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

**Efeito da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* durante a sepse polimicrobiana
experimental**

Versão corrigida de acordo com a Resolução CoPGr N° 6018. O Documento original se encontra
disponível na FMRP.

MARIA DO CARMO SOUZA

Ribeirão Preto – SP
2013

MARIA DO CARMO SOUZA

**Efeito da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* durante a sepse polimicrobiana
experimental**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em
Imunologia Básica e Aplicada do Departamento de
Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do grau de Doutora em Ciências, Área
de Concentração Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: **Prof. Dr. João Santana da Silva**

Ribeirão Preto – SP

2013

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

Ficha catalográfica

Souza, Maria do Carmo

Efeito da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* durante a sepse polimicrobiana experimental. Ribeirão Preto, 2013.

154 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada. Orientador: Silva, João Santana.

1. Sepse; 2. *Toxoplasma gondii*; 3. CLP; 4. Imunidade da mucosa; 5. inflamação intestinal; 6. Choque séptico.

Nome: **Maria do Carmo Souza**

Título: **Efeito da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* durante a sepse polimicrobiana experimental**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Doutora em Ciências – Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof (a). Dr (a).: **João Santana da Silva** Instituição: **FMRP - USP**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: **Amélia Maria Ribeiro de Jesus** Instituição: **UFS**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: **Virmondes Rodrigues Junior** Instituição: **UFTM**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: **José Carlos Alves Filho** Instituição: **FMRP - USP**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: **Dario Zamboni** Instituição: **FMRP - USP**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – USP, com apoio financeiro da CAPES, CNPQ, FAPESP e SES-MT.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda a minha família, aos meus pais por terem sido exemplo de vida, honestidade e amor, aos meus irmãos por me ensinarem cada um a seu modo o jeito simples e tranquilo de viver, ao meu marido Celismar, por aguentar esses momentos finais de pura adrenalina. Em especial aos meus filhos João Vitor e Caroline Vitória por serem companheiros e pacientes cada vez que ouviam um AGORA NÃO. Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelos desafios que ela me trouxe.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, por ter me acolhido em seu laboratório, pela paciência, e principalmente por ter me orientado não só com relação ao meu trabalho de tese, mas em relação à vida fora do laboratório. Tenho muito orgulho de ter sido sua orientada.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, por ter sido a minha porta de entrada na USP, pela co-orientação e contribuição.

Agradeço aos professores da banca examinadora pela disponibilidade, correções e sugestões.

Ao grupo de pesquisa com *Toxoplasma gondii*, em especial à Dra. Denise Moraes da Fonseca, Dra. Luciana Benevides pelas constantes discussões dos experimentos e da correção final da tese. Ao Giuliano e os novos integrantes Murilo Solano e Rodrigo Rodrigues, que nesse momento final deram fundamental apoio nos experimentos. Ao grande amigo Kanashiro, por quem tenho um carinho muito especial, e que mesmo não fazendo parte deste laboratório, é parte integrante do grupo “Toxo”.

Aos amigos Tiago Medina, por ter me auxiliado sempre com as correções de texto e por ser assim tão simples e amigo. À Grace Kelly (trenzão, múmia) e Cristiane Milanezi (Xuxa, peste...) por terem convivido comigo direta ou indiretamente durante estágio no exterior, pela amizade e auxílio nos experimentos.

Aos integrantes do laboratório que fazem parte não só do meu trabalho, mas da minha vida: Maria Cláudia, Djalma, Walter, Manuela, Fernanda, Natália, Daniela Carlos, Marcelona, Marcelinha, Renata, Ricardo, Vanessa, Laís, Fred, Gustavo Garcia, Gustavo

Gardinazzi, Hellen, Alessandra. Aos que não estão mais no laboratório, mas que fizeram parte da minha história nele: Fabrine e Fabricio (Fas), Fredy, Moira, Juliana, Diego, Wanessa, Carlo, Sandra, Paulo.

À Ana Cristine, secretária da Pós-Graduação, pela dedicação e competência no trabalho que executa, mas principalmente pela amizade e pelos conselhos sempre tão sensatos.

A todos os funcionários Wander, Denise Ferraz, Vânia Fernandes, Julio, Rubilan, Edinelson, Calabirão, Cristina, Rinaldo, Rubens, Lucia Pacheco, Dona Vera (que cuida do laboratório com tanta disposição e carinho).

Aos integrantes do laboratório de farmacologia: Daniela Nascimento, Fabrício, Silvia, Fernanda, Jhimmy, Adriana, Andressa, Paulinha, Larissa, Raphael, Jaqueline, Andressa Duarte, Andreza, Kátia, Giuliana, Diva, Fabíola, Sérgio, Ieda, pela amizade, convívio e auxílio.

À CAPES, FAPESP, CNPq, FAEPA e SES-MT, pela concessão de recursos necessários para realizar este trabalho.

“It is a far, far better thing that I do, than I have ever done; it is a far, far better rest that I go to, than I have ever known.”

Charles Dickens.

RESUMO

SOUZA, M.C. **Efeito da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* durante a sepse polimicrobiana experimental.** 154p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A maioria dos estudos da interação parasito-hospedeiro tem focado na interação de um único patógeno. Porém, o hospedeiro em um ambiente natural é comumente exposto a múltiplos patógenos sequencialmente ou mesmo simultaneamente. Diversos estudos têm utilizado o modelo de Ligadura e perfuração do Ceco (CLP) para estudar a sepse, mas nenhum deles apresentou modelo de coinfeção ou estudo avaliando o papel de infecções prévias no desfecho da sepse polimicrobiana experimental. Neste contexto, nossa hipótese é de que a infecção crônica por parasitos poderia alterar o curso da resposta durante a sepse polimicrobiana. Para testar essa hipótese, animais C57BL/6 ou BALB/c foram infectados com 5 ou 20 cistos da cepa ME 49 de *Toxoplasma gondii* e 40 dias após a infecção os animais foram induzidos à sepse polimicrobiana. Em nosso estudo, 100% dos animais cronicamente infectados por *T. gondii* morreram num período de 24 horas após CLP. O mesmo não foi observado quando animais foram infectados cronicamente com os parasitos *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi* ou com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Um dado interessante em nosso estudo foi que, nos animais previamente infectados com *T. gondii*, constatamos melhora na eliminação de bactérias liberadas pela CLP e aumento do recrutamento celular para o sítio da infecção. Apesar de esses animais apresentarem melhora na resposta contra as bactérias, verificamos a presença de lesão intestinal e maior infiltrado inflamatório neste órgão, associado a um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e consequente aumento de óxido nítrico (NO), num período de 24 horas depois da CLP. Verificamos que as células TCD4⁺ e TCD8⁺ são responsáveis pela produção de IFN- γ e TNF- α nesse modelo de coinfeção, e em modelo *in vitro*, que macrófagos podem ser responsáveis pela produção de IL-1 β dependente de ativação do inflamassoma NLRP3/ASC/Caspase 1. Neste estudo, observamos que a rápida resposta contra a CLP acontece em função da presença de células de memória de padrão Th1, induzidas na infecção por *T. gondii*. Dessa forma, esse trabalho mostra que a infecção crônica por *T. gondii* agrava a sepse polimicrobiana subletal, por aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-1 β , com a indução de hipotensão, predispondo ao choque séptico.

Palavras chave: 1. Sepse; 2. *Toxoplasma gondii*; 3. CLP; 4. Imunidade da mucosa; 5. inflamação intestinal; 6. Choque séptico.

ABSTRACT

SOUZA, M.C. **Effect of chronic infection by *Toxoplasma gondii* during experimental polymicrobial sepsis.** 154p. PhD Thesis – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2013.

Most studies of parasite-host interaction have focused on the interaction of a single pathogen with cells or organism of the host. However, in a natural environment, the host is commonly exposed to multiple pathogens sequentially or even simultaneously. Several studies have used the model of cecal ligation and puncture (CLP) to study sepsis, but none of them evaluated the effect of the presence of previous infections to the outcome of polymicrobial sepsis. In this context, we hypothesized that chronic infection with *Toxoplasma gondii* could alter the course of host response against polymicrobial sepsis. To test this hypothesis, C57BL/6 or BALB/c mice were orally infected with 5 or 20 cysts of ME-49 strain of *T. gondii* and 40 days post infection, they were subjected to CLP. When mice were chronically infected with *T. gondii*, 100% of the animals died within 24 hours after CLP. The same phenomenons were not observed in animals previously infected with other parasites, such as *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* or the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Interestingly, when we evaluated the response against the CLP in animals that were infected with *T. gondii*, we found an improvement in the killing of bacteria released by CLP and an increase in recruitment of inflammatory cells to the site of infection. However, despite the fact that these animals have improved response against the bacterial infection, they presented intestinal damage and increased inflammatory infiltrate in this organ. The animals also had increased pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-1 β), and nitric oxide (NO) detected within 24 hours after CLP. We also found that the TCD4⁺ and TCD8⁺ cells were responsible to produce IFN- γ and TNF- α , and, using an *in vitro* model, we verified that macrophages are primarily responsible for the production of IL-1 β in a pathway dependent on the activation of NLRP3/ASC/Caspase 1 inflammasoma. In this study, we found that early response against CLP happens due to the presence of mainly Th1 memory cells, induced by *T. gondii* infection. Finally, we found that chronic infection with *T. gondii* aggravates sublethal polymicrobial sepsis by increasing the cytokines IL-6, TNF- α and IL-1 β , with induction of hypotension that predispose to septic shock.

Keywords: 1. Sepsis; 2. *Toxoplasma gondii*; 3. CLP; 4. Mucosal Immunity; 5. Gut Inflammation; 6. Septic shock.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Sepse	21
1.1.1	Epidemiologia e definição	21
1.1.2	Fisiopatologia.....	22
1.2	<i>Toxoplasma gondii</i>	27
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo Geral	34
2.2	Objetivos Específicos	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	Animais.....	36
3.2	Infecção experimental por parasitos e fungo	36
3.3	Modelo experimental de sepse polimicrobiana	37
3.4	Análise de sobrevida.....	38
3.5	Determinação da bacteremia.....	38
3.6	Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal	39
3.7	Dosagem de óxido nítrico (NO)	40
3.8	Citometria de fluxo	40
3.9	Determinação do parasitismo tecidual por PCR em tempo real	41
3.10	Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real.	42
3.11	Geração de macrófagos derivados da medula óssea.....	44
3.12	Dosagem de citocinas por ELISA.	44
3.13	Determinação bioquímica das enzimas	45
3.14	Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	45
3.15	Análise histopatológica.....	46
3.16	Indução das imunizações	47
3.17	Tratamento com anticorpos anti-IFN- γ e anti-TNF- α e aminoguanidina.....	47
3.18	Tratamento de animais BALB/c com anticorpo anti-CD25	48
3.19	Fracionamento de DNA dependente de metilação após infecção por <i>T. gondii</i>	48
3.20	NanoString.....	49

3.21	Pressão arterial.....	50
3.22	Ensaio de transferência de células T reguladoras.....	50
3.23	Análise Estatística.....	51
4	RESULTADOS.....	52
4.1	Suscetibilidade à sepse polimicrobiana após infecção crônica por <i>Toxoplasma gondii</i>	53
4.2	Infecção crônica com <i>T. gondii</i> induz aumento da resposta imune contra sepse subletal polimicrobiana.....	54
4.3	Sepse polimicrobiana não altera a carga parasitária da infecção crônica por <i>T. gondii</i>	57
4.4	Infecção crônica por <i>T. gondii</i> não induz danos teciduais sistêmicos durante a sepse polimicrobiana subletal.....	58
4.5	Infecção crônica por <i>T. gondii</i> induz dano tecidual intestinal e infiltrado celular durante a sepse polimicrobiana subletal.....	60
4.6	Animais previamente infectados com <i>T. gondii</i> tem aumento na resposta inflamatória local e sistêmica durante a sepse polimicrobiana subletal.....	62
4.7	Linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ são as fontes celulares de produção de IFN- γ e de TNF- α na cavidade peritoneal de animais previamente infectados com <i>T. gondii</i> submetidos à CLP.....	64
4.8	Infecção por <i>T. gondii</i> potencializa a produção de óxido nítrico durante a sepse polimicrobiana subletal, que não é diretamente responsável pela mortalidade nesse modelo de estudo.	66
4.9	Tratamento com anticopos anti-IFN- γ ou anti-TNF- α em baixas concentrações melhorou a sobrevivência de animais previamente infectados com <i>T. gondii</i> que foram submetidos à sepse polimicrobiana.....	68
4.10	Infecção crônica por <i>T. gondii</i> induz células de memória de linfócitos TCD4 ⁺ do padrão Th1.....	69
4.11	Animais imunizados com antígeno na presença de adjuvante que polariza para um padrão Th1 de resposta imune (OVA + CFA) são mais suscetíveis à sepse polimicrobiana.	70
4.12	Análise da expressão relativa de genes relacionados à ativação de IFN- γ	71
4.13	Sinalização via TLR-2 e TLR-11 aumenta a suscetibilidade de animais previamente infectados com <i>T. gondii</i> durante a sepse polimicrobiana subletal.....	74
4.14	Macrófagos produzem IL-1 β <i>in vitro</i> dependente da pré-ativação por bactérias Gram positivas.....	75
4.15	Células T reguladoras são importantes no controle da suscetibilidade à sepse polimicrobiana após infecção crônica por <i>T. gondii</i>	77
4.16	Infecção crônica por <i>T. gondii</i> inibe respostas Th2 por meio da metilação de de GATA3.....	79
4.17	Animais previamente infectados com <i>T. gondii</i> desenvolveram hipotensão durante a sepse polimicrobiana subletal.	80

5	DISCUSSÃO	82
5.1	Discussão	83
6	CONCLUSÕES.....	94
6.1	Conclusões.....	95
7	REFERÊNCIAS	96
7.1	Referências	97
8	ANEXOS	109
8.1	Anexo 1 – Lista de primers utilizados para a análise NanoString	110
8.2	Anexo 2 – Manuscrito do artigo original.....	112
9	APÊNDICES	141
9.1	Apêndice A – Artigo publicado (Andrade <i>et al.</i> , 2013)	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Maturação e liberação de IL-1 β .	24
Figura 2.	Infecção prévia por <i>T. gondii</i> induz suscetibilidade à sepse polimicrobiana subletal.	54
Figura 3.	Aumento da eliminação bacteriana e migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após sepse polimicrobiana subletal induzida em animais infectados por <i>T. gondii</i> .	56
Figura 4.	Sepse polimicrobiana não induz reativação da infecção crônica por <i>T. gondii</i> .	57
Figura 5.	Infecção prévia por <i>T. gondii</i> não aumenta o recrutamento de neutrófilos para o pulmão e não induz danos teciduais sistêmicos durante a sepse polimicrobiana subletal.	59
Figura 6.	Infecção crônica por <i>T. gondii</i> induz dano tecidual intestinal e infiltrado celular durante a sepse polimicrobiana subletal.	61
Figura 7.	Infecção prévia por <i>T. gondii</i> modula a produção de citocinas durante a sepse polimicrobiana subletal.	63
Figura 8.	Infecção crônica por <i>T. gondii</i> induz aumento da migração de células produtoras de IFN- γ e TNF- α para a cavidade peritoneal durante a sepse polimicrobiana.	65
Figura 9.	Infecção por <i>T. gondii</i> potencializa a produção de óxido nítrico durante a sepse polimicrobiana subletal, mas não é diretamente responsável pela indução da suscetibilidade nesse modelo de estudo.	67
Figura 10.	Tratamento com anticorpos anti-IFN- γ ou anti-TNF- α em baixas concentrações melhora a sobrevida de animais submetidos à sepse polimicrobiana após infecção por <i>T. gondii</i> .	69
Figura 11.	Infecção crônica por <i>T. gondii</i> induz células de memória do padrão Th1.	70
Figura 12.	Desenvolvimento do padrão de resposta Th1 induz aumento de suscetibilidade à sepse polimicrobiana subletal.	71
Figura 13.	Os genes induzidos durante a infecção <i>T. gondii</i> permanecem ativados na fase crônica da infecção.	73
Figura 14.	Animais deficientes de TLR-2 e TLR-11 previamente infectados por <i>T. gondii</i> tem melhora da sobrevida quando submetidos à CLP.	75
Figura 15.	Produção de IL-1 β por macrófagos depende do primeiro sinal por bactérias Gram positivas.	77

Figura 16. Animais BALB/c que foram cronicamente infectados por <i>T. gondii</i> são resistentes à sepse polimicrobiana, exceto por aqueles animais na qual foram depletadas as células T reguladoras.....	78
Figura 17. A transferência de células T reguladoras para animais suscetíveis C57BL/6, melhorou a sobrevivência de animais previamente infectados com <i>T. gondii</i> com posterior indução de sepse polimicrobiana.	79
Figura 18. Infecção por <i>T. gondii</i> induz aumento de metilação na região promotora de GATA 3	80
Figura 19. Infecção prévia por <i>T. gondii</i> induz queda da pressão arterial durante a sepse polimicrobiana.....	81

LISTA DE ABREVIACÕES

μl	Microlitro
AIDS/SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	“Antigen-presenting cells”
AST	Aspartato Aminotransferase
CD	“Cluster Differentiation”
cDNA	“Complementary” DNA
CLP	Ligadura e perfuração do ceco
COX-2	Ciclooxigenase 2
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”
DPI	Dias pós-infecção
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
FITC	Isocianato de fluoresceína
Foxp3	Fator de transcrição “forkhead Box P3”
GAPDH	“Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase”
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócio e monócito
H&E	Hematoxilina e Eosina
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal

kg	Quilograma
Log	Logaritmo da função matemática
LPS	Lipopolissacarídeo
Ly6G	“Lymphocyte antigen 6G”
ME-49	Cepa de baixa virulência de <i>T. gondii</i> , classificada no tipo II
Mg	Miligrama
MHC	“Major Histocompatibility Complex”
mmHg	Milímetro de mercúrio
NK	Célula Natural “killer”
NO	Óxido nítrico
PBS	“Phosphate buffered saline”
PE	Ficoeritrina
Percp	Clorofilia-peridina
Pg	Picograma
PMA	Phorbol 12-myristate 12-acetate
qPCR	“Real-time quantitative polymerase chain reaction”
RPMI	Meio de cultura celular 1640
SBF	Soro bovino fetal
s.c.	Subcutâneo
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TGF- β	Fator de crescimento e transformação β
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Th	Linfócitos T “helper” (auxiliar)
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
Tregs	Células T reguladoras

UFC	Unidades formadoras de colônias
UTI	Unidade de terapia intensiva
WT	Animais selvagens (wide-type)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sepses

1.1.1 Epidemiologia e definição

A sepsis é a maior causa de morbidade e mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) em diversos países (SCHIMID *et al.*, 2004). Nos Estados Unidos, esta doença afeta aproximadamente 750.000 pacientes/ano com taxa de mortalidade entre 30 e 70%. Além disso, nesse país, o custo do tratamento dessa doença foi calculado em aproximadamente 18 bilhões de dólares/ano (RIEDEMANN *et al.* 2003). No Brasil, Silva *et al.* (2004) observaram que a incidência de sepsis, sepsis grave e choque séptico é de 46,9%, 27,3% e 23%, respectivamente, para pacientes em UTI, sendo que a taxa de mortalidade geral fica em torno de 33,9%, 46,9% e 52,2% respectivamente. No entanto, os mecanismos que levam a essa alta taxa de mortalidade durante a sepsis letal ainda não são bem compreendidos.

No que diz respeito aos aspectos fisiopatológicos da doença, a sepsis é definida como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) causada por um processo infeccioso frequentemente de origem bacteriana, embora também possa ser causada por fungos, parasitos e vírus (BONE *et al.*, 1997). Essa resposta inflamatória sistêmica pode levar à sepsis grave, acompanhada pela disfunção de algum órgão, podendo ainda evoluir para choque séptico, definido como sepsis grave acompanhada de hipotensão persistente e refratária a vasoconstritores (BONE *et al.*, 1992; AZIZ *et al.*, 2013).

A infecção em qualquer sítio anatômico pode resultar em sepsis ou choque séptico, sendo que os fatores de risco mais comuns para o desencadeamento de sepsis são:

comorbidades (hipertensão, câncer, aterosclerose, diabetes, imunossupressão pré-existente); medicina invasiva (catéteres, monitorização e diagnóstico) e incidência aumentada de infecção por germes multirresistentes (DAVID, 2007; DEJAGER *et al.*, 2011).

1.1.2 Fisiopatologia

A sepse inicia-se pela disseminação direta de patógenos para a corrente sanguínea, por translocação, a partir do sítio de infecção, e, uma vez disseminada na corrente sanguínea, a resposta do hospedeiro contra patógenos é mediada através do sistema imune inato e adaptativo (LEVER & MACKENZIE, 2007). Com relação ao sistema imune inato, diversos modelos experimentais têm mostrado que os componentes bacterianos são os principais estímulos iniciais observados na inflamação sistêmica durante o desenvolvimento da sepse. O reconhecimento de microorganismos ocorre através de estruturas conservadas, constitutivamente expressas em sua superfície, denominadas de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs do inglês: *pathogen-associated molecular patterns*). Os PAMPs podem ser reconhecidos por receptores encontrados em células do sistema imune como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, sendo denominados de receptores de reconhecimento padrão (PRRs do inglês: *pattern recognition receptors*). Entre esses PRRs, os receptores do tipo Toll (TLRs do inglês: *Toll like receptors*) são receptores transmembrana, presentes tanto na superfície celular quanto em compartimentos endossomais que reconhecem ácidos nucleicos virais e vários produtos bacterianos, incluindo lipopolissacarídeo, ácidos lipoteicóicos e peptidoglicano (TAKEDA *et al.*, 2003; KAWAI & AKIRA, 2010). Desse modo, determinados componentes bacterianos ou PAMPs atuam via PRRs, mais especificamente TLRs 2, 4 e 9, induzindo as

células do sistema imune a produzir e secretar citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e G-CSF, e quimiocinas, como MIP2- α e KC (EBONG *et al.* 1999).

Em adição aos receptores transmembrana, existem os receptores intracelulares (citossólicos) não ancorados a membranas, que também atuam no reconhecimento de patógenos virais ou bacterianos. O reconhecimento citossólico tem surgido com linha de frente pra defesa do hospedeiro, tendo como componente chave da vigilância citossólica o inflamassoma, um complexo multiprotéico que controla a maturação das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-18 (FRANCHI *et al.*, 2012; RATHINAM & FITGERALD, 2011). Distintos inflamassomas têm sido diferenciados por seus constituintes protéicos, ativadores e efetores. Na maioria dos casos, o inflamassoma contém um domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo (NOD, do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain*), seguido por um domínio repetido rico em leucina, sendo o melhor estudado o NLRP3 (do inglês: *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) (FRANCHI *et al.*, 2012; RATHINAM *et al.*, 2012). Em resposta a diversos sinais microbianos, ambientais ou endógenos, o complexo NLRP3 monta o inflamassoma, levando à multidimerização da molécula adaptadora ASC (do inglês: *apoptosis-associated speck-like protein*). Subsequentemente, pró-caspase-1 é recrutada levando à autoativação de caspase-1, que cliva então a IL-1 β e IL-18 em citocinas biologicamente ativas (Figura 1). Estas citocinas têm amplos efeitos pró-inflamatórios importantes no controle inicial de infecção microbiana, desencadeando a produção das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, importantes para controlar a infecção. No entanto, apesar da identificação de numerosos efeitos, a ligação direta de quaisquer ligantes a NLRP3 não tem sido claramente demonstrado (STROWIG *et al.*, 2012). Porém, no caso das infecções bacterianas, toxinas formadoras de poros e de RNA-m bacteriano parecem representar as causas mais

importantes da ativação deste complexo (KANNEGANTI *et al*, 2006.; SANDER *et al.*, 2011).

Figura 1. Maturação e liberação de IL-1β.

Para ocorrer a maturação e liberação de IL-1β são requeridos dois sinais distintos: O primeiro sinal leva à síntese de pró-IL-1β e de outro componente do inflamassoma, como o NLRP3; o segundo sinal resulta na formação do complexo NLRP3/ASC/pró-caspase (inflamassoma), com ativação de caspase-1, que cliva pró-IL1β e pró-IL-8 em IL-1β e IL-18. (MARRACK *et al.*, 2009)

Essas duas classes de receptores são de extrema importância para o controle da infecção, pois além de reconhecerem componentes bacterianos, ativam a resposta imune, desencadeando uma resposta inflamatória responsável pela morte das bactérias. Porém, ao tempo em que controla a infecção, podem levar a danos teciduais e disfunção de órgãos como observado em modelos experimentais ou em pacientes com quadro de sepse

(DINARELLO, 1997; van der POLL T *et al.*, 2011). Esses danos teciduais estão associados com a elevada concentração de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas e de óxido nítrico, que reduzem a expressão de CXCR2 em neutrófilos, além de reduzir os níveis de moléculas de adesão em ambos, células endoteliais e neutrófilos, contribuindo para a diminuição da migração de neutrófilos para o sítio de infecção na sepse grave, levando ao acúmulo dessas células em órgãos distantes, como o pulmão (ALVES-FILHO *et al.*, 2006). Apesar disso, na sepse subletal, os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao foco da infecção e desempenham importante papel na defesa contra infecções bacterianas, devido ao grande estoque de enzimas proteolíticas e a rápida produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio capazes de eliminar bactérias patogênicas (MEDZHITOV, 2000).

Na sepse, células “T helper” (Th) sob interação com células apresentadoras de antígenos (APCs), que atuam na imunidade inata, proliferam e se diferenciam em Th1 e produzem grandes quantidades de citocinas TNF- α , IL-2, IFN- γ , e leucotrienos. Há também a participação de células do padrão Th17, com liberação de IL-17A, que medeia a resposta pró-inflamatória aumentando ainda mais a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Por outro lado, na sepse ocorre também a produção de IL-4, que induz a diferenciação das “T helper” para o padrão Th2 de resposta imune, com produção de citocinas imunomoduladoras como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (RITTIRSCH, *et al.*, 2008; PERL *et al.*, 2006). Durante a sepse, as citocinas do padrão Th1 e Th17 são produzidas e liberadas no início da infecção, seguida pela excessiva produção de citocinas do padrão Th2 (RITTIRSCH, *et al.*, 2008).

O aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias na circulação sanguínea durante a sepse é acompanhado por uma resposta compensatória com elevada concentração de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e TGF- β . Posteriormente em animais ou

pacientes sobreviventes à sepse, é observado aumento de células T reguladoras, as quais estão associadas a um estado de imunossupressão ou hiporresponsividade (NASCIMENTO *et al.*, 2010; OSUCHOWSKI *et al.*, 2006), o que pode deixar o hospedeiro mais vulnerável a infecções secundárias (RIEDEMANN *et al.*, 2003; WANG & DENG, 2008; CUTHBERTSON *et al.*, 2010).

Nesse sentido, Benjamim e colaboradores (2003) mostraram que animais que sobrevivem à sepse grave são altamente suscetíveis a uma infecção pulmonar secundária, induzida por *Aspergillus fumigatus*. Essa infecção foi associada com 100% de mortalidade no terceiro dia após a cirurgia. Em outro trabalho, Nascimento e colaboradores (2010) demonstraram que infecção secundária, por uma dose não letal de *Legionella pneumophila* era responsável pela morte de 100% de animais sobreviventes da sepse grave, o que foi correlacionado com aumento na frequência de células T reguladoras capazes de persistir ao longo do tempo. Nesse trabalho foi demonstrado que o aumento de células T reguladoras estava associado com a diminuição da proliferação de células T CD4⁺, promovendo assim, a indução da imunossupressão nesta patologia.

Baseado na informação de que a sepse grave leva animais sobreviventes a um estado de imunossupressão capaz de deixar os animais mais suscetíveis a infecções secundárias, surge o seguinte questionamento: infecções prévias poderiam modular a resposta imune após o seu desenvolvimento e assim alterar o quadro infeccioso da sepse, uma vez que estamos constantemente sendo expostos ou parasitados por diferentes agentes infecciosos?

A partir dessas informações, apresentadas acima, a nossa hipótese é que a uma infecção prévia poderia exacerbar ou deprimir a resposta imune contra infecções posteriores e, portanto, alterar o curso de uma resposta inflamatória responsável pela eliminação de microorganismos invasores, podendo dessa forma agravar o processo

infeccioso induzido no quadro de sepse. A resposta desta pergunta poderia explicar, pelo menos em parte, o porquê de alguns pacientes desenvolverem formas graves da doença, enquanto outros não.

1.2 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa, subclasse coccidia. A doença causada por *T. gondii* é chamada toxoplasmose, sendo esta capaz de causar infecções fatais em neonatos e indivíduos imunocomprometidos (GUPTA *et al.*, 2012). No entanto, quando adquirida após o nascimento, a infecção por *T. gondii* em humanos é normalmente assintomática (DUBEY & JONES, 2008).

Com relação à incidência, estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infectada por *T. gondii* (MONTROYA & LISENFELD, 2004). Nos Estados Unidos, cerca de 9% dos indivíduos entre 12 e 49 anos são soropositivos para anticorpos contra este agente patogênico (JONES *et al.*, 2007). Na França, a estimativa de soroprevalência entre toda a população é alta, atingindo de 60 a 70% (KASPER *et al.*, 2004) e essa prevalência também é elevada nos países da América Latina, incluindo o Brasil, variando de 51 a 72% (TENDER *et al.*, 2000).

O parasito *T. gondii* apresenta três estágios infecciosos: o taquizoíta (do grego *tachys* = rápido) que se apresenta em grupos ou clones, com rápida proliferação na célula hospedeira, ocorrendo principalmente na fase aguda da infecção; o bradizoíta (do grego *brady* = lento) apresenta-se em forma de cistos teciduais, e que em decorrência da resposta imune encontra-se dentro de cistos sob replicação lenta, ocorrendo principalmente na fase crônica da infecção; e por fim o esporozoíta (contidos dentro de oocistos liberados nas

fezes de felídeos), sendo esta última correspondente a forma infectante oriunda do processo reprodutivo do parasito (DUBEY *et al.*, 1998). O *T. gondii* é um protozoário zoonótico amplamente distribuído que infecta a maioria se não todas as espécies de pássaros e mamíferos, da família dos felídeos, como gatos domésticos. No entanto, estes últimos são os únicos hospedeiros definitivos em que o *T. gondii* é capaz de completar todo o seu ciclo de vida, sendo os principais reservatórios da infecção (DUBEY *et al.*, 1998; ELMORE *et al.*, 2010).

Com relação à transmissão, o *T. gondii* pode ser transmitido principalmente por via oral, sendo esta a via natural de infecção deste parasito. Esta se dá por meio da ingestão de carne crua ou mal cozida (principalmente de suínos e carneiros) contendo cistos ou através da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos liberados nas fezes de felídeos. Outra via de infecção é a congênita, que pode ocorrer quando a mulher é infectada durante a gestação ou por reativação de infecção latente. A transmissão também pode ocorrer através de transplantes de órgão de doadores soropositivos, mas raramente ocorre por transfusão sanguínea ou acidente laboratorial (MONTROYA & LIESENFELD, 2004; ALIBERTI, 2005).

Clinicamente, a infecção por *T. gondii* pode apresentar sinais e sintomas, que dependendo do estado imunológico do hospedeiro, podem não se manifestar. A infecção primária em indivíduos imunocompetentes, é normalmente assintomática, porém quando presentes os sintomas podem surgir como linfadenite e febre, acompanhada por astenia e mialgia. Em casos mais raros, indivíduos infectados podem apresentar miocardite, pneumonia, hepatite ou ainda encefalite (MONTROYA & LIESENFELD, 2004). No entanto quando se trata de toxoplasmose congênita, as manifestações clínicas podem ser mais graves, levando a quadros de hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracranianas, coriorretinite, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardamento mental e psicomotor e anemia

(MONTROYA & LIESENFELD, 2004). Em indivíduos imunocoprometidos (como o que ocorre em pacientes com AIDS), a supressão do sistema imunológico pode levar à reativação de uma infecção latente, resultando na ruptura do cisto e levando à necrose tecidual, e quando isso ocorre no sistema nervoso central, é frequentemente fatal (ALIBERTI, 2005).

Numerosos modelos animais, incluindo primatas, coelhos, cobaias, hamsters, ratos e camundongos tem sido usados nos últimos anos para estudar a imunopatogênese da doença, testar a eficiência de vacinas e novas drogas para o tratamento da transmissão congênita, coriorretinite e encefalite. Desses, os camundongos são os mais suscetíveis a *T. gondii*, representando assim um modelo particularmente importante por apresentar grande semelhança com a infecção que ocorre em humanos, além de oferecer a possibilidade de utilizar animais deficientes de genes específicos, contribuindo para o conhecimento da resposta imune associada com a infecção por *T. gondii* (DENKERS, 1999; FUX *et al*, 2000).

Estudos em modelos animais têm mostrado que quando *T. gondii* infecta o hospedeiro pela via natural de infecção (ingestão de oocistos ou cistos teciduais), o taquizoíta invade ativamente as células epiteliais intestinais do hospedeiro, com multiplicação do parasito na lâmina própria (LP), levando ao desenvolvimento de desordens inflamatórias intestinais em algumas linhagens de camundongos (NICHOLS & O'CONNOR, 1981; OLDENHOVE *et al.*, 2009). Camundongos C57BL/6 infectados por via oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, apresentam letalidade de 100% dos animais na fase aguda da infecção, enquanto camundongos BALB/c sobrevivem ao mesmo inóculo (LIESENFELD *et al.*, 1996).

Com relação à resposta imune contra este patógeno, em modelos animais da infecção subletal com *T. gondii*, o hospedeiro mantém um equilíbrio entre a indução de

uma resposta imune eficaz, mas que não elimina totalmente o parasito, levando à infecção crônica (LAMBERT & BARRAGAN, 2010; ALIBERTI *et al.*, 2003). Depois de 9 dias da infecção, a resposta imune elimina o parasito de todos os tecidos exceto no sistema nervoso central e musculo esquelético, onde *T. gondii* são encistados e permanecem em estado inativo (MUNOZ *et al.*, 2011). Durante a fase aguda da infecção é observada uma robusta resposta inflamatória, polarizada para o padrão Th1, com eficiente ativação de células apresentadoras de antígenos (REIS E SOUSA *et al.*, 1997; MASHAYEKHI *et al.*, 2011). A imunidade contra *T. gondii* é mediada por uma resposta imunológica específica, dependente principalmente da produção da interleucina 12 (IL-12) e da citocina IFN- γ (YAP & SHER, 1999).

No início da infecção, *T. gondii* estimula macrófagos, células dendríticas e neutrófilos a liberarem IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF- α). A IL-12 liberada, por sua vez induz células “Natural killers” (NK) e células T a produzirem IFN- γ e TNF- α , e promove a diferenciação de células TCD4⁺ para o padrão Th1 de resposta imune, que produzem as mesmas citocinas sob reestimulação com antígeno (YAP & SHER, 1999). Desse modo, a indução de IL-12 na fase inicial da infecção é importante por induzir a resistência inata ao patógeno, enquanto assegura a indução do padrão correto de resposta imunológica adaptativa (REIS E SOUSA *et al.*, 1997). A produção sinérgica de IFN- γ e TNF- α , induzida pela presença de IL-12, aumenta a capacidade microbicida dos macrófagos (GAZZINELLI *et al.*, 1994), em parte por aumentar a produção de óxido nítrico (NO) (BLANCHETTE *et al.*, 2003), sendo este último responsável pelo controle da replicação do parasito (ADAMS *et al.*, 1990; LANGERMANS *et al.*, 1992).

Embora os mecanismos induzidos por IFN- γ sejam potentes em combater o parasito, eles não são completamente efetivos em sua eliminação (YAP & SHER, 1999).

Sendo assim, alguns parasitos escapam do controle imunológico e sobrevivem no hospedeiro por longos períodos, continuando dessa forma a se proliferar, porém de maneira controlada (ALIBERTI, 2005). Estudos têm demonstrado que tanto células TCD4⁺, quanto células TCD8⁺ agem sinergicamente para prevenir a reativação do parasito durante o estágio crônico da infecção (GAZZINELLI *et al.*, 1991). No entanto, outros estudos indicam que as células TCD8⁺ seriam as principais células efetoras da imunidade protetora, e as células TCD4⁺ exerceriam importante papel auxiliar na ativação das células TCD8⁺ (GAZZINELLI *et al.*, 1991).

A produção inata de IL-12 durante a toxoplasmose requer que o parasito primeiro seja reconhecido pelo hospedeiro. Aqui, os receptores da imunidade inata, os TLRs tem um papel importante neste processo. Assim, camundongos deficientes da molécula adaptadora MyD88, requerida para a sinalização “downstream” da maioria dos TLRs são mais suscetíveis à toxoplasmose (SCANGA *et al.*, 2002), mostrando que os TLRs são fundamentais no processo de reconhecimento, ativação e indução da resposta do sistema imunológico. Existem TLRs específicos implicados na resposta imune contra *T. gondii*, incluindo os TLRs 2, 4, 9, 11 e 12. Sendo TLRs 11 e 12 envolvidos no reconhecimento e resposta a profilina-“like” (YAROVINSKY *et al.*, 2005; JENKINS *et al.*, 2010), enquanto TLRs 2 e 4 reconhecem glicosilfosfatidilinositol presente na superfície do parasito (Debierre-Grockiego *et al.*, 2007).

Adicionalmente, em decorrência da infecção oral com *T. gondii*, componentes bacterianos translocam do intestino levando à ativação de TLRs 2, 4 e 9 que respondem a esses estímulos microbianos, contribuindo para o desenvolvimento da resposta imune Th1 (HEIMESAAT *et al.*, 2006; BENSON *et al.*, 2009; HAND *et al.*, 2012). Hand e colaboradores (2012) demonstraram também que quando a infecção ocorre pela via oral, é

induzida a diferenciação de células de memória não só contra o parasito *T. gondii*, mas também contra bactérias da microbiota.

Com relação à infecção crônica por *T. gondii*, já foi descrito que a resposta imune do padrão Th2 induzido por *Nippostrongylus brasiliensis* não influencia a resposta e imunopatologia desenvolvida pelo padrão Th1 durante infecção por *T. gondii*, porém a infecção crônica por *T. gondii* reduz o estabelecimento e o desenvolvimento da resposta Th2 induzida por *N. brasiliensis* (LIESENFELD *et al.*, 2004). Mais recentemente, foi publicado que a infecção aguda ou crônica por *T. gondii* é capaz de bloquear o desenvolvimento de inflamação das vias aéreas em modelo experimental de alergia (FENOY *et al.*, 2012).

Considerando que o *T. gondii* é um forte indutor de resposta inflamatória do tipo Th1, é possível que esta infecção agrave a resposta inflamatória contra bactérias que invadem a mucosa do intestino, predispondo pacientes co-infectados a desenvolver quadros de sepse ou SIRS mais graves. Diante do exposto, torna-se de extrema importância avaliar o papel da infecção crônica por *T. gondii* sobre a resposta elaborada durante a sepse polimicrobiana experimental, principalmente por levar em consideração que as duas doenças são comuns na população mundial e pela carência de conhecimento sobre a interação de infecções parasitárias com o desenvolvimento e gravidade da sepse.

2.1 Objetivo Geral

Determinar se a infecção prévia por parasitos ou fungo interfere no curso da sepse polimicrobiana, assim como os mecanismos envolvidos nesse fenômeno.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Determinar o percentual de sobrevivência da sepse polimicrobiana após infecção crônica por parasitos e fungo.
- b. Caracterizar o padrão inflamatório da infecção por *T. gondii* após indução da sepse subletal;
- c. Caracterizar o perfil celular presente na cavidade peritoneal nos animais previamente infectado por *T. gondii* com posterior indução de sepse polimicrobiana;
- d. Determinar a participação de componentes imunológicos inatos na suscetibilidade à sepse em animais infectados por *T. gondii*;
- e. Determinar a participação de células de memória na resposta contra sepse polimicrobiana subletal após infecção crônica por *T. gondii*;
- f. Determinar se a infecção por *T. gondii* altera a expressão dos TLRs e se induz a suscetibilidade à sepse;
- g. Determinar a ocorrência de mudanças epigenéticas (metilação) induzida durante a infecção por *T. gondii* e verificar se o fenômeno está relacionado com a suscetibilidade à sepse.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos fêmeas das linhagens BALB/c (wild type, WT) e C57BL/6 (wild type, WT) ou deficientes para TLR-2, 4, 9 e 11. Os animais WT foram fornecidos pelo biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) ou Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) pesando de 18 a 22g. Os camundongos deficientes foram criados e fornecidos pelo Centro de Criação de Camundongos Especiais da FMRP-USP (Ribeirão Preto, SP, Brasil) ou pelo centro de criação da Universidade de Massachusetts (Worcester, Massachusetts, EUA). Todos os animais foram mantidos em gaiolas acopladas a um respirador, em um ambiente com ciclo de luz (claro/escuro), temperatura controlada (23 a 25 °C), com livre acesso à água e ração.

Os protocolos experimentais realizados neste trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (CETEA), e pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais (IACUC) da Faculdade de Medicina da Universidade de Massachusetts, Worcester, MA, USA. Os experimentos conduzidos de acordo com as normas estabelecidas por este órgão (Declaração nº 107/2009).

3.2 Infecção experimental por parasitos e fungo

Para as infecções experimentais foram utilizadas as cepas de *P. brasiliensis*, *T. cruzi*, *L. major* e *T. gondii*.

Para a infecção com *Leishmania major* formas promastigotas do parasito na fase estacionária (2×10^6 formas) foram inoculadas intradermicamente na orelha direita dos animais, e após 40 dias foi induzida a sepse polimicrobiana grave.

Para a infecção com fungo, 1×10^6 leveduras viáveis de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) foram inoculadas nos animais por via intravenosa e após 90 dias da infecção foi induzida a sepse polimicrobiana grave.

Para a infecção por *Trypanosoma cruzi*, animais foram infectados com 100 formas trypomastigotas da cepa Y do parasito por via intraperitoneal (i.p.) e após 40 dias induzida a sepse polimicrobiana.

Para a infecção com *Toxoplasma gondii*, animais foram infectados por via oral com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, e após 40 dias da infecção foi realizada indução da sepse polimicrobiana.

3.3 Modelo experimental de sepse polimicrobiana

Para mimetizar o quadro de sepse polimicrobiana, utilizamos o método de ligação e perfuração do ceco (CLP) originalmente descrito há mais de 30 anos pelo grupo do IH Chaudry (BAKER *et al.*, 1983; WICHTERMAN *et al.*, 1980) e recentemente revisado (BURAS *et al.*, 2005; REMICK *et al.*, 2000; RITTIRSCH *et al.*, 2009). Resumidamente, os camundongos foram anestesiados com injeção (i.p.) de Ketamina (62,5 mg/kg) e Xilazina (12,5 mg/kg), e uma incisão mediana de aproximadamente 1 cm foi efetuada no abdômen anterior. O ceco foi exposto e ligado com um fio de algodão abaixo da válvula íleo-cecal e foram realizadas duas perfurações com agulha estéril 22 G (sepse sub-letal) ou 18G (sepse letal ou grave) em seguida, o ceco foi recolocado ao abdômen, fechando-se a cavidade. Em seguida, o ceco foi pressionado gentilmente para certificar a saída de fezes

pela perfuração e colocado de volta no abdômen, sendo a incisão suturada. No grupo controle (Sham) os animais foram somente operados sem a submissão à CLP. Todos os animais receberam 1 ml de salina (0,9%) via subcutânea (*s.c.*), imediatamente após a cirurgia para evitar desidratação e colocados em presença de luz. Em média de 40 minutos após a cirurgia, os animais já estavam recuperados do efeito anestésico. Alguns animais foram observados quanto à sobrevida até o décimo dia, e outros foram eutanasiados em tempos determinados para a avaliação da resposta imune. Para evitar a morte de todos os animais que foram submetidos à sepse polimicrobiana grave, o antibiótico Ertapenem sódico 20 mg/Kg (Laboratories Merck Sharp & Dohme, Ciermont, Ferrand Cedex, França) foi administrado via intraperitoneal (*i.p.*) 6 h após a indução da sepse. Posteriormente, esse tratamento foi efetuado a cada 12 h, durante 3 dias, conforme demonstrado previamente (BENJAMIM *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2010).

3.4 Análise de sobrevida

Os animais foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e alimentação, e monitorados a cada 12 horas por um período de 10 dias após indução da sepse polimicrobiana. Após esse período, os camundongos foram sacrificados de acordo com as normas de uso de animais de experimentação em laboratórios. Os resultados foram expressos em % de sobrevida.

3.5 Determinação da bacteremia

A quantificação da carga bacteriana no sangue e no lavado peritoneal foi realizada nos períodos de 6, 12 e 24 horas após a indução da sepse polimicrobiana. Para essas

análises, os animais foram anestesiados, e o sangue coletado por punção cardíaca. Após coleta sanguínea, os animais foram eutanasiados e o lavado peritoneal foi coletado por punção após injeção de 1,5mL de PBS/EDTA na cavidade peritoneal. Todos esses procedimentos foram realizados sob condições estéreis.

Após a coleta, amostras de 10 μ L do sangue ou do lavado peritoneal foram semeados sem diluições em placas de Petri contendo meio de cultivo Ágar Mueller Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) e incubadas a 37°C. Após período de 24 horas de incubação das placas, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado. Os resultados foram expressos em Log₂ de UFC/mL de sangue ou de lavado peritoneal.

3.6 Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal

A migração de neutrófilos foi avaliada 6, 12 e 24 horas após a indução da CLP. Os animais foram sacrificados por Xilasina/Ketamina endovenosa e as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas pela lavagem da cavidade peritoneal, utilizando para isso 1,5 ml de tampão fosfato salina (PBS) contendo EDTA (1mM). A contagem total foi realizada através de um contador de células (COULTER[®] ACT series analyser; Coulter Corporation, Miami, Florida, EUA). A contagem diferencial foi realizada através de esfregaços corados pelo método de May-Grünwald Giemsa (Rosenfeld) ou por citometria de fluxo (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). Os resultados foram expressos como número de neutrófilos por cavidade peritoneal.

3.7 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A dosagem de nitrito foi realizada utilizando-se a reação de Griess, como previamente descrito (GREEN *et al.*, 1981). Resumidamente, 50µL de cada amostra de cultura de macrófagos foi adicionado a 50µL de reagente de Griess. Em seguida a absorbância foi determinada em leitor de microplacas (EMAX Molecular Devices Corporation®) a 540nm. Os resultados expressos em µM, foram determinados por comparação com uma curva-padrão feita com nitrito de sódio (NaNO₂) em concentrações de 200 a 0,78µM.

3.8 Citometria de fluxo

Para caracterização fenotípica das células do baço ou exudato peritoneal, foi avaliada a expressão dos seguintes marcadores de superfície: CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, F4/80 e GR1. Para as citocinas intracelulares foram usados os marcadores: IFN-γ, IL-6, IL-10 e TNF. Brevemente, o baço foi processado, as hemácias lisadas com 3mL de tampão de lise (ACK) por 5 minutos a 4°C. As células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e ressuspensas em 1 mL de PBS 1x. As células foram contadas e 1x10⁶ células foram centrifugadas a 1500 RPM por 10 minutos. Foi adicionado 5µl/tubo de soro de coelho a 10%, e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida foi adicionado (10µl/tubo) do mix de anticorpos monoclonais específicos para os marcadores determinados acima, conjugados com FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7 ou Alexa Fluor 647 (BD Biosciences e eBioscience, San Diego, CA, EUA) após homogeneizadas, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. Após incubação com anticorpos, foram adicionados 2mL de PBS 1x,

homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 1500 RPM. O pellet foi ressuspendido em 100µl de PBS/formol 2%. Nas marcações de citocinas intracelulares, células foram estimuladas com PMA/Ionomicina por 12 horas, adicionado Golgiplug® (BD Biosciences) por 4 horas antes do término da estimulação. Após estimulação foi realizada marcação de superfície celular, e as células submetidas aos procedimentos de permeabilização e marcações indicadas pelo fabricante do kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Tubo contendo células não marcadas foi usado como controle. Posteriormente as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). As análises foram feitas usando os softwares “FACSdiva” (BD Biosciences) e “FlowJo” (TreeStar, Ashland, Oregon, EUA).

3.9 Determinação do parasitismo tecidual por PCR em tempo real

Para quantificação da carga parasitária de *T. gondii* no cérebro dos animais infectados, fragmentos do cérebro foram coletados e as amostras armazenados em tubo seco a uma temperatura de -70°C. A extração de DNA total tecidual foi realizada com o Kit Illustra™ Tissue & Cells GenomicPrep (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha), onde 25-30 mg do tecido foi pesado e fragmentado com o auxílio de um bisturi. Logo após, o tecido foi submetido à lise com tampões específicos do Kit e digeridos com proteinase K. Neste processo de extração foi também utilizado RNase A para minimizar contaminação de RNA no material. O DNA purificado foi então eluído da coluna de sílica em 100µL de tampão de eluição fornecido no Kit. Após a extração, o DNA foi quantificado em um espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000, Wilmington, EUA) e 100ng foram utilizados para estimativa da carga parasitária. A quantificação foi realizada por meio da reação da polimerase em cadeia em tempo real (PCR tempo real) utilizando-se o

reagente SYBR Green (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), no aparelho StepOnePlus® Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com os seguintes parâmetros de ciclagem: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C, além de um passo de dissociação, com temperatura variando de 60 a 95°C. A sequência dos primers utilizados para amplificação para o alvo gene B1 de *Toxoplasma gondii* foi senso: 5'- TTC AAG CAG CGT ATT GTC GA – 3' e anti-senso: 5' - CAT GAA CGG ATG CAG TTC CT – 3' (MWG Oligo Synthesis Report). Os resultados foram obtidos com auxílio de uma curva padrão feita com concentrações graduais conhecidas de DNA purificado do parasito.

3.10 Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real.

A extração do RNA foi realizada utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e kit para extração de RNA (GE Healthcare, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as amostras foram trituradas em reagente Trizol (1 ml/mg de tecido), sendo posteriormente agitadas por 30 segundos na presença 200 µl de clorofórmio (Sigma) para cada 1 ml da suspensão. Após, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo após acréscimo de etanol 70% em proporções iguais à amostra (v:v), foi agitada delicadamente e transferida para uma coluna de afinidade para RNA. Após algumas lavagens, as amostras de RNA foram eluídas da coluna com 60 µl de água deionizada e livre de RNase, sendo armazenadas a -70°C até a confecção do DNA complementar (cDNA). Uma alíquota de 3 µL foi utilizada para determinação da concentração e qualidade de RNA total, através de leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000, Wilmington, EUA). O cDNA foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de

transcriptase reversa (Promega, Madison, EUA) e 1 µg de RNA, de acordo com as especificações do fabricante. A expressão quantitativa de genes de citocinas e TLRs foram analisadas através de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o reagente SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) e o aparelho StepOnePlus® Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Brevemente, o cDNA (2,5 ng/reacção) sintetizado a partir do RNA mensageiro e *primers* específicos (1-2 µg/reacção) foram utilizados juntamente com o reagente SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), como determinado pelo fabricante. A suspensão foi submetida a 40 ciclos de amplificação, seguidos de um ciclo final de 20 minutos com temperatura crescente de 60 a 95 °C para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reacção, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. A positividade das reacções foi determinada baseada na expressão das mesmas moléculas em tecidos de camundongos não infectados. Os resultados foram analisados com base no valor de TC (ciclo limiar) ou linha de corte, definido após a reacção, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atingiu um dado limiar, que permitiu a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Os cálculos para determinação da expressão relativa dos genes alvo foram realizados de acordo com instruções contidas no “User’s Bulletin” (P/N 4303859, Applied Biosystems), normalizando os dados em relação à expressão constitutiva de GAPDH em cada amostra, e à expressão de mRNA para as moléculas específicas nas amostras do animal não infectado. O resultado foi calculado utilizando-se a equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde $\Delta\Delta C_t = C_t \text{ mRNA específico da amostra} - C_t \text{ mRNA do GAPDH da amostra} - (C_t \text{ mRNA específico do controle} - C_t \text{ mRNA GAPDH controle})$.

3.11 Geração de macrófagos derivados da medula óssea

A obtenção de células da medula óssea foi realizada conforme previamente descrita (MARIM *et al.*, 2010). As células da medula óssea de animais C57BL/6 (WT, e knockouts para TLR-2, TLR-4, IL-12, NOD-1, NOD-2, IL-1R, ASC, Caspase-1, NALRP 3 e IL-1 β) foram cultivadas na presença de meio RPMI contendo 10% de soro feral bovino e 30% de sobrenadante de células L929 (LCCM), como fonte de Fator Estimulante de Colônias Granulócito / Macrófago (GM-CSF), em placas de Petri especiais (BD optilux) e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 7 dias.

3.12 Dosagem de citocinas por ELISA.

As concentrações de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6) e da quimiocina KC no soro ou sobrenadante do lavado peritoneal foram mensurados pelo método imunoenzimático (ELISA), conforme instruções do fabricante Duoset R&D (Minneapolis, MN, EUA). Brevemente, placas de poliestireno de 96 poços (Costar, Corning, NY, EUA) foram sensibilizadas, recobrimo-as com tampão de ligação contendo anticorpo de captura (50 μ l/poço). Após a incubação de aproximadamente 18 horas à 4°C, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS/Tween 0,05% em lavadora automática de placas (Immunowash 1575, Bio-Rad Laboratories, CA, EUA), e os sítios não específicos foram bloqueados por 2 horas à temperatura ambiente com 200 μ l de tampão de bloqueio específico. Posteriormente, após uma nova lavagem, diluições dos padrões (curva padrão) e das amostras foram adicionadas (50 μ l/poço). Após 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram lavadas e os anticorpos de detecção biotinilados diluídos segundo orientações dos fabricantes foram adicionados (50 μ l/poço). Depois de decorrido esse período de incubação,

foi adicionado a solução de peroxidase (50 µl/poço), sendo novamente incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente. E por fim, após novas lavagens foram adicionados em cada poço solução contendo substrato e cromógeno da peroxidase, tetra-methyl-benzidine (TMB, KPL, Gaithersburg, MA, EUA). Decorrido 30 minutos, a reação foi finalizada pela adição de H₂SO₄ 2N. A densidade óptica de cada amostra foi obtida em leitor de ELISA (eMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) usando filtro de comprimento de onda de 450nm, e a quantificação de cada citocina foi realizada conforme curva padrão obtida.

3.13 Determinação bioquímica de uréia e enzimas

Para analisar a magnitude da lesão tecidual em diferentes órgãos dos animais infectados com *T. gondii*, submetidos ou não à sepse polimicrobiana, os soros dos animais dos diferentes grupos foram utilizados para dosagem de ureia e da atividade da enzima hepática alanina transaminase (ALT) ou transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), da isoenzima cardíaca da creatina fosfoquinase (CK-MB) e da enzima relacionada à lesão tecidual geral desidrogenase láctica (LDH). A concentração sérica foi determinada por método colorimétrico enzimático pela metodologia Enzimático-Trinder (TRINDER, 1969) seguindo as normas do fabricante do kit (LabTest, Minas Gerais, Brasil). Os valores foram expressos em U/mL.

3.14 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no pulmão dos animais foi realizada pelo ensaio da mieloperoxidase (MPO). Após os animais serem perfundidos com tampão

PBS, o pulmão direito de cada animal foi coletado e colocado em 200µL de tampão gelado (NaCl 0.1M, NaPO₄ 0.02 M, NaEDTA 0.012 M, pH 4,7) e homogeneizado com auxílio do Pollytron® (13000 rpm), realizado conforme descrito por Souza e colaboradores (SOUZA *et al.*, 2000), com algumas modificações (ALVES-FILHO *et al.*, 2006). Os resultados foram expressos como número de neutrófilos por mg de tecido.

3.15 Análise histopatológica

Para observação da morfologia e alterações patológicas nos diferentes órgãos dos grupos de animais experimentais, amostras de cérebro, fígado e pulmão foram coletadas após 40 dias da infecção, submetidos ou não à sepse polimicrobiana, fixados em formol tamponado a 10% e, após 24 horas, desidratados em concentrações crescentes de álcool e xilol. Posteriormente, os fragmentos foram incluídos em parafina e cortes de 5µm de espessura dos tecidos foram obtidos com auxílio de um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubadas a 60°C para fixação. Em seguida foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e hidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao álcool 70%). Os cortes foram então corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), desidratados com concentrações crescentes de álcool (de 70% ao absoluto), lavados com xilol e montados em lamínula e Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil).

Para análise das lesões patológicas induzidas por *T. gondii* no intestino delgado, este foi coletado e lavado com PBS para retirada das fezes. Após a lavagem, o intestino foi seccionado em quatro partes: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Esses fragmentos foram então enrolados individualmente em um “rolo suíço” e processados

como descrito anteriormente. As imagens foram obtidas em microscópio óptico e as análises comparativas entre os diferentes grupos foram realizadas.

3.16 Indução das imunizações

Animais C57BL/6 foram imunizados por via subcutânea com solução de Ovalbumina e Adjuvante Completo de Freund (OVA / CFA) ou Ovalbumina e Alumen (OVA/Alumen). A imunização foi feita em duas doses (100 µg de OVA / 1.6mg de Alumen) ou (100 µg de OVA / 50 µl de CFA) por animal, com intervalos semanais, a segunda dose foi realizada na presença de adjuvante. Uma semana após administrada a última dose subcutânea, os camundongos receberam uma dose de 200 µg de OVA via IP. Após três dias, os camundongos foram induzidos à sepse polimicrobiana subletal. Os camundongos foram acompanhados para avaliação da sobrevida e o resultado expresso como percentual de sobrevida.

3.17 Tratamento com anticorpos anti-IFN- γ e anti-TNF- α e aminoguanidina

Os animais C57BL/6 foram infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e após 40 dias da infecção foram tratados com os anticorpos neutralizantes anti-IFN- γ ou anti-TNF- α (500µg/Kg ou 10µg/Kg), pela via intraperitoneal. O tratamento foi realizado uma vez ao dia por durante 3 dias consecutivos, com início 24 horas antes da indução da sepse polimicrobiana. Para o tratamento com aminoguanidina, os animais pré-infectados com *T. gondii*, iniciaram tratamento com 50 mg/Kg de aminoguanidina 30 minutos antes

de serem induzidos à CLP, tendo recebido a mesma dose a cada 6 horas. As sobrevidas foram analisadas por até 10 dias e os resultados expressos como percentual de sobrevida.

3.18 Tratamento de animais BALB/c com anticorpo anti-CD25

Camundongos BALB/c foram tratados com 1 mg do anticorpo monoclonal anti-CD25 dois dias antes da infecção com 20 cistos da cepa ME49 de *T.gondii*. Após 40 dias da infecção os animais foram induzidos à sepse polimicrobiana subletal para análise da sobrevida, monitorada por um período de 10 dias.

3.19 Fracionamento de DNA dependente de metilação após infecção por *T. gondii*.

Animais C57BL/6 foram infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e 40 dias após infecção, foram sacrificados, o baço coletado e processado para isolamento das células. Após isolamento celular, as células TCD4⁺ foram separadas por seleção negativa utilizando o kit da EasySep (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada), e posteriormente realizada extração de DNA. A análise foi realizada usando o kit EpiTect Methyl II PCR Arrays (Qiagen Sciences, Germantown, MD, EUA) no qual identifica a metilação gênica e indica o percentual da fração de DNA metilado ou não metilado. O método empregado pelo sistema EpiTect Methyl II PCR é baseado na detecção de DNA remanescente depois da clivagem com enzimas de restrição sensível à metilação e/ou enzima dependente de metilação. Essas enzimas digeriram o DNA não metilado ou metilado, respectivamente. Depois da digestão, o DNA remanescente de cada reação enzimática individual foi quantificada por real-time PCR, usando “primers” que flanqueiam a região promotora (gene) de interesse. A fração relativa de DNA metilado e não metilado

são subsequentemente determinados por comparar a quantidade de cada digestão com a digestão do “mock” (sem enzima adicionada), usando um método Δ CT. Brevemente, a absorção de DNA genômico é aliquoteado em quatro porções iguais e sujeitos ao “mock” (sem enzima), enzima endonuclease de restrição sensível a metilação ou dependente de metilação e dupla digestão com enzima sensível e dependente de metilação. Depois da digestão, as reações enzimáticas foram misturadas diretamente com qPCR master mix e dispensados em uma placa de PCR array contendo uma mistura de primers pré aliquoteados. O PCR em tempo real foi realizado, sendo utilizadas para isso condições cíclicas específicas. Finalmente, os valores brutos de Δ CT foram passados para um banco de análise de dados, no qual automaticamente calcula a quantidade relativa de fração de DNA metilado e não metilado. A fração não metilada representa a absorção de DNA genômico contendo sítios CpG não metilado na região amplificada do gene e a fração metilada representa a absorção do DNA genômico contendo dois ou mais sítios CpG metilados na região alvo do gene.

3.20 Análise da expressão gênica por NanoString

Animais foram infectados e depois de 40 dias induzido a sepse polimicrobiana. Após 24 horas da CLP, os animais foram sacrificados, o baço e o lavado peritoneal foram coletados. O baço foi processado, as células foram isoladas para a extração do RNA. O RNA foi extraído seguindo as instruções da mini kit Rneasy (Qiagen Sciences, Germantown, MD, EUA). Após a extração, o RNA foi quantificado em nanodrop ND1000 RNA-40, em seguida, diluído para alcançar 100 ng/5 μ L. As amostras foram preparadas numa reação de hibridização, em termociclador C1000 Thermal Cycler conforme recomendação do Kit e, em seguida, realizado o processamento em equipamento

nanoString nCounter para leitura do nanostring. Os dados foram analisados em um nSolver Analysis Software v1.0 e considerados alterados significativamente aqueles que tiveram um aumento ou diminuição >1.5 vezes.

3.21 Pressão arterial

A aferição da pressão arterial dos animais foi realizada através do método não invasivo por pletismógrafo de cauda (CODA System, Kent Scientific, Torrington, CT, EUA). Foram realizadas 20 aferições para cada animal e a média das aferições de cada animal foi considerada para análise estatística. Os resultados foram expressos como milímetro de mercúrio (mm Hg).

3.22 Ensaio de transferência de células T reguladoras

Para o experimento de transferência de células T reguladoras, o baço de animais naïves foram coletados e processados para o isolamento das células totais. As células T reguladoras foram purificadas com o auxílio de partículas magnéticas EasySep[®] (STEMCELL Technologies Inc. Vancouver, BC, Canada), seguindo as instruções do fabricante. Em síntese: primeiramente as células TCD4⁺ foram separadas por seleção negativa, por meio de um cocktail de anticorpos conjugados de biotina específico para as demais populações celulares, exceto para CD4⁺. Em seguida, as células recuperadas foram marcadas com anti-CD25⁺ PE. As células CD25⁺ foram selecionadas positivamente da fração de células TCD4⁺ previamente purificadas. Assim, as células CD4⁺ CD25⁺ foram retidas no tubo, por meio de lavagem após a retirada do tubo de dentro do magneto.

3.23 Análise Estatística

A sobrevida dos animais foi expressa como porcentagem de animais sobreviventes analisadas pelo teste Mantel-Cox logrank (X^2 , chi-squared). Os resultados dos testes paramétricos envolvendo variáveis contínuas foram expressos em termos de média $\pm$ erro padrão da média. Para comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey-Kramer. Em todas as análises estatísticas, consideramos o nível crítico para rejeição de hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foram utilizados para caracterizar o grau de significância estatística. A análise estatística e os gráficos foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Suscetibilidade à sepse polimicrobiana após infecção crônica por *Toxoplasma gondii*.

Partindo do pressuposto de que pouco se sabe sobre a correlação de doenças infecciosas parasitárias com o desenvolvimento da gravidade da sepse, nos propomos a estudar se uma infecção crônica pode de alguma forma alterar o desenvolvimento da sepse polimicrobiana.

Para isso, realizamos infecção crônica por *T. gondii* e 40 dias após infecção induzimos sepse polimicrobiana grave pelo método de CLP. Observamos que todos os animais que foram previamente infectados com *T. gondii* e depois induzidos à sepse grave morreram dentro do período de 24 horas (Figura 2A), e quando foi induzida sepse subletal nesses animais, ainda assim houve um aumento na taxa de mortalidade desses animais quando comparados aos animais não infectados por *T. gondii* submetidos à CLP (Figura 2B).

Em paralelo, realizamos o mesmo ensaio de sepse grave, utilizando infecção crônica por outros parasitos ou fungo. Verificamos que animais cronicamente infectados com *P. brasiliensis* (Figura 2C), *L. major* (Figura 2D) e *T. cruzi* (Figura 2E) quando induzidos à sepse polimicrobiana grave não apresentaram diferença na curva de mortalidade comparada aos animais que foram submetidos somente à sepse polimicrobiana grave. Esses resultados sugerem que somente a infecção prévia oral por *T. gondii* é capaz de induzir aumento da suscetibilidade à sepse induzida por CLP.

4.2 Infecção crônica com *T. gondii* induz aumento da resposta imune contra sepse subletal polimicrobiana.

Para elucidar a causa do aumento da mortalidade observada em animais submetidos à sepse polimicrobiana subletal após infecção crônica por *T. gondii*, comparamos a resposta imune destes animais com animais sépticos não infectados previamente.

Sabendo que o controle do crescimento bacteriano é de fundamental importância na resposta durante a sepse, investigamos se animais previamente infectados com *T. gondii* e submetidos à indução de sepse polimicrobiana subletal estariam morrendo devido a um aumento da disseminação bacteriana. Após realizar uma cinética de cultura bacteriana, observamos que os animais que foram previamente infectados com *T. gondii* apresentaram

um melhor controle da carga bacteriana por apresentarem menor quantidade de unidades formadoras de colônias recuperadas após 24 horas do cultivo tanto do sangue total quanto do lavado peritoneal, comparados aos animais que foram submetidos à CLP somente (Figura 3A).

Além disso, é descrito que a migração de neutrófilos para o sítio de infecção é importante para o controle bacteriano (ALVES-FILHO *et al.*, 2006). Sabendo disso, analisamos o recrutamento dessas células para a cavidade peritoneal em animais submetidos à sepse polimicrobiana após indução da infecção crônica. Observamos que os animais previamente infectados com *T. gondii* apresentaram aumento do recrutamento celular, tanto de leucócitos totais, quanto de neutrófilos para o sítio da infecção (peritônio) após o desenvolvimento da sepse polimicrobiana subletal (Figura 3B e 3C). Esses dados indicam que a infecção prévia por *T. gondii* favorece o recrutamento celular e consequentemente a eliminação das bactérias no sítio da infecção em animais submetidos à CLP.

Figura 3. Aumento da eliminação bacteriana e migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após sepse polimicrobiana subletal induzida em animais infectados por *T. gondii*.

Animais C57BL/6 foram infectados por via oral com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e após 40 dias da infecção foram submetidos à CLP. 6, 12 e 24 horas após a CLP, a carga bacteriana foi analisada no sangue e no lavado peritoneal (A), os resultados são expressos como unidades formadas de colônias (UFC). A contagem de leucócitos no sangue e lavado peritoneal foram analisados, sendo que a contagem total de leucócitos foi realizada em contador de células e a contagem diferencial realizada em lâminas coradas com May-Grünwald Giemsa (B) ou por citometria de fluxo, através a análise da expressão de Gr1 (C). As barras representam a média $\pm$ erro padrão da media de 4 animais por grupo. Tendo sido analisada em programa Prisma, ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.3 Sepse polimicrobiana não altera a carga parasitária da infecção crônica por *T. gondii*.

O fato de que animais que foram previamente infectados com *T. gondii* têm um aumento na resposta imune inata (avaliada pelo aumento da migração de neutrófilos) durante a sepse polimicrobiana subletal, favorecendo a eliminação da carga bacteriana desses animais, não justifica o aumento da mortalidade de animais pré-infectados submetidos à CLP. Para avaliar se o aumento da mortalidade ocorreu devido ao fato de que a sepse polimicrobiana poderia desencadear uma imunossupressão que levaria à reativação da infecção por *T. gondii*, que se encontrava latente. Assim, realizamos análise para quantificar o parasito após a CLP.

Essa análise foi realizada através da quantificação de cistos, análise histopatológica (Figura 4A) e quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real do cérebro dos animais que foram somente infectados por *T. gondii* e de animais que foram infectados e submetidos à CLP (Figura 4B). Observamos que o número de cistos, bem como da carga parasitária no cérebro foram similares em ambos os grupos analisados. Indicando que a infecção polimicrobiana não induz à reativação da infecção crônica por *T. gondii*.

Figura 4. Sepse polimicrobiana não induz reativação da infecção crônica por *T. gondii*.

Camundongos C57BL/6 foram infectados com 5 cistos de *T. gondii* e após 40 dias da infecção foram induzidos à CLP e analisados quanto à quantidade de cistos no cérebro (A) e quantificação de DNA do parasito por PCR real time (B). Dados são representativos da média $\pm$ erro padrão da media de três diferentes experimentos, utilizando 4 animais por grupo. A análise estatística foi realizada no programa Prisma, através ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.4 Infecção crônica por *T. gondii* não induz danos teciduais sistêmicos durante a sepse polimicrobiana subletal

Sabendo que um dos sintomas da sepse grave é o desenvolvimento de lesão tecidual sistêmica, analisamos se animais previamente infectados com *T. gondii* apresentavam alguma lesão tecidual e danos em órgão vitais que poderia levar ao aumento da mortalidade dos animais que foram previamente infectados com o parasito e induzidos à sepse polimicrobiana subletal.

Primeiramente, realizamos a detecção de mieloperoxidase (enzima abundante em neutrófilos) no pulmão e a dosagem enzimática: renal (uréia), hepática (ALT ou TGP), cardíaca (CK-mB) e de morte celular (LDH), além de analisar o extravasamento celular por azul de Evans nos diversos órgãos como rim, baço, coração, cérebro, pulmão e fígado com o intuito de avaliar alterações na permeabilidade vascular nesses tecidos. Observamos um aumento da concentração de mieloperoxidase nas primeiras 6 horas após a indução da sepse polimicrobiana subletal em animais que foram previamente infectados com *T. gondii*, no entanto, essas concentrações voltaram ao normal após 12 horas (Figura 5A). Além disso, após 24 horas da CLP, não observamos diferença na concentração das diferentes enzimas avaliadas (Figura 5B), e na quantidade de azul de Evans extravasado após indução da sepse polimicrobiana nesses animais (Figura 5C). Esses dados sugerem que a infecção prévia por *T. gondii* não induz os danos teciduais sistêmicos que são observados na sepse grave, quando esses animais são submetidos ao modelo de sepse subletal.

Figura 5. Infecção prévia por *T. gondii* não aumenta o recrutamento de neutrófilos para o pulmão e não induz danos teciduais sistêmicos durante a sepse polimicrobiana subletal.

Animais C57BL/6 foram infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e após 40 dias foi induzida sepse polimicrobiana subletal por CLP. A detecção de mieloperoxidase (MPO), foi realizada em homogenato de pulmão (A), a dosagem enzimática foi realizada através de ensaio colorimétrico (B) e a quantificação do extravasamento celular foi realizada por extravasamento de Azul de Evans injetado logo após a indução da CLP (C). Estes parâmetros foram medidos 24 horas depois de induzida a sepse polimicrobiana subletal, tendo sido utilizados 4 animais por grupo. Dados são representativos da média $\pm$ erro padrão da média de três diferentes experimentos. A análise estatística foi realizada no programa Prisma, através de ANOVA uma via seguida pelo teste de Tukey.

4.5 Infecção crônica por *T. gondii* induz dano tecidual intestinal e infiltrado celular durante a sepse polimicrobiana subletal

É descrito que a infecção por *T. gondii* induz a diferenciação de células de memória específicas para antígenos da flora intestinal (Hand *et al.*, 2012). Como o intestino é o principal órgão acometido na infecção oral por *T. gondii* e a CLP leva à ativação de uma resposta imune adaptativa contra bactérias intestinais, avaliamos se a sepse polimicrobiana poderia desencadear danos ao tecido intestinal dos animais previamente infectados. Para isso, realizamos análise histopatológica do intestino de camundongos previamente infectados com *T. gondii* e posteriormente induzidos à sepse polimicrobiana subletal. Através dessa análise, observamos perda da integridade do tecido intestinal, principalmente na região ilíaca (Figura 6A). Além disso, observamos que animais previamente infectados por *T. gondii* apresentaram aumento do infiltrado inflamatório no intestino, principalmente no íleo, após desenvolvimento da sepse polimicrobiana subletal, comparado com os animais que foram induzidos à sepse somente (Figura 6B). Esses dados sugerem que a infecção prévia por *T. gondii* pode estar induzindo um processo inflamatório que lesiona o íleo desses animais durante a sepse polimicrobiana.

Figura 6. Infecção crônica por *T. gondii* induz dano tecidual intestinal e infiltrado celular durante a sepse polimicrobiana subletal.

Animais C57BL/6 foram infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e posteriormente induzidos à sepse polimicrobiana por CLP. Após 24 horas da CLP as diferentes partes do intestino foram isolados e o íleo coletado, em seguida fixado, parafinado, cortado e corado por H&E (A), uma pequena porção de aproximadamente 1 cm foi coletado para análise de MPO (B). Os resultados são representativos do íleo de 4 animais por grupo experimental.

4.6 Animais previamente infectados com *T. gondii* tem aumento na resposta inflamatória local e sistêmica durante a sepse polimicrobiana subletal

Um dos principais fatores que desencadeia a mortalidade em modelos de sepse é o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , que pode conduzir ao choque séptico devido à indução de hipotensão (EBONG *et al.* 1999). Sabendo disso, analisamos a presença das citocinas pró-inflamatórias nesses animais. Para isso, camundongos foram infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e após 40 dias da infecção foi induzida a sepse polimicrobiana, e após 24 horas da CLP, realizamos quantificação de citocinas ou da quimiocina KC por ELISA. Obsevamos aumento na produção das citocinas IFN- γ (Figura 7A), TNF- α (Figura 7B), IL-6 (Figura 7C) e IL-1 β (Figura 7E) que foi confirmada por Western blot (Figura 7F), porém, não houve diferença na produção da quimicina KC (Figura 7D) no lavado peritoneal de animais previamente infectados com *T. gondii* quando induzidos à sepse polimicrobiana subletal comparado aos animais que foram induzidos à sepse somente. Além disso, avaliamos a presença das citocinas pró-inflamatórias em amostras de sangue dos animais pré-infectados com *T. gondii* com posterior indução da sepse polimicrobina, e observamos aumento das citocinas TNF- α (Figura 7G), IFN- γ (Figura 7H) e IL-6 (Figura 7I), e da quimicina KC (Figura 7J) quando comparado aos demais grupos. Esses dados demonstram que a infecção prévia por *T. gondii* induz aumento da produção de citocinas local e sistêmica durante a sepse polimicrobiana subletal.

Figura 7. Infecção prévia por *T. gondii* modula a produção de citocinas durante a sepse polimicrobiana subletal.

Animais C57BL/6 foram infectados com 5 cistos de *T. gondii* e após 40 dias da infecção foram induzidos à sepse polimicrobiana subletal. Após 24 horas da CLP o sangue e lavado peritoneal foram coletados e centrifugados para coleta de soro e sobrenadante, respectivamente. As citocinas próinflamatórias IFN- γ e TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C) foram dosadas por ELISA, sendo que a secreção de IL-1 β ativa foi confirmada por Westernblot (D). Dados são representativos da média $\pm$ erro padrão da média de três diferentes experimentos, tendo sido utilizados 4 animais por grupo para ELISA e dois para o Westernblot. Para análise estatística foi utilizado o programa Prisma, através de ANOVA uma via seguida pelo teste de Tukey.

4.7 Linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ são as fontes celulares de produção de IFN- γ e de TNF- α na cavidade peritoneal de animais previamente infectados com *T. gondii* submetidos à CLP.

Para analisar qual a contribuição dos linfócitos T sobre a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α , realizamos ensaio de citometria de fluxo, com o intuito de avaliar a produção intracelular dessas citocinas em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Para isso, animais foram previamente infectados por *T. gondii* e após 40 dias da infecção foram induzidos à CLP, após 24 horas as células do baço e da cavidade peritoneal foram coletadas e estimuladas *ex vivo* e foi conduzido ao procedimento de marcações para citometria de fluxo. Observamos que as citocinas IFN- γ e TNF- α são produzidas tanto por linfócitos TCD4⁺ (Figura 8 E e F) quanto por linfócitos TCD8⁺ (Figura G e H). Um dado surpreendente apresentado é que células do baço de animais somente infectados com *T. gondii* 40 dias após infecção apresentaram maior número de células produtoras de IFN- γ e TNF- α do que os animais que foram infectados cronicamente e subsequentemente submetidos à sepse polimicrobiana (Figura 8A-D). No entanto quando avaliado o lavado peritoneal, os animais que foram infectados cronicamente e depois submetidos à sepse polimicrobiana subletal tiveram maior número dessas células produtoras das mesmas citocinas na cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo só infectado por *T. gondii* ou somente induzido à CLP (Figura 8E-H). Esses dados sugerem que animais cronicamente infectados por *T. gondii* possuem células de padrão Th1 no baço, mesmo após a eliminação do parasito. E, após a indução de CLP, essas células produtoras de IFN- γ e TNF- α deixam

o baço e migram para a cavidade peritoneal, onde contribuem para o aumento na concentração de citocinas pró-inflamatórias mostrados na Figura 7.

Figura 8. Infecção crônica por *T. gondii* induz aumento da migração de células produtoras de IFN-γ e TNF-α para a cavidade peritoneal durante a sepse polimicrobiana.

Camundongos C57BL/6 foram infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* e após 40 dias induzidos à sepse polimicrobiana. As células do baço (A-D) e da cavidade peritoneal (E-H) foram isoladas após 24 horas da sepse, estimuladas com PMA/Ionomicina por 12 horas, permeabilizadas e marcadas para CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN-γ e TNF-α e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Dados são representativos da média ± erro padrão da média de três diferentes experimentos, tendo sido utilizados 4 animais por grupo. Para análise estatística foi utilizado o programa Prism, através de ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.8 Infecção por *T. gondii* potencializa a produção de óxido nítrico durante a sepse polimicrobiana subletal, que não é diretamente responsável pela mortalidade nesse modelo de estudo.

Já foi descrito que as citocinas IFN- γ e TNF- α são capazes de ativar macrófagos, que em decorrente desta ativação produzem óxido nítrico (NO) (CHEN *et al.*, 1996). Assim, analisamos a quantificação indireta da produção desse gás pelo método de Griess,. Para isso, animais foram infectados cronicamente por *T. gondii*, submetidos à CLP, após 24 horas, o sangue e o lavado peritoneal foram coletados para quantificação indireta de NO. Observamos que animais que foram previamente infectados com *T. gondii* e posteriormente induzidos à sepse polimicrobiana subletal, têm aumento da produção de NO tanto no sangue (Figura 9A), quanto no lavado peritoneal (Figura 9B). Esse dado é relevante e sugere que o aumento de NO, devido a sua função microbicida, pode ter relação direta com a eliminação bacteriana, visto que os animais infectados previamente por *T. gondii* e induzidos à sepse polimicrobiana apresentaram diminuição da carga bacteriana (Figura 3A). No entanto, o aumento de NO poderia estar levando à lesão tecidual e desencadeando aumento da mortalidade.

Em seguida, analisamos se o NO estaria diretamente envolvido com o aumento da mortalidade em nosso modelo experimental, para isso, utilizamos tratamento com aminoguanidina, um inibidor seletivo de iNOS (enzima responsável pela produção de NO) (ZHAO *et al.*, 2006). Observamos que animais tratados com aminoguanidina, iniciada 30 minutos antes da indução da sepse polimicrobiana subletal, não apresentaram diferença na taxa de mortalidade quando comparados aos animais que não receberam o tratamento (Figura 9C). Esses dados sugeram que a mortalidade dos animais pré-infectados com *T.*

gondii durante a sepse polimicrobiana não está diretamente associada com o aumento *in vivo* de NO.

Figura 9. Infecção por *T. gondii* potencializa a produção de óxido nítrico durante a sepse polimicrobiana subletal, mas não é diretamente responsável pela indução da suscetibilidade nesse modelo de estudo.

Camundongos foram infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* e após 40 dias da infecção foi induzida a sepse polimicrobiana. A produção de NO foi indiretamente avaliada pelo método de Griess no soro (A) e no lavado peritoneal (B), representada como μM de NO₂⁻. As barras representam a média ± SEM de 4 animais por grupo. Resultados similares foram obtidos em 3 experimentos independentes e a análise estatística foi utilizado o programa Prisma, através de ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Para análise de sobrevivência, os animais foram infectados cronicamente por *T. gondii*, e o tratamento com 50mg/kg de aminoguanidina via IP, iniciado 30 minutos antes da CLP (C). Os animais foram monitorados por até 10 dias. Os resultados são expressos como percentual de sobrevivência. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mantel-Cox log-rank, utilizando 10 animais por grupo.

4.9 Tratamento com anticorpos anti-IFN- γ ou anti-TNF- α em baixas concentrações melhorou a sobrevida de animais previamente infectados com *T. gondii* que foram submetidos à sepse polimicrobiana

Como havíamos observado aumento da produção de IFN- γ e TNF- α , tanto local quanto sistemicamente nos animais que foram infectados com *T. gondii* e induzidos à sepse polimicrobiana subletal, e já está descrito que essas citocinas estão associadas com a indução de hipotensão que conduz ao choque séptico (TANG *et al.*, 2000; MIRA *et al.*, 1999; KOTHARI *et al.*, 2013), bloqueamos *in vivo* a produção individual dessas citocinas e, em seguida, avaliamos a sobrevida dos animais infectados com *T. gondii* e submetidos à CLP. Para isso, utilizamos anticorpos monoclonais anti-IFN- γ ou anti-TNF- α . Observamos que os animais que foram cronicamente infectados com *T. gondii*, e subsequentemente induzidos à sepse polimicrobiana subletal, e que receberam o tratamento direto com os anticorpos anti-IFN- γ ou anti-TNF- α , nas doses de 500 μ g/mL apresentaram um atraso na mortalidade, mas ao final de 10 dias a mortalidade foi semelhante aos animais não tratados (Figura 10A). No entanto, quando animais receberam uma dose menor, de 10 μ g/mL dos mesmos anticorpos, a sobrevida foi significativamente melhorada quando comparados ao grupo não tratado, principalmente naqueles animais que receberam anti-TNF- α (Figura 10B). Esses dados mostram que essas citocinas em alta concentração, contribuem para o aumento da mortalidade durante a sepse polimicrobiana subletal de animais cronicamente infectados com *T. gondii*.

Figura 10. Tratamento com anticorpos anti-IFN- γ ou anti-TNF- α em baixas concentrações melhora a sobrevivência de animais submetidos à sepse polimicrobiana após infecção por *T. gondii*.

Animais C57BL/6 foram infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e após 40 dias, tratados com os anticorpos anti-IFN- γ ou anti-TNF- α e após 24hs induzido sepse polimicrobiana. O ensaio foi realizado utilizando a dose de 500 μ g/kg(A) ou 10 μ g/kg (B). A taxa de sobrevivência foi monitorada por até 10 dias, tendo sido utilizados 6 animais por grupo. Os resultados são expressos como percentual de sobrevivência e o valor de *p* foi considerado quando comparando os camundongos infectados submetidos à sepse contra animais com sepse somente. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mantel-Cox log-rank.

4.10 Infecção crônica por *T. gondii* induz células de memória de linfócitos TCD4⁺ do padrão Th1.

Para verificar se os linfócitos TCD4⁺ que estavam produzindo as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α foram originados na infecção crônica por *T. gondii*, realizamos ensaio de citometria de fluxo para confirmar se essas células eram de memória. Observamos que animais que foram infectados cronicamente por *T. gondii* tiveram indução de células TCD4⁺ de memória, do padrão de resposta Th1 (Figura 11). Esses dados sugerem que animais cronicamente infectados por *T. gondii* já possuem uma resposta Th1 montada que pode ser específica para componentes da flora intestinal, e quando o animal é submetido à CLP, a resposta imune de memória contra antígenos das bactérias liberadas neste processo é expandida rapidamente.

Figura 11. Infecção crônica por *T. gondii* induz células de memória do padrão Th1.

Animais C57BL/6 foram infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e após 40 dias foi induzido sepse polimicrobiana. O baço foi retirado e as células recuperadas, marcadas e analisadas por citometria de fluxo. Dados são representativos da média $\pm$ erro padrão da média de três diferentes experimentos, tendo sido utilizados 4 animais por grupo. Para análise estatística foi utilizado o programa Prisma, através de ANOVA uma via seguida pelo teste de Tukey.

4.11 Animais imunizados com antígeno na presença de adjuvante que polariza para um padrão Th1 de resposta imune (OVA + CFA) são mais suscetíveis à sepse polimicrobiana.

Como os animais previamente infectados com *T. gondii* apresentam uma forte resposta do padrão Th1, analisamos se a indução de linfócitos de padrão Th1 era suficiente para causar suscetibilidade à sepse polimicrobiana subletal. Para isso, utilizamos modelo de imunização com a proteína ovalbumina (OVA) na presença de diferentes adjuvantes, CFA ou alumínio, para induzir os padrões Th1 ou Th2 de resposta imune, respectivamente. Através desta análise, observamos que quando foi induzido um padrão Th1 de resposta imune (OVA+CFA), os animais desenvolveram aumento de suscetibilidade à sepse polimicrobiana, comparados aos animais que foram imunizados com OVA na presença de adjuvante que polariza para um padrão Th2 (Figura 12). Esses dados sugerem que a suscetibilidade determinada em nosso modelo de estudo é em parte, devido ao

desenvolvimento de memória do padrão Th1 seguido de um estímulo bacteriano secundário, não necessariamente memória contra *T. gondii* ou bactéria intestinal.

Figura 12. Desenvolvimento do padrão de resposta Th1 induz aumento de suscetibilidade à sepse polimicrobiana subletal.

Animais C57BL/6 foram imunizados com (100 µg de OVA / 1.6mg de Alumen) ou (100 µg de OVA / 50 µl de CFA) por animal, com intervalo semanais, após uma semana da última administração os animais receberam 200 µg de OVA via IP e depois de 3 dias foram induzidos à sepse polimicrobiana e a taxa de mortalidade analisada. Essa taxa de mortalidade foi monitorada por até 10 dias. Os resultados são expressos como percentual de sobrevivência. Valor de *p* foi considerado comparando os camundongos imunizados submetidos à sepse contra animais com sepse somente, tendo sido utilizados 10 animais por grupo experimental. Para análise de significância foi utilizado o teste de Mantel-Cox log-rank.

4.12 Análise da expressão relativa de genes relacionados à ativação de IFN-γ

Sabendo que a infecção por *T. gondii* induz uma forte resposta Th1, hipotetizamos que genes que exacerbam a resposta Th1 poderiam ser mais expressos em animais infectados com *T. gondii* (mesmo na ausência de infecção ativa) e isso levaria ao aumento da mortalidade durante a sepse polimicrobiana, pois exacerbaria o desenvolvimento de uma resposta pró-inflamatória. Analisamos por nanostring a expressão de genes relacionados com a resposta Th1 na produção de citocinas, genes ativadores e repressores do IFN-γ, além dos TLRs que estariam envolvidos no reconhecimento tanto do patógeno quanto da microbiota liberada quando induzida a sepse polimicrobiana.

Para realizar essa análise, utilizamos o critério de genes induzidos, considerando >1.5 vezes maior ($p < 0.05$) do que a base (grupo Sham). Quando analisamos as células do baço de camundongos cronicamente infectados com *T. gondii* observamos um aumento da expressão de interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β) e do tipo II (IFN- γ), aumento da expressão de IL-1 α e IL-1 β , IL-6, COX-2, NOS 2, IL-10 e CXCL1 (KC), além de induzir o aumento da expressão específica de NLRP3 e 6 que são genes relacionados à ativação do inflamassoma. Além disso, observamos que a indução da sepse polimicrobiana conduziu a uma “down” modulação dos TLRs 3,5,11 e 12, e induziu uma maior expressão de TLR-2, único TLR com expressão aumentada após indução da sepse polimicrobiana subletal (Figura 13). Esses dados sugerem que a infecção prévia por *T. gondii* induz a expressão aumentada de genes relacionados à resposta Th1, sendo que esse aumento pode estar diretamente relacionado com a aumentada e rápida produção de citocinas pró-inflamatórias.

Figura 13. Os genes induzidos durante a infecção *T. gondii* permanecem ativados na fase crônica da infecção.

Animais C57BL/6 foram infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e após 40 dias foi induzida sepse polimicrobiana. As células do baço foram isoladas para extração de RNA e análise da expressão gênica. A expressão foi avaliada usando o kit do equipamento nCounter® mRNA Expression Assay e utilizado equipamento NaqnoString data analysis. Foi utilizado MultiExperimentViewer (MeV v4.6.2) para agrupar o conjunto de dados. A normalização do conjunto de dados foi realizada para determinar se a expressão gênica em um grupo experimental era significativamente diferente do outro. Três determinações gênicas foram realizadas para cada grupo experimental, e a média deste foi dividida pela média do grupo controle Sham. Os dados normalizados pelo grupo Sham são expressos após transformados em $\log_2$.

4.13 Sinalização via TLR-2 e TLR-11 aumenta a suscetibilidade de animais previamente infectados com *T. gondii* durante a sepse polimicrobiana subletal.

Para confirmar se TLRs estariam envolvidos no aumento de suscetibilidade à sepse polimicrobiana após infecção crônica por *T. gondii*, realizamos ensaio de sobrevivência utilizando animais deficientes de diferentes TLRs que participam tanto no reconhecimento bacteriano quanto no reconhecimento do *T. gondii*. Observamos que animais deficientes de TLR-2 (Figura 15A), mas não de TLR-4 (Figura 15B) e TLR-9 (Figura 15C) cronicamente infectados com *T. gondii* apresentaram melhora na sobrevivência durante a sepse polimicrobiana em relação aos animais WT. Quando utilizamos animais deficientes de TLR-11, por ser importante via para produção de IFN- γ na infecção por *T. gondii*, observamos uma sobrevivência de 100% dos animais deficientes de TLR11 cronicamente infectados por *T. gondii* e submetidos à sepse polimicrobiana (Figura 15D). Esses dados sugerem a participação de TLR-2 e TLR-11 na indução da suscetibilidade à sepse polimicrobiana subletal após infecção prévia por *T. gondii*.

Figura 14. Animais deficientes de TLR-2 e TLR-11 previamente infectados por *T. gondii* tem melhora da sobrevivida quando submetidos à CLP.

Camundongos WT ou deficientes de TLR-2 (A), TLR-4 (B), TLR-9 (C) ou TLR-11 (D) foram infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e após 40 dias induzida sepse polimicrobiana. A taxa de sobrevivida foi monitorada por até 10 dias, tendo sido utilizados 6 animais por grupo experimental. Os resultados são expressos como percentual de sobrevivida e o valor de p foi considerado comparando os camundongos infectados submetidos à sepse contra animais com sepse somente. Para análise de significância foi utilizado o teste de Mantel-Cox log-rank.

4.14 Macrófagos produzem IL-1 β *in vitro* dependente da pré-ativação por bactérias

Gram positivas.

Já foi descrito que IL- β pode induzir permeabilidade intestinal e a disseminação de bactéria comensal, induzindo desta forma um aumento da resposta inflamatória na mucosa intestinal (Meinzer *et al.*, 2012). Uma vez que foi observado aumento da produção desta citocina no lavado peritoneal de animais que foram previamente infectados com *T. gondii* e induzidos à sepse polimicrobiana, simulamos modelo *in vitro* utilizando macrófagos

recuperados da medula óssea de animais WT ou deficientes de moléculas envolvidas na ativação e consequente liberação de IL-1 β .

Observamos que macrófagos de animais WT quando são estimulados somente com LPS, Peptidoglicano (Pg) ou antígeno solúvel de taquizoíta de *T. gondii* (STAg), não produzem IL-1 β . Porém quando pré-estimulados com Peptidoglicano e após 6 horas estimulados com STAg, são capazes de produzir esta citocina. Além disso, utilizamos macrófagos da medula óssea de animais deficientes de TLR-4, IL-12, NOD-1, NOD-2 (dados não mostrados) e NLRP3, ASC, Caspase 1 e TLR-2. Observamos que a produção de IL-1 β foi diminuída quando utilizamos macrófagos de animais deficientes de TLR-2, NLRP3 e ASC e foi completamente inibida quando utilizado macrófagos de animais deficientes de Caspase 1. Esses dados sugerem que em parte, a produção de IL-1 β em nosso modelo é dependente da ativação do primeiro sinal induzida por peptidoglicano via TLR-2 e consequente indução do inflamassoma via formação do complexo NLRP3/ASC e totalmente dependente de Caspase 1 (Figura 14). Esses dados sugerem ainda que além da imunidade adaptativa, ocorre também o envolvimento da imunidade inata na indução da suscetibilidade à sepse polimicrobiana após infecção crônica por *T. gondii*.

Figura 15. Produção de IL-1β por macrófagos depende do primeiro sinal por bactérias Gram positivas.

Células da medula óssea foram recuperadas e cultivadas por 7 dias com sobrenadante de células L929 (LCCM), para diferenciação de macrófagos. Em seguida foram estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (500ng/mL), Peptidoglicano (Pg) (10μg/mL) ou antígeno solúvel de *T. gondii* - STAg (10μg/mL) por durante 6 horas, sozinhos ou pré-estimulados com LPS ou Pg e re-estimulados com STAg por mais 6 horas. Um grupo controle positivo foi analisado, tendo sido pré-estimulado com LPS e re-estimulado com nigericina. Após período de incubação, o sobrenadante foi coletado e analisado quanto a produção de IL-1β por ELISA.

4.15 Células T reguladoras são importantes no controle da suscetibilidade à sepse polimicrobiana após infecção crônica por *T. gondii*

Após verificar que a via Th1 foi importante para determinar a gravidade da sepse polimicrobiana após infecção crônica com *T. gondii*, analisamos como estava esta condição em animais BALB/c, sabendo que estes animais apresentam uma menor resposta inflamatória em resposta à infecção por *T. gondii*, em parte por causa da alta produção de IL-4 e diminuída produção de IFN-γ. Observamos através da análise da sobrevivência após infecção crônica com 20 cistos de *T. gondii*, que animais BALB/c não apresentaram aumento da mortalidade durante a sepse polimicrobiana subletal como foi apresentado por animais C57BL/6. No entanto camundongos BALB/c depletados de células T reguladoras por utilização de anti-CD25, apresentaram aumento da mortalidade (Figura 16). Esses

dados sugerem que as células T reguladoras participam do mecanismo de proteção durante a sepse polimicrobiana após infecção crônica por *T. gondii*.

Figura 16. Animais BALB/c que foram cronicamente infectados por *T. gondii* são resistentes à sepse polimicrobiana, exceto por aqueles animais na qual foram depletadas as células T reguladoras.

Animais BALB/c foram tratados com anticorpo monoclonal anti-CD25 dois dias antes da infecção com 20 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e após 40 dias da infecção foram induzidos à sepse polimicrobiana subletal. Foram utilizados 6 animais por grupo e a taxa de sobrevivência foi monitorada por até 10 dias. Os resultados são expressos como percentual de sobrevivência. Valor de *p* foi considerado comparando os camundongos tratados e infectados submetidos à sepse contra animais não tratados. Para análise de significância foi utilizado o teste de Mantel-Cox log-rank.

Após observarmos que as células T reguladoras podem em parte estar protegendo camundongos BALB/c da suscetibilidade induzida contra a sepse polimicrobiana depois da infecção por *T. gondii*. Para confirmar a participação das células T reguladoras na proteção de camundongos BALB/c, avaliamos se estas células protegem os animais C57BL/6. Para isso, realizamos transferência de células T reguladoras 24 horas antes de induzir a sepse polimicrobiana nos camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*. Observamos que animais que foram infectados e receberam células T reguladoras apresentaram um aumento da sobrevivência durante a sepse polimicrobiana quando comparados aos animais que não receberam essas células (Figura 17). Esses dados revelam o papel protetor das células T reguladoras em nosso modelo experimental, que pode estar atuando na inibição da produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias.

Figura 17. A transferência de células T reguladoras para animais suscetíveis C57BL/6, melhorou a sobrevivência de animais previamente infectados com *T. gondii* com posterior indução de sepse polimicrobiana.

Animais C57BL/6 Thy 1.2 foram infectados com 5 cistos da cepa ME 49 de *T. gondii*, após 40 dias da infecção receberam 1×10^6 células T reguladoras ($CD4^+CD25^+$) 24 horas antes de serem submetidos à CLP. Foram utilizados 5 animais por grupo e a taxa de sobrevivência foi monitorada por até 10 dias. Os resultados são expressos como percentual de sobrevivência. Valor de *p* foi considerado comparando os camundongos infectados que receberam células T reguladoras e foram submetidos à sepse contra animais que foram infectados e submetidos à sepse. Para análise de significância foi utilizado o teste de Mantel-Cox log-rank.

4.16 Infecção crônica por *T. gondii* inibe respostas Th2 por meio da metilação de GATA3

Em paralelo, avaliamos se a infecção por *T. gondii* poderia estar demetilando sítios promotores do padrão de resposta Th1 e com isso levando a uma imediata resposta após indução de sepse polimicrobiana subletal. Para isso, realizamos análise epigenética em células $CD4^+$ do baço de animais C57BL/6 infectados com *T. gondii* para verificar o percentual de metilação nas regiões promotoras dos padrões de resposta Th1, Th2, Th17 e Tregs. Ao contrário do que esperávamos, não observamos demetilação no padrão Th1 de resposta, mas um aumento da metilação no promotor de GATA3 (fator de transcrição para padrão Th2), o qual já apresentava um percentual de metilação de 52% (Figura 18). Esses

dados sugerem que a infecção por *T. gondii* aumenta a metilação de GATA3, inibindo assim a via Th2 que tem função imunomoduladora durante a sepse experimental.

Symbol	Non infected	<i>T. gondii</i> infected	
Tbx21	1,32%	0,50%	Células Th1
Eomes	0,85%	0,27%	
Pparg	0,03%	0,00%	Células Th2
Gata3	52,62%	66,40%	
Il13	0,31%	0,17%	Células Th17
Rora	0,34%	0,27%	
Fos11	0,34%	0,08%	Células T reguladoras induzidas e naturais (iTreg & nTreg)
Irf4	3,05%	1,25%	
Irf8	0,03%	0,01%	
Myb	2,76%	0,86%	
Nr4a3	1,60%	1,87%	
Pou2f2	1,49%	0,55%	
Rel	0,01%	0,00%	
Relb	0,00%	0,04%	
Tg1f1	2,07%	0,96%	
Tnfsf11	1,57%	0,55%	
Chd7	0,35%	0,10%	Células T reguladoras versus convencionais
Gata4	0,17%	0,25%	
Hoxa10	0,52%	1,15%	
Id2	1,07%	0,51%	
Lrrc32	0,15%	0,20%	
Perp	0,48%	0,09%	

Figura 18. Infecção por *T. gondii* induz aumento de metilação na região promotora de GATA 3

Camundongos C57BL/6 foram infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e 40 dias após infecção, foram eutanasiados, o baço coletado e processado para isolamento das células. Após isolamento celular, as células TCD4⁺ foram separadas por seleção negativa através de beads magnéticas e realizada extração de DNA. A análise foi realizada usando o kit EpiTect Methyl II PCR Arrays, da Qiagen, no qual identifica a metilação gênica e indica o percentual da fração de DNA metilação ou não. Esta análise foi realizada em dois ensaios independentes, e a variação maior ou igual a 10% de metilação foi considerada significativa.

4.17 Animais previamente infectados com *T. gondii* desenvolveram hipotensão durante a sepse polimicrobiana subletal.

E por fim, para confirmar se os animais previamente infectados com *T. gondii* e induzidos à sepse polimicrobiana subletal estavam sofrendo choque séptico, realizamos aferição da pressão arterial. Observamos que os animais que foram previamente infectados com *T. gondii* e depois submetidos à CLP apresentaram queda da pressão arterial tanto sistólica quanto diastólica (Figura 19). Nossos dados sugerem que a infecção prévia por *T.*

gondii induz aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF e IL-1 β e hipotensão que somados, são fatores determinantes na indução do choque séptico durante a sepse grave.

Figura 19. Infecção prévia por *T. gondii* induz queda da pressão arterial durante a sepse polimicrobiana

Animais C57BL/6 foram infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e após 40 dias foram induzidos à sepse polimicrobiana subletal pelo método CLP. Após 24 horas da CLP, os animais foram submetidos à análise da pressão arterial utilizando esfigmomanômetro na calda do animal. Os dados são representados como milímetro de mercúrio (mmHg). As barras representam a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. Resultados similares foram obtidos em 2 experimentos independentes. Para análise estatística foi utilizado o programa Prisma, através de ANOVA uma via seguida pelo teste de Tukey.

5.1 Discussão

A maioria dos estudos da interação parasito-hospedeiro tem focado na interação de um único patógeno com as células ou organismo do hospedeiro. Porém, o hospedeiro em um ambiente natural é comumente exposto a múltiplos patógenos sequencialmente ou simultaneamente (TELFER *et al.*, 2010; JAMIESON *et al.*, 2010). Outro importante problema na interação parasito-hospedeiro demonstrados em modelos de coinfeção, é que a resposta imune contra um patógeno pode alterar a resposta imune contra o outro agente infeccioso (BAKALETZ, 2004). Vários estudos demonstram que, dependendo do tipo do patógeno, da proximidade temporal da infecção ou até mesmo da rota da infecção, uma variedade de desfechos são possíveis (BARTON *et al.*, 2007; GARDNER, 1981; GUMENSCHMEIMER *et al.*, 2007; HUMPHREYS *et al.*, 2008; NAVARINI *et al.*, 2006). Em nosso modelo experimental, realizamos infecção crônica por diferentes parasitos ou por fungo e analisamos sua influência sobre a resposta infecciosa aguda utilizando modelo de sepse polimicrobiana subletal.

A sepse inicia-se pela disseminação direta de patógenos para a corrente sanguínea, por translocação, a partir do sítio de infecção (intestino, no caso do modelo experimental do presente trabalho), e, uma vez disseminada na corrente sanguínea, a resposta do hospedeiro contra patógenos é mediada através do sistema imune inato e adaptativo (LEVER & MACKENZIE, 2007). O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa, enquanto que a imunidade adaptativa compreende um conjunto de células altamente especializadas que atuam no reconhecimento específico de patógenos e montam uma forte resposta para controlar, cada vez que o patógeno é reconhecido, montando a

memória dos epítomos do patógeno e modulando positiva ou negativamente a resposta imune (OBERHOLZER *et al.*, 2001).

Diversos estudos utilizam o modelo de CLP para estudar a sepse, no entanto nenhum deles apresenta modelo de coinfecção ou estudo relacionando infecções prévias e o desfecho da sepse polimicrobiana. Por outro lado, diversos estudos mostram que infecções prévias podem modular o sistema imune e com isso levar a uma falha ou aumento da resposta inflamatória contra outra infecção (LIESENFELD *et al.*, 2004; ERB *et al.*, 2002; MILLER *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, animais infectados cronicamente com os parasitos *L. major*, *T. cruzi* e com o fungo *P. brasiliensis*, não apresentaram diferenças nas taxas de sobrevivência dos animais induzidos à sepse polimicrobiana grave. No entanto, infecção crônica por *T. gondii* seguido da indução da sepse polimicrobiana grave levam a um aumento significativo da taxa de mortalidade, mostrando que a infecção prévia por este parasito conduz ao aumento da gravidade e da mortalidade durante à sepse polimicrobiana.

Para as infecções com *L. major* e *P. brasiliensis* que apresentam padrão misto de resposta Th1 e Th2, o que pode estar acontecendo é um equilíbrio na resposta imunológica e com isso o curso da resposta contra sepse polimicrobiana não está sendo alterado (LIU & UZONNA, 2012; ROMANO *et al.*, 2004). No entanto, para os parasitos *T. cruzi* (RASSI *et al.*, 2010) e *T. gondii* (MILLER *et al.*, 2009), que apresentam padrão de resposta predominantemente do padrão Th1, essa diferença não deveria estar ocorrendo, se considerarmos o padrão ativo de resposta. Porém, na infecção por *T. gondii* existe um fator relevante que é a quebra de tolerância à microbiota causada durante a infecção oral e o fato de que o modelo de sepse utilizado em nosso estudo seja o de ligadura e perfuração do ceco, a qual induz à liberação de bactérias da microbiota na cavidade peritoneal.

Existem diversos fatores que devem ser levados em consideração quando analisamos a infecção oral por *T. gondii*, visto que durante a fase aguda da infecção oral, ocorre lesão tecidual intestinal responsável pela liberação transitória de bactérias na cavidade peritoneal (entre o 5º e 10º dia de infecção) e com isso desencadeia produção de células de memória contra as mesmas (BENSON *et al.*, 2009; HAND *et al.*, 2012). Esse fenômeno tem sido observado nos estudos que mostraram que a infecção oral por *T. gondii*, mas não a peritoneal induz translocação de bactérias comensais que são as responsáveis pela ativação de TLRs do tipo 2, 4 e 9. Essa ativação é necessária para o combate do parasito e consequente ativação do sistema imune, agindo como adjuvantes na resposta contra *T. gondii* (EGAN *et al.*, 2001; HALL *et al.*, 2008; BENSON *et al.*, 2009). Além disso, estes estudos mostram que durante a fase aguda da infecção, ocorre mudança na composição e número de bactérias da microbiota, mais especificamente, bactérias Gram-negativas (enterobacteriaceae) que se acumulam no intestino e atravessam a barreira epitelial intestinal (RAETZ *et al.*, 2012). No entanto, nenhum trabalho relata que a infecção por *T. gondii* poderia de alguma forma interferir na resposta contra a sepse polimicrobiana induzida pelo método de CLP. As duas doenças toxoplasmose e sepse são comuns na população mundial, mas, não existem trabalhos correlacionando infecção por *T. gondii* com o desenvolvimento e gravidade da sepse.

Um dado interessante apresentado em nosso estudo é que animais previamente infectados com *T. gondii*, têm uma melhor resposta contra a sepse polimicrobiana subletal, com aumento do recrutamento celular, principalmente de neutrófilos para o sítio da infecção, responsável pelo aumento da eliminação da carga bacteriana apresentada. Corroborando com nossos estudos, Kasten e colaboradores, em 2010, mostraram que em camundongos OT-II (TCR específico para OVA), a ativação de células CD4⁺ com OVA medeia resposta contra a sepse com produção de IFN- γ e IL-17, que induzem ativação de

neutrófilos com aumento da morte bacteriana em modelos de sepse por CLP. Esse dado é interessante, visto que neutrófilos são de extrema importância no controle da replicação bacteriana (ALVES-FILHO *et al.*, 2088; ALVES-FILHO *et al.*, 2010; REDDY & STANDIFORD, 2010; KOVACH & STANDIFORD, 2012). Apesar da melhora na resposta contra as bactérias liberadas durante a CLP, os animais previamente infectados com *T. gondii* tiveram aumento da mortalidade.

Avaliamos a hipótese de que a sepse poderia estar desencadeando reativação da infecção por *T. gondii*. Essa hipótese foi levantada levando em consideração trabalhos que demonstraram que a sepse polimicrobiana grave pode induzir um estado de imunossupressão (DELANO *et al.*, 2006; WISNOSKI *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2010). A imunossupressão poderia estar desencadeando a reativação da infecção por *T. gondii*, que estava latente. No entanto, nosso estudo demonstra que a resposta imune da sepse polimicrobiana não está reativando a infecção crônica por *T. gondii*, visto que não há diferenças nas contagens de cistos e na quantificação de DNA do parasito recuperados do cérebro de animais somente infectados em comparação com animais que foram infectados e submetidos à sepse polimicrobiana.

Outro ponto analisado foi se a infecção crônica poderia estar predispondo os animais submetidos à sepse polimicrobiana a causar danos teciduais e com isso levar esses animais à morte, uma vez que trabalhos utilizando modelo experimental de sepse relatam que dano tecidual é fator agravante da sepse e predispõe os animais à morte (DINARELLO, 1997; FOLZ *et al.*, 1999). Em nosso modelo experimental não foram observados danos teciduais quando analisados a produção de mieloperoxidase no pulmão, nem a produção de enzimas representativas de danos renais, hepáticos, cardíacos e celulares, tendo sido analisada ainda a produção de exudato em diferentes órgãos que não se mostraram alterados quando comparados aos grupos controles. No entanto quando foi

realizada análise do tecido intestinal: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, observamos que animais que foram submetidos à infecção crônica por *T. gondii* e posteriormente induzidos à sepse polimicrobiana exibiram aumento no infiltrado celular nos diferentes sítios intestinais e perda de vilosidade na região ilíaca.

Ainda observando a resposta contra a sepse polimicrobiana, quando foi analisada a produção de citocinas pró-inflamatórias, foi visto que estavam bastante elevadas naqueles animais que foram infectados previamente com *T. gondii*, esse aumento pode estar diretamente relacionado com a indução da lesão intestinal observada nesses animais. Além disso, diversos trabalhos mostram que a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Estas citocinas são reconhecidas por outros autores como fatores determinantes da gravidade da sepse e implicam na evolução para o choque séptico (FONG *et al.*, 1989; CALANDRA & GLAUSER, 1990; DOFFERHOFF *et al.*, 1991; DINARELLO, 1997). Para confirmar se os animais estão sendo induzidos ao choque séptico, realizamos análise da pressão arterial desses animais e confirmam que somente animais que foram pré-infectados com *T. gondii* apresentam queda da pressão arterial após indução da sepse subletal polimicrobiana, confirmando evolução para choque séptico.

Em nosso estudo, os animais infectados com *T. gondii* mesmo na fase crônica apresentam produção aumentada de IFN- γ e quando foi induzida sepse polimicrobiana esses valores foram significativamente aumentados. Adicionalmente, em animais previamente infectados por *T. gondii* e depois submetidos à CLP, a concentração de TNF- α foi maior do que nos animais não infectados, mostrando que a infecção prévia por *T. gondii* induz aumento dessas duas citocinas, levando a um efeito sinérgico das duas infecções, agravando assim a sepse polimicrobiana subletal. Esse fato é importante, pois diversos trabalhos têm mostrado que polimorfismo no gene do TNF- α induz aumento desta citocina e gravidade da sepse, conduzindo ao choque séptico (TANG *et al.*, 2000; MIRA *et*

al., 1999; KOTHARI *et al.*, 2013). Além disso, essas duas citocinas têm a capacidade de ativar macrófagos que em decorrência disso, estariam produzindo mais óxido nítrico, o qual estava aumentado no sangue e lavado peritoneal desses animais.

Quando analisadas quais células estariam produzindo IFN- γ e TNF- α , foi observado que tanto células TCD4⁺ quanto TCD8⁺ são responsáveis pela produção dessas citocinas. Observamos também que a infecção por *T. gondii* leva à indução de células de memória do padrão Th1. A participação dessas células é condizente com a infecção por *T. gondii*, que na fase aguda da doença induz lesão intestinal com ativação do sistema imune contra bactérias intestinais que translocaram (EGAN *et al.*, 2001; HALL *et al.*, 2008; BENSON *et al.*, 2009) e quando induzida a sepse por CLP onde há a liberação dessas mesmas bactérias intestinais para a cavidade peritoneal, ocorre aumento da resposta imune adaptativa específica contra essas bactérias.

Na tentativa de desvendar quais foram os fatores essencialmente responsáveis pela morte dos animais, realizamos tratamento com aminoguanidina, inibidor seletivo de óxido nítrico sintase (enzima responsável pela produção de óxido nítrico) (SOUTHAN & SZABÓ, 1996). Porém não houve diferença na taxa de mortalidade quando animais foram tratados com este inibidor. No entanto, quando bloqueamos as citocinas IFN- γ e TNF- α com anticorpos monoclonais, neutralizantes para IFN- γ e TNF- α em pequenas concentrações, houve aumento da sobrevivência de animais que foram previamente infectados com *T. gondii* e posteriormente induzidos à sepse polimicrobiana subletal. Estes resultados mostram que a ação de ambas citocinas pode ser fator determinante do agravamento da sepse polimicrobiana subletal, sendo necessário um balanço da produção das mesmas, visto que são importantes no controle da infecção crônica por *T. gondii* (GAZZINELLI *et al.*, 1994), mas cuja elevação é danosa para o hospedeiro durante a sepse polimicrobiana.

Outro fator importante na resposta contra sepse polimicrobiana subletal após infecção crônica por *T. gondii* é que este parasito induz forte resposta Th1 que pode durar por toda a vida do hospedeiro (DENKERS & GAZZINELLI, 1998). Sendo importante determinar se a resposta Th1 específica contra *T. gondii* é responsável pela indução da suscetibilidade contra sepse polimicrobiana, foi induzida a imunização para primar o sistema imune dos animais para o padrão Th1 (utilizando OVA + CFA) e Th2 (utilizando OVA + Alumen) (SHIBAKI & KATZ, 2002; JEEVAN *et al.*, 2011, respectivamente). Quando induzido o padrão Th1 de resposta imune, foi observado aumento da mortalidade quando comparado com animais não imunizados ou imunizados para o padrão Th2, mostrando que não se trata especificamente de memória contra *T. gondii*, mas principalmente pela indução da resposta de padrão Th1 de resposta imune.

Análise da expressão de genes ativadores e repressores do IFN- γ , além dos TLRs que estariam envolvidos no reconhecimento tanto de *T. gondii*, quanto das bactérias da microbiota liberadas quando induzida a sepse polimicrobiana, mostra que células do baço de camundongos infectados cronicamente com *T. gondii*, após 40 dias da infecção apresentam maior expressão de genes para interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β) e do tipo II (IFN- γ), IL-12, IL-23, além dos receptores TLR-11 e TLR-12 que reconhecem profilina de *T. gondii*. E, quando submetidos à sepse polimicrobiana subletal, os animais mantêm a expressão de interferons do tipo I (IFN- α e β) e do tipo II (IFN- γ), e aumentam a expressão de IL-1 α e β , IL-6, COX-2, NOS 2, IL-10 e CXCL1 (KC), além de induzir o aumento da expressão específica de NLRP3. O NLRP3 é o gene ligado à ativação do inflamassoma, desencadeado pela via de ativação do TLR-2, único TLR com expressão aumentada depois da indução da sepse polimicrobiana. Porém, o aumento da expressão do TLR-2 não necessariamente indica aumento da ativação, a menos que tenha o ligante presente no microambiente.

Os dados acima confirmam o envolvimento da imunidade inata com a participação do inflamassoma em nosso modelo. Conforme descrito na literatura, a ativação do receptor de reconhecimento padrão TLR-2, presente na superfície celular, pode se dar pelo reconhecimento de lipopeptídeos e ácido lipoteicóico (TAKEUCHI *et al.*, 1999; UNDERHILL *et al.*, 1999) enquanto NOD2, um PRR citoplasmático ocorre pelo reconhecimento de muramil dipeptídeo, que é produto da quebra do peptidoglicano presente em bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (DESHMUKH *et al.*, 2009; HRUZ *et al.*, 2009), além disso, foi descrito que essa ativação é capazes de induzir aumento de NLRP3 e Pró-IL1 β , formando assim um complexo multiprotéico denominado de inflamassoma (NLRP3/ASC/Pró-caspase1). Essas vias levam à ativação de caspase1 que cliva pró-IL1 β e pró-IL-18 em IL1 β e IL-18 ativas (MUNOZ-PLANILLO *et al.*, 2009; CHO *et al.*, 2012; CASTOLDI *et al.*, 2012). Para analisar a participação da imunidade inata em nosso modelo verificamos por ensaios *in vitro*, a produção de IL-1 β utilizando agonistas para TLR-2 e TLR-4, que reconhecem peptidoglicano e lipopolissacarídeo, respectivamente. Realizamos este ensaio com a proposta de mimetizar o que ocorre *in vivo* no nosso modelo de estudo. Observamos que somente macrófagos que são estimulados por peptidoglicano, sinalizando via TLR-2 funciona como primeiro sinal que leva à formação do inflamassoma (NALRP3/ASC/Caspase-1) e quando reestimulado com antígeno de *T. gondii* (STAG), levam à produção de IL-1 β . Esses dados demonstram a participação do inflamassoma em nosso modelo de estudo, justificando a produção excessiva de IL-1 β no lavado peritoneal de animais pré-infectados com *T. gondii* que foram induzidos à sepse polimicrobiana subletal.

Para verificar o envolvimento direto dos TLRs neste modelo experimental, realizamos ensaio de sobrevida utilizando animais deficientes dos diferentes TLRs envolvidos tanto no reconhecimento da microbiota intestinal (TLR 2, 4 e 9) (RAKOFF-

NAHOUM *et al.*, 2004; CARIO & PODOLSKY, 2006) quanto no reconhecimento específico de *T. gondii* (TLR-11) (YAROVINSKY & SHER, 2006). Observamos que dos TLRs que reconhecem produtos bacterianos, somente animais deficientes de TLR-2 têm aumento da sobrevivência quando induzidos à sepse polimicrobiana subletal após infecção crônica por *T. gondii*. Além disso, animais deficientes de TLR-11 neste modelo, apresentam sobrevivência de 100%. Este dado é interessante visto que TLR-11/TLR-12 presentes em células dendríticas reconhecem a proteína profilina de *T. gondii* (ANDRADE *et al.*, 2013; KOBLANSKY. *et al.*, 2013), que ativa essas células e induz significativa produção de IL-12, ao mesmo tempo que ativa macrófagos a produzirem IFN- γ (PLATTNER *et al.*, 2008; YAROVINSKY *et al.*, 2005). Além disso, Raetz e colaboradores demonstraram que a infecção por *T. gondii* induz disbiose intestinal que é mediada por TLR-11, levando ao aumento de bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Gram-negativas), enquanto diminui Bacterioides, sendo essa alteração responsável pela lesão intestinal. Mais recentemente, foi mostrado que sob estimulação por antígeno solúvel do taquizoíta de *T. gondii* (STAg) ou profilina, o TLR-11 dimeriza com TLR-12 e colocaliza-se com UBC93B1 (proteína responsável pela translocação dos TLRs 3, 7 e 9 do retículo endoplasmático e consequente ativação dentro do endolisossoma) (KOBLANSKY. *et al.*, 2013; TABETA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2013), mostrando que TLR-11 e 12 participam juntos na resposta contra a infecção por *T. gondii*.

Além disso, trabalhos recentes têm mostrado que mudanças epigenéticas (mecanismos que podem incluir modificações químicas do DNA e/ou histonas associadas resultando em mudança da acessibilidade física dos fatores de transcrição ao DNA) (BIRD, 2007), podem ser responsáveis por alterações na resposta imune, levando a modulação positiva ou negativa da resposta imune. (CARSON *et al.*, 2011; BALLESTAR, 2011; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2012; TURGEON *et al.*, 2012; DANG *et al.*, 2013). Em

nosso estudo, desenvolvemos experimento para analisar metilação de DNA específicos na diferenciação de células T “helper”. Utilizamos para isso enzimas de restrição que agem clivando o DNA metilado, sendo uma sensível e outra dependente de metilação. Esse ensaio permitiu analisar a situação de metilação de ilhas CpG na região promotora da diferenciação das células T “helper”, observa-se que animais C57BL/6 não infectados apresentam metilação no gene promotor de GATA3, região promotora do padrão de resposta Th2, e quando o animal é infectado por *T. gondii*, essa metilação aumenta mais de 10%, valor considerado significativo. Isso nos leva a sugerir a razão pela qual camundongos C57BL/6 apresentam uma suscetibilidade intrínseca contra a infecção por *T. gondii*, pois, em decorrência desta metilação, leva ao silenciamento parcial do padrão Th2, tornando a resposta imune do animal mais propensa ao padrão Th1 de resposta imune, e com isso aumentando a resposta contra sepse polimicrobiana subletal, tornando-a prejudicial.

Levando em consideração a suscetibilidade intrínseca de animais C57BL/6 contra *T. gondii*, realizamos ensaios utilizando animais BALB/c, que são resistentes a essa infecção (CHEN *et al.*, 2005; MORAMPUDI *et al.*, 2011). Observamos que animais BALB/c que foram induzidos à sepse polimicrobiana subletal após infecção crônica por *T. gondii* não apresentaram o mesmo perfil de suscetibilidade apresentada pelos animais C57BL/6, exceto por aqueles animais que receberam anticorpo monoclonal anti-CD25, situação na qual foram depletadas células T reguladoras (OH *et al.*, 2009). Estes dados mostram que células T reguladoras são fundamentais pra proteger os animais BALB/c quando induzida sepse polimicrobiana subletal após a infecção por *T. gondii*.

Tendo visto que células T reguladoras são importantes para controlar a resistência à infecção contra *T. gondii* em animais BALB/c, a transferência de células T reguladoras do baço de animais C57BL/6 não infectados para animais infectados por *T. gondii* 24 horas

antes da indução da sepse polimicrobiana subletal tornou-os resistentes à coinfeção, o que confirma o papel fundamental dessas células no controle da resposta imune, tendo em vista que essas células inibem o desenvolvimento de inflamação induzida por células Th1 (XU *et al.*, 2003).

Coletivamente, nossos dados demonstram que animais previamente infectados por *T. gondii* apresentam aumento de mortalidade durante a sepse polimicrobiana subletal por diversos mecanismos, entre eles ativação do inflamassoma, silenciamento do padrão Th2, aumento da produção e liberação das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-1 β , aumento de óxido nítrico e consequente desenvolvimento de hipotensão. Sendo esses fatores suficientes para a indução de choque séptico em animais previamente infectados por *T. gondii* e induzidos à sepse polimicrobiana subletal.

6 CONCLUSÕES

6.1 Conclusões

Os animais cronicamente infectados por *T. gondii* apresentam aumento da mortalidade durante a sepse polimicrobiana subletal dependente da resposta imune inata e adaptativa.

Sugerimos a participação do sistema imune inato, através do aumento do recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção, além da possível ativação do inflamassoma por bactérias Gram-positivas, induzindo o primeiro sinal para a ativação desta via, e consequentemente algum subproduto da infecção por *T. gondii* induz a formação do inflamassoma NALRP3/ASC/Caspase-1, que cliva pró-IL-1 β em IL-1 β .

Sugerimos a participação do sistema imune adaptativo, pelo aumento de células TCD4⁺ e TCD8⁺ produtoras tanto IFN- γ como TNF- α , além disso, demonstramos que a infecção por *T. gondii* induz memória do padrão Th1 e silenciamento do padrão Th2.

Todos os resultados unidos sugerem que a infecção prévia por *T. gondii*, induz aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, que contribui para a hipotensão e predispõe os animais que são induzidos à sepse polimicrobiana subletal ao choque séptico.

7 REFERÊNCIAS

7.1 Referências

- ADAMS LB, HIBBS JB, JR, TAINTOR RR, KRAHENBUHL JL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **J Immunol**. 1990; 144(7): 2725–2729.
- ALIBERTI J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nat Rev Immunol**. 2005; 5(2): 162-70.
- ALIBERTI J, VALENZUELA JG, CARRUTHERS VB, HIENY S, ANDERSEN J, et al. (2003) Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. **Nat Immunol**. 2003; 4(5): 485–490.
- ALVES-FILHO JC, DE FREITAS A, SPILLER F, SOUTO FO, CUNHA FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**. 2008; 30(1): 3-9.
- ALVES-FILHO JC, SPILLER F, CUNHA FQ. Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock**. 2010; 34(1): 15-21.
- ALVES-FILHO JC, TAVARES-MURTA BM, BARJA-FIDALGO C, BENJAMIM CF, BASILE-FILHO A, ARRAES SM, CUNHA FQ. Neutrophil function in severe sepsis. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**. 2006; 6(2): 151-8.
- ANDRADE WA, SOUZA MC, RAMOS-MARTINEZ E, NAGPAL K, DUTRA MS, MELO MB, BARTHOLOMEU DC, GHOSH S, GOLENBOCK DT, GAZZINELLI RT. Combined Action of Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors and TLR11/TLR12 Heterodimers Imparts Resistance to *Toxoplasma gondii* in Mice. **Cell Host Microbe**. 2013; 13(1): 42-53.
- AZIZ M, JACOB A, YANG W-Y, MATSUDA A, E WANG P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. **J Leukoc Biol**. 2013; 93(3): 329-42.
- BAKALETZ LO. Developing animal models for polymicrobial diseases. **Nat Rev Microbiol**. 2004; 2: 552–568.
- BAKER CC, CHAUDRY IH, GAINES HO, BAUE AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery**. 1983; 94(2): 331-5.
- BALLESTAR E. Epigenetic alterations in autoimmune rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol**. 2011; 7(5): 263-71.
- BARTON ES, WHITE DW, CATHELYN JS, BRETT-MCCLELLAN KA, ENGLE M, DIAMOND MS, MILLER VL, VIRGIN H. W. T. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. **Nature**. 2007; 447: 326–329.

BENJAMIM CF, HOGABOAM CM, LUKACS NW, KUNKEL SL. Septic mice are susceptible to pulmonare aspergilosis. **Am J Pathol.** 2003; 163: 2605.

BENSON A, PIFER R, BEHRENDT CL, HOOPER LV, YAROVINSKY F. Gut commensal bacteria direct a protective immune response against *Toxoplasma gondii*. **Cell Host Microbe.** 2009; 6(2): 187–196.

BIRD A. Perceptions of epigenetics. **Nature.** 2007; 447: 396-398.

BLANCHETTE J, JARAMILLO M, E OLIVIER M. Signalling events involved in interferon- γ -inducible macrophage nitric oxide generation. **Immunology.** 2003; 108(4): 513–522.

BONE RC, R. A. BALK, F. B. CERRA, R. P. DELLINGER, A. M. FEIN, W. A. KNAUS, R. M. SCHEIN & W. J. SIBBALD. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest.**1992; 101: 1644-1655.

BONE RC, GRODZIN CJ, BALK RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Crit Care.** 1997; 112: 235-243.

BURAS JA, HOLZMANN B, SITKOVSKY M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov.** 2005; 4(10): 854-65.

CALANDRA T, GLAUSER MP. Cytokines and septic shock. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 1990; 13(5): 377-81.

CARIO, E., AND PODOLSKY, D.K. Toll-like receptor signaling and its relevance to intestinal inflammation. **Ann. N Y Acad. Sci.** 2006; 1072, 332–338.

CARSON IV WF, CAVASSANI A, DOU Y, KUNKEL SL. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. **Epigenetics.** 2011; 6(3): 273–283.

CASTOLDI A, BRAGA TT, CORREA-COSTA M, AGUIAR CF, BASSI EJ, CORREA-SILVA R, ELIAS RM, SALVADOR F, MORAES-VIEIRA PM, CENEDEZE MA, REIS MA, HIYANE MI, PACHECO-SILVA A, GONÇALVES GM, E CÂMARA NOS. TLR2, TLR4 and the MYD88 Signaling Pathway Are Crucial for Neutrophil Migration in Acute Kidney Injury Induced by Sepsis. **PLoS One.** 2012; 7(5): e37584.

CHEN LC, PACE JL, RUSSELL SW, E MORRISON DC. Altered regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages from senescent mice. **Infect Immun.** 1996; 64(10): 4288–4298.

CHEN X, OPPENHEIM JJ, HOWARD OM. BALB/c mice have more CD4+CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4+CD25-responder T cells than C57BL/6 mice. **J Leukoc Biol.** 2005; 78(1): 114-21.

CHO JS, GUO Y, RAMOS RI, HEBRONI F, PLAISIER SB, XUAN C, GRANICK JL, MATSUSHIMA H, TAKASHIMA A, IWAKURA Y, CHEUNG AL, CHENG G, LEE DJ, SIMON SI, MILLER LS. Neutrophil-derived IL-1 β is sufficient for abscess formation in immunity against *Staphylococcus aureus* in mice. **PLoS Pathog.** 2012; 8(11): e1003047.

CUTHBERTSON BH, ROUGHTON S, JENKINSON D, MACLENNAN G, E VALE L. Quality of life in the five years after intensive care: a cohort study. **Crit Care.** 2010; 14(1): R6.

DANG MN, BUZZETTI R, POZZILLI P. Epigenetics in autoimmune diseases with focus on type 1 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev.** 2013; 29(1): 8-18.

DAVID CF. Sepsis da bancada ao leito. **Revinter** 2007; V1, 3-11.

DEBIERRE-GROCKIEGO F, CAMPOS MA, AZZOUZ N, SCHMIDT J, BIEKER U, RESENDE MG, MANSUR DS, WEINGART R, SCHMIDT RR, GOLENBOCK DT, GAZZINELLI RT, SCHWARZ RT. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.** 2007; 179(2): 1129–1137.

DEJAGER L, PINHEIRO I, DEJONCKHEERE E E LIBERT C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiol.** 2011; 19(4): 198-208.

DELANO MJ, SCUMPIA PO, WEINSTEIN JS, COCO D, NAGARAJ S, KELLY-SCUMPIA KM, O'MALLEY KA, WYNN JL, ANTONENKO S, AL-QURAN SZ, SWAN R, CHUNG CS, ATKINSON MA, RAMPHAL R, GABRILOVICH DI, REEVES WH, AYALA A, PHILLIPS J, LAFACE D, HEYWORTH PG, CLARE-SALZLER M, MOLDAWER LL. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+) CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. **J Exp Med.** 2007; 204(6): 1463-74.

DENKERS EY. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. **Microbes Infect.** 1999; 1(9): 699-708.

DENKERS EY E GAZZINELLI RT. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. **Clin Microbiol Rev.** 1998; 11(4): 569–588.

DESHMUKH HS, HAMBURGER JB, AHN SH, MCCAFFERTY DG, YANG SR, et al. Critical role of NOD2 in regulating the immune response to *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun.** 2009; 77: 1376–1382.

DINARELLO CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest.** 1997; 112(6): 321S-329S.

DOFFERHOFF AS, VELLENGA E, LIMBURG PC, VAN ZANTEN A, MULDER PO, WEITS J. Tumour necrosis factor (cachectin) and other cytokines in septic shock: a review of the literature. **Neth J Med.** 1991; 39(1-2): 45-62.

DUBEY, J. P., JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **Int J Parasitol.** 2008; 38: 1257-78.

DUBEY J.P., LINDSAY, D.S., SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev.** 1998; 11(2): 267-99.

EBONG SJ, CALL DR, BOLGOS G, NEWCOMB DE, GRANGER JI, O'REILLY M, REMICK DG. Immunopathologic responses to non-lethal sepsis. **Shock.** 1999; 12(2): 118-26.

EGAN C. E. , MAURER K. J. , COHEN S. B. , MACK M. , SIMPSON K. W. , AND DENKERS E. Y. Synergy Between Intraepithelial Lymphocytes and Lamina Propria T Cells Drives Intestinal Inflammation During Infection. **Mucosal Immunol.** 2011; 4(6): 658–670.

ELMORE SA, JONES JL, CONRAD PA, PATTON S, LINDSAY DS, DUBEY JP. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends Parasitol.** 2010; 26(4): 190-6.

ERB KJ, TRUJILLO C, FUGATE M, E MOLL E. Infection with the Helminth *Nippostrongylus brasiliensis* Does Not Interfere with Efficient Elimination of *Mycobacterium bovis* BCG from the Lungs of Mice. **Clin Diagn Lab Immunol.** 2002; 9(3): 727–730.

ESTELLER, M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. **Hum. Mol. Genet.** 2007; 16 Spec 1: R50-9.

FENOY IM, CHIURAZZI R, SÁNCHEZ VR, ARGENZIANO MA, SOTO A, PICCHIO MS, MARTIN V, GOLDMAN A. *Toxoplasma gondii* infection induces suppression in a mouse model of allergic airway inflammation. **PLoS One.** 2012; 7(8): e43420.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ A, BARAGAÑO RANEROS A, CARVAJAL PALAO R, SANZ AB, ORTIZ A, ORTEGA F, SUÁREZ-ÁLVAREZ B, LÓPEZ-LARREA C. DNA demethylation and histone H3K9 acetylation determine the active transcription of the NKG2D gene in human CD8 (+) T and NK cells. **Epigenetics.** 2013; 8(1): 66-78.

FOLZ RJ, ABUSHAMAA AM, SULIMAN HB. Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia. **J Clin Invest.** 1999; 103(7): 1055-66.

FONG Y, TRACEY KJ, MOLDAWER LL, HESSE DG, MANOGUE KB, KENNEY JS, LEE AT, KUO GC, ALLISON AC, LOWRY SF, et al. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. **J Exp Med.** 1989; 170(5): 1627-33.

FRANCHI, L., MUNˆ OZ-PLANILLO, R., AND NU N EZ, G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. **Nat. Immunol.** 2012; 13: 325–332.

FUX B, FERREIRA AM, CASSALI GD , TAFURI WL, VITOR RWA. Experimental Toxoplasmosis in BALB/c Mice. Prevention of Vertical Disease Transmission by Treatment and Reproductive Failure in Chronic Infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2000; 95(1): 121-126.

GARDNER ID. Suppression of antibacterial immunity by infection with influenza virus. **J Infect Dis.** 1981; 144: 225–231.

GAZZINELLI RT, HAKIM FT, HIENY S, SHEARER GM, SHER A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **J. Immunol.** 1991; 146: 286–292.

GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HAYASHI, S., DENKERS, E.Y., HIENY, S., CASPAR, P., TRINCHIERI, G., AND SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** 1994; 153: 2533–2543.

GEISS GK, BUMGARNER RE, BIRDITT B, DAHL T, DOWIDAR N, DUNAWAY DL, FELL HP, FERREE S, GEORGE RD, GROGAN T, JAMES JJ, MAYSURIA M, MITTON JD, OLIVERI P, OSBORN JL, PENG T, RATCLIFFE AL, WEBSTER PJ, DAVIDSON EH, HOOD L, DIMITROV K. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. **Nat Biotechnol.** 2008; 26(3): 317-25.

GUMENSCHMEIER M, BALKOW S, SIMON MM, JIRILLO E, GALANOS C, FREUDENBERG MA. Stage of primary infection with lymphocytic choriomeningitis virus determines predisposition or resistance of mice to secondary bacterial infections. **Med Microbiol Immunol.** 2007; 196: 79–88.

GUPTA N, HARTMANN A, LUCIUS R, VOELKER DR. The obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* secretes a soluble phosphatidylserine decarboxylase. **J Biol Chem.** 2012; 287(27): 22938-47.

HALL, J. A.; BOULADOUX, N.; SUN, C. M.; WOHLFERT, E. A.; BLANK, R. B.; ZHU, Q.; GRIGG, M. E.; BERZOFSKY, J. A. BELKAID, Y. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. **Immunity.** 2008; 29(4): 637-49.

HAND TW, DOS SANTOS LM, BOULADOUX N, MOLLOY MJ, PAGÁN AJ, PEPPER M, MAYNARD CL, ELSON CO 3RD, BELKAID Y. Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. **Science.** 2012; 337(6101): 1553-6.

HEIMESAAT MM et al ., Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** 2006; 177: 8785.

HRUZ P, ZINKERNAGEL AS, JENIKOVA G, BOTWIN GJ, HUGOT JP, et al. NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* through a-toxin-independent innate immune activation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106: 12873– 12878.

HUMPHREYS TD, KHANOLKAR A, BADOVINAC VP, HARTY JT. Generation and maintenance of *Listeria*-specific CD8+ T cell responses in perforin-deficient mice chronically infected with LCMV. **Virology**. 2008; 370: 310–322.

JAENISCH, R.; BIRD, A. "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals". **Nature Genetics** 2003; 33 Suppl (3s): 245–254.

JAMIESON AM, YU S, ANNICELLI CH, MEDZHITOV R. Influenza virus-induced glucocorticoids compromise innate host defense against a secondary bacterial infection. **Cell Host Microbe**. 2010; 7(2): 103-14.

JEEVAN A, YOSHIMURA T, LY LH, DIRISALA VR, MCMURRAY DN. Cloning of guinea pig IL-4: reduced IL-4 mRNA after vaccination or *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Tuberculosis** (Edinb). 2011; 91(1): 47-56.

JENKINS MC, TUO W, FENG X, CAO L, MURPHY C, FETTERER R. *Neospora caninum*: cloning and expression of a gene coding for cytokine-inducing profilin. **Exp Parasitol**. 2010; 125(4): 357–362.

JONES JL, KRUSZON-MORAN D, SANDERS-LEWIS K, WILSON M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999 2004, decline from the prior decade. **Am J Trop Med Hyg**. 2007; 77(3): 405-10.

KANNEGANTI, T.D., OZOREN, N., BODY-MALAPEL, M., AMER, A., PARK, J.H., FRANCI, L., WHITFIELD, J., BARC HET, W., COLONNA, M., VANDENABEE LE, P., et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. **Nature** 2006; 440: 233–236.

KASPER L, COURRET N, DARCHE S, LUANGSAY S, MENNECHET F, MINNS L, RACHINEL N, RONET C, BUZONI-GATEL D. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. **Int J Parasitol**. 2004; 34(3): 401-9.

KASTEN KR, TSCHÖP J, ADEDIRAN SG, HILDEMAN DA, CALDWELL CC. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis. **Shock**. 2010; 34(4): 327-36.

KASTEN KR, TSCHÖP J, GOETZMAN HS, ENGLAND LG, DATTILO JR, CAVE CM, SEITZ AP, HILDEMAN DA, CALDWELL CC. T-cell activation differentially mediates the host response to sepsis. **Shock**. 2010; 34(4): 377-83.

KAWAI T e AKIRA S. The role os pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like Receptors. **Nat. Immunol**. 2010; 11: 373-384.

KIRKEBØEN KA, STRAND OA. Nitric oxide - an important mediator in sepsis? **Tidsskr Nor Laegeforen**. 1999; 119(27): 4061-5.

KOBLANSKY AA, JANKOVIC D, OH H, HIENY S, SUNGNAK W, MATHUR R, HAYDEN MS, AKIRA S, SHER A, GHOSH S. Recognition of Profilin by Toll-like Receptor 12 Is Critical for Host Resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunity**. 2013; 38(1): 119-30.

KOTHARI N, BOGRA J, ABBAS H, KOHLI M, MALIK A, KOTHARI D, SRIVASTAVA S, SINGH PK. Tumor Necrosis Factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock. **Cytokine**. 2013; 61(2): 676-81.

KOVACH MA, STANDIFORD TJ. The function of neutrophils in sepsis. **Curr Opin Infect Dis**. 2012; 25(3): 321-7.

LAMBERT H, BARRAGAN A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cell Microbiol**. 2012; 12: 292–300.

LANGERMANS JA, VAN DER HULST MEB, NIBBERING PH, HIEMSTRA PS, FRANSEN L, VAN FURTH R. IFN- γ induce L-arginine-dependent toxoplasma static activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . **J Immunol**. 1992; 148: 568–574.

LEVER, A., MACKENZIE, I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. **BMJ**. 2007; 335: 879–883.

LIESENFELD O, DUNAY IR, ERB KJ. Infection with *Toxoplasma gondii* reduces established and developing Th2 responses induced by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. **Infect Immun**. 2004; 72(7): 3812-22.

LIESENFELD O, KOSEK J, REMINGTON JS, SUZUKI Y. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J Exp Med**. 1996; 184(2): 597-607.

LIU D E UZONNA JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**. 2012; 2: 83.

MAIER S, TRAEGER T, ENTLEUTNER M, WESTERHOLT A, KLEIST B, HÜSER N, HOLZMANN B, STIER A, PFEFFER K, HEIDECKE CD. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. **Shock**. 2004; 21(6): 505-11.

MARIM FM, SILVEIRA TN, LIMA DS JR, ZAMBONI DS. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One**. 2010; 5(12): e15263.

MARRACK P, MCKEE AS, & MUNKS MW. Timeline: Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nat Rev Immunol**. 2009; 9 (4); 287-293.

MASHAYEKHI M, SANDAU MM, DUNAY IR, FRICKEL EM, KHAN A, et al. CD8alpha(+) Dendritic Cells Are the Critical Source of Interleukin-12 that Controls Acute Infection by *Toxoplasma gondii* Tachyzoites. **Immunity**. 2011; 35: 249–259.

MEDZHITOV R, JANEWAY C JR. Innate immunity. **N Engl J Med**. 2000; 343: 338-44.

MEINZER U, BARREAU F, ESMIOL-WELTERLIN S, JUNG C, VILLARD C, LÉGER T, BEN-MKADDEM S, BERREBI D, DUSSAILLANT M, ALNABHANI Z, ROY M, BONACORSI S, WOLF-WATZ H, PERROY J, OLLENDORFF V, HUGOT JP. *Yersinia pseudotuberculosis* effector YopJ subverts the Nod2/RICK/TAK1 pathway and activates caspase-1 to induce intestinal barrier dysfunction. **Cell Host Microbe**. 2012; 1(4): 337-51.

MILLER CM, BOULTER NR, IKIN RJ, SMITH NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**. 2009; 39: 23–39.

MILLER CM, SMITH NC, IKIN RJ, BOULTER NR, DALTON JP, DONNELLY S. Immunological interactions between 2 common pathogens, Th1-inducing protozoan *Toxoplasma gondii* and the Th2-inducing helminth *Fasciola hepatica*. **PLoS One**. 2009; 4(5): e5692

MIRA JP, CARIOU A, GRALL F, DELCLAUX C, LOSSER MR, HESHMATI F, CHEVAL C, MONCHI M, TEBOUL JL, RICHÉ F, LELEU G, ARBIBE L, MIGNON A, DELPECH M, DHAINAUT JF. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. **JAMA**. 1999; 282(6): 561-8.

MONTOYA, J. G., LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**. 2004; 363: 1965-76.

MORAMPUDI V, DE CRAEYE S, LE MOINE A, DETIENNE S, BRAUN MY, D'SOUZA S. Partial depletion of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T regulatory cells significantly increases morbidity during acute phase *Toxoplasma gondii* infection in resistant BALB/c mice. **Microbes Infect**. 2011; 13(4): 394-404.

MUNOZ M, LIESENFELD O, HEIMESAAT MM, Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunol. Rev**. 2011; 240 (1): 269-85.

MUNOZ-PLANILLO R, FRANCHI L, MILLER LS, NUNEZ G. A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. **J Immunol**. 2009; 183: 3942–3948.

NASCIMENTO DC, ALVES-FILHO JC, SÔNEGO F, FUKADA SY, PEREIRA MS, BENJAMIM C, ZAMBONI DS, SILVA JS, CUNHA FQ. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. **Crit Care Med**. 2010; 38(8): 1718-25.

NAVARINI AA, RECHER M, LANG KS, GEORGIEV P, MEURY S, BERGTHALER A, FLATZ L, BILLE J, LANDMANN R, ODERMATT B, et al. Increased susceptibility to bacterial superinfection as a consequence of innate antiviral responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2006; 103: 15535–15539.

NICHOLS B A, O'CONNOR G R. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. **Lab Invest.** 1981; 44: 324–335.

OBERHOLZER, A, OBERHOLZER, C, MOLDAWER, LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. **Shock.** 2001; 16, 83–96.

OH U, BLEVINS G, GRIFFITH C, RICHERT N, MARIC D, LEE CR, MCFARLAND H, JACOBSON S. Regulatory T cells are reduced during anti-CD25 antibody treatment of multiple sclerosis. **Arch Neurol.** 2009; 66(4): 471-9.

OLDENHOVE G, BOULADOUX N, WOHLFERT EA, HALL JA, CHOU D, DOS SANTOS L, O'BRIEN S, BLANK R, LAMB E, NATARAJAN S, KASTENMAYER R, HUNTER C, GRIGG ME, BELKAID Y. Decrease of Foxp3⁺ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. **Immunity.** 2009; 31 (5), 772-86.

ORDWAY JM, BEDELL JA, CITEK RW, NUNBERG A, GARRIDO A, KENDALL R, STEVENS JR, CAO D, DOERGE RW, KORSHUNOVA Y, HOLEMON H, MCPHERSON JD, LAKEY N, LEON J, MARTIENSSEN RA, JEDDELOH JA. Comprehensive DNA methylation profiling in a human cancer genome identifies novel epigenetic targets. **Carcinogenesis** 2006; 27: 2409-23.

OSUCHOWSKI, M. F., K. WELCH, J. SIDDIQUI & D. G. REMICK. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. **J Immunol.** 2006; 177: 1967-74.

PERL M, CHUNG CS, GARBER M, HUANG X, AYALA A. Contribution of anti-inflammatory/immune suppressive processes to the pathology of sepsis. **Front Biosci.** 2006; 11: 272-99.

PLATTNER F, YAROVINSKY F, ROMERO S, DIDRY D, CARLIER MF, SHER A, SOLDATI-FAVRE D. Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. **Cell Host Microbe.** 2008; 3(2): 77-87.

RAETZ M, HWANG SH, WILHELM CL, KIRKLAND D, BENSON A, STURGE CR, MIRPURI J, VAISHNAVA S, HOU B, DEFRANCO AL, GILPIN CJ, HOOPER LV, YAROVINSKY F. Parasite-induced T(H)1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. **Nat Immunol.** 2012; 14(2): 136-42.

RAKOFF-NAHOUM, S., PAGLINO, J., ESLAMI-VARZANEH, F., EDBERG, S., AND MEDZHITOV, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell.** 2004; 118: 229–241.

RASSI AJR, RASSI A, MARIN-NETO JA. Chagas disease. **The Lancet.** 2010; 375 (9723): 1388 - 1402.

RATHINAM VAK, VANAJA SK, WAGGONER L, SOKOLOVSKA A, BECKER C, STUART LM, LEONGJM E FITZGERALD KA. TRIF Licenses Caspase-11-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation by Gram-Negative Bacteria. **Cell**. 2012; 150: 1–14.

RATHINAM VA e FITZGERALD KA. Cytosolic surveillance and antiviral. Immunity. **Curr. Opin. Virol**. 2011; 1(6): 455–462.

REDDY RC, STANDIFORD TJ. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. **Curr Opin Hematol**. 2010; 17(1): 18-24.

REIS E SOUSA C, HIENY S, SCHARTON-KERSTEN T, JANKOVIC D, CHAREST H, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **J Exp Med**. 1997; 186: 1819–1829.

REMICK DG, NEWCOMB DE, BOLGOS GL, CALL DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**. 2000; 13(2): 110-6.

RIEDEMANN NC, GUO R-F, WARD PA. The enigma of sepsis. **J Clin Invest**. 2003; 112 (4): 460-167.

RITTIRSCH D, FLIERL MA, WARD PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nat Rev Immunol**. 2008; 8(10): 776-87.

RITTIRSCH D, HUBER-LANG MS, FLIERL MA, WARD PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nat Protoc**. 2009; 4(1): 31-6.

ROMANO CC, MENDES-GIANNINI MJ, DUARTE AJ, BENARD G. The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. **Clin Immunol**. 2005; 114: 86–94.

SANDER, L.E., DAVIS, M.J., BOEKSCHOTEN, M.V., AMSEN, D., DASCHER, C.C., RYFFEL, B., SWANSON, J.A., MULLER, M., AND BLANDER, J.M . Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. **Nature** 2011; 474 , 385–389 .

SCANGA CA, ALIBERTI J, JANKOVIC D, TILLOY F, BENNOUNA S, DENKERS EY, MEDZHITOV R, SHER A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **J Immunol**. 2002; 168(12): 5997–6001.

SCHMID A, PUJIM J, CHEVROLET JC, MARSCH S, LUDWING S, STOCKER R, et al. Burden of illness imposed by severe sepsis in Switzerland. **Swiss Med Wkly**. 2004; 134: 97-102.

SCUMPIA PO, DELANO MJ, KELLY KM, O'MALLEY KA, EFRON PA, MCAULIFFE PF, BRUSKO T, UNGARO R, BARKER T, WYNN JL, ATKINSON MA, REEVES WH,

SALZLER MJ, MOLDAWER LL. Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. **J Immunol.** 2006; 177(11): 7943-9.

SHIBAKI A, KATZ SI. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. **Exp Dermatol.** 2002; 11(2): 126-34.

SILVA E, PEDRO M A, SOGAYAR AC, MOHOVIC T, SILVA CLO, JANISZEWSKI M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care.** 2004; 8(4): 251–260.

SOUTHAN GJ, SZABÓ C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. **Biochem Pharmacol.** 1996; 51(4): 383-94.

STROWIG T, HENAO-MEJIA J, ELINAV E, FLAVELL R. Inflammasomes in health and disease. **Nature.** 2012; 481(7381): 278-86.

TABETA K, HOEBE K, JANSSEN EM, DU X, GEORGEL P, CROZAT K, MUDD S, MANN N, SOVATH S, GOODE J, SHAMEL L, HERSKOVITS AA, PORTNOY DA, COOKE M, TARANTINO LM, WILTSHIRE T, STEINBERG BE, GRINSTEIN S, BEUTLER B. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. **Nat Immunol.** 2006; 7(2): 156-64.

TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors. **Annu Rev. Immunol.** 2003; 21: 335-76.

TAKEUCHI O, HOSHINO K, KAWAI T, SANJO H, TAKADA H, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity.** 1999; 11: 443–451.

TANG GJ, HUANG SL, YIEN HW, CHEN WS, CHI CW, WU CW, LUI WY, CHIU JH, LEE TY. Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection. **Crit Care Med.** 2000; 28(8): 2733-6.

TELFER S, LAMBIN X, BIRTLES R, BELDOMENICO P, BURTHE S, PATERSON S, BEGON M. Species Interactions in a Parasite Community Drive Infection Risk in a Wildlife Population. **Science.** 2010; 330(6001): 243-6.

TENTER AM, HECKEROTH AR, WEISS LM. Toxoplasma gondii: from animals to humans. **Int J Parasitol.** 2000; 30(12-13): 1217-58.

TURGEON N, BLAIS M, DELABRE JF, ASSELIN C. The histone H3K27 methylation mark regulates intestinal epithelial cell density-dependent proliferation and the inflammatory response. **J Cell Biochem.** 2013; 14(5): 1203-15.

UNDERHILL DM, OZINSKY A, HAJJAR AM, STEVENS A, WILSON CB, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature.** 1999; 401: 811–815.

VAN DER POLL T, VAN ZOELLEN MAD, WIERSINGA WJ. Regulation of Pro-and Anti-Inflammatory Host Responses. Sepsis – Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Responses. **Contrib Microbiol.** 2011; 17: 125–136.

XU D, LIU H, KOMAI-KOMA M, CAMPBELL C, MCSHARRY C, ALEXANDER J, LIEW FY. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice. **J Immunol.** 2003; 170(1): 394-9.

WANG JS, DENG JC. Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression. **J. Mol. Med (Berl).** 2008; 86: 495-506.

WICHTERMAN KA, BAUE AE, CHAUDRY IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res.** 1980; 29(2): 189-201.

WISNOSKI N, CHUNG CS, CHEN Y, HUANG X, AYALA A. The contribution of CD4+ CD25+ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. **Shock.** 2007; 27(3): 251-7.

YAP GS, SHER A. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. **Immunobiology.** 1999; 201(2): 240-7.

YAROVINSKY F, SHER A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.** 2006; 36: 255–259.

YAROVINSKY F, ZHANG D, ANDERSEN JF, BANNENBERG GL, SERHAN CN, HAYDEN MS, HIENY S, SUTTERWALA FS, FLAVELL RA, GHOSH S, SHER A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science.** 2005; 308(5728): 1626–1629.

ZHAO W, TILTON RG, CORBETT JA, MCDANIEL ML, MISKO TP, WILLIAMSON JR, CROSS AH, HICKEY WF. Experimental allergic encephalomyelitis in the rat is inhibited by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide synthase. **J Neuroimmunol.** 1996; 64: 123–133.

8.1 Anexo 1 – Lista de primers utilizados para a análise NanoString

Gene Name	TargetSeq	ProbeID
GAPDH	AGGTTGTCTCCTGCGACTTCAACAGCAACTCCCACTCTTCCACCTTCGATGCCGGGGCTGGCATTGCTCTCAATGACAACCTTTGTCAAGCTCATTTCTG	NM_001001303.1:890
GUSB	AATACGTGGTCGGAGAGCTCATCTGGAATTTGCGCGACTTCATGACGAACCAGTCACCGCTGAGAGTAATCGGAAACAAGAAGGGGATCTTCACTCGCCA	NM_010368.1:1735
viperin	TGCTGGGAGAATAGGGGATGATCTAGTGGACATTTGTTAAGTGTTACAGGCTGATGCCTTGTGTCCCATGACTGATTGATGCAGAGTAGTAATGCTGTGA	NM_021384.2:3185
tlr3	TTTCTCTGGGCTGAAGTGGACAAATCTCACCCAGCTCGATCTTTCCTACAACAACCTCCATGATGTGCGCAACGGTTCCTTCTCCTATCTCCCAAGCCTG	NM_126166.2:1165
Ifng	CTAGCTCTGAGACAATGAACGCTACACACTGCATCTTGGCTTTGCAGCTCTTCTCATGGCTGTTTCTGGCTGTTACTGCCACGGCACAGTCATTGAAAG	NM_008337.1:95
Il-1b	GTTGATTCAAGGGGACATTAGGCAGCACTCTCTAGAACAGAACCTAGCTGTCAACGTGTGGGGGATGAATTGGTCATAGCCCGCACTGAGGTCTTTCATT	NM_008361.3:1120
Il-10	GGGCCCTTTGCTATGGTGTCTTTCAATTGCTCTCATCCCTGAGTTCAGAGCTCCTAAGAGAGTTGTGAAGAAACTCATGGGTCTTGGAAGAGAAACCA	NM_010548.1:985
tlr2	GCAGGCGGTCACTGGCAGGAGATGTGTCCGCAATCATAGTTTCTGATGGTGAAGGTTGGACGGCAGTCTCTGCGACCTAGAAGTGGAAAAGATGTCGTTC	NM_011905.2:255
rig-i	CCTCGTGCCACGTCAAGGAGTATTTCTACACCAGCAGCAAGTGCTCCAATCTTGCAGTCGTGTTTGTCACTCGAAGGAACCGCCAAGTGTGTGCCAACCC	NM_013653.1:165
tnfa	TTCCTGAGTTCTGCAAAGGGAGAGTGGTCAGGTTGCCTCTGTCTCAGAATGAGGCTGGATAAGATCTCAGGCCTTCTACCTTCAGACCTTTCCAGACTC	NM_013693.1:1135
Irf7	CGCTGTGCACTCCACAGCACAGGGCGTTTATCTTGCGCCAAGACAATTCAGGGGATCCAGTTGATCCGCATAAGGTGTACGAACCTAGCCGGGAGCTTG	NM_016850.2:705
tlr4	AACGGCAACTTGACCTGAGGAGAACAACCTCTGGGGCCTAAACCCAGTCTGTTTGCAATTAATAAATGCTACAGCTCACCTGGGGCTCTGCTATGGAC	NM_021297.2:2510
Il6	CTCTCTGCAAGAGACTTCCATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGATGCTGGTGACAACCACGGCCTTCCCTACTTCACAAGTCCGGAGAGGAGACTTCACAG	NM_031168.1:40
Il-1a	ACCTCTGAAACGTCAAAGATGTCAAACCTTACCTTCAAGGAGAGCCGGGTGACAGTATCAGCAACGTCAAGCAACGGGAAGATTCTGAAGAAGAGACGGC	NM_010554.4:225
Il12a	TCATGAAGACATCACACGGGACCAAACCAGCACATTGAAGACCTGTTTACCACTGGAACCTACACAAGAACGAGAGTTGCCTGGCTACTAGAGAGACTTCT	NM_008351.1:355
Il12b	TCGTAGAGAAGACATCTACCGAAGTCCAATGCAAAGGCGGGAATGTCTGCGTGCAAGCTCAGGATCGCTATTACAATTCCTCGTGCAGCAAGTGGGCATG	NM_008352.1:1045
stat1	ACGCTGGGAACAGAACTAATGAGGGGCCTCTCATTGTCACCGAAGAACCTTCACTCTCTTAGCTTTGAAACCCAGTTGTGCCAGCCAGGCTTGGTGATTGA	NM_009283.3:1590
soes1	CAGCTTGTGTCTGGGGCCAGGACCTGAATTCCACTCCTACCTCTCCATGTTTACATATTCCCAGTATCTTTGCACAAACCAGGGGTCGGGGAGGGTCTCT	NM_009896.2:1020
Ifnb1	GATGAACTCCACCAGCAGACAGTGTTTCTGAAGACAGTACTAGAGGAAAAGCAAGAGGAAAGATTGACGTGGGAGATGTCCTCAACTGCTCTCCACTTGA	NM_010510.1:335
cox2	CCATCAGTTTTTCAAGACAGATCATAAGCGAGGACCTGGGTTACCCGAGGACTGGGCCATGGAGTGGACTTAAATCACATTTATGGTGAAACTCTGGAC	NM_011198.3:675
excl10	AGGACGGTCCGCTGCAACTGCATCCATATCGATGACGGGCCAGTGAGAATGAGGGCCATAGGGAAGCTTGAAATCATCCCTGCGAGCCTATCCTGCCCCAC	NM_021274.1:115
Il23a	CAAGGACAACAGCCAGTTCTGCTTGCAAAGGATCCGCCAAGGTCTGGCTTTTTATAAGCACCTGCTTGACTCTGACATCTTCAAAGGGGAGCCTGCTCTA	NM_031252.1:360
excl1	TGCTAGTAGAAGGGTGTTGTGCGAAAAGAAGTGCAGAGAGATAGAGTTAGTATTATGTTTGTATGTATTAGGGTGAGGACATGTGTGGGAGGCTGTGT	NM_008176.1:560

Gene Name	TargetSeq	ProbeID
Il-18	ACTTTGGCCGACTTCACTGTACAACCGCAGTAATACGGAATATAAATGACCAAGTTCTCTTCGTTGACAAAAGACAGCCTGTGTTGAGGATATGACTGA	NM_008360.1:270
HPRT1	TGCTGAGGCGGCGAGGGAGAGCGTTGGGCTTACCTCACTGCTTTCCGGAGCGGTAGCACCTCCTCCGCCGGCTTCCTCCTCAGACCGCTTTTTGCCGCGA	NM_013556.2:30
Il21	ATGGCCTGGGGGATGGTTTTGATCTAAGGAAAAAGGTGTCTGTACCTCACAGTGCCTTTAAACAAGCAGAGATCCCGTGTACCGCCCTAAGATAGCACA	NM_021782.2:1762
tlr5	CTGGGGACCCAGTATGCTAACTTGACCATTGGTCCAGGGGCTTTCAGAAACCTGCCAATCTTAGGATCTTGGACTTGGGCCAAAGCCAGATCGAAGTCT	NM_016928.2:560
nos2	CCCCCTCCTCCACCCTACCAAGTAGTATTGTACTATTGTGGACTACTAAATCTCTCTCCTCTCCTCCCTCCCCTCTCTCCCTTTCCTCCCTTCTTCTCC	NM_010927.3:3715
tlr7	TCTGCAGGAGCTCTGTCCTTGAGTGGCCTGCAAATCCACAGGCTCACCCATACTTCTGGCAGTGCCTGAAAAATGCCCTGACCACAGACAATCATGTGGC	NM_133211.3:3210
aim2	CACCAGTTCCTCAGTTGTGGTTGATGTTGAATCTAACCACGAAGTCCCAAATAACGTTGTTAAGAGAGCCAGGGAAACTCCAGGATTAGTAAACTGAAG	NM_001013779.2:1134
a20	GGCTGAACAACCTTCTTCCTCAGGCTTTGTATTTGAGCAATATGCGGAAAGCTGTGAAGATACGAGAGAGAACCCAGAAGACATTTTCAAACCTACCAAT	NM_009397.2:232
trex1	GCTGACCCTCCTGACCTTGGCAATAGCCACTCTGTATGGACTCTTCCTGGCCTCACCTGGGCAGTAAGTCAAGAGGGGAAATATGATGAATAAAGACTTC	NM_011637.6:962
Ifna4	CAGAAGGCTCAAGCCATCCTTGTGCTAAGAGATCTTACCCAGCAGATTTTGAACCTCTTCACATCAAAAGACTTGTCTGCTACTTGAATGCAACTCTAC	NM_010504.2:261
tlr9	GGCCACAATTTCAAGTTTTGTGACCCATCTGTCCATGCTACAGAGCCTTAGCCTGGCACACAATGACATTTCATACCCGTGTGCTCCTCACATCTCAACAGCA	NM_031178.2:1801
casp1	GACAATAAATGGATTGTTGGATGAACTTTTAGAGAAGAGAGTGCTGAATCAGGAAGAAATGGATAAAATAAACTTGCAAACATTACTGCTATGGACAAG	NM_009807.2:259
Il1ra	CAACCAGCTCATTGCTGGGTACTTACAAGGACCAAATATCAAACCTAGAAGAAAAGATAGACATGGTGCCTATTGACCTTCATAGTGTGTTCTTGGGCATC	NM_031167.5:224
nlrp3	TTGTCAGGATCTCGCATTGGTTCTGAGCTCCAACCATCTCTGACCAGACTGTACATTGGAGAAAATGCCTTGGGAGACTCAGGAGTCCAAGTTTTGTGT	NM_145827.3:2745
Ifi204	TGCTTTCACCTGAAAACAATTGACAGGCAACCAAAGTTAGTGTGTGGAGAACACAGTTTCATCAAGATATCAAAGAGAGGAAATGTACCAAAGGAGCCTG	NM_008329.2:1296
tlr1	TCAGCACTACGATCGGTTTGAACTGTCTAACATCAAGTGTGTGCTTGAAGACCAGGGCTGCTCTTATTTCTTACGTGCTTTGTCAAAGCTTGGAAGAA	NM_030682.1:805
lpg2	TTTGC GGCGCTACAATGATGCGCTATTTATCCACGATACTGTCCGTGCCCGGGACGCCCTTGACATGTTGCAAGATTTTACGACAGAGAACGCACCACA	NM_030150.2:950
Ifi205	TGAATTATCTGCCTACCTACTCAAACCAAGCAGGCCACTTCTGTTGTTGAAGATCTCAGCACCTGTACATTGCTGCCGAAATTCAGGGAGTATAACCAA	NM_172648.3:41
nlrc5	CCCAGGCTTAGGAGTTAACCTGACCTTGGGAGAGTTCGCACTCATCTCTTCTTCTTCTGTTTAAAGGGACAAAGCCGAGCTACAGGTTTAGGGATAAGTAC	NM_001033207.3:6665
nlrc4	AACGTGGGACGCTTTGACTCACCACAATGAACTTTATAAGGAACAACAGACGAGCCCTTATTCAAAGGATGGGCTTAACAGTTACCAAGCAAATCTGCGA	NM_001033367.3:190
nlrp6	CTCTGCGGTTGGTCTTCCCTCAGTCCCACAACCAGCAATGCCTTCCTTTCTGAGCCTACCATTCTGTCCCTTGACGATATCCCAACAGTAATAGAAGCAT	NM_001081389.1:3050
tlr8	TCCATAAAGCGAACTATTCCAGAAGCTATCCTTGTGACGAGATAAGGCACAACCTCCCTTGTGATTGCAGAATGCAACCATCGTCAACTGCATGAAGTTCC	NM_133212.2:110
tlr11	AGCTTCATCTTCTCAACCAGTCAACTTCAGAGATTCTTCCACAACAGCTTCCTCTTCTGAGCACTTCTTTATCTGGTGTGAAAACAGCTATGCAGTAG	NM_205819.2:1680
nlrp12	CCTGAGCCACTTTCAAGTGGTTGTAGTCAGAAGCATCTCAACAAAGATGGAGCACATGGTCTGCTCGTTTTGTGCGAGGTATTGCAGAAGTACAGAAGTG	NM_001033431.1:2066
UNC93B1	GCCCTTCAAACACGTGCGTGACTTTCGCTTACGCCATCTGGTGCCCTTCTTTATCTACAGTGGCTTTGAGGTGCTCTTGCCTGCACTGGTTTTGCCCTG	NM_019449.2:1060
zbp1	CGCCAAGGCTCTGGGAATGACGACAGCCAAAGAAGTGAACCCACTCCTGTATTCCATGAGAAATAAGCACCTTCTGAGCTATGACGGACAGACGTGGAAG	NM_021394.2:473
tlr12	GGGCTCTGCCTCGGTGGTACTGTGTCTACTCTGCTTCCAGATGCTTTCTCTGCTTTTCTGGTCTCAAGGTCCTGGCACTGAGTCTGCACCTTACCCAAC	NM_205823.2:380

8.2 Anexo 2 – Manuscrito do artigo original

9.1 Apendice A – Artigo publicado (Andrade *et al.*, 2013)