Juliana de Camargo Vieira

Efeito do inibidor de PARP em linfócitos Th17
e Treg em modelo experimental de sepse

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes e Infeciosos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo

2019

Juliana de Camargo Vieira

Efeito do inibidor de PARP em linfócitos Th17
e Treg em modelo experimental de sepse

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes e Infeciosos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Vieira, Juliana de Camargo
Efeito do inibidor de PARP em linfócitos Th17 e
Treg em modelo experimental de sepse / Juliana de
Camargo Vieira. -- São Paulo, 2019.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Imunes e Infecciosos.
Orientador: Francisco Garcia Soriano.

Descritores: 1.Sepse 2.Linfócitos 3.Linfócitos T
reguladores 4.Células Th17 5.Poli (ADP-ribose)
polimerase-1 6.Olaparibe 7.Inflamação

USP/FM/DBD-078/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus irmãos, Luana e Vinícius, meus pais, Silvana e Cleber e ao meu namorado, Pedro.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos ao professor Francisco Soriano, pela paciência, orientação e ensinamentos. À Thais, por toda ajuda e disposição em me ensinar. À Suely, Denise e Hermes pela ajuda nos experimentos e apoio. E a todos meus colegas do LIM 51, pela ajuda, conselhos e conversas que fizeram a elaboração e execução deste trabalho mais leve.

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Resumo

Vieira JC. *Efeito do inibidor de PARP em linfócitos Th17 e Treg em modelo experimental de sepse* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: A sepse é causada por uma resposta desregulada a uma infecção cujo tratamento é de suporte, inexistindo alternativas imunomoduladoras. Linfócitos T reguladores são responsáveis por limitar a inflamação mas podem causar imunossupressão e os Th17 são pró-inflamatórios e responsáveis pela imunidade de mucosas; ambos apresentam-se elevados nos pacientes com sepse. A PARP é uma enzima sensor de dano ao DNA que é continuamente ativada na sepse, sendo importante também na diferenciação dos linfócitos T reguladores e como coativador de NF- κ B. Neste estudo, avaliamos se o tratamento com inibidor de PARP é capaz de manter os linfócitos Th17 e T reguladores próximos aos valores basais, impedindo que ocorra a resposta exacerbada causada por estas células e servindo portanto como opção de tratamento imunomodulador. **Métodos:** Camundongos machos da linhagem C57Bl/6 com 7 semanas de idade e pesando entre 20-25 gramas foram submetidos à ligadura e punção cecal e receberam tratamento com olaparibe (10mg/Kg) após 30 minutos e após 8 horas da cirurgia. Baço, timo e sangue foram coletados e utilizados para análise das populações de linfócitos T reguladores e Th17, citocinas e miRNAs. **Resultados:** O modelo de ligadura e punção cecal foi capaz de mimetizar a linfopenia encontrada em pacientes e o aumento de linfócitos T reguladores e Th17. O tratamento com olaparibe reduziu os linfócitos T reguladores no baço tanto em porcentagem quanto em quantidade de células. Tanto o nível de IL-10 quanto a expressão do miRNA 146a-5p caíram em ambos os grupos CLP, sugerindo menor atividade supressora destes linfócitos. No sangue houve aumento dos linfócitos T reguladores, mas apenas o grupo não tratado apresentou alta de IL-10, sugerindo que o tratamento conteve o perfil supressor. No timo o tratamento parece agir por uma forma diferente; embora

ocorra aumento dos linfócitos T reguladores, o grupo tratado teve aumento da expressão do miRNA 17a-5p, que reduz a atividade supressora desses linfócitos, mostrando que as células produzidas tem sua atividade supressora alterada, o que é corroborado pelo não aumento de IL-10 nesse grupo. Os linfócitos Th17, que são pró-inflamatórios, foram controlados com o tratamento no baço e no sangue. Isso possivelmente ocorreu pela ação da PARP que impediu o aumento de citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17A, INF- γ , que estavam elevadas apenas no grupo não tratado. Além disso, a relação entre linfócitos Th17 e T reguladores foi controlada, sugerindo melhora no desfecho clínico. Conclusões: O tratamento com olaparibe se mostrou eficiente em reduzir as respostas inflamatória (causada pelo Th17) e supressora (causada pelo Treg) neste modelo, talvez pela alteração de citocinas e da expressão dos miRNA 17a-5p e 146a-5p.

Descritores: sepse; linfócitos; linfócitos T reguladores; células Th17; poli(ADP-ribose) polimerase-1; olaparibe; inflamação.

Abstract

Vieira JC. *Effect of PARP inhibitor in Th17 and Treg lymphocytes in experimental model of sepsis* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introduction: Sepsis is caused by a dysregulated response to an infection whose treatment is supportive, and there are no immunomodulatory alternatives. Regulatory T lymphocytes are responsible for limiting inflammation but may cause immunosuppression and Th17 are proinflammatory and responsible for mucosal immunity; both are elevated in patients with sepsis. PARP is a DNA-damaging enzyme that is continuously activated in sepsis, also important in the differentiation of regulatory T lymphocytes and as a cofactor of NF κ B. In this study, we evaluated whether treatment with PARP inhibitor is able to keep the T regulatory and Th17 lymphocytes close to the baseline values, preventing the exacerbated response caused by these cells and therefore serving as an option for immunomodulatory treatment. Methods: C57Bl male mice at 7 weeks of age weighing between 20-25 grams were submitted at cecal binding and puncture and received treatment with olaparib (10mg/kg) after 30 minutes and after 8 hours of the surgery. Spleen, thymus and blood cells have been used for analysis of T regulatory and Th17 lymphocytes populations, cytokines and miRNA. Results: The cecal ligation and puncture model was able to mimic the lymphopenia found in patients and the increase of T regulatory and Th17 lymphocytes. Treatment with olaparib reduced the T regulatory lymphocytes in the spleen in both percentage and number of cells. Both the IL-10 level and the 146a-5p miRNA expression fell in both CLP groups, suggesting lower suppressor activity of these lymphocytes. In the blood there was an increase in the T regulatory lymphocytes, but only the untreated group showed high IL-10, suggesting that the treatment contained the suppressor profile. In the thymus the treatment seems to act in a different way; although there is an increase in the T regulatory lymphocytes, the treated group

had increased expression of 17a-5p miRNA, which reduces the suppressive activity of these lymphocytes, showing that the cells produced have their suppressor activity altered, which is corroborated by the non-increase of IL-10 in this group. Th17 lymphocytes, which are proinflammatory, were controlled with treatment in the spleen and blood. This was possibly due to the action of PARP which prevented the increase of cytokines such as IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17A, INF- γ , which were raised only in the group not treated. In addition, the ratio between Th17 and T regulatory lymphocytes was controlled, suggesting improvement in clinical outcome. Conclusions: The treatment with olaparib was efficient in reducing inflammatory responses (caused by Th17) and suppressor (caused by Treg) in this model, perhaps due to the alteration of cytokines and the expression of miRNAs 17a-5p and 146a-5p.

Descriptors: sepsis; lymphocytes; T-lymphocytes, regulatory; Th17 cells; poly (ADP-ribose) polymerase-1; olaparib; inflammation.

Sumário

	iii
Agradecimentos	iv
Normalização adotada	v
Resumo	vi
Abstract	viii
Introdução	1
Revisão da literatura	2
Sepsis	2
Poli (ADP-ribose) polimerase	6
Inibidor de PARP	8
Linfócitos T reguladores e Th17	10
Linfócitos T reguladores (Treg)	12
Linfócitos T auxiliares 17 (Th17)	13
Micro RNAs	15
Justificativa do trabalho	17
Objetivos	18
Geral	18
Específicos	18
Materiais e métodos	19
Comissão de Ética	19
Desenho experimental in vivo	19
Animais	19
Grupos	19

Escolha do modelo experimental	20
Ligadura e punção cecal - CLP	20
Inibidor de Parp	20
Doses	21
Experimentos	21
Coleta de tecidos	21
Citometria de fluxo	21
Extração de RNA	22
Tratamento com DNase	22
Análise da concentração	22
Transcrição Reversa	23
Array de Micro RNAs	23
Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	24
Extração e quantificação de proteínas	24
Detecção e quantificação de citocinas	25
Análise de dados	25
Resultados	26
Dados observacionais	26
Efeito da CLP em linfócitos Treg	26
Efeito da CLP em linfócitos Th17	27
Linfócitos T	29
Linfócitos T reguladores	33
Linfócitos Th17	37
Relação Th17/Treg	40
Linfócitos B, neutrófilos e monócitos	41
Quantificação de citocinas	43
MicroArray	52
RT-PCR	53

Discussão	58
Conclusões	64
Referências	65

Lista de Figuras

- 1 **Diferenciação de linfócitos Treg e Th17** As células apresentadoras de antígenos (APCs) apresentam peptídeos via MHC de classe II, ativando linfócitos Th naïve. Dependendo da afinidade do TCR em reconhecer o peptídeo e o microambiente, as células são polarizadas em Th17 ou Treg para manter a homeostase. Estas células podem se trans-diferenciar uma na outra dependendo de fatores como a concentração de TGF- β . Os principais produtos dos Treg, que são imunorreguladores, são IL-10 e TGF- β e dos Th17, que são pró-inflamatórios, são IL-17, IL-21 e IL-22. (Imagem adaptada de Sehrawat et al. 2017) 11
- 2 **Efeito da CLP em linfócitos Treg.** Comparação das porcentagens de linfócitos Treg entre os grupos veículo (V) e CLP-veículo (CLP-V) em células do baço (A), do timo (B) e do sangue (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V) ($n \geq 12$). 27
- 3 **Efeito da CLP em linfócitos Th17.** Comparação das porcentagens de linfócitos Th17 entre os grupos veículo (V) e CLP-veículo (CLP-V) em células do baço (A), do timo (B) e do sangue (c). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V) ($n \geq 12$). 28
- 4 **Análise feita por citometria de fluxo** *Gate* para retirar debris celulares (A), *gate* selecionando as células marcadas com anti-CD3 (B), combinação dos anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 dentro do *gate* CD3+ 29

- 5 **Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T no baço.** Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD3+ CD4+ CD8- em porcentagem (A) e em quantidade de células (B), CD3+ CD4- CD8+ em porcentagem (C) e em quantidade de células (D), CD3+ CD4+ CD8+ em porcentagem (E) e em quantidade de células (F) de células do baço. (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 13$). 30
- 6 **Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T no timo.** Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD3+ CD4+ CD8- em porcentagem (A) e em quantidade de células (B), CD3+ CD4- CD8+ em porcentagem (C) e em quantidade de células (D), CD3+ CD4+ CD8+ em porcentagem (E) e em quantidade de células (F) em células do timo. (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 13$). 31
- 7 **Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T no sangue.** Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD3+ CD4+ CD8- em porcentagem (A) e em quantidade de células (B), CD3+ CD4- CD8+ em porcentagem (C) e em quantidade de células (D), CD3+ CD4+ CD8+ em porcentagem (E) e em quantidade de células (F) em células do sangue. (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 6$). . . . 33
- 8 **Análise feita por citometria de fluxo** *Gate* para retirar debris celulares (A), *gate* selecionando as células marcadas com anti-CD4 (B), combinação dos anticorpos anti-CD25 e anti-FoxP3 dentro do *gate* CD4+ 34

- 9 **Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T reguladores no baço.**
Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD4+CD25+
FoxP3+ em porcentagem (A) e em quantidade de células (B). (*)
 $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado
com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 12$). 34

- 10 **Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T reguladores no timo.**
Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD4+CD25+
FoxP3+ em porcentagem (A) e em quantidade de células (B), CD4+
CD25+FoxP3- em porcentagem (C) de células do timo. (*) $p < 0,05$
comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com
o grupo olaparibe (O); (\$) $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP-
veículo (CLP-V) ($n \geq 12$). 36

- 11 **Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T reguladores no sangue.** Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T
CD4+CD25+FoxP3+ em porcentagem (A) e em quantidade de
células (B) de células do sangue. (*) $p < 0,05$ comparado com o
grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe
(O) ($n \geq 8$). 37

- 12 **Análise feita por citometria de fluxo** *Gate* para retirar debris celu-
lares (A), *gate* selecionando as células marcadas com anti-CD4 (B),
gate selecionando todas as células com marcações anti-ROR γ e/ou
anti-IL-17A (C) e combinação dos anticorpos anti-ROR γ e anti-IL-
17F dentro do *gate* ROR γ + e/ou IL-17A+ (D) 38

- 13 **Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T auxiliares** 17. Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD4+IL17A+IL17F+ROR γ + em porcentagem (A) e em quantidade de células (B) de células do baço, em porcentagem (C) e em quantidade de células (D) de células do timo e em porcentagem (E) e em quantidade de células (F) de células do sangue. (*) p<0,05 comparado com o grupo veículo (V); (#) p<0,05 comparado com o grupo olaparibe (O); (\$) p<0,05 comparado com o grupo CLP-veículo (CLP-V) (n $\geq$ 4). 39
- 14 **Relação entre Th17 e Treg.** Relação entre os valores obtidos nos painéis de Th17 e Treg por citometria de fluxo. Baço (A), timo (B) e sangue (C). (*) p<0,05 comparado com o grupo CLP-veículo (CLP-V) (n $\geq$ 5). 40
- 15 **Análise feita por citometria de fluxo** *Gate* para retirar debris celulares (A), células marcadas com anti-CD19 (B), células marcadas com anti-CD11b (C) e células marcadas com anti-Ly6G (D). 41
- 16 **Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos B, neutrófilos e monócitos** Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos B CD19+ (A em baço e B em sangue), neutrófilos Ly6G+ (C em baço e D em sangue) e monócitos CD11+ (E em baço e F em sangue). (*) p<0,05 comparado com o grupo veículo (V); (#) p<0,05 comparado com o grupo olaparibe (O) (n $\geq$ 4). 42
- 17 **Efeito da CLP e do olaparibe em IL-1 β** Quantificação de interleucina 1 β em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) p<0,05 comparado com o grupo veículo (V); (#) p<0,05 comparado com o grupo olaparibe (O) (n $\geq$ 4). 44

18	Efeito da CLP e do olaparibe em IL-6 Quantificação de interleucina 6 em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O); (\$) $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP-veículo (CLP-O) ($n \geq 4$).	45
19	Efeito da CLP e do olaparibe em IL-10 Quantificação de interleucina 10 em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 4$).	46
20	Efeito da CLP e do olaparibe em IL-17A Quantificação de interleucina 17a em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O); (\$) $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP-veículo (CLP-O) ($n \geq 4$).	47
21	Efeito da CLP e do olaparibe em IL-17F Quantificação de interleucina 17f em baço (A), timo (B) e plasma (C). ($n \geq 4$).	48
22	Efeito da CLP e do olaparibe em IL-22 Quantificação de interleucina 22 em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 4$).	49
23	Efeito da CLP e do olaparibe em TNF-α Quantificação de TNF- α em baço (A), timo (B) e plasma (C). ($n \geq 4$).	50
24	Efeito da CLP e do olaparibe em TNF-β Quantificação de TNF- β em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 4$).	51
25	Efeito da CLP e do olaparibe em INF-γ Quantificação de INF- γ em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V) ($n \geq 4$).	52

- 26 **Classificação dos genes pelo RefFinder Software** Classificação dos possíveis genes *housekeepings* realizada pelo RefFinder Software com base nos resultados obtidos para os grupos Veículo (V), Olaparibe (O), CLP-Veículo (CLP-V) e CLP-Olaparibe (CLP-O) em amostras de baço. Os genes à esquerda os mais estáveis e os à direita os menos estáveis. Os dois mais estáveis (SNORD68 e SNORD61) foram selecionados para serem *housekeepings* e normalizarem as amostras (n = 3). 53
- 27 **Classificação dos genes pelo RefFinder Software** Classificação dos possíveis genes *housekeepings* realizada pelo RefFinder Software com base nos resultados obtidos para os grupos Veículo (V), Olaparibe (O), CLP-Veículo (CLP-V) e CLP-Olaparibe (CLP-O) em amostras de timo. Os genes à esquerda os mais estáveis e os à direita os menos estáveis. Os dois mais estáveis (SNORD95 e SNORD72) foram selecionados para serem *housekeepings* e normalizarem as amostras (n = 3). 54
- 28 **Classificação dos genes pelo RefFinder Software** Classificação dos possíveis genes *housekeepings* realizada pelo RefFinder Software com base nos resultados obtidos para os grupos Veículo (V), Olaparibe (O), CLP-Veículo (CLP-V) e CLP-Olaparibe (CLP-O) em amostras de sangue. Os genes à esquerda os mais estáveis e os à direita os menos estáveis. Os dois mais estáveis (SNORD68 e SNORD95) foram selecionados para serem *housekeepings* e normalizarem as amostras (n = 3). 55
- 29 **RT-PCR** Expressão do miRNA 15a-5p em células do baço (A), do timo (B) e sangue (C). (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) (n ≥ 5). 55

30	RT-PCR Expressão do miRNA 17a-5p em células do baço (A), do timo (B) e sangue (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O); (\$) $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP-veículo (CLP-V) ($n \geq 5$).	56
31	RT-PCR Expressão do miRNA 146a-5p em células do baço (A), do timo (B) e sangue (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O). ($n \geq 5$). . . .	57
32	RT-PCR Expressão do miRNA 365-5p em células do baço (A), do timo (B) e sangue (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O). ($n \geq 5$). . . .	57

Lista de Tabelas

1	Pontuação de avaliação de insuficiência orgânica sequencial - Escore SOFA	3
2	Pontuação de avaliação de insuficiência orgânica sequencial rápida (Quick SOFA - qSOFA)	3
3	Sequência de primers utilizados	24

Introdução

Sepse é uma disfunção orgânica potencialmente fatal frequente em unidades de tratamento intensiva dos hospitais. É causada por uma resposta desregulada a uma infecção cujo tratamento primordial é direcionado ao controle da infecção e correção de distúrbios hemodinâmicos (Singer et al. 2016). Os pacientes com sepsis apresentam resposta imune desregulada e diversos tipos celulares contribuem para isso, sendo que linfócitos T reguladores e Th17 tem um papel importante na fisiopatologia (Cao et al. 2012; Rendon et al. 2012). Estes linfócitos apresentam uma regulação interligada e que está sujeita à atividade da PARP (Zhang et al. 2013), uma proteína sensor de dano ao DNA que é ativada na sepsis devido ao estresse oxidativo. Quando continuamente ativada, leva à morte celular por necrose (Virag e Szabó 2002). Como na sepsis a PARP é continuamente ativada devido aos danos ao DNA e ela atua na regulação dos linfócitos Treg (Zhang et al. 2013), a sua inibição pode ser uma opção de tratamento imunomodulador para a sepsis.

Revisão da literatura

Sepse

A sepsé é uma doença de grande importância na saúde pública pois acomete muitos dos pacientes em unidades de tratamento intensivo (UTI), sendo responsável pela maior causa de mortes em UTIs de adultos (Deutschman et al. 2014; Hotchkiss et al. 2016). No Brasil, a mortalidade da sepsé em unidades de tratamento intensivo é de 55,7%; este nível é menor em países mais desenvolvidos e maior nos menos desenvolvidos (Finfer e Machado 2016).

Em maio de 2017, após uma resolução da Organização Mundial da Saúde (OMS), a sepsé passou a ser considerada prioridade, tendo como foco a melhora na prevenção, diagnóstico e manejo da doença. Nessa resolução foram propostas ações com potencial de salvar muitas vidas, mas para que isso aconteça é necessário uma ação coordenada da pesquisa básica, clínica e de políticas de saúde, em especial nos países de baixa e média renda (Reinhart et al. 2017).

A sepsé pode afetar todos os órgãos, sendo mais comuns disfunções neurológicas (estado mental alterado), pulmonar (hipoxemia), cardiovascular (choque), renal (oligúria e/ou aumento da concentração de creatina), hematológico (plaquetopenia) e hepático (hiperbilirrubinemia). Os critérios de diagnóstico tem sido frequentemente revistos e atualmente é usada a pontuação de avaliação de insuficiência orgânica sequencial (SOFA - sequential organ failure assessment), reproduzida abaixo, cuja maior pontuação está relacionada com aumento de mortalidade (Singer et al. 2016).

Tabela 1: Pontuação de avaliação de insuficiência orgânica sequencial - Escore SOFA

Órgão/Sistema	Escore SOFA				
	0	1	2	3	4
Respiratório, PO ₂ /FiO ₂ , mmHg (kPa)	≥400 (53.3)	< 400 (53.3)	< 300 (40)	< 200 (26.7) com assistência respiratória	< 100 (13.3) com assistência respiratória
Coagulação, Plaquetas, 10 ³ mm	≥150	< 150	< 100	< 50	< 20
Fígado, Bilirrubina, mg/dL	< 1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	> 12.0
Cardiovascular	PAM 70mmHg	PAM < 70mmHg	Dopamina < 5 ou dobutamina (qualquer dose)	Dopamina 5.1-15 ou epinefrina ≤0.1 ou norepinefrina ≤0.1	Dopamina ≥15 ou epinefrina ≥0.1 ou norepinefrina ≥0.1
Sistema Nervoso Central, Escala Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Renal, Creatinina, mg/dL. Urina, mL/d	< 1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9 < 500	> 5.0 < 200

Catecolaminas são dadas em $\mu\text{g/kg/min}$ por ao menos 1 hora. FiO₂ é a fração de oxigênio inspirado; PAM é a pressão arterial média; PO₂ é a pressão parcial de oxigênio.

Entretanto, pela complexidade deste método, no pronto socorro e na enfermaria é realizado uma versão simplificada chamada de quick SOFA (qSOFA) para triagem, na qual para cada critério atribui-se 1 ponto. Se o resultado for maior ou igual a 2 e houver infecção, caracteriza-se disfunção orgânica e a gravidade do paciente. Os critérios estão especificados abaixo (Marik et al. 2017).

Tabela 2: Pontuação de avaliação de insuficiência orgânica sequencial rápida (Quick SOFA - qSOFA)

Critério	Pontuação
Taxa respiratória $\geq 22/\text{min}$	1
Mudança no estado mental	1
Pressão arterial sistólica $\leq 100 \text{ mmHg}$	1

Apesar dos avanços na ciência, a sepse apresenta alta taxa de mortalidade e o tratamento é de suporte, direcionado ao controle da infecção e correção de distúrbios hemodinâmicos, inexistindo tratamentos imunomoduladores.

A patogênese da sepse é muito complexa e envolve diferentes células, vias de sinalização e moléculas. Quando ocorre uma infecção, as células do sistema imune inato agem para defender o organismo e eliminar os patógenos e retornar à homeostase. Muitas vezes esse mecanismo funciona, porém em alguns casos o patógeno permanece e se multiplica. Durante a sepse o sistema imune não está em homeostase - a resposta imune na sepse é caracterizada pela inflamação sistêmica intensa e pela resposta anti-inflamatória que pode se tornar imunossupressora (Hotchkiss et al. 2016).

A resposta pró-inflamatória é resultado da ação de células do sistema imune inato que reconhecem tanto os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes em bactérias, fungos e vírus quanto os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) por meio dos receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs). Com isso, o fator de transcrição nuclear κ B é translocado para o núcleo e passa a estimular a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas 1β (IL- 1β), IL-12, IL-18. Além disso, ocorre ativação do sistema complemento, cascatas de coagulação e endotélio vascular (van der Poll et al. 2017).

A imunossupressão envolve tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo e é caracterizada pela exaustão de linfócitos e reprogramação das células apresentadoras de antígenos. Nesta fase ocorre apoptose de linfócitos T CD4+, T CD8+, B e de células dendríticas (DC). Em modelo animal, ao evitar a apoptose dos linfócitos observa-se melhor prognóstico. Os pacientes que morrem em decorrência da sepse apresentam no baço linfócitos T que produzem menos IFN γ e TNF (Boomer et al. 2011) e maior expressão de PD1 (proteína de morte celular programada/ programmed cell death 1) no sangue periférico (Liu et al. 2017).

Os linfócitos T reguladores (Treg), que suprimem a função dos T efetores e inibem neutrófilos, estão elevados nos pacientes com sepse, o que pode contribuir para a redução da funcionalidade dos linfócitos T efetores, neutrófilos e monócitos e, conseqüentemente, para imunossupressão (van der Poll et al. 2017).

Na sepse, células da imunidade inata como neutrófilos são responsáveis pelo burst oxidativo que gera espécies reativas de oxigênio (ROS) como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio, (H_2O_2) e radicais hidroxil (HO). A geração de ROS é importante para a defesa do organismo pois contribui para o clearance bacteriano e está aumentada quando ocorre ativação do NF κ B (Mantzarlis et al. 2017). Entretanto, a geração de ROS leva ao dano do DNA em diversos pontos da cromatina. Para que a maquinaria de reparo consiga acessar a região danificada e reparar o DNA, é necessário que haja uma sinalização e afrouxamento do nucleossomo. A poli(ADP-ribose) polimerase é uma enzima sinalizadora de dano ao DNA que está ativada na sepse e é responsável por esse processo (Virag e Szabó 2002).

Poli (ADP-ribose) polimerase

A ADP-ribosilação é uma modificação pós-traducional covalente e reversível na qual uma (mono) ou várias (poli) moléculas de ADP-riboses são acrescentadas, por meio de ligações glicosídicas, à resíduos de aminoácidos. Os polímeros de poli-ADP-riboses variam em tamanho, podendo ser encontrados até 200 unidades e apresentarem ramificações a cada 20-50 resíduos. Estes polímeros possivelmente apresentam estrutura helicoidal com alguma similaridade com as estruturas de DNA e RNA; há reconhecimento cruzado de anticorpos contra poli-ADP-riboses e anticorpos contra DNA e RNA (D'Amours et al. 1999).

A síntese de poli-ADP-riboses envolve três atividades enzimáticas: a primeira é a ADP-ribosilação do substrato, a segunda é o acréscimo de moléculas de ADP-riboses, tornando-se um polímero de poli-ADP-riboses, e a última é a ramificação deste polímero. A poli-ADP-ribosilação é realizada pelas poli(ADP-ribose) polimerases, uma classe de enzimas conhecidas como PARPs (Morales et al. 2014).

As PARPs estão presentes em todos os reinos da vida (Perina et al. 2014) e são antigas filogeneticamente - o ancestral de todos os eucariotos existentes já codificava proteínas deste tipo, com a mesma funcionalidade das que existem hoje mas também com outras atividades catalíticas (Citarelli et al. 2010). Elas catalizam a adição de ADP-riboses em proteínas aceptoras utilizando dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺) como substrato: ele é quebrado em nicotinamida e ADP-ribose para que a ADP-ribose seja utilizada na formação do polímero. O catabolismo da PARP é feito pela poli (ADP-ribose) glicohidrolase (PARG), que hidrosila os polímeros de ADP-riboses formados após a ativação da PARP, para que ela possa reiniciar a ADP-ribosilação quando necessário (Virag e Szabó 2002).

As PARPs são caracterizadas pela dobra catalítica β - α -loop- β - α , uma sequência de 50 aminoácidos apresentando 100% de homologia entre os vertebrados, cujo motivo estrutural é o responsável pela ligação de NAD⁺, sendo

encontrado em outras ADP-riboses transferases. A mais conhecida e estudada das PARPs é a PARP-1, que possui 116 kDa; ela é muito abundante nas células e parece ser a maior responsável pela atividade de poli-ADP-ribosilação (Virag e Szabó 2002).

A PARP-1 é responsável pela maioria da síntese de polímeros de poli-ADP-ribose. Ela apresenta um domínio N-terminal de ligação ao DNA, um domínio central de auto modificação e um domínio C-terminal catalítico. Ela está envolvida em diversos eventos celulares, como reparo de DNA e manutenção da integridade genômica, regulação da expressão de proteínas em nível transcricional, regulação da replicação e diferenciação celular, regulação da atividade da telomerase, via de morte celular, fonte emergencial de energia, sinalização para degradação, regulação da organização do citoesqueleto (Virag e Szabó, 2002) e está envolvida na sinalização de eventos epigenéticos que alteram a estrutura da cromatina, como a metilação e desmetilação do DNA (Caiafa et al, 2009; Ciccarone et al, 2017).

Histonas são proteínas que podem ser poli-ADP-ribosiladas e consequentemente adquirem carga negativa, fazendo com que sejam repelidas eletrostaticamente pelo DNA. Este processo está relacionado com remodelamento da cromatina, reparo de DNA e regulação da transcrição gênica pois leva ao relaxamento do nucleossomo e permite acesso às enzimas de reparo, fatores de transcrição e maquinaria transcrricional (Rouleau et al. 2004).

A quebra do DNA é o elemento principal na regulação da poli-ADP-ribosilação por estimular sua atividade catalítica; a PARP é uma proteína sensor de dano ao DNA. A PARP liga-se à fita de DNA fragmentado (single strand breaks/SSB) originada do estresse oxidativo e abre a cromatina, permitindo que enzimas de reparo alcancem o local e reparem utilizando como molde a fita complementar do DNA. Quando ocorre dano ao DNA, ocorre depleção de NAD⁺ por meio da atividade da PARP. A depleção de NAD⁺ leva à depleção de ATP, logo, se a PARP for continuamente ativada, ocorre morte por necrose. Diferentemente

da apoptose, a necrose afeta as regiões vizinhas à célula que morreu (devido à liberação de DAMPs), intensificando a inflamação (Morales et al. 2014).

Um estudo com animais knockout para PARP-1 mostra a importância da ativação de PARP na inflamação sistêmica. Camundongos knockout para PARP-1 submetidos à ligadura e punção cecal (CLP) apresentam (após 12h e 24h) níveis plasmáticos menores de TNF- α , IL-6 e IL-10 e redução da atividade de mieloperoxidase no intestino e pulmões quando comparados com os camundongos *wild-type*; esses efeitos foram associados com melhora na sobrevivência (Soriano et al. 2002). O uso de inibidor de PARP também mostra melhora em modelo de sepse, conseguindo produzir um efeito igual à ausência da enzima. Porcos tratados com inibidor de PARP apresentam melhor sobrevivência após 24h e 96h, melhora na bacteremia, níveis plasmáticos de TNF atenuados e efeito cardiovascular protetor quando comparados aos animais não tratados (Godfarb et al. 2002). O estresse oxidativo e ativação de PARP-1 está associado com a indução de apoptose no coração de ratos submetidos à ligadura e punção cecal e ocorre um efeito protetor quando tratados com inibidor de PARP-1 (Zhang et al. 2015).

Com relação aos linfócitos, a PARP-1 regula negativamente a função de linfócitos T reguladores (Treg) (CD4+CD25+FoxP3+) poli-ADP-ribosilando FoxP3. Sua deleção faz com que a expressão de FoxP3 seja mais persistente e estável, conferindo uma atividade supressora mais intensa aos linfócitos Tregs. Camundongos knockout para PARP-1 apresentam maior número de Tregs em órgãos linfáticos periféricos e linfócitos T reguladores naturais (nTreg) no timo (Luo et al. 2015).

Inibidor de PARP

Inibidores de PARP são fármacos que inibem a atividade da enzima poli-ADP-ribose polimerase (PARP) bloqueando seu sítio catalítico. Existem alguns aprovados para uso clínico e outros ainda em ensaios clínicos. O olaparibe é

um dos inibidores aprovados e que é atualmente utilizado como monoterapia no tratamento de câncer de ovário (Frampton et al. 2015).

O olaparibe é um medicamento aprovado e há estudos sobre seu efeito em diferentes doenças. Em modelo de asma, a alteração de citocinas e linfócitos T CD4+ apresentam efeito dose-dependente, sendo que as doses testadas foram 1, 5 e 10 mg/kg (Ghonim et al. 2015). Em modelo de queimadura, o olaparibe foi usado na dose 10 mg/kg, e mediadores inflamatórios também apresentaram níveis mais baixos quando comparados aos controles (Ahmad et al. 2017).

Linfócitos T reguladores e Th17

Linfócitos são células imunes que podem ser subdivididas em natural killers, linfócitos B e linfócitos T, sendo que estes últimos podem ser subdivididos em auxiliares (helper) e citotóxicos.

Os linfócitos T auxiliares apresentam o *cluster of differentiation* 4 (CD4), sendo portanto chamados de CD4+. Os linfócitos CD4+ naïve são aqueles que não tiveram contato com antígenos. Eles podem se diferenciar em células especializadas que produzem diferentes citocinas e atuam de maneira específica no sistema imune. Essa diferenciação depende de citocinas do microambiente em que a célula se encontra e os fatores de transcrição que são ativados. Eles podem se diferenciar em linfócitos T auxiliares 1 (Th1), Th2, Th9, Th17, Th22, e T reguladores (Raphael et al. 2015). Alguns desses linfócitos apresentam uma regulação interligada, como Th17 e Treg, alvos deste estudo.

A diferenciação em uma destas células inibe a diferenciação da outra. Quando as células apresentadoras de antígenos (APCs) apresentam peptídeos via MHC de classe II (*major histocompatibility complex* - complexo principal de histocompatibilidade) aos linfócitos T auxiliares (Th) naïve, eles são ativados. Dependendo do microambiente e da afinidade do receptor de células T (TCR) em reconhecer o peptídeo, as células podem ser polarizadas em Th17 ou Treg. Ambas necessitam de fator de transformação do crescimento β (*transforming growth factor* TGF β) TGF- β para a diferenciação e a expressão dos fatores de transcrição FoxP3 e ROR- γ t e as citocinas IL-2 e IL-6 definem o fenótipo dos linfócitos em Treg e Th17 respectivamente (Sehrawat et al. 2017).

Posteriormente, estas células podem se trans-diferenciar uma na outra dependendo de fatores como a concentração de TGF- β . Os principais produtos dos Tregs, que são imunorreguladores, são IL-10 e TGF- β e dos Th17, que são pró-inflamatórios, são IL-17, IL-21 e IL-22 (figura 1).

Figura 1: **Diferenciação de linfócitos Treg e Th17** As células apresentadoras de antígenos (APCs) apresentam peptídeos via MHC de classe II, ativando linfócitos Th naíve. Dependendo da afinidade do TCR em reconhecer o peptídeo e o micro-ambiente, as células são polarizadas em Th17 ou Treg para manter a homeostase. Estas células podem se trans-diferenciar uma na outra dependendo de fatores como a concentração de TGF- β . Os principais produtos dos Treg, que são imunorreguladores, são IL-10 e TGF- β e dos Th17, que são pró-inflamatórios, são IL-17, IL-21 e IL-22. (Imagem adaptada de Sehrawat et al. 2017)

Linfócitos T reguladores (Treg)

Os linfócitos T reguladores (Treg) são células imunes essenciais para a indução e manutenção da tolerância imunológica. Eles podem ser desenvolvidos no timo, que são Treg naturais (nTreg) ou na periferia a partir de linfócitos T CD4+ naïves, gerando Treg induzidos (iTreg) (Sakaguchi et al. 2008). As principais citocinas que estas células secretam são IL-10 e TGF- β .

A diferenciação e manutenção dos linfócitos em Treg e sua função supressora ocorre devido à ação do fator de transcrição *forkhead box P3* (FoxP3). Linfócitos T naïve em um microambiente com TGF β e IL-2 passam a expressar FoxP3 que é o fator de transcrição característico e maior regulador do desenvolvimento de Treg. A expressão de FoxP3 pode ser influenciada por outros fatores de transcrição como o NF- κ B, que se liga em regiões do enhancer CNS3 (*conserved noncoding DNA sequence* - sequência de DNA conservada não codificadora) do gene de FoxP3 e aumenta a expressão e diferenciação de Treg. Esse processo acontece ainda mais intensamente em caso de resposta inflamatória intensa, pois o NF- κ B está muito expresso e atua como sinalizador para o desenvolvimento dos Treg no timo (Long et al. 2009; Ren et al. 2017).

Na fase inicial da sepse os linfócitos Treg limitam a inflamação, o dano tecidual e gravidade da disfunção de órgãos (Tatura et al. 2015). Na sepse, ocorre aumento de Treg CD4+CD25+ e depleção de linfócitos CD4+CD25-. Além do aumento em quantidade, os linfócitos Treg de animais sépticos apresentam uma resposta mais intensa, mostrando-se mais supressores que os controle em experimentos *in vitro*. A inibição da atividade de Tregs pode promover a recuperação da função imune (Cao et al. 2015).

Um dos componentes da fase imunossupressora que ocorre na sepse é resultado da atividade dos linfócitos Treg. Eles estão envolvidos na anergia de linfócitos que é um estado de falha na proliferação ou secreção de citocinas e ausência de resposta aos antígenos (Cao et al. 2015).

A supressão imune mediada pelos linfócitos Treg pode ocorrer pela secreção de citocinas inibitórias, citólise, distúrbio metabólico, modulação de células dendríticas e pela secreção de exossomos com miRNA (Ren et al. 2017). Além disso, os linfócitos Treg podem recrutar ou inibir outras células imunes por ação de citocinas. (Sakaguchi et al. 2010)

Os linfócitos Treg são células que apresentam plasticidade, podendo adquirir fenótipos de outros linfócitos T auxiliares como Th1, Th2, Tfh e Th17. Em uma situação de inflamação um linfócito Treg pode se transdiferenciar em um linfócito que produz citocinas pró-inflamatórias; mas não se sabe se ele continua a ter atividade imunossupressora ou não (Ren et al. 2017).

Linfócitos T auxiliares 17 (Th17)

Os linfócitos T auxiliares 17 (*T helper 17 cells* - Th17) são linfócitos CD4 efetores com atividade pró-inflamatória. Eles produzem citocinas como IL-17A, IL-17F, IL-21, e IL-22 e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (fator estimulante de colônia 2 - GM-CSF) que induzem a produção de neutrófilos. Os linfócitos Th17 são importantes para indução e manutenção da imunidade em mucosas como intestino, pulmões e cavidade oral, onde contribuem para o clearance de patógenos como bactérias e fungos (Wacleche et al. 2017).

A diferenciação de linfócitos T CD4 naíve em linfócitos Th17 ocorre na presença de IL-6 e TGF- β . Estas citocinas ativam a proteína STAT3 (*signal transduction and activation of transcription 3* /transdução de sinal e ativação da transcrição 3) que é um fator de transcrição que regula a transcrição dos genes de IL-17A, IL-17F, IL-23 e a expressão de RORC, BATF, IRF4. Com isso, ocorre a expressão de ROR- γ t (*RAR-related orphan receptor γ t*), o fator de transcrição essencial para o desenvolvimento dos linfócitos Th17 (Wacleche et al. 2017).

Na sepse ocorre aumento da proporção de linfócitos Th17 (Salomão et al. 2011). Em um modelo de CLP foi demonstrado aumento de IL-17 e IL-23, levando ao maior recrutamento de neutrófilos (Cauvi et al. 2014).

Embora os linfócitos Th17 estejam elevados em uma situação de infecção e sejam altamente pró-inflamatórios, eles podem adquirir um fenótipo regulador. Os linfócitos Th17 tem uma plasticidade que permite que ocorra a transdiferenciação de Th17 em Treg, o que contribui para a resolução da inflamação, visto que Treg tem ação supressora (Gagliani et al. 2015).

A relação entre linfócitos Th17 e linfócitos Treg (Th17/Treg) está correlacionada com o score SOFA utilizado no diagnóstico. Quanto maior essa relação maior é o desfecho adverso em pacientes com sepse (Gupta et al. 2016).

Micro RNAs

MicroRNAs são pequenas moléculas de RNA de fita simples não codificador extremamente conservadas entre as espécies. Eles possuem cerca de 22 nucleotídeos e regulam negativamente a expressão gênica por indução da repressão da tradução.

A transcrição dos miRNA é realizada normalmente pela RNA polimerase II na forma de pri-miRNA com cerca de 500-3000 nucleotídeos que apresenta uma cauda poli-A em uma ponta e um 7-metilguanosina-Cap na outra. Esse pri-miRNA é clivado em pré-miRNA (sem a cauda poli-A e sem Cap) pela enzima Drosha (ribonuclease III) e pela proteína de DGCR8. O pré-miRNA passa por uma proteína canal (exportina-5) para chegar ao citoplasma onde é alvo da enzima Dicer, uma endonuclease (RNase III), que cliva-o em dois pequenos fragmentos, os miRNAs. O miRNA liga-se à proteína argonauta, compondo o complexo silenciador induzido por RNA (RISC). O complexo silenciador liga-se à região 3' UTR dos mRNAs, fazendo com que sua tradução seja impedida ou reduzida (Macfarlane et al. 2010; Winter et al. 2009). Os miRNAs podem ser transportados por exossomos para outras células (Vickers et al. 2012).

Em uma situação normal a expressão dos miRNAs varia entre os tecidos e células, sendo considerados *roomkeeping genes* pois são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção do estado diferenciado das células. Em situações de doenças eles ficam alterados; pacientes com hipertensão, por exemplo, apresentam os miR-103a-2-5p e miR-585-5p super expressos e tem como alvo a PARP-1 (Dluzen et al. 2017). Alguns miRNA quando super expressos resultam em uma sensibilização ao olaparibe, como o miR-107 e o miR-222, que regulam a resposta ao dano ao DNA (Neijenhuis et al. 2011).

Os miRNAs podem ser utilizados como assinaturas moleculares endógenas com função de biomarcadores, adquirindo relevância para o diagnóstico de diversas doenças. Eles estão envolvidos na regulação das respostas imunes inata

e adaptativa, inclusive em processos inflamatórios como a sepse (Vasilescu et al. 2009).

Os miRNA atuam nas vias regulatórias de diversas citocinas; o aumento do miR-155, por exemplo, foi observado em macrófagos e no tecido hepático após estimulação com LPS/TNF (Wang et al. 2012) e a aplicação de miR-511 em camundongos reduziu a expressão do receptor de TNF e protegeu contra a síndrome do choque tóxico dependente de TNF (Puimege et al. 2015). Eles também atuam na via de sinalização dos receptores tipo toll (*toll like receptor*/TLR), importantes na resposta imune inata inicial contra a infecção bacteriana; o TLR-4, importante na sepse, apresenta vários miRNAs associados à sua regulação (Benz et al. 2016).

O avanço no conhecimento dos mecanismos moleculares da expressão gênica dos fatores moduladores da sepse pode contribuir para a compreensão da defesa do organismo, das vias de ação dos sistemas imune inato e adaptativo com desenvolvimento de testes diagnósticos indicadores de resposta inflamatória aguda e agentes terapêuticos específicos. Para isso, é preciso que os dados de padrões de expressão gênica sejam coletados em sistemas experimentais bem definidos, de forma que seja possível indicar a regulação de rotas celulares e as funções fisiológicas dos genes envolvidos em resposta celular particular do hospedeiro.

Justificativa do trabalho

Como na sepse a PARP é continuamente ativada devido aos danos ao DNA e ela atua na regulação dos linfócitos Treg, a sua inibição pode ser uma opção de tratamento imunomodulador para a sepse. Nossa hipótese é que o tratamento com olaparibe seja capaz de manter os linfócitos Th17 e Treg próximos aos valores basais, impedindo que ocorra a resposta exacerbada causada por estas células.

Objetivos

Geral

Avaliar o efeito da inibição da PARP nos linfócitos T reguladores e linfócitos Th17 em modelo experimental de sepse e alterações em miRNA.

Específicos

Analisar a proporção e quantificar os linfócitos Treg e linfócitos Th17 em camundongos submetidos à CLP e tratados com olaparibe.

Analisar a expressão de citocinas relacionadas aos linfócitos Treg e Th17 em camundongos submetidos à CLP e tratados com olaparibe.

Analisar a expressão de miRNA relacionados aos Treg, Th17 e sepse em camundongos submetidos à CLP e tratados com olaparibe.

Materiais e métodos

Comissão de Ética

Este trabalho foi registrado com o número 947/2017 e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 08 de novembro de 2017.

Desenho experimental in vivo

Animais

Foram utilizados 80 camundongos machos da linhagem C57Bl/6 com 7 semanas de idade pesando cerca de 20-25 gramas fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da mesma instituição à temperatura média de 22°C, com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07h00min às 19h00min horas (período claro) e 19h00min às 07h00min (período escuro). Após 5 dias de adaptação à troca de ambiente os animais foram alocados em gaiolas plásticas, cada uma contendo 5 animais.

Grupos

Os animais foram subdivididos nos seguintes grupos:

Grupo Veículo (V): Não foi submetido à CLP e não foi tratado com inibidor de PARP, recebeu apenas veículo.

Grupo Olaparibe (O): Não foi submetido à CLP e foi tratado com o inibidor de PARP.

Grupo CLP-Veículo (CLP-V): Foi submetido à CLP e não foi tratado com inibidor de PARP, recebeu apenas o veículo.

Grupo CLP-Olaparibe (CLP-O): Foi submetido à CLP e tratado com inibidor de PARP.

Escolha do modelo experimental

Para simular a sepse nos camundongos utilizamos o modelo de ligadura e punção cecal (CLP) por assemelhar-se ao curso da sepse em humanos (Toscano et al. 2011).

Ligadura e punção cecal - CLP

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de ketamina (80mg/Kg) e xilasina (10mg/Kg) que foi administrada intraperitonealmente. Sob condições assépticas, foi realizada uma laparotomia de 1 a 2 cm e o ceco foi exposto. Observamos toda sua extensão e o ligamos firmemente cerca de 1/3, abaixo da válvula ileocecal, com uma sutura de algodão 3.0 (Ethicon; Johnson & Johnson, USA). A região contida foi perfurada três vezes na parte menos vascularizada com uma agulha de gauge 21 (Becton Dickinson, EUA). Após pequeno extravasamento do material do ceco, ele foi devolvido para a cavidade peritoneal e a laparotomia foi suturada com fio de algodão 4.0. Os animais foram devolvidos às suas gaiolas com livre acesso a comida e água.

Inibidor de Parp

O olaparibe foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração final de 4%. Em seguida, foi acrescentado polietilenoglicol (PEG) na concentração final de 5%. A solução foi aquecida à 37°C e o volume final foi completado com PBS filtrado.

Os grupos que não receberam tratamento com olaparibe, receberam uma solução (Veículo) com DMSO e PEG nas mesmas concentrações que os grupos que receberam o fármaco.

Doses

Os animais dos grupos olaparibe (O) e CLP-olaparibe (CLP-O) receberam duas doses do inibidor de PARP de nome comercial Olaparibe (Lynparza, Astra-Zeneca) na dose de 10 mg/Kg por via intraperitoneal. A primeira dose foi após 30 minutos da realização da CLP e a segunda após 8 horas. Os grupos Veículo e CLP-Veículo receberam nos mesmos horários a quantidade proporcional do veículo.

Experimentos

Coleta de tecidos

Após 24 horas de CLP, todos os animais foram eutanasiados com ketamina (240mg/Kg) e xilasina (30mg/Kg). Foi coletado sangue, pela veia cava inferior, e tecidos: baço e timo. O sangue foi centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos a 4°C para separação do plasma dos elementos celulares.

Citometria de fluxo

Baço, timo e sangue (células) foram utilizados para caracterização fenotípica de células por citometria de fluxo, na qual a análise das populações celulares foi determinada. Foram realizados quatro painéis:

Painel 1: marcação de CD3 (linfócitos T), CD4 (linfócitos T CD4) e CD8 (linfócitos T CD8). Painel 2: marcação de CD4 (linfócitos T CD4), CD25 (cadeia alfa do receptor de IL-2) e FoxP3 (linfócitos T reguladores). Painel 3: marcação de CD4 (linfócitos T CD4), IL17A, IL17E, e ROR γ (linfócitos Th17). Painel 4: marcação de CD11b (monócitos), CD19 (linfócitos B) e Ly6G (neutrófilos).

Para os painéis 1 e 4, alíquotas de células (5×10^5) foram ressuspensas em 20 μ L de PBS-BSA 2% contendo os anticorpos monoclonais adequados para análise dos marcadores de superfície. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD3 (FITC) (Biolegend), anti-CD4 (PE) (Biolegend), anti-CD8a (PE/Cy5) (Biolegend),

anti-CD11b (APC) (eBioscience), anti-CD19 (PE-Cy5) (Temecula), anti-Ly6G (PE) (eBioscience). As células foram incubadas durante 30 minutos na geladeira, depois lavadas uma vez com 500 μ L de PBS e então ressuspensas em 200 μ L de PBS para análise em citômetro de fluxo Guava 8HT (Merck-Millipore).

Para os painéis 2 e 3 foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD4 (PE-Cy7) (Biolegend) e anti-CD25 (APC-Cy7) (Biolegend). As células foram incubadas durante 30 minutos na geladeira, depois lavadas uma vez com 500 μ L de PBS. Para fazer a marcação das moléculas intracelulares, as amostras foram incubadas com 20 μ L de tampão de permeabilização 1X (Biolegend) contendo o anticorpo anti-FoxP3 (PE) (Temecula) (para o painel 2) e os anticorpos anti-ROR γ (PE) (Temecula), anti-IL17A (Alexa 647) (Temecula) e anti-IL17F (Alexa 488) (Temecula) (para o painel 3) durante 30 minutos na geladeira, depois lavadas uma vez com 500 μ L de PBS e então ressuspensas em 200 μ L de PBS para análise em citômetro de fluxo Guava 8HT (Merck-Millipore).

Extração de RNA

Os tecidos (baço, timo e células sanguíneas) foram homogeneizados com Trizol Reagent (Invitrogen) conforme especificações do fabricante para obtenção do RNA total.

Tratamento com DNase

As amostras foram tratadas com DNase I, Amplification Grade (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) de acordo com as especificações do fabricante.

Análise da concentração

A análise da concentração e pureza foi mensurada por espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, EUA) nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm para determinação

da concentração (ng/ μ L) e das razões 260/280 e 230/260 (indicativo da qualidade do RNA extraído).

Transcrição Reversa

O cDNA foi sintetizado à partir do RNA total extraído e realizado por meio do miScript II RT Kit (Qiagen - Hilden, Alemanha), usando o tampão HiSpec. As amostras foram incubadas em termociclador por 60 minutos à 37°C seguida por 5 minutos à 95°C para inativação da enzima transcriptase reversa. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer -20°C até a realização do array e dos qPCR.

Array de Micro RNAs

A análise em larga escala da expressão dos miRNAs foi realizada utilizando "miScript miRNA PCR Array Mouse Apoptosis" (Qiagen - Hilden, Alemanha). Os controles incluídos nas placas permitiram o uso do método $\Delta\Delta CT$ de quantificação relativa, avaliação do desempenho da transcrição reversa e avaliação do desempenho do PCR. Foram feitas 24 placas, sendo 12 para baço e 12 para timo; n = 3 por grupo. Foi utilizado o kit para PCR "miScript SYBR® Green PCR Kit" (Qiagen - Hilden, Alemanha) e o experimento foi realizado no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ABI), segundo os parâmetros: durante 15 min a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 94°C; 30 segundos a 55°C; e 30 segundos a 70°C, e seu software determinou o número de cópias de cada gene das placas de microarray.

A análise do array foi realizada pelo software disponível no Data Analysis Center da SaBiosciences (<https://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>). Os miRNA mais significativamente alterados e relacionados aos linfócitos Th17, Treg e a sepse foram confirmados por RT-PCR.

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Os miRNA significativamente alterados no array foram confirmados e quantificados por análise quantitativa da expressão gênica por meio de qPCR no StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ABI).

Os ensaios foram realizados utilizando o kit para PCR "miScript SYBR® Green PCR Kit" (Qiagen - Hilden, Alemanha). Os parâmetros de amplificação foram: (1) ativação da enzima a 95°C por 15 minutos, (2) 40 ciclos com três etapas: desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento dos primers a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 15 segundos. Após a determinação do número de cópias de cada gene, o valor obtido para os genes de interesse foi normalizado pelos valores dos genes constitutivos cujos valores mantiveram-se uniformes em todos os grupos estudados. Eles foram escolhidos de acordo com a classificação feita pelo RefFinder Software (Xie et al. 2012), uma ferramenta online que faz um *screening* dos genes de referência utilizando e integrando os programas computacionais geNorm, Normfinder, BestKeeper, e o método de comparação de Ct para comparar e determinar quais os melhores *housekeepings*.

Tabela 3: Sequência de primers utilizados

Gene	Sequência
mmu-miR-15a-5p	5' TAG CAG CAC ATA ATG GTT TGT G 3'
mmu-miR-17-5p	5' CAA AGT GCT TAC AGT GCA GGT AG 3'
mmu-miR-146a-5p	5' TGA GAA CTG AAT TCC ATG GGT T 3'
mmu-miR-365-3p	5' TAA TGC CCC TAA AAA TCC TTA T 3'

Extração e quantificação de proteínas

Os tecidos baço e timo foram utilizados para extração de proteínas realizada em tampão contendo 1% tergitol NP-40 (Sigma - St. Louis, Missouri, EUA), 10% glicerol, 135mM NaCl, 20mM tris (pH 8.0), 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfo-

nil (PMSF) (Sigma - St. Louis, Missouri, EUA). As amostras ficaram 30 minutos em gelo em gangorra e foram centrifugadas a 15000 rpm a 4°C por 30 minutos. Em seguida foi realizada quantificação pelo método de Bradford utilizando o reagente Bradford (Sigma - St. Louis, Missouri, EUA) e medindo a absorbância em 450 nm.

Deteção e quantificação de citocinas

Foram quantificadas as citocinas pelo método de milliplex (uma variante do ELISA) utilizando o "MAP Mouse TH17 Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay" (Merck Millipore - Burlington, Massachusetts, EUA). A análise de citocinas foi feita seguindo as orientações do fabricante para proteínas extraídas do baço e do timo e plasma.

Análise de dados

Os resultados foram avaliados no GraphPad Prism Software. Foram feitos testes de normalidade com intervalo de confiança de 95%. As análises mostraram normalidade e portanto foram seguidas de one-way ANOVA com post-hoc Tukey, sendo o nível de significância (α) de 0,05 e o intervalo de confiança de 95%. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor de P foi menor que 0,05, sendo * os grupos diferentes do grupo veículo (V), # os grupos diferentes do grupo olaparibe (O) e \$ os grupos diferentes do grupo CLP tratado com veículo (CLP-V). Os resultados estão apresentados em média +/- erro padrão da média.

Resultados

Dados observacionais

Dos 23 camundongos submetidos à CLP e que receberam veículo (CLP-V), quatro morreram antes das primeiras 24 horas. No grupo CLP-O, dos 23 submetidos à CLP e que receberam olaparibe, dois morreram antes das primeiras 24 horas. Após a CLP os camundongos tornaram-se letárgicos, ficaram amontoados e apresentaram piloereção. Após 8 horas (no momento da segunda dose de olaparibe ou veículo) os animais do grupo tratado com olaparibe apresentaram um comportamento menos letárgico que os animais não tratados.

Efeito da CLP em linfócitos Treg

Nos tecidos analisados verificamos aumento da porcentagem de linfócitos Treg no grupo submetido à CLP quando comparado ao grupo controle. No baço (figura 2A), no timo (figura 2B) e no sangue (figura 2C) houve diferença estatística entre os grupos, sendo que no sangue o aumento foi mais pronunciado.

Figura 2: **Efeito da CLP em linfócitos Treg.** Comparação das porcentagens de linfócitos Treg entre os grupos veículo (V) e CLP-veículo (CLP-V) em células do baço (A), do timo (B) e do sangue (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V) ($n \geq 12$).

Efeito da CLP em linfócitos Th17

A porcentagem de linfócitos Th17 no grupo submetido à CPL estava aumentada no baço (figura 3A) e ainda mais evidentemente no sangue (figura 3C)

quando comparado ao grupo controle. No timo (figura 3B) não houve diferença estatística entre os grupos. Novamente pudemos ver que nosso modelo de CLP foi capaz de mimetizar o efeito da sepse nestas células que é visto em pacientes.

Figura 3: **Efeito da CLP em linfócitos Th17.** Comparação das porcentagens de linfócitos Th17 entre os grupos veículo (V) e CLP-veículo (CLP-V) em células do baço (A), do timo (B) e do sangue (c). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V) ($n \geq 12$).

Linfócitos T

As subpopulações de linfócitos foram avaliadas por citometria de fluxo utilizando os anticorpos anti CD3, anti CD4 e anti CD8. Foi feito um primeiro *gate* para seleção das células (eliminando debris celulares) (Figura 4A), depois um novo *gate* selecionando apenas as células marcadas com anti-CD3 (Figura 4B) e as análises foram feitas pelas marcações CD3+CD4+CD8- ou CD3+CD4-CD8+ ou CD3+CD4+CD8+ (Figura 4C).

Figura 4: **Análise feita por citometria de fluxo** *Gate* para retirar debris celulares (A), *gate* selecionando as células marcadas com anti-CD3 (B), combinação dos anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 dentro do *gate* CD3+

Os linfócitos T CD4+ do baço dos animais não sofreram alterações em porcentagem (figura 5A), mas estavam reduzidos em número de células nos grupos submetidos à CLP quando comparados aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) (figura 5B). Os linfócitos T CD8+ também não sofreram alterações em porcentagem entre os grupos (figura 5C) mas em número de células o grupo submetido à CLP que não recebeu tratamento (CLP-V) tinha menos células quando comparado ao grupo veículo (V) (figura 5D). Os linfócitos T duplo-marcados não estavam alterados em porcentagem entre os grupos (figura 5E) mas o número de células estava reduzido nos grupos submetidos à CLP quando comparados aos animais dos grupos veículo (V) e olaparibe (O) (figura 5F).

Figura 5: Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T no baço. Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD3+ CD4+ CD8- em porcentagem (A) e em quantidade de células (B), CD3+ CD4- CD8+ em porcentagem (C) e em quantidade de células (D), CD3+ CD4+ CD8+ em porcentagem (E) e em quantidade de células (F) de células do baço. (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 13$).

No timo, observamos aumento da porcentagem dos linfócitos T CD4+ (figura 6A) e T CD8+ (figura 6C) nos animais que foram submetidos à CLP quando comparados com os animais dos grupos veículo (V) e olaparibe (O). Entretanto, quando analisamos o número total de células no tecido, observamos que houve queda tanto do número de linfócitos T CD4+ (figura 6B) quanto de

linfócitos T CD8+ (figura 6D) nos grupos submetidos à CLP quando comparados com os grupo veículo (V) e/ou olaparibe (O). Os linfócitos T duplo-marcados CD4+ CD8+ apresentaram queda (também quando comparados com os grupos veículo e olaparibe) tanto em porcentagem (figura 6E) quanto em número de células (figura 6F).

Figura 6: **Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T no timo.** Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD3+ CD4+ CD8- em porcentagem (A) e em quantidade de células (B), CD3+ CD4- CD8+ em porcentagem (C) e em quantidade de células (D), CD3+ CD4+ CD8+ em porcentagem (E) e em quantidade de células (F) em células do timo. (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 13$).

No sangue ocorre queda da porcentagem dos linfócitos T CD4⁺ dos animais que foram submetidos à CLP e não receberam o tratamento com olaparibe (CLP-V) com relação ao grupo veículo (V) (figura 7A) e queda em número de células dos animais dos grupos submetidos à CLP quando comparados aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) (figura 7B). Isso ocorre também com os linfócitos T CD8⁺, que estão reduzidos em porcentagem no grupo submetido à CLP não tratado (CLP-V) quando comparado aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) (figura 7C) e em número de células dos grupos submetidos à CLP quando comparados aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) (figura 7D). Os linfócitos duplo-marcados não sofreram alterações em nenhum dos grupos em porcentagem no sangue (figura 7E) mas estavam reduzidos no grupo submetido à CLP que recebeu o tratamento quando comparado ao grupo veículo (V) (figura 7F).

Figura 7: Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T no sangue. Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD3+ CD4+ CD8- em porcentagem (A) e em quantidade de células (B), CD3+ CD4- CD8+ em porcentagem (C) e em quantidade de células (D), CD3+ CD4+ CD8+ em porcentagem (E) e em quantidade de células (F) em células do sangue. (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 6$).

Linfócitos T reguladores

Os linfócitos T reguladores (Treg) são uma subpopulação dos CD4+ e foram avaliados por citometria de fluxo utilizando anticorpos anti CD4, anti CD25 e anti FoxP3. Foi feito um primeiro *gate* para seleção das células (eliminando

debris celulares) (Figura 8A), depois um novo *gate* selecionando apenas as células marcadas com anti-CD4 (Figura 8B) e as análises foram feitas pelas marcações CD4+CD25+ (células ativas) ou CD4+CD25+FoxP3+ (linfócitos Treg) (Figura 8C).

Figura 8: **Análise feita por citometria de fluxo** *Gate* para retirar debris celulares (A), *gate* selecionando as células marcadas com anti-CD4 (B), combinação dos anticorpos anti-CD25 e anti-FoxP3 dentro do *gate* CD4+

No baço dos animais submetidos à CLP houve aumento da porcentagem (figura 9A) e do número (figura 9B) de linfócitos T reguladores CD4+CD25+FoxP3+ do grupo submetido à CLP que não recebeu tratamento (CLP-V) quando comparado com os grupos veículo (V) e olaparibe (O).

Figura 9: **Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T reguladores no baço.** Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD4+CD25+ FoxP3+ em porcentagem (A) e em quantidade de células (B). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 12$).

No timo os linfócitos T reguladores CD4+CD25+FoxP3+ estavam elevados em porcentagem nos grupos submetidos à CLP quando comparados aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) (figura 10A). Em quantidade de células, o grupo submetido à CLP que recebeu tratamento (CLP-O) apresentou níveis mais elevados que o grupo que não recebeu o tratamento (figura 10B). A porcentagem dos linfócitos T CD4+CD25+ estava aumentada nos animais que foram submetidos à CLP e não receberam olaparibe (CLP-V) quando comparados aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) mas os que receberam o tratamento conseguiram manter os níveis mais baixos (figura 10C).

Figura 10: **Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T reguladores no timo.** Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD4+CD25+ FoxP3+ em porcentagem (A) e em quantidade de células (B), CD4+ CD25+FoxP3- em porcentagem (C) de células do timo. (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O); (\$) $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP-veículo (CLP-V) ($n \geq 12$).

No sangue, a porcentagem dos linfócitos T reguladores CD4+CD25+FoxP3+

aumentou nos animais submetidos à CLP (figura 11A) mas em quantidade de células não houve diferença entre os grupos (figura 11B).

Figura 11: Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T reguladores no sangue. Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD4+CD25+FoxP3+ em porcentagem (A) e em quantidade de células (B) de células do sangue. (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 8$).

Linfócitos Th17

Os linfócitos T auxiliares 17 (Th17) são uma subpopulação dos CD4+ e foram avaliados por citometria de fluxo utilizando anticorpos anti CD4, anti-ROR γ , anti IL-17A e anti IL-17F. Foi feito um primeiro *gate* para seleção das células (eliminando debris celulares) (Figura 12A), depois um novo *gate* selecionando apenas as células marcadas com anti-CD4 (Figura 12B), e um último *gate* selecionando todas as células marcadas com ROR γ e/ou IL-17A (Figura 12C) e as análises foram feitas pelas marcações CD4+ROR γ +IL-17A+IL-17F+ (Figura 12D).

Figura 12: **Análise feita por citometria de fluxo** *Gate* para retirar debris celulares (A), *gate* selecionando as células marcadas com anti-CD4 (B), *gate* selecionando todas as células com marcações anti-ROR γ e/ou anti-IL-17A (C) e combinação dos anticorpos anti-ROR γ e anti-IL-17F dentro do *gate* ROR γ + e/ou IL-17A+ (D)

No baço, houve aumento em porcentagem dos linfócitos Th17 dos animais submetido à CLP e que não receberam tratamento (CLP-V) quando comparados ao grupo olaparibe (O), entretanto animais submetidos à CLP que receberam olaparibe (CLP-O) não tiveram esse aumento (figura 13A). Em número de células, o grupo submetido à CLP que recebeu tratamento (CLP-O) apresentou valores mais baixos que o grupo que não foi tratado (CLP-V) (figura 13B).

No timo não houve alterações dos linfócitos Th17 em nenhum dos grupos observados, nem em porcentagem (figura 13C) e nem em quantidade de células (figura 13D). No sangue, o grupo submetido à CLP que não recebeu tratamento com olaparibe (CLP-V) apresentou a porcentagem de linfócitos Th17 elevada (figura 13E) quando comparado ao grupo veículo (V). Os grupos submetidos à

CLP apresentaram queda em número de células quando comparados ao grupo veículo (V) (figura 13F).

Figura 13: **Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos T auxiliares 17.** Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos T CD4+IL17A+IL17F+ ROR γ + em porcentagem (A) e em quantidade de células (B) de células do baço, em porcentagem (C) e em quantidade de células (D) de células do timo e em porcentagem (E) e em quantidade de células (F) de células do sangue. (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O); (\$) $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP-veículo (CLP-V) ($n \geq 4$).

Relação Th17/Treg

A relação Th17/Treg está relacionado ao maior score SOFA. Tanto no baço (figura 14A) quanto no timo (figura 14B), os animais submetidos à CLP que receberam tratamento com olaparibe (CLP-O) apresentaram a relação menor que os que não receberam o tratamento (CLP-V). No sangue (figura 14C) não encontramos alterações.

Figura 14: **Relação entre Th17 e Treg.** Relação entre os valores obtidos nos painéis de Th17 e Treg por citometria de fluxo. Baço (A), timo (B) e sangue (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP-veículo (CLP-V) ($n \geq 5$).

Linfócitos B, neutrófilos e monócitos

Linfócitos B, neutrófilos e monócitos foram avaliados no baço e no sangue por citometria de fluxo utilizando anticorpos anti CD19, anti Ly6G e anti CD11b. Foi feito um primeiro *gate* para seleção das células (eliminando debris celulares) (Figura 15A), e as análises foram feitas pelas marcações CD19+ (Figura 15B) ou C11b+ (Figura 15C) ou Ly6G+ (Figura 15D).

Figura 15: **Análise feita por citometria de fluxo** *Gate* para retirar debris celulares (A), células marcadas com anti-CD19 (B), células marcadas com anti-CD11b (C) e células marcadas com anti-Ly6G (D).

Os linfócitos B CD19+ do baço não apresentaram alterações em nenhum dos grupos (figura 16A), mas estavam reduzidos no grupo que sofreu CLP e recebeu olaparibe (CLP-O) nas amostras de sangue (figura 16B).

Os neutrófilos Ly6G+ do baço não apresentaram alterações em nenhum dos grupos (figura 16C), mas no sangue estavam aumentados nos grupos que sofreram CLP com relação ao grupo olaparibe (figura 16D).

Os monócitos CD11b+ do baço não apresentaram alterações em nenhum dos grupos (figura 16E), mas no sangue estavam aumentados nos grupos que sofreram CLP (figura 16F).

Figura 16: Efeito da CLP e do olaparibe em linfócitos B, neutrófilos e monócitos
Quantificação por citometria de fluxo de linfócitos B CD19+ (A em baço e B em sangue), neutrófilos Ly6G+ (C em baço e D em sangue) e monócitos CD11+ (E em baço e F em sangue). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 4$).

Quantificação de citocinas

Foram quantificadas as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL17a, IL-17f, IL-22, TNF- α , TNF- β e INF- γ no baço, no timo e no plasma.

O plasma do grupo submetido à CLP que não recebeu tratamento (CLP-V) apresentou níveis mais elevados de IL-1 β quando comparados aos grupos veículo (V) e olaparibe (O); o tratamento impediu o aumento dessa citocina de forma bastante significativa (figura 17C). O baço apresenta um perfil semelhante ao observado no plasma (figura 17A) e o timo teve uma resposta diferente dos demais: a citocina estava elevada em ambos os grupos submetidos à CLP.

Figura 17: **Efeito da CLP e do olaparibe em IL-1 β** Quantificação de interleucina 1 β em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 4$).

No plasma o grupo submetido à CLP que não recebeu tratamento (CLP-V) apresentou níveis mais elevados de IL-6 quando comparados aos grupos veículo (V) e olaparibe (O), inclusive superiores ao grupo tratado (CLP-O) (figura 18C). No baço (figura 18A) e no timo (figura 18B) não houve diferença entre os grupos.

Figura 18: **Efeito da CLP e do olaparibe em IL-6** Quantificação de interleucina 6 em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O); (\$) $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP-veículo (CLP-O) ($n \geq 4$).

O plasma do grupo submetido à CLP que não recebeu tratamento (CLP-V) apresentou níveis mais elevados de IL-10 quando comparados aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) (figura 19C). No baço, os grupos CLP apresentaram queda dessa citocina quando comparados aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) (figura 19A) e no timo não houve diferença entre os grupos (figura 19B).

Figura 19: **Efeito da CLP e do olaparibe em IL-10** Quantificação de interleucina 10 em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 4$).

O plasma do grupo submetido à CLP que não recebeu tratamento (CLP-V) apresentou níveis mais elevados de IL-17a quando comparados aos grupos veículo (V) e olaparibe (O), inclusive superiores ao grupo tratado (CLP-O) (figura 20C). No baço a quantidade de IL-17a foi menor no grupo submetido à CLP que recebeu tratamento com olaparibe (CLP-O) quando comparado ao grupo veículo (V) (figura 20A). No timo não houve diferença entre os grupos (figura 20B).

Figura 20: **Efeito da CLP e do olaparibe em IL-17A** Quantificação de interleucina 17a em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O); (\$) $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP-veículo (CLP-O) ($n \geq 4$).

Não houve diferença estatística da quantidade de IL-17f entre os grupos, mas o perfil dos gráficos mostra redução nos animais submetidos à CLP e tratados com olaparibe (CLP-O) no baço (figura 21A) e no plasma (figura 21C) e aumento no grupo submetido à CLP não tratado (CLP-V) no timo (figura 21B).

Figura 21: Efeito da CLP e do olaparibe em IL-17F Quantificação de interleucina 17f em baço (A), timo (B) e plasma (C). ($n \geq 4$).

A quantidade de IL-22 foi menor no baço dos grupos submetidos à CLP quando comparados ao grupo veículo (V) e/ou olaparibe (O) (figura 22A). No timo houve aumento em ambos os grupos submetidos à CLP quando comparado ao grupo veículo (V) (figura 22B). No plasma não houve diferença estatística, mas o perfil do gráfico mostra redução no grupo submetido à CLP tratado com olaparibe (CLP-O).

Figura 22: **Efeito da CLP e do olaparibe em IL-22** Quantificação de interleucina 22 em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 4$).

No plasma o grupo submetido à CLP que não recebeu tratamento (CLP-V) apresentou níveis mais elevados de TNF- α quando comparados aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) (figura 23C). No baço, embora sem diferença estatística significativa, o perfil do gráfico mostra um leve aumento nos animais submetidos à CLP e não tratados (CLP-V) (figura 23A), e no timo, aumento no grupo submetido à CLP e tratado com olaparibe (CLP-O) (figura 23B).

Figura 23: **Efeito da CLP e do olaparibe em TNF- α** Quantificação de TNF- α em baço (A), timo (B) e plasma (C). ($n \geq 4$).

A quantidade de TNF- β foi menor no baço dos grupos submetidos à CLP quando comparados ao grupo olaparibe (O) (figura 24A). No timo houve aumento em ambos os grupos submetidos à CLP quando comparado aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) (figura 24B). No plasma o grupo submetido à CLP que não recebeu tratamento (CLP-V) apresentou níveis mais baixos quando comparados aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) (figura 24C).

Figura 24: **Efeito da CLP e do olaparibe em TNF- β** Quantificação de TNF- β em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) ($n \geq 4$).

O plasma do grupo submetido à CLP que não recebeu tratamento (CLP-V) apresentou níveis mais elevados de INF- γ quando comparados ao grupo veículo (V) (figura 25C). No baço houve queda nos grupos submetidos à CLP quando comparados ao grupo veículo (V) (figura 25A) e no timo não houve diferença estatística, mas o perfil do gráfico mostra aumento nos grupos tratados com olaparibe (O e CLP-O) (figura 25B).

Figura 25: Efeito da CLP e do olaparibe em INF- γ Quantificação de INF- γ em baço (A), timo (B) e plasma (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V) ($n \geq 4$).

MicroArray

O software do aparelho StepOnePlus (ABI) forneceu a determinação do número de cópias de cada gene das placas de microarray. A análise do array foi realizada pelo software disponível no Data Analysis Center da SaBiosciences (<https://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center>).

overview-page/) e os miRNA mais significativamente alterados relacionados aos linfócitos Treg, Th17 e sepse foram confirmados por RT-PCR.

RT-PCR

O RT-PCR foi feito dos miRNA 15a-5p, 17-5p, 146a-5p e 365-3p que foram os escolhidos dentre os alterados no array. Para normalização, foi feita uma análise no RefFinder, mostrando que os melhores *housekeepings* eram: SNORD61 e SNORD68 para amostras de baço (figura 26), SNORD 72 e SNORD95 para amostras de timo (figura 27) e SNORD 68 e SNORD 95 para amostras de sangue (figura 28).

Figura 26: **Classificação dos genes pelo RefFinder Software** Classificação dos possíveis genes *housekeepings* realizada pelo RefFinder Software com base nos resultados obtidos para os grupos Veículo (V), Olaparibe (O), CLP-Veículo (CLP-V) e CLP-Olaparibe (CLP-O) em amostras de baço. Os genes à esquerda os mais estáveis e os à direita os menos estáveis. Os dois mais estáveis (SNORD68 e SNORD61) foram selecionados para serem *housekeepings* e normalizarem as amostras (n = 3).

Figura 27: **Classificação dos genes pelo RefFinder Software** Classificação dos possíveis genes *housekeepings* realizada pelo RefFinder Software com base nos resultados obtidos para os grupos Veículo (V), Olabaribe (O), CLP-Veículo (CLP-V) e CLP-Olaparibe (CLP-O) em amostras de timo. Os genes à esquerda os mais estáveis e os à direita os menos estáveis. Os dois mais estáveis (SNORD95 e SNORD72) foram selecionados para serem *housekeepings* e normalizarem as amostras (n = 3).

Figura 28: **Classificação dos genes pelo RefFinder Software** Classificação dos possíveis genes *housekeepings* realizada pelo RefFinder Software com base nos resultados obtidos para os grupos Veículo (V), Olaparibe (O), CLP-Veículo (CLP-V) e CLP-Olaparibe (CLP-O) em amostras de sangue. Os genes à esquerda os mais estáveis e os à direita os menos estáveis. Os dois mais estáveis (SNORD68 e SNORD95) foram selecionados para serem *housekeepings* e normalizarem as amostras (n = 3).

A expressão do miRNA 15a-5p estava reduzida nos animais submetidos à CLP e não tratados (CLP-V) quando comparado ao grupo olaparibe (O) tanto em células do baço (figura 29A) quanto do timo (figura 29B). Embora o perfil seja semelhante ao observado nos outros tecidos, não houve diferença significativa na expressão do miR-15a-5p nos leucócitos circulantes (figura 29C).

Figura 29: **RT-PCR** Expressão do miRNA 15a-5p em células do baço (A), do timo (B) e sangue (C). (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O) (n $\geq$ 5).

A expressão do miRNA 17a-5p não apresentou alterações entre os grupos em células do baço (figura 30A). Em células do timo estava elevada no grupo olaparibe (O) quando comparado ao grupo veículo (V), reduzida nos animais submetidos à CLP e não tratados (CLP-V) quando comparado aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) e no grupo submetido à CLP tratado (CLP-O) quando comparado ao grupo olaparibe (O) (figura 30B). No sangue ocorreu aumento da expressão no grupo submetido à CLP e tratado com olaparibe (CLP-O) quando comparado aos demais grupos (figura 30C).

Figura 30: **RT-PCR** Expressão do miRNA 17a-5p em células do baço (A), do timo (B) e sangue (C). (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p < 0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O); (\$) $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP-veículo (CLP-V) ($n \geq 5$).

A expressão do miRNA 146a-5p estava reduzida em células do baço de animais submetidos à CLP não tratados (CLP-V) quando comparado ao grupo olaparibe (O) (figura 31A). Em células do timo a expressão aumentou nos grupos submetidos à CLP (CLP-V e CLP-O) quando comparados ao grupo veículo (V) e o CLP-O também quando comparado ao grupo olaparibe (O) (figura 31B). No sangue ocorreu aumento da expressão no grupo submetido à CLP e tratado com olaparibe (CLP-O) quando comparado aos grupos veículo (V) e olaparibe (O) (figura 31C).

Figura 31: **RT-PCR** Expressão do miRNA 146a-5p em células do baço (A), do timo (B) e sangue (C). (*) $p<0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p<0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O). ($n \geq 5$).

A expressão do miRNA 365-5p estava elevada em células do baço do grupo submetido à CLP e não tratado (CLP-V) quando comparado ao grupo veículo (V) (figura 32A). Em células do timo a expressão estava elevada nesse mesmo grupo quando comparado aos grupos veículos (V) e olaparibe (O) (figura 32B). No sangue não houve alteração da expressão entre os grupos (figura 32C).

Figura 32: **RT-PCR** Expressão do miRNA 365-5p em células do baço (A), do timo (B) e sangue (C). (*) $p<0,05$ comparado com o grupo veículo (V); (#) $p<0,05$ comparado com o grupo olaparibe (O). ($n \geq 5$).

Discussão

Na sepse ocorre linfopenia pela morte de linfócitos e queda na sua proliferação. A linfopenia pode ser um possível marcador de prognóstico, visto que pacientes com linfopenia persistente após o diagnóstico de sepse apresentam maior mortalidade quando comparados aos que não tiveram linfopenia (Drewry et al. 2014). Em nosso modelo, pudemos observar linfopenia nos animais através da queda de linfócitos T mono-marcados no sangue, baço e timo e queda da proliferação de linfócitos no timo. Isso mostra que nosso modelo aproxima-se bastante dos dados observados em pacientes com sepse.

Os linfócitos T são originados no timo como duplo-marcados (CD4+CD8+) e depois passam a expressar apenas CD4+ ou CD8+. Condizente com dados da literatura que apontam a involução do timo (Kuchler et al. 2017), observamos queda da proliferação de linfócitos T no timo nos animais submetidos à CLP; houve queda dos duplo-marcados (figuras 6E e F) tanto em porcentagem quanto em quantidade de células.

Os linfócitos T reguladores (Tregs) são linfócitos T auxiliares tolerantes ao próprio e ao não próprio e responsáveis pela supressão imune de células efectoras. Eles apresentam-se elevados em pacientes com sepse e sua inibição pode contribuir para a melhora imunológica (Cao et al. 2015). Novamente nosso modelo mostrou-se eficaz; os animais submetidos à CLP, assim como os pacientes com sepse, apresentam alta dos Treg (figura 2). Com o tratamento com olaparibe, essa alta dos Treg foi controlada, mantendo níveis próximos aos basais (figura 9).

Os linfócitos Treg observados no baço, órgão linfoide periférico, provavelmente são iTreg (Treg induzidos), ou seja, adquiriram fenótipo de Treg na periferia (Sakaguchi et al. 2008). No baço, nosso tratamento mostrou-se eficaz em manter os níveis de Treg próximos a valores basais tanto em porcentagem quanto em quantidade de células após a CLP (figura 9A e B). Embora os animais submetidos à CLP de ambos os grupos apresentem linfopenia (figuras 5B e D), o perfil supres-

sor causado por essas células só é presente nos animais não tratados. Entretanto, os níveis de IL-10 caíram em ambos os grupos submetidos à CLP (figura 19A), e a expressão do miRNA 146a-5p no grupo não tratado (figura 31A), sugerindo que essas células apresentam sua atividade supressora afetada. O miRNA 146a-5p é preferencialmente expresso em linfócitos T reguladores e é indispensável para a supressão mediada por estas células, além de inibir a diferenciação em Th17 (Zhou et al. 2008; Li et al. 2017). No sangue, os linfócitos Treg aumentaram nos grupos submetidos à CLP, assim como o miRNA 146a-5p. Entretanto, a IL-10 só estava elevada no grupo não tratado, o que sugere que embora tenha aumento de Treg, o grupo tratado não é tão supressor quanto o não tratado.

No timo, houve aumento dessas células em porcentagem nos grupos CLP e também em número no grupo tratado (figuras 10A e B), mostrando que a ação do olaparibe pode atuar de forma diferente nos linfócitos nTreg (Treg naturais - adquirem fenótipo regulador no timo). A superexpressão do miRNA 17a-5p reduz a atividade supressora de linfócitos T reguladores (Yang et al. 2016) e no timo o grupo submetido à CLP tratado com olaparibe não apresenta diferença com relação ao grupo veículo (figura 30B), sugerindo que embora ocorra aumento da porcentagem e do número de Treg nesse grupo, a atividade supressora pode estar reduzida. Essa hipótese é corroborada pelo não aumento de IL-10 nesse grupo (figura 19B), a principal citocina de Treg. O miRNA 146a-5p porém estava elevado em ambos os grupos CLP (figura 31B), e é essencial para a supressão mediada por essas células. Talvez o meio pelo qual o olaparibe reduz a atividade supressora seja diferente no timo e no baço. Também no timo, os linfócitos T CD4+CD25+FoxP3- estavam aumentados em porcentagem no grupo submetido à CLP não tratado (figura 10C). Essas são células ativadas e estão associadas ao mau prognóstico e pior sobrevivência em infiltrados de tumores (Siddiqui et al. 2007). No timo o olaparibe age reduzindo as células ativadas (linfócitos T efetores) e aumentando as reguladoras, embora talvez com menor atividade supressora.

A PARP-1 regula negativamente a função de linfócitos Tregs (CD4+CD25+

FoxP3+) poli-ADP-ribosilando FoxP3 (Luo et al. 2015). Sua deleção faz com que a expressão de FoxP3 seja mais persistente e estável, conferindo uma atividade supressora mais intensa aos linfócitos Tregs (Zhang et al. 2013). Camundongos knockout para PARP-1 apresentam maior número de Tregs em órgãos linfáticos periféricos e nTregs no timo (Nasta et al. 2010). Em nosso estudo, a inibição da PARP não alterou os Treg do timo (a deleção completa da PARP-1 a longo prazo deve ter um efeito diferente na maturação celular e seleção da inibição farmacológica parcial de curto prazo) entretanto, quando os camundongos foram submetidos à CLP e tratados com olaparibe, houve aumento da porcentagem e do número de linfócitos Treg (CD4+CD25+FoxP3+) (figuras 10A e B). Além de atuar em Treg, a PARP-1 é cofator positivo do NF- κ B, um fator de transcrição responsável por diversas citocinas que é ativado na CLP. A PARP atua de maneira dependente de estímulo, em processos inflamatórios, para facilitar a formação do complexo pré-iniciação (PIC), um complexo de várias proteínas necessário para a transcrição de genes codificadores de proteína (Hassa et al. 2006).

Como a sepse produz grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species/ ROS) conseqüentemente ocorre quebra de DNA em muitos pontos ao longo dos cromossomos, além de ativar o NF- κ B. Com isso, pode ocorrer a ativação de praticamente toda a massa de PARP nuclear. A nossa hipótese é de que a PARP é consumida na poli-ADP-ribolisação das histonas e como cofator de NF- κ B e outras funções são suprimidas durante a sepse como por exemplo a poli-ADP-ribolização de FoxP3. Dessa forma, na sepse, apesar da ativação da PARP, ocorre aumento de Treg, o que explica o aumento destes linfócitos no baço do grupo submetido à CLP e que não recebeu tratamento.

Assim como os Treg, os linfócitos Th17 estão proporcionalmente elevados em pacientes com sepse (Salomão et al. 2011). Em nosso modelo, este aumento também ocorreu nos camundongos submetidos à CLP (figura3), mas com o tratamento com olaparibe essas células foram controladas, mantendo níveis próximos aos basais. O baço dos animais submetidos à CLP que foram tratados tiveram

queda do número e da porcentagem de linfócitos Th17, já os não tratados tiveram aumento da porcentagem (figuras 13A e B). Logo, apesar de ocorrer linfopenia em ambos os grupos CLP (figuras 5B e D), o perfil pró-inflamatório está mais pronunciado no grupo que não recebeu tratamento. No sangue, o grupo não tratado mostra queda de linfócitos (linfopenia) (figuras 7A e B), mas a porcentagem dos Th17 é maior (figura 13E), mostrando um perfil mais pró-inflamatório. Esses dados nos mostram que embora ocorra queda do número de linfócitos, os animais submetidos à CLP que não receberam tratamento apresentam um perfil pró-inflamatório causado por essas células mais expressivo. Isso mostra que o tratamento com olaparibe foi capaz de reduzir a porcentagem e número de linfócitos Th17, contribuindo para manter a relação Th17/Treg mais baixa e reduzindo a inflamação causada por estas células.

Um possível mecanismo que justifique o aumento de Th17 no grupo não tratado é pelo aumento de citocinas. A atuação da PARP junto ao NF- κ B deve potencializar a expressão de citocinas. A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória, que promove a diferenciação de Th17 (Lasigliè et al. 2011; Mailer et al. 2015), assim como a IL-6 e TNF α (Sehrawat et al. 2017; Zheng et al. 2014), que estão mais expressas no grupo submetido à CLP que não foi tratado (figuras 17C, 18C, 23C). A IL-17A também está elevada neste grupo e é uma das principais citocinas características de Th17 (Sehrawat et al. 2017) (figura 20C). A IL-22 é outra citocina característica de Th17 e está reduzida no baço nos grupos submetidos à CLP (figura 22A). O grupo que não foi tratado apresentou alta dos Th17 (figura 13A e E), o que pode sugerir, que apesar do aumento em porcentagem dessas células, elas estão produzindo pouco dessa citocina. O grupo tratado (CLP-O) apresentou valores de Th17 próximos aos dos controles e menores que o grupo não tratado (CLP-V) (figuras 13B e F), o que explica a queda de IL-22. No timo, embora não tenhamos observado aumento dos Th17, ambos os grupos submetidos à CLP apresentaram alta de IL-22 (figura 22B). INF- γ é uma citocina liberada após a indução da resposta imune adaptativa e tem como função atrair os macrófagos

e em ambos os grupos CLP ela estava reduzida no baço (figura 25A), mas no plasma ela estava elevada no grupo submetido à CLP não tratado (figura 25C). Essa citocina é produzida por Th17 e pode amplificar a patogênese em outros modelos experimentais (Chen et al. 2017). O olaparibe pode ter controlado a produção dessas citocinas, seja por ação direta ou como co-ativador de NF- κ B, e por isso foi capaz de controlar a resposta dos Th17.

Outro possível mecanismo é pela ação do olaparibe na PARP-14, que regula a ativação de STAT3 e a diferenciação de Th17 (Mehrotra et al. 2015). Embora não seja um dado disponível na literatura, pode ser que o olaparibe iniba também a PARP-14, o que justifica a queda no perfil pró-inflamatório dos Th17 no grupo que foi tratado com olaparibe.

A relação Th17/Treg está correlacionada com o score SOFA e quanto maior essa relação, maior o desfecho adverso em pacientes com sepse (Gupta et al. 2016). Em nosso modelo, tanto no baço quanto no timo, nós observamos uma relação Th17/Treg menor nos animais submetidos à CLP tratados com olaparibe (CLP-O) quando comparados com os que não receberam o tratamento (CLP-V) (figuras 14A e B). O tratamento com olaparibe foi capaz de reduzir tanto o perfil pró-inflamatório de linfócitos Th17 quanto o perfil supressor de linfócitos Treg dos camundongos submetidos à CLP e também a relação Th17/Treg.

Os micro RNAs que analisamos estão relacionados à sepse e aos linfócitos Tregs de acordo com dados da literatura. O miRNA 15a-5p é supressor de tumor e está reduzido no plasma de pacientes com sepse que sobreviveram quando comparados aos que não sobreviveram (Wang et al. 2012; Long et al. 2015). Em nosso modelo este miRNA estava reduzido tanto no baço quanto no timo dos animais submetidos à CLP não tratados (figuras 29A e B), sendo que estes são os animais que sobreviveram às primeiras 24h após a CLP. Essa redução não foi observada no grupo submetido à CLP que foi tratado e cujos valores são próximos aos dos grupo veículo (V). O miRNA 365-5p, expresso em pacientes com sepse, é um importante regulador negativo de IL-6 (Xu et al. 2011; Gong et al. 2018), mas

apesar de estar mais expresso no baço e timo dos animais submetidos à CLP e não tratados (figuras 32A e B), não houve diferença significativa na quantidade de IL-6 (figura 18). Esses dados apontam para uma possível regulação por meio da PARP dos miRNAs estudados. Com a CLP houve alteração deles, distanciando a expressão da expressão basal, representada pelos grupos veículo e olaparibe. Entretanto, quando os camundongos foram tratados houve uma reaproximação à expressão basal.

Tanto o miRNA 17a-5p quanto o 146a-5p são importantes para a resposta dos linfócitos Tregs, e a sua modulação pode ser um dos responsáveis pela alteração da porcentagem e quantidade de linfócitos Tregs. De acordo com nossos resultados, eles podem estar sendo modulados pela PARP, seja essa modulação direta ou indireta, fazendo com que os camundongos do grupo submetido à CLP que foram tratados com olaparibe conseguissem respostas mais próximas às basais do que os não tratados.

Como limitações deste trabalho, podemos apontar a ausência do uso de antibióticos e de reposição volêmica, que nos distanciam da prática clínica. O que apresentamos é uma foto de um momento específico do nosso modelo. Nele observamos que o tratamento com inibidor de PARP é capaz de reduzir as respostas anti e pró-inflamatórias, causadas pelos Treg e Th17 respectivamente, e manter a relação Th17/Treg mais baixa. Apontamos ainda que os mecanismos pelos quais isso pode estar acontecendo é devido à regulação de citocinas e/ou de miRNAs (relacionados a estes linfócitos) feita pela PARP, o que precisa ser confirmado em estudos futuros.

Conclusões

O modelo de CLP foi eficaz para reproduzir a linfopenia e o aumento de linfócitos T reguladores e Th17 vistos nos pacientes com sepse. O tratamento com olaparibe reduziu a resposta pró-inflamatória causada pelos linfócitos Th17 - houve queda dos linfócitos Th17 e das citocinas associadas a ele. O tratamento também reduziu a resposta supressora causada pelos linfócitos Treg - houve queda dos linfócitos Treg e/ou da sua principal citocina, IL-10. Além disso, a relação entre Th17 e Treg foi controlada com o tratamento com olaparibe. Possíveis mecanismos pelos quais ocorreu alteração dos linfócitos Th17 e Treg são: por meio da alteração da produção de citocinas, provavelmente pela ação da PARP junto ao NF- κ B, e pela expressão dos miRNA 17a-5p e 146a-5p.

Referências

Ahmad A, Olah G, Herndon D, Szabo C. The clinically used PARP inhibitor olaparib improves organ function, suppresses inflammatory responses and accelerates wound healing in a murine model of third-degree burn injury. *British Journal of Pharmacology*. 2017;175(2):232-245.

Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(1):78.

Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011;306(23):2594-605.

Caiafa P, Guastafierro T, Zampieri M. Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *The FASEB Journal*. 2009; 23(3):672-678.

Cao C, Ma T, Chai Y, Shou S. The role of regulatory T cells in immune dysfunction during sepsis. *World Journal of Emergency Medicine*. 2015;6(1):5-9. doi:10.5847/wjem.j.1920-8642.2015.01.001.

Cauvi DM, Williams MR, Bermudez JA, Armijo G, De Maio A. Elevated expression of IL-23/IL-17 pathway-related mediators correlates with exacerbation of pulmonary inflammation during polymicrobial sepsis. *Shock*. 2014;42(3):246-55.

Chen Y, Chauhan SK, Shao C, Omoto M, Inomata T, Dana R. IFN- γ -Expressing Th17 Cells Are Required for Development of Severe Ocular Surface Autoimmunity. *J Immunol*. 2017;199(3):1163-1169.

Christaki E, Patrozou E. The kinetics of T regulatory cells in shock: beyond sepsis. *Crit Care*. 2010;14(2):132.

Ciccarone F, Zampieri M, Caiafa P. PARP1 orchestrates epigenetic events setting up chromatin domains. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2017;63:123-134.

Citarelli M, Teotia S, Lamb R. Evolutionary history of the poly(ADP-ribose) polymerase gene family in eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology*. 2010;10(1):308.

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical Journal*. 1999;342(2):249.

Deutschman C, Tracey K. Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. *Immunity*. 2014;40(4):463-475.

Dluzen D, Kim Y, Bastian P, Zhang Y, Lehrmann E, Becker K et al. MicroRNAs Modulate Oxidative Stress in Hypertension through PARP-1 Regulation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:1-12.

Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock*. 2014;42(5):383-91.

Finfer S, Machado F. The Global Epidemiology of Sepsis. Does It Matter That We Know So Little?. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2016;193(3):228-230.

Frampton J. Olaparib: A Review of Its Use as Maintenance Therapy in Patients with Ovarian Cancer. *BioDrugs*. 2015;29(2):143-150.

Gagliani N, Vesely M, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm N et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*. 2015;523(7559):221-225.

Ghonim MA, Pyakurel K, Ibba SV, et al. PARP inhibition by olaparib or gene knockout blocks asthma-like manifestation in mice by modulating CD4⁺ T cell function. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13:225. doi:10.1186/s12967-015-0583-0.

Goldfarb RD, Marton A, Szabo E, Virag L, Salzman AL, Glock D, Akhter I, McCarthy R, Parrillo JE, Szabo C. Protective effect of a novel, potent inhibitor of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase in a porcine model of

severe bacterial sepsis. *Critical Care Medicine*. 2002;30(5):974-980

Guglani L, Khader SA. Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(2):120-7.

Gupta D, Bhoi S, Mohan T, Galwnkar S, Rao D. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with post traumatic sepsis. *Cytokine*. 2016;88:214-221.

Hassa PO, Hottiger MO. PARP-1 as Novel Coactivator of NF- κ B in Inflammatory Disorders. In: *Poly(ADP-Ribosyl)ation*. Molecular Biology Intelligence Unit. Springer, Boston, MA 2006.

Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nature reviews Disease primers*. 2016;2:16045. doi:10.1038/nrdp.2016.45.

Kuchler L, Sha L, Giegerich A, Knappe T, Angioni C, Ferreirós N et al. Elevated intrathymic sphingosine-1-phosphate promotes thymus involution during sepsis. *Molecular Immunology*. 2017;90:255-263

Kühlhorn F, Rath M, Schmoeckel K, et al. Foxp3+ regulatory T cells are required for recovery from severe sepsis. *PLoS One*. 2013;8(5):e65109

Lasigliè D, Traggiai E, Federici S, et al. Role of IL-1 beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLPR3 mutated patients. *PLoS One*. 2011;6(5):e20014.

Liu Q, An L, Qi Z, Zhao Y, Li C. Increased Expression of Programmed Cell Death-1 in Regulatory T Cells of Patients with Severe Sepsis and Septic Shock: An Observational Clinical Study. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2017;86(5):408-417.

Long M, Park S, Strickland I, Hayden M, Ghosh S. Nuclear Factor- κ B Modulates Regulatory T Cell Development by Directly Regulating Expression of Foxp3 Transcription Factor. *Immunity*. 2009;31(6):921-931.

Luo X, Nie J, Wang S, Chen Z, Chen W, Li D, Li B. Poly(ADP-ribosyl)ation of FOXP3 Protein Mediated by PARP-1 Protein Regulates the Function of Regu-

latory T Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(48):28675-28682

MacFarlane L, R. Murphy P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*. 2010;11(7):537-561.

Mailer R, Joly A, Liu S, Elias S, Tegner J, Andersson J. IL-1 β promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Scientific Reports*. 2015;5:14674.

Mantzarlis K, Tsolaki V, Zakynthinos E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:1-10

Marik P, Taeb A. SIRS, qSOFA and new sepsis definition. *Journal of Thoracic Disease*. 2017;9(4):943-945.

Mehrotra P, Krishnamurthy P, Sun J, Goenka S, Kaplan MH. Poly-ADP-ribosyl polymerase-14 promotes T helper 17 and follicular T helper development. *Immunology*. 2015;146(4):537-46.

Morales JC, Li L, Fattah FJ, et al. Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 2014;24(1):15-28.

Nasta F, Laudisi F, Sambucci M, Rosado M, Pioli C. Increased Foxp3+ Regulatory T Cells in Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Deficiency. *The Journal of Immunology*. 2010;184(7):3470-3477.

Neijenhuis S, Bajrami I, Campbell J, Lord C, Ashworth A. Abstract B201: Identification of miRNA modulators to PARP inhibitor response. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2011;10(Supplement 1):B201-B201.

Perina D, Mikoc A, Ahel J, Cetkovic H, Žaja R, Ahel I. Distribution of protein poly(ADP-ribosyl)ation systems across all domains of life. *DNA Repair*. 2014;(23):4–16.

Puimège L, Van Hauwermeiren F, Steeland S, Van Ryckeghem S, Vandewalle J, Lodens S et al. Glucocorticoid-induced microRNA-511 protects against TNF by down-regulating TNFR1. *EMBO Molecular Medicine*. 2015;7(8):1004-

1017.

Raphael I, Nalawade S, Eagar T, Forsthuber T. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015;74(1): 5-17.

Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing sepsis as a global health priority — a WHO resolution. *New England Journal of Medicine*. 2017; 377: 414–417.

Ren J, Li B. The Functional Stability of FOXP3 and ROR γ t in Treg and Th17 and Their Therapeutic Applications. *Chromatin Proteins and Transcription Factors as Therapeutic Targets*. 2017;:155-189.

Rendon JL, Choudhry MA. Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *J Leukoc Biol*. 2012;92(3):529-38

Rouleau M, Aubin R, Poirier G. Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *Journal of Cell Science*. 2004;117(6):815-825.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775–787.

Salomão R, Brunialti M, Santos M, Rigato O, Machado F, Silva E. Th17 lymphocytes and alternatively activated monocytes are upregulated in clinical sepsis. *Critical Care*. 2011;15(Suppl 2):P21. doi:10.1186/cc10169.

Sehrawat S, Rouse BT. Interplay of Regulatory T Cell and Th17 Cells during Infectious Diseases in Humans and Animals. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:341. doi:10.3389/fimmu.2017.00341.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315 (8):801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287.

Soriano FG, Liaudet L, Szabo E, Virag L, Mabley J, Pacher P, Szabo C. Resistance against acute septic peritonitis in poly(ADPribose) polymerase deficient mice. *Shock*. 2002; 17(4):286-292

Tatura R, Zeschnigk M, Hansen W, Steinmann J, Goncalves Vidigal P,

Hutzler M et al. Relevance of Foxp3+regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. *Immunology*. 2015;146(1):144-156.

Toscano M, Ganea D, Gamero A. Cecal Ligation Puncture Procedure. *Journal of Visualized Experiments*. 2011;(51)

van der Poll T, van de Veerdonk F, Scicluna B, Netea M. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology*. 2017;17(7):407-420.

Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M et al. MicroRNA Fingerprints Identify miR-150 as a Plasma Prognostic Marker in Patients with Sepsis. *PLoS ONE*. 2009;4(10):e7405.

Vickers K, Remaley A. Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Current Opinion in Lipidology*. 2012;23(2):91-97.

Virag L, Szabó C. The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Pharmacological Reviews*. 2002;54(3):375-429.

Wacleche V, Landay A, Routy J, Ancuta P. The Th17 Lineage: From Barrier Surfaces Homeostasis to Autoimmunity, Cancer, and HIV-1 Pathogenesis. *Viruses*. 2017;9(10):303.

Wang H, Zhang P, Chen W, Feng D, Jia Y, Xie L. Four serum microRNAs identified as diagnostic biomarkers of sepsis. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2012;73(4):850-854.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory R, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. 2009;11(3):228-234.

Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant molecular biology*. 2012; 80(1), 75-84. (<http://leonxie.esy.es/RefFinder/>)

Zhang P, Maruyama T, Konkel J, Abbatiello B, Zamarron B, Wang Z et al. PARP-1 Controls Immunosuppressive Function of Regulatory T Cells by Destabilizing Foxp3. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e71590.

Zhang L, Yao J, Wang X, Li H, Liu T, Zhao W. Poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor has a heart protective effect in a rat model of experimental sepsis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(9): 9824-9835.

Zheng Y, Sun L, Jiang T, Zhang D, He D, Nie H. $\text{TNF}\alpha$ Promotes Th17 Cell Differentiation through IL-6 and IL- 1β Produced by Monocytes in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Immunology Research*. 2014; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/3853522014>.