.

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 2016. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26903338> >.

SONG, M. M.; SHUAI, K. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. **J Biol Chem**, v. 273, n. 52, p. 35056-62, Dec 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9857039> >.

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 2011. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20732989> >.

SPEYER, C. L. et al. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. **Am J Pathol**, v. 165, n. 6, p. 2187-96, Dec 2004. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15579460> >.

SPILLER, F. et al. Inhibition of neutrophil migration by hemopexin leads to increased mortality due to sepsis in mice. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 183, n. 7, p. 922-31, Apr 2011. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971829> >.

STARR, R. et al. Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 24, p. 14395-9, Nov 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826711> >.

SWAMYDAS, M. et al. CXCR1-mediated neutrophil degranulation and fungal killing promote Candida clearance and host survival. **Sci Transl Med**, v. 8, n. 322, p. 322ra10, Jan 2016. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26791948> >.

SÔNEGO, F. et al. Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. **Front Immunol**, v. 7, p. 155, 2016. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27199981> >.

TAKAHASHI, R. et al. SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production. **J Exp Med**, v. 208, n. 10, p. 2055-67, Sep 2011. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21893603> >.

TANIGUCHI, L. U. et al. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. **Crit Care**, v. 18, n. 6, p. 608, Nov 2014. ISSN 1466-609X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25370578> >.

TANNAHILL, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238-42, Apr 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23535595> >.

THAKKER, M. et al. Staphylococcus aureus serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. **Infect Immun**, v. 66, n. 11, p. 5183-9, Nov 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9784520> >.

TRENGOVE, M. C.; WARD, A. C. SOCS proteins in development and disease. **Am J Clin Exp Immunol**, v. 2, n. 1, p. 1-29, 2013. ISSN 2164-7712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885323> >.

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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22732279> >.

VATS, D. et al. Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. **Cell Metab**, v. 4, n. 1, p. 13-24, Jul 2006. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814729> >.

VILLENA, J. A.; KRALLI, A. ERR α : a metabolic function for the oldest orphan. **Trends Endocrinol Metab**, v. 19, n. 8, p. 269-76, Oct 2008. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18778951> >.

VINCENT, J. L. et al. Sepsis definitions: time for change. **Lancet**, v. 381, n. 9868, p. 774-5, Mar 2013. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23472921> >.

WAIBOCI, L. W. et al. Both the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) kinase inhibitory region and SOCS-1 mimetic bind to JAK2 autophosphorylation site: implications for the development of a SOCS-1 antagonist. **J Immunol**, v. 178, n. 8, p. 5058-68, Apr 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404288> >.

WANG, H. et al. miR-21-3p controls sepsis-associated cardiac dysfunction via regulating SORBS2. **J Mol Cell Cardiol**, v. 94, p. 43-53, May 2016. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27033308> >.

WHITE, L. E. et al. Acute kidney injury is surprisingly common and a powerful predictor of mortality in surgical sepsis. **J Trauma Acute Care Surg**, v. 75, n. 3, p. 432-8, Sep 2013. ISSN 2163-0763. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24089113> >.

WILSON, J. E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. **J Exp Biol**, v. 206, n. Pt 12, p. 2049-57, Jun 2003. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12756287> >.

YANG, L. et al. PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. **Nat Commun**, v. 5, p. 4436, 2014. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25019241> >.

YOSHIDA, T. et al. SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis. **J Exp Med**, v. 199, n. 12, p. 1701-7, Jun 2004. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15197228> >.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 6, p. 454-65, Jun 2007. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525754> >.

ZHANG, P.; XIE, M.; SPITZER, J. A. Hepatic neutrophil sequestration in early sepsis: enhanced expression of adhesion molecules and phagocytic activity. **Shock**, v. 2, n. 2, p. 133-40, Aug 1994. ISSN 1073-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7728585> >.

ZHANG, Z. et al. Plumbagin Protects Mice from Lethal Sepsis by Modulating Immunometabolism Upstream of PKM2. **Mol Med**, Mar 2016. ISSN 1528-3658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26982513> >.