

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada

**Determinação dos mecanismos moleculares e celulares relacionados com a resposta imunológica associados com a suscetibilidade de camundongos isogênicos à sepse**

(versão corrigida)

Guilherme Cesar Martelossi Cebinelli

Ribeirão Preto – São Paulo  
2023

**Determinação dos mecanismos moleculares e celulares relacionados com a resposta imunológica associados com a suscetibilidade de camundongos isogênicos à sepse**

Guilherme Cesar Martelossi Cebinelli

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em ciências, na área de concentração: imunologia básica e aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Ribeirão Preto – São Paulo

2023

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

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Cebinelli, Guilherme Cesar Martellosi

Determinação dos mecanismos moleculares e celulares relacionados com a resposta imunológica associados com a suscetibilidade de camundongos isogênicos à sepse, 2023.

110 p.

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em ciências, na área de concentração: imunologia básica e aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha.

1. Sepse. 2. Desfecho. 3. Resposta imune. 3. Neutrófilos. 4. PD-L1. 5. IFN-gama. 6. Single cell RNA sequencing.

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor, Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; com auxílio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP.

Guilherme Cesar Martelossi Cebinelli

**Determinação dos mecanismos moleculares e celulares relacionados com a resposta imunológica associados com a suscetibilidade de camundongos isogênicos à sepse**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em ciências, na área de concentração: imunologia básica e aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Aprovado em:        de        de 2023

**Banca examinadora**

---

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

---

Prof. Dr. Diego Luís Costa  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

---

Prof. Dr. Reinaldo Salomão  
Universidade Federal de São Paulo

---

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedico a  
Gislaine e Julio Cesar, meus pais;  
Geovana, minha irmã;  
Darcy, minha vó;  
que de várias formas, incessantemente e incondicionalmente  
proporcionam carinho, amor e amparo,  
me estimulando a realização e finalização desta tese

## **Agradecimentos**

Especialmente ao professor Dr. Fernando de Queiroz Cunha, profissional e pessoa exemplar. Agradeço pela orientação, pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

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

Agradeço aos professores, Dr. Marcelo Torres Bozza; Dr. Reinaldo Salomão; e Dr. Diego Luís Costa, pela disponibilidade de participar da banca examinadora, que será de grande valia para as discussões e aperfeiçoamento deste trabalho.

Agradeço aos colegas e servidores do Laboratório de Inflamação e Dor, Kátia, Sérgio, Diva, Ieda, Marcos, Marcela e Vânia, pois sempre obtive apoio científico, metodológico e logístico quando precisei. Agradeço pelas discussões científicas sobre esse trabalho, momentos de diálogo e aprendizado, e também pelos momentos de descontração.

Agradeço a Ana Cristine Silva Ferreira pelo auxílio burocrático e Denise Bufato Ferraz pela contribuição em realizações de citometria de fluxo.

Agradeço ao corpo docente do programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

Agradeço a amizade formada durante esta trajetória, a Paula Barbim Donate Yabuta, Rafaela Mano Guimarães, Fernanda Vargas da Silva Castanheira, Kalil Alves de Lima, Eduardo Damasceno, Marcos Rosa, Bruno Marcel, Daniele Nascimento, Cleyson Oliveira, Amanda Cristina Corveloni, Anderson Ramos, Bruna Manuella Souza Silva, Caroline Vitória de Oliveira, e Diego Brito Caetité.

Agradeço a todos os colaboradores deste trabalho, Paula Barbim Donate, Kalil Alves de Lima, Cleyson Da Cruz Oliveira Barros, Anderson dos Santos Ramos, Victor Costa, Daniele Carvalho Bernardo Nascimento, Luis Eduardo Alves Damasceno, Amanda Curto Tavares, Antonio Édson Rocha Oliveira, André Nicolau Aquime Gonçalves, Helder Takashi Imoto Nakaya, Thiago Mattar Cunha e José Carlos Farias Alves-Filho.

Agradeço as agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro fundamental para desenvolvimento deste trabalho e concessão de bolsa de estudo (FAPESP número 2019/15070-0).

## **Agradecimentos especiais**

Agradeço aos meus pais Julio Cesar Cebinelli e Gislaine Maria Martelossi Cebinelli, e a minha irmã Geovana Martelossi Cebinelli, pelo amor e carinho incondicional, pelos ensinamentos e exemplos os quais me definiram. Obrigado por estarem presentes nos momentos difíceis, me ajudando; e nos felizes, celebrando. Agradeço toda minha família, em especial minha vó, Darcy Furlan Martelossi, quem muito me incentivou e contribuiu com a minha educação, e ao meu companheiro e namorado Henrique Jorge Novaes Morgan pela amizade, amor e carinho, participando comigo em momentos de comemoração e com paciência em momentos difíceis.

“Os conhecimentos podem ser transmitidos, mas nunca a sabedoria.”

Hermann Hess

## Resumo

Cebinelli, Guilherme Cesar Martelossi. Determinação dos mecanismos moleculares e celulares relacionados com a resposta imunológica associados com a suscetibilidade de camundongos isogênicos à sepse, 2023, 110p. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Sepse é definida como uma doença que acarreta disfunções de órgãos com risco a vida em decorrência de uma resposta inflamatória desregulada do hospedeiro à uma infecção. Estima-se uma ocorrência anual de 48,9 milhões de casos de sepse acarretando potencialmente 11 milhões de mortes em todo o mundo. Apesar de inúmeras tentativas de implementar imunoterapias que modulem moléculas relevantes na patogênese da sepse, até o momento nenhuma abordagem apresentou eficácia clínica. Assim, sugere-se que a patogênese da sepse não é completamente conhecida e mais estudos são necessários para a identificação de novos alvos terapêuticos. Neste sentido, nosso objetivo foi identificar os mecanismos moleculares e celulares da resposta imunológica que estão associados com a suscetibilidade de camundongos isogênicos, com mesma idade, sexo e mantidos nas mesmas condições ambientais, submetidos a sepse de mesma intensidade, e em decorrência identificar novos alvos para terapia. Inicialmente, observamos diferentes desfechos quando induzimos sepse de mesma intensidade pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP) em camundongos isogênicos, do mesmo sexo, idade e criados nas mesmas condições ambientais. Embora não observarmos diferenças nas concentrações plasmáticas de citocinas após 6 horas da indução de sepse entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes, nos tempos de 12 h, 24 h e 48 h, os camundongos que sobreviveram à sepse apresentaram concentrações reduzidas dessas citocinas, enquanto nos camundongos não sobreviventes essas concentrações permaneceram mais elevadas. De acordo com dados anteriormente publicados na literatura, observamos que camundongos não sobreviventes também apresentaram um aumento da concentração plasmática de biomarcadores de lesões hepáticas, renais e cardíacas e bacteremia. Além disso, estes camundongos apresentaram concentrações aumentadas de quimiocinas e citocinas nos pulmões, rins, coração, fígado e também no foco primário da infecção (cavidade peritoneal) 24h após CLP. Em seguida, isolamos leucócitos de camundongos sobreviventes e não sobrevivente após 12 h da indução de sepse e realizamos análise de single cell RNA sequencing. Através da avaliação dos dados obtidos por redução dimensional, identificamos várias populações de leucócitos e observamos aumento da frequência de neutrófilos imaturos em camundongos não sobreviventes. Além disso, observamos que neutrófilos maduros de camundongos não sobreviventes apresentaram aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios e expressão de Hif1a e Cd274, gene que codifica a proteína PD-L1. Na literatura é descrito que estas moléculas estão associadas com o aumento do tempo de sobrevivência de neutrófilos e aumento da produção de *neutrophils extracellular traps*, que provem lesões de órgãos. Além disso, é descrito que interferon gama (IFN-gama) é capaz de induzir a expressão de PD-L1 em neutrófilos e acarretar aumento da promoção de lesão pulmonar em modelo de endotoxemia por LPS. Neste sentido, demonstramos que INF-gama é capaz de induzir a expressão de Hif1a e PD-L1 em neutrófilos, e ainda que camundongos Ifng-deficientes são mais resistentes a sepse e apresentaram menor indução de PD-L1 em neutrófilos. Em conclusão, observamos que camundongos isogênicos que cresceram sob as mesmas condições ambientais, interessantemente apresentam diferentes suscetibilidades à sepse por CLP. Neste contexto, camundongos não sobreviventes apresentaram manutenção da elevada inflamação sistêmica e aumento de lesões de tecidos. Além disso, neutrófilos de camundongos não sobreviventes apresentam expressão aumentada de PD-L1 e Hif1a, que pode ser promovida pela sinalização de IFN-gama. Desta forma, a modulação negativa de IFN-gama, PD-L1 e Hif1a podem ser potenciais alvos terapêuticos para a sepse.

Palavras chave: sepse, desfecho, resposta imune, neutrófilos, PD-L1, IFN-gama, Single cell RNA sequencing.

## Abstract

Cebinelli, Guilherme Cesar Martelossi. Determination of the molecular and cellular mechanisms related to the immune response associated with the susceptibility of isogenic mice to sepsis, 2023, 110p. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. There is estimate an annual occurrence of 48.9 million cases of sepsis causing potentially 11 million deaths. Despite the attempt to implement immunotherapies modulating important molecules in the pathogenesis of sepsis, no approach showed efficacy in the clinics. This suggests that the pathogenesis of sepsis is not completely understood and that new methodologies may contribute to the identification of new therapeutic targets. In this context, the present work aimed to identify new therapeutic targets for sepsis analysis the molecular and cellular mechanisms related to the immune response responsible for the different outcomes of mice submitted to sepsis. Initially, by inducing the cecal ligation and puncture sepsis (CLP) in mice genetically equal and having the same grown-up environment, we observe different responses to sepsis in which half of the mice survive and the other half die from sepsis. Although we did not observe differences in the plasma concentrations of cytokines after 6 hours of sepsis induction between surviving and non-surviving mice, at 12 h, 24 h and 48 h, mice that survived sepsis showed reduced concentrations of these cytokines, while in non-survived mice these concentrations remained higher. Unsurprisingly, non-surviving mice also showed increased plasma concentrations of biomarkers of liver, kidney and heart damage and bacteremia. Furthermore, these mice showed increased concentrations of chemokines and cytokines in the lungs, kidneys, heart, liver and also in the primary focus of infection (peritoneal cavity) 24h after CLP. Further, we isolated leukocytes from survived and non-survived mice after 12 h of sepsis induction and performed single cell RNA sequencing analysis. The evaluation of the data obtained by dimensional reduction revealed several populations of leukocytes, and we observed an increase in the frequency of immature neutrophils in non-survived mice. Furthermore, we observed that mature neutrophils from non-survived mice showed increased production of pro-inflammatory mediators and expression of Hif1a and Cd274, the gene that encodes the PD-L1 protein. In the literature it is described that these molecules are associated with increased neutrophil survival and increased production of neutrophil extracellular traps, which cause organ damage. Furthermore, it is described that interferon gamma (IFN-gamma) is able to induce PD-L1 expression in neutrophils and lead to increased promotion of lung injury in a model of endotoxemia by LPS. In this sense, we demonstrated that INF-gamma induced the expression of Hif1a and PD-L1 in neutrophils, and that Ifng-deficient mice are more resistant to sepsis and showed less induction of PD-L1 in neutrophils. In conclusion, we observed that isogenic mice grown under the same environmental conditions interestingly show different susceptibility to CLP sepsis. In this context, non-survived mice show maintenance of high systemic inflammation and increased tissue damage. Furthermore, neutrophils from non-survived mice show increased expression of PD-L1 and Hif1a, which can be promoted by IFN-gamma signaling. Thus, the negative modulation of IFN-gamma, PD-L1 and Hif1a may be potential therapeutic targets for sepsis.

Keywords: sepsis, outcome, immune response, neutrophils, PD-L1, IFN-gama. Single cell RNA sequencing.

## Lista de tabelas

Tabela 1: Resultado da análise de curva ROC da concentração de IL-6 e desfecho de camundongos submetidos a sepse grave seguida de tratamento com antibiótico.....	44
Tabela 2: Expressão diferencial de genes da comparação entre células T CD4 de camundongos não sobreviventes e sobreviventes.....	86
Tabela 3: Expressão diferencial de genes da comparação entre células T CD4 naive de camundongos não sobreviventes e sobreviventes.....	86
Tabela 4: Expressão diferencial de genes da comparação entre células T CD8 de camundongos não sobreviventes e sobreviventes.....	89
Tabela 5: Expressão diferencial de genes da comparação entre células T CD8 ISGs de camundongos não sobreviventes e sobreviventes.....	90
Tabela 6: Expressão diferencial de genes da comparação entre células Tregs de camundongos não sobreviventes e sobreviventes.....	91
Tabela 7: Expressão diferencial de genes da comparação entre células B de camundongos não sobreviventes e sobreviventes.....	97
Tabela 8: Expressão diferencial de genes da comparação entre monócitos de camundongos não sobreviventes e sobreviventes.....	98
Tabela 9: Expressão diferencial de genes da comparação entre neutrófilos maduros de camundongos não sobreviventes e sobreviventes.....	102
Tabela 10: Expressão diferencial de genes da comparação entre neutrófilos imaturos de camundongos não sobreviventes e sobreviventes.....	104

## Lista de figuras

Figura 1: Camundongos isogênicos apresentam diferentes desfechos a sepse de mesma intensidade. ....	40
Figura 2: Camundongos não sobreviventes apresentam inflamação sistêmica persistente e aumento de marcadores de lesões de órgãos. ....	41
Figura 3: Camundongos não sobreviventes apresentam aumento de bacteremia. ....	42
Figura 4: IL-6 é um preditor de sobrevivência e correlaciona-se com a concentração de marcadores de lesões de órgãos. ....	43
Figura 5: Deficiência ou neutralização de IL-6 não acarreta melhora na suscetibilidade de camundongos a sepse. ....	45
Figura 6: Camundongos preditos a não sobreviverem apresentam aumento da concentração de citocinas no foco infeccioso e em órgãos.....	46
Figura 7: Camundongos não sobreviventes apresentam diminuição do número de neutrófilos e aumento do número de bactérias no foco inicial de infecção, além de aumento do número de neutrófilos nos pulmões 24 h após a indução de sepse por CLP.....	48
Figura 8: Neutrófilos de camundongos sépticos não sobreviventes apresentam menor expressão de CXCR2 em sua superfície 24 h após a indução de sepse por CLP.....	49
Figura 9: Neutrófilos de camundongos sépticos não sobreviventes apresentam maior expressão de CD11b em sua superfície 24 h após a indução de sepse por CLP.....	50
Figura 10: Isolamento de células CD45 positivas de sangue periférico.....	52
Figura 11: Controles de qualidade do preparo da biblioteca de expressão gênica de células únicas e da biblioteca de multiplexação. ....	53
Figura 12: Representação metodológica e multiplexação das amostras submetidas ao <i>single cell RNA sequencing</i> .....	54
Figura 13: Redução dimensional e identificação de populações de leucócitos de camundongos controles, sobreviventes e não sobreviventes a sepse. ....	55
Figura 14: Validação por citometria de fluxo da frequência de leucócitos obtidos pela metodologia de scRNAseq. ....	56
Figura 15: Camundongos sépticos apresentam aumento da frequência de linfócitos T CD8 interferon stimulated genes (ISGs).....	57
Figura 16: Expressão diferencial de genes entre populações de linfócitos T CD8 ISGs e linfócitos T CD8. ....	58
Figura 17: Camundongos não sobreviventes apresentam aumento da frequência de neutrófilos imaturos quando comparados aos preditos a sobreviverem após a 12 h da indução de sepse. ....	59

Figura 18: Camundongos não sobreviventes apresentam aumento de vias relacionadas a apoptose em populações de linfócitos T CD4, T CD4 naive, T CD8 e Tregs, e linfócitos T CD8 ISGs apresentam aumento de vias responsáveis pela expressão de PD-L1.....	61
Figura 19: Avaliação de genes diferencialmente expressos em células B entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes.....	62
Figura 20: Avaliação de genes diferencialmente expressos em monócitos entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes.....	63
Figura 21: Avaliação de genes diferencialmente expressos em populações de neutrófilos maduros e imaturos entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes. ....	64
Figura 22: Camundongos não sobreviventes apresentam aumento de IFN-gama e NETs plasmáticos e aumento da expressão de PD-L1 em neutrófilos. ....	66
Figura 23: IFN-gama induz a expressão de PD-L1 e <i>Hif1a</i> em neutrófilos. ....	67
Figura 24: Camundongos deficientes para IFN-gama são menos suscetíveis a sepse e apresentam menor indução de PD-L1 em neutrófilos. ....	68

## Lista de símbolos e siglas

ALT	Alanina aminotrasferase
AST	Aspartato aminotransferase
BUN	Blood ureia nitrogen
CCL2	Quimiocina ligante CC 2
CCL3	Quimiocina ligante CC 3
CD11b	Cluster of differentiation 11 b
cDNA	DNA complementar
CFU	Unidades formadoras de colônias
CLP	Cecal ligation and puncture
CTLA4	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4
CXCL1	Quimiocina ligante CXC 1
CXCL10	Quimiocina ligante CXC 10
CXCL2	Quimiocina ligante CXC 2
CXCR2	Receptor 2 do tipo CXC
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Glut1	Transportador de glicose 1
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Horas
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
HREs	Hypoxia response elements
IFN-gama	Interferon gama
IFNs	Interferons do tipo 1
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-33	Interleucina 33
IL-6	Interleucina 6
IMDM	Iscove's modified dulbecco's medium
ISGs	Interferon stimulated genes
JAKs	Janus Kinases
kg	kilograma
Ldha	Lactato desidrogenase A
LPS	Lipopolissacarídeo

MAPKs	Mitogen-activated protein kinases
mg	miligrama
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
NETs	Neutrophil extracellular traps
NFkB	Nuclear factor kB
ng	Nanograma
NK	Natural Killer
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
OMS	Organização mundial da saúde
p	Nível de significancia
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
qPCR	PCR quantitativo
RIG	Retinoic acid-inducible gene
ROC	Receiver operating characteristic
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
scRNAseq	Single cell RNA sequencing
Sp.	Espécie
STATs	Signal transducers and activators of transcription
TCR	T cell receptor
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
Tregs	Linfócitos T reguladores
µg	Micrograma
µl	microlitro
UMAP	Uniform anifold approximation and projection
Vegf	Fator de crescimento endotelial vascular

## Sumário

1. Introdução.....	20
1.1 Contexto histórico e definição de sepse.....	20
1.2 Epidemiologia da sepse .....	21
1.3 Fisiopatologia da sepse .....	21
1.4 Tratamento da sepse.....	25
2 Objetivos .....	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. Metodologia.....	29
3.1 Animais de experimentação .....	29
3.2 Indução do modelo de sepse polimicrobiana .....	29
3.3 Tratamento com anticorpos monoclonais .....	30
3.4 Coleta de sangue de camundongos anestesiados e separação de hemocomponentes ...	30
3.5 Coleta e processamento de lavado peritoneal .....	31
3.6 Coleta e processamento de órgãos .....	31
3.7 Determinação da concentração de quimiocinas e citocinas.....	32
3.8 Quantificação de bactérias.....	33
3.9 Quantificação de marcadores plasmáticos de lesões de órgãos.....	33
3.10 Quantificação de NETs.....	33
3.11 Citometria de fluxo .....	34
3.12 Isolamento e cultura de neutrófilos.....	34
3.13 Isolamento de leucócitos de sangue periférico e multiplexação para single cell RNA sequencing.....	35
3.14 Single cell RNA sequencing .....	35
3.15 Processamento dos dados de single cell RNA sequencing.....	36
3.17 qPCR .....	37
3.18 Análise estatística.....	38
4. Resultados.....	39

4.1 Camundongos isogênicos criados nas mesmas condições experimentais apresentam diferentes desfechos a sepse de mesma intensidade .....	39
4.2 Camundongos não sobreviventes apresentam inflamação sistêmica persistente, aumento de marcadores de lesões de órgãos e bacteremia .....	40
4.3 Concentração plasmática de IL-6 é um preditor de sobrevivência e correlaciona-se com a concentração de marcadores de lesões de órgãos .....	42
4.4 Camundongos preditos a não sobreviverem apresentam aumento das concentrações de citocinas no foco infeccioso e em órgãos .....	45
4.5 Camundongos preditos a não sobreviverem apresentam diminuição do número de neutrófilos e aumento do número de bactérias no foco inicial de infecção, além de aumento do número de neutrófilos nos pulmões .....	47
4.6 Implementação do single cell RNA sequencing .....	51
4.7 Camundongos não sobreviventes a sepse apresentam aumento da frequência de neutrófilos imaturos .....	54
4.8 Camundongos não sobreviventes apresentam aumento de vias relacionadas a apoptose em populações de linfócitos T CD4, T CD4 naive, T CD8 e Tregs, e linfócitos T CD8 ISGs apresentam aumento de vias responsáveis pela expressão de PD-L1 .....	59
4.9 Células B de camundongos não sobreviventes apresentam um fenótipo de ativação via citocinas, aumento de genes relacionados com apoptose e diminuição de sinalização via BCR.....	61
4.10 Monócitos de camundongos não sobreviventes apresentam aumento da produção de mediadores inflamatórios. ....	62
4.11 Neutrófilos maduros de camundongos não sobreviventes apresentam aumento da capacidade inflamatória, sinalização via IFN-gama, expressão de Hif1a e Cd274 (PD-L1) .....	63
4.12 Camundongos não sobreviventes apresentam aumento de IFN-gama plasmático e aumento da expressão de PD-L1 em neutrófilos.....	65
4.13 IFN-gama induz a expressão de PD-L1 e Hif1a em neutrófilos, e camundongos deficientes para IFN-gama apresentam menor indução de PD-L1 em neutrófilos e são menos suscetíveis a sepse .....	66
5. Discussão .....	69
6. Sumário .....	75
7. Conclusões .....	77
8. Referências.....	78

9. Anexos.....	86
9.1 Lista de tabelas .....	86
9.2 Aprovação do comitê de ética no uso de animais.....	107
9.3 Prêmios recebidos durante o período de doutorado.....	108
9.4 Artigos publicados durante o período de doutorado.....	108
9.5 Estágio no exterior realizado durante o período de doutorado.....	110

## 1. Introdução

### 1.1 Contexto histórico e definição de sepse

A palavra sepse é derivada do grego “shjiz”, que se refere a decomposição animal ou vegetal. O primeiro uso do termo sepse em um contexto médico ocorreu em aproximadamente 2700 anos atrás em poemas de Homero. O termo sepse também foi encontrado na coletânea *Corpus Hippocraticum*, do médico e filósofo Hipócrates (460-377 antes de cristo). Ele descreveu a sepse como uma decadência biológica perigosa (FUNK; PARRILLO; KUMAR, 2009). Posteriormente, Ibn Sīnā (980-1037), considerado o pai da medicina moderna, descreveu que o quadro de sepse ocorria na maioria dos casos com a presença de febre.

Após varias observações realizadas por Semmelweiss, Lister, e Koch, e a proposta da teoria dos germes por Pasteur em 1878, a sepse passou a ser descrita como causada por uma infecção que se espalha para a corrente sanguínea, acarretando uma inflamação sistêmica (FUNK; PARRILLO; KUMAR, 2009; SINGER et al., 2016). Contudo, mesmo com o advento e implementação de antibióticos no tratamento da sepse, uma grande porção de pacientes continuou a morrer após controle da infecção. Deste modo, foi demonstrado que a resposta do hospedeiro e não somente a presença da infecção, tem participação na patogênese da sepse (ANGUS; VAN DER POLL, 2013; CERRA, 1985).

Em 1991 foi realizado o primeiro consenso para definição de sepse e estabelecimento de diretrizes de tratamento. Neste momento inicial a sepse foi definida como uma resposta inflamatória sistêmica em decorrência de uma infecção, também foi proposto a utilização do termo de sepse grave, para descrever casos com graves disfunções de órgãos, além do tempo de choque séptico, para descrever quadros graves com hipotensão não responsiva a tratamentos (BONE; SIBBALD; SPRUNG, 1992). Em 2003, um segundo consenso endossou os conceitos estabelecidos anteriormente, com a ressalva de alguns sinais clínicos que não distinguia a sepse de outras condições clínicas (LEVY et al., 2003).

O terceiro consenso, e o mais atual, em 2016 definiu a sepse como uma doença que acarreta disfunções de órgãos com risco a vida em decorrência de uma resposta inflamatória desregulada do hospedeiro frente a uma infecção. O termo choque séptico foi mantido para descrever pacientes em quadros com maior gravidade e com presença de hipotensão sem resposta ao tratamento, mas o termo sepse grave não foi mais utilizado devido a sua redundância (SINGER et al., 2016).

## 1.2 Epidemiologia da sepse

Apesar da diminuição da incidência e mortalidade, a sepse ainda se mantém como a maior causa de mortes em todo o mundo, e um problema grave de saúde. Estima-se uma incidência mundial de 48,9 milhões de casos, acarretando 11 milhões de mortes anualmente (RUDD et al., 2020).

No Brasil, durante o período de 2010 e 2019 ocorreram 1.044.227 casos de sepse, com um coeficiente de prevalência de 51,3 casos por 100 mil habitantes. Projetando estes números, observa-se uma incidência anual de aproximadamente 110 mil casos. Neste mesmo período, foram registradas 463 mil mortes causadas por sepse, representando aproximadamente 50 mil mortes anuais. A maior taxa de mortalidade foi observada em grupo de pessoas com mais de 60 anos, seguida pela faixa de idade de 50 a 59, e menores de 4 anos de idade (ALMEIDA et al., 2022). De forma geral, a taxa de mortalidade de sepse no Brasil é de 55 %, semelhante a taxa mundial (ALMEIDA et al., 2022; RUDD et al., 2020).

A sepse pode ser resultante de infecções adquiridas no contexto hospitalar ou na comunidade. A pneumonia é o tipo mais comum de infecção resultante em sepse, seguida de infecções intra-abdominais e do trato urinário. Dependendo da causa da sepse, mais de um patógeno pode ser identificado, porém a maior parte das infecções é causada por bactérias. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* são as bactérias gram-positivas mais comumente isoladas e *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, e *Pseudomonas aeruginosa* predominam entre as gram-negativas (OPAL et al., 2003; RANIERI et al., 2012). No entanto, em menor proporção, os casos de sepse podem ser causados por infecções fúngicas (VINCENT et al., 2009) e virais, como por exemplo, o vírus da dengue e atualmente o SARS-CoV-2 (HOTCHKISS et al., 2016; LI et al., 2020a)

Visto o elevado índice de mortalidade associado ao quadro de sepse, em maio de 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) adotou uma resolução com o objetivo de aperfeiçoar a prevenção, diagnóstico e tratamento dessa condição clínica (REINHART et al., 2017). Deste modo, além de campanhas de educação para a população, existe necessidade do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que sejam mais eficientes e que, por conseguinte, levem à redução da alta taxa de mortalidade.

## 1.3 Fisiopatologia da sepse

Durante infecções, as células da resposta imune inata são ativadas e iniciam o processo inflamatório através do reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Na maioria dos casos, a ativação da resposta imune é capaz de controlar a infecção através de mecanismos de resistência. Concomitantemente, mecanismos de tolerância reduzem os danos

teciduais causados pela ativação da resposta imune, e deste modo há o retorno do organismo à homeostase (SCHNEIDER; AYRES, 2008). Contudo, quando os mecanismos imunológicos de resistência não são eficientes em controlar a infecção, observa-se o desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada e persistente. Neste contexto, os mecanismos de tolerância, muitas vezes, não são capazes de contrabalançar os processos lesivos, principalmente em órgãos vitais, estabelecendo assim o quadro característico da sepse (HOTCHKISS et al., 2016).

A ineficiência na eliminação do patógeno pode ser causada, por exemplo, pela presença de superantígenos, microrganismos resistentes à opsonização, à fagocitose ou ainda resistentes à terapia com antibióticos (STEARNS-KUROSAWA et al., 2011). Além das características associadas aos patógenos, fatores de risco relacionados ao hospedeiro também aumentam as chances de se desenvolver um quadro de sepse. Esses fatores, na maioria das vezes, estão relacionados com algum comprometimento de mecanismos de resistência à infecção, como presentes em portadores de doenças crônicas (síndrome da imunodeficiência adquirida, doença pulmonar obstrutiva crônica, câncer, etc), usuários de agentes imunossupressores e, em crianças e idosos, cujo o sistema imunológico está em maturação ou involução, respectivamente (ANGUS et al., 2001). Além disso, fatores adicionais podem estar relacionados com uma menor tolerância ao dano, tais como os presentes em indivíduos mais velhos ou com comorbidades (MOK et al., 2021).

A sepse é uma doença inflamatória iniciada pela ativação de células do sistema imunológico inato, células epiteliais e endoteliais, simultaneamente por produtos microbianos gerados pela infecção e por sinais endógenos de dano. O reconhecimento de PAMPs e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), por receptores do tipo Toll (TLRs), receptores do tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), do tipo RIG (*retinoic acid-inducible gene*), lectina ligadora de manose, receptores scavenger e outros, promove a ativação de um sistema de sinalização intracelular complexo e redundante (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; TANG et al., 2012).

O reconhecimento de diferentes componentes de bactérias, vírus e fungos, e também por produtos de lesões teciduais, desencadeia o recrutamento de mediadores intermediários que resultam na fosforilação de MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), JAKs (*Janus Kinases*), e STATs (*signal transducers and activators of transcription*), ou na translocação nuclear de NFκB (*nuclear factor κB*). Como resultado, estes intermediários promovem a expressão de vários genes, entre eles os de citocinas associadas com a inflamação incluindo o fator de necrose tumoral (TNF), Interleucina 1 (IL)-1, IL-12, IL-18 e Interferons do tipo 1 (IFNs). Esses mediadores levam a produção e liberação de outras citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como, IL-6, IFN-gama, quimiocina ligante CC 2 (CCL2), CCL3, e quimiocina ligante CXC 1 (CXCL1), CXCL2 e CXCL10 (HOTCHKISS et al., 2016).

A liberação excessiva de PAMPs e DAMPs, resultante da falta de eficiência em controlar a infecção, acarreta a produção intensa destes mediadores pró-inflamatórios por células residentes presentes no local da infecção, promovendo uma inflamação sistêmica persistente. O aumento de mediadores pró-inflamatórios promove a ativação do endotélio vascular aumentando a expressão de molécula de adesão e selectinas. Além disso, o aumento da produção de proteases pró-inflamatórias promove a perda de junções do tipo *tight* entre as células endoteliais e em conjunto com o aumento de mediadores de coagulação, ocorre disfunção endotelial, caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular e um endotélio em estado pró-coagulante (HOTCHKISS et al., 2016; PARIKH, 2013).

Apesar da ativação do endotélio ser importante para o recrutamento de leucócitos para o foco infeccioso, contribuindo com a eliminação do patógeno (KUBES, 2002). A excessiva e prolongada liberação de mediadores inflamatórios na sepse acarreta disfunção endotelial generalizada que compromete a microvasculatura dos órgãos. Como resultado, observam-se excessivos danos renais, hepáticos, falha respiratória e colapso cardiovascular (CHELAZZI et al., 2015).

Em conjunto com a inflamação sistêmica exagerada e disfunção endotelial disseminada, a migração de neutrófilos para órgãos também contribui para a indução de lesões teciduais. Em condições inflamatórias, os neutrófilos são rapidamente recrutados para o foco infeccioso e apresentam vários mecanismos efetores que participam efetivamente do controle da infecção, como fagocitose, presença de enzimas proteolíticas, rápida produção de espécies reativas e liberação de *neutrophil extracellular traps* (NETs), que são compostas por DNA nuclear conjugado com proteínas nucleares (como histonas) e proteínas de grânulos citoplasmáticos (como MPO, elastase e catepsina G), que em conjunto promovem a captura e eliminação de patógenos, via seus componentes antimicrobianos, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (FUCHS et al., 2007; MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; YIPP; KUBES, 2013). No entanto, durante a sepse é demonstrado que a migração de neutrófilos para o foco infeccioso é diminuída por meio da internalização do seu receptor de quimiocinas CXCR2, mediado por seus ligantes, sinalização via TLRs e óxido nítrico. Em decorrência desta falha, o controle da infecção fica comprometido (ALVES-FILHO et al., 2010; RIOS-SANTOS et al., 2007). Concomitantemente, é observado aumento de migração de neutrófilos para órgãos distais. Nestas localidades, através da produção de seus mediadores, como por exemplo a produção de NETS, neutrófilos contribuem com a promoção de lesões teciduais (ALVES-FILHO et al., 2008a; CZAIKOSKI et al., 2016; SOUTO et al., 2011).

Além de alterações na capacidade de migração, durante a sepse ocorre diminuição de apoptose de neutrófilos, em conjunto com aumento da liberação de neutrófilos imaturos da medula óssea. Desta forma, pacientes com sepse apresentam vários estágios de maturação de neutrófilos (TAMAYO et al., 2012; WILLEMEN et al., 2015). Neutrófilos imaturos apresentam menor capacidade fagocítica e de eliminação de patógenos em relação a neutrófilos maduros.

Além disso, apresentam aumento da meia vida por conta de menor suscetibilidade a apoptose, ainda, sua migração é menos eficiente em comparação com neutrófilos maduros e possuem maior capacidade de produzirem IL-10 (DRIFTE et al., 2013).

*Hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) é um fator transcricional heterodimérico, composto por uma subunidade constante, HIF-1beta, e outra variável, podendo ser HIF-1alfa, HIF-2alfa ou HIF-3alfa (WANG et al., 1995; WANG; SEMENZA, 1995). Em condições de normóxia a subunidade HIF-1alfa é rapidamente degradada, não gerando efeitos celulares. Isso ocorre pela hidroxilação de resíduos de prolina presentes em sua estrutura pelas prolil hidroxilases dependentes de ferro como a PHD1, PHD2 e PHD3. Desta forma, HIF-1alfa hidroxilado interage com a proteína von Hippel-Lindau (VHL), levando sua degradação pela via ubiquina-proteassoma (MAXWELL et al., 1999; OHH et al., 2000).

Já em condições de hipóxia ocorre redução da hidroxilação de HIF-1alfa, diminuindo a sua degradação e promovendo complexação com HIF-1beta, que acarreta na sua translocação para o núcleo. A formação do complexo heterodimérico é capaz de interagir com *hypoxia response elements* (HREs) acarretando a expressão de vários genes relacionados com adaptação a hipóxia, metabolismo e função celular, tais como Vegf, Glut1 e Ldha (GLEADLE; RATCLIFFE, 1997; SEMENZA, 2012).

Em neutrófilos, é descrito que a estabilização de HIF1-alfa é capaz de aumentar a liberação de NETs e também promover inibição da apoptose (HANNAH et al., 1995; MCGETTRICK; O'NEILL, 2020). Peyssonnaud et al. (2007) demonstraram que a deleção de HIF1A em células mieloides (*Hif1a-flox Lysm-Cre*) aumentou a sobrevivência de camundongos submetidos ao modelo de endotoxemia por LPS (PEYSSONNAUX et al., 2007). Além da hipóxia, foi demonstrado que LPS e IFN-gama são capazes de induzir a expressão HIF1-alfa em macrófagos, além de também estimularem a expressão de PD-L1 em macrófagos e neutrófilos (NOMAN et al., 2014; PARRA-IZQUIERDO et al., 2019; WANG et al., 2021). No contexto da sepse, foi demonstrado que LPS e IFN-gama aumentam a expressão de PD-L1 em neutrófilos, acarretando a redução de apoptose e, por conseguinte, favorecendo as lesões pulmonares (WANG et al., 2021).

Temporalmente a sepse pode ser dividida em uma fase inicial caracterizada pela ativação de leucócitos e inflamação sistêmica exagerada, seguida por uma fase caracterizada por imunossupressão, diminuição da ativação de leucócitos e tolerância a endotoxinas, aumentando as chances de infecções secundárias (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009; HOTCHKISS et al., 2009). No entanto, atualmente é mais aceito que exista uma coexistência dos processos pró-inflamatórios e imunossupressores (ADIB-CONQUY; CAVAILLON, 2009; XIAO et al., 2011). Além de neutrófilos participarem destes dois processos, produzindo mediadores pró e anti-inflamatórios ou inibitórios, como a produção de IL-10 e expressão de PD-L1, como discutido anteriormente. A sepse acarreta profunda modulação da atividade de

outras células imunes, acarretando a perpetuação do quadro pró-inflamatório e de hiporresponsividade celular.

Neste sentido, de maneira similar aos neutrófilos, os monócitos também apresentam uma dicotomia de funções. Eles produzem mediadores inflamatórios contribuindo com a inflamação sistêmica exacerbada, mas também se reprogramam para um estado imunossupressor e de tolerância a endotoxinas, regulado pela expressão de HIF-1 $\alpha$  (CEBINELLI et al., 2021; SHALOVA et al., 2015). A reprogramação de monócitos durante a sepse está associada ao aumento produção de IL-10, diminuição da expressão de HLA-DR e citocinas pró-inflamatórias (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009; SHALOVA et al., 2015).

Além disso, a sepse também acarreta profundo impacto na função e quantidade de linfócitos. Camundongos deficientes para células B são mais suscetíveis ao modelo experimental da sepse (KELLY-SCUMPIA et al., 2011; RAUCH et al., 2012). As células B são ativadas através de PRRs e participam do início da resposta antimicrobiana através da produção de GM-CSF (RAUCH et al., 2012), mas também produzem IL-3 induzindo hematopoiese de emergência e potencializando o quadro de sepse (WEBER et al., 2015). Apesar de apresentar papel pró-inflamatório inicial e participar do controle da infecção, com o decorrer da sepse, o número de células B é diminuído por consequência do aumento de apoptose (VENET et al., 2010) e algumas subpopulações adquirem um fenótipo de exaustão e regulador (SUZUKI et al., 2016; VENET; MONNERET, 2018).

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> também sofrem apoptose, diminuindo a sua quantidade ao decorrer do quadro séptico (LE TULZO et al., 2002; VENET et al., 2010). Além disso, as células que não sofreram apoptose, apresentam funções efetoras comprometidas pela aquisição de um fenótipo de exaustão ou de anergia. Neste sentido, observa-se a diminuição da proliferação, menor capacidade de produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ , além do aumento da expressão de moléculas co-inibidoras, como PD-1 e CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) (BOOMER et al., 2011; GUIGNANT et al., 2011; SPEC et al., 2015; VENET; MONNERET, 2018).

Ao contrário das outras populações de célula T, os números de linfócitos T reguladores (Tregs) apresentam aumento durante a sepse (MONNERET et al., 2003; VENET et al., 2009). É observado que a liberação de IL-33 em resposta a danos teciduais, apresenta papel fundamental na expansão destas células (NASCIMENTO et al., 2010, 2017). Desta forma, através de seus mecanismos efetores, as células Tregs possuem a capacidade de suprimirem a resposta adaptativa e inata (VENET et al., 2009).

## 1.4 Tratamento da sepse

Uma vez diagnosticada a sepse, torna-se extremamente necessária uma intervenção terapêutica rápida e apropriada para um desfecho clínico positivo. Atualmente, o tratamento

convencional baseia-se na intervenção de dois componentes: o controle da infecção e estabilização hemodinâmica.

A primeira intervenção é o controle da infecção, iniciado pela identificação da fonte de infecção e o tipo do patógeno. No entanto, antes mesmo do resultado da cultura microbiológica, antimicrobianos de amplo espectro já são comumente administrados (FUNK; PARRILLO; KUMAR, 2009). Após a identificação do patógeno, o fármaco antimicrobiano pode ser alterado, com objetivo de otimizar a eficácia do tratamento, limitar a toxicidade, prevenir resistência a droga, e redução de gastos. Em alguns casos, é necessária intervenção cirúrgica para erradicação da fonte de infecção (HOTCHKISS et al., 2016; KUMAR et al., 2010).

Após o controle da infecção inicia-se a estabilização hemodinâmica, com o objetivo de promover a prevenção de lesão de órgãos e o quadro de choque hipovolêmico gerados pela disfunção cardiovascular que promove hipoperfusão e diminuição da disponibilidade de oxigênio aos órgãos. Essa intervenção ocorre através da reposição de fluídos; uso de agentes vasoativos, como noradrenalina; e ventilação mecânica (VINCENT; DE BACKER, 2013).

Apesar das mencionadas intervenções para o controle da infecção e estabilização hemodinâmica, ainda se registra um alto índice de mortalidade (REINHART et al., 2017). Ao longo dos últimos anos, várias tentativas de imunoterapias na sepse foram realizadas, pelo menos 150 estudos clínicos já foram ou estão sendo desenvolvidos. Contudo, permanece-se inconclusivo como a resposta imune do hospedeiro deve ser manipulada (HOTCHKISS et al., 2016). Alguns estudos tiveram como objetivo a modulação negativa de importantes mediadores pró-inflamatórios associados a fisiopatologia da sepse, entre eles: o antagonismo de PRRs (ex: TLR4) e a inibição de citocinas pró-inflamatórias (ex: TNF e IL-1) (OPAL et al., 1997, 2013). Outros estudos investiram na imunoestimulação, com objetivo de restaurar a resposta imune exaurida (ex: PDL-1 e IFN-gama) (LEENTJENS et al., 2012), *Clinical Trial* NIH: NCT02576457). Porém, estes últimos, mesmo demonstrando-se promissoras abordagens por prevenirem infecções secundárias e a mortalidade tardia da sepse, não se observou efeito terapêutico na sepse aguda.

No geral, a intervenção desses alvos conhecidos como importantes na sepse, não se demonstraram eficientes para o quadro de sepse aguda e não foram implementados como forma de tratamento, sugerindo que a imunopatogênese da sepse ainda não é completamente compreendida. Deste modo, estudos objetivando o melhor entendimento desta condição são fundamentais para a identificação de novos alvos imunoterapêuticos na sepse.

Neste sentido, nosso grupo de pesquisa vem observando que quando a sepse experimental de mesma intensidade é semelhantemente induzida pelo procedimento de ligadura e perfuração do ceco (*cecal ligation and puncture, CLP*), camundongos isogênicos, com a mesma idade, sexo, alimentação e mantidos nas mesmas condições ambientais (mesma microbiota), apresentam respostas e desfechos diferentes (CEBINELLI et al., 2021; NASCIMENTO et al., 2017). Por exemplo, dependendo da intensidade de perfurações no ceco,

em média metade dos camundongos não sobrevivem, enquanto que a outra recupera-se. Desta forma, nesta condição experimental (não existem diferenças genéticas, sexo, idade, microbiota, alimentação, etc), a identificação das causas que promovem a diferença de resposta entre os camundongos sobreviventes e não sobreviventes poderá contribuir com a identificação de novos mecanismos relacionados com a fisiopatologia da sepse e por conseguinte com a identificação de novos alvos para terapia.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Nosso objetivo foi identificar os mecanismos moleculares e celulares da resposta imunológica que estão associados com a suscetibilidade de camundongos isogênicos, com mesma idade, sexo e mantidos nas mesmas condições ambientais, submetidos a sepse de mesma intensidade, e em decorrência identificar novos alvos para terapia.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a concentração de citocinas, quantidade bactérias, concentração de marcadores de lesões de órgãos em camundongos sobreviventes e não sobreviventes;
- Avaliar migração celular de neutrófilos para o foco infeccioso e pulmões em camundongos sobreviventes e não sobreviventes;
- Associar a frequência de populações de leucócitos com a suscetibilidade a sepse;
- Determinar os genes diferencialmente expressos entre populações de leucócitos de camundongos sobreviventes e não sobreviventes, e explorar as suas funções na atividade celular;
- Identificar novos alvos para terapia da sepse.

### 3. Metodologia

#### 3.1 Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos selvagens da linhagem genética C57BL/6J (referência número 000664), deficientes para os genes *Ifng* (referência número 002287) e *Il6* (referência número 002650), provenientes da The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EUA). Todos os camundongos foram mantidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo sob condições controladas de ciclo claro/escuro, umidade, temperatura e alimentação *ad libitum*.

Para a normalização das microbiotas de animais não isogênicos em nossas condições experimentais, camundongos com 3 semanas foram mantidos em co-housing por 28 dias no biotério de experimentação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Dessa forma, camundongos com 7 semanas de idade foram utilizados em todos os experimentos do presente estudo. Os procedimentos metodológicos envolvendo camundongos foram conduzidos de acordo com as normativas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob o registro de número 151/2019.

#### 3.2 Indução do modelo de sepse polimicrobiana

O modelo de sepse polimicrobiana foi induzido pelo procedimento de ligadura e perfuração do ceco (*cecal ligation and puncture, CLP*), baseando-se no procedimento originalmente proposto por Baker (BAKER et al., 1983) e empregado rotineiramente em nosso laboratório. Inicialmente os camundongos foram anestesiados por inalação contendo 1,5 % de isoflurano (Cristalia, Itapira, São Paulo, BRA). Após a tricotomia dos pelos da região abdominal e assepsia do local com solução de álcool 50 % e iodo 0,1 %, foi realizada uma incisão de aproximadamente 1 cm no abdômen para se ter acesso à cavidade peritoneal. Em seguida foi identificado e exteriorizado o ceco, e o conteúdo cecal foi posicionado na região distal e aprisionado através de uma ligadura com linha de algodão. Duas perfurações com uma agulha foram realizadas no ceco dos camundongos. Em seguida, o ceco foi pressionado gentilmente para saída de pequena quantidade de seu conteúdo pelas perfurações e colocado de volta no interior da cavidade abdominal, sendo a incisão suturada. Após a cirurgia, foi administrado 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea, para hidratação, e os

animais foram expostos ao calor até a total recuperação da anestesia. Para a indução de sepse de intensidade moderada, que promove uma mortalidade de aproximadamente 50 %, utilizou-se agulha de 21 *gauges*. Para a indução de sepse de intensidade grave, que promove uma mortalidade de aproximadamente 100 %, utilizou-se uma agulha de 18 *gauges*. No entanto, também se induziu sepse de intensidade grave em conjunto com tratamento com antibiótico Ertapeném sódico 30 mg/kg (Merck Sharp & Dohme, Riom, Clermont-Ferrand, FRA) 6 h após a cirurgia, e de 12 h em 12 h por 3 dias, promovendo uma mortalidade de aproximadamente 50 %. Os camundongos pertencentes ao grupo controle foram submetidos à cirurgia, porém não tiveram o ceco perfurado. Para avaliação da sobrevivência após a cirurgia, os camundongos foram identificados e novamente acondicionados no biotério de experimentação do Departamento da Farmacologia e a mortalidade registrada a cada 12h, durante 7 dias, ou foram anestesiados por inalação contendo 1,5 % de isoflurano ou eutanasiados para coleta de espécimes biológicos. Por fim de 7 dias, agrupou-se os camundongos e suas amostras em grupos de acordo com o seu desfecho da sepse, em sobreviventes e não sobreviventes.

### **3.3 Tratamento com anticorpos monoclonais**

Camundongos submetidos a sepse foram tratados via intravenosa com 20 µg/camundongo de anti-IL-6 ou rat IgG1 (BE0046, BioXCell, Labanon, New Hampshire, EUA), 6 h e diariamente por 3 dias, após a indução de sepse por CLP, de acordo com os dados publicados anteriormente (RIEDEMANN et al., 2003).

### **3.4 Coleta de sangue de camundongos anestesiados e separação de hemocomponentes**

Camundongos foram anestesiados por inalação contendo 1,5 % de isoflurano. Em seguida, utilizando capilares de vidro embebidos em 20 µL de heparina sódica 5.000 unidades internacionais por mL (Blau Farmacêutica, Cotia, São Paulo, BRA) ou EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 10 g/dL (Gold Analisa Diagnóstica Ltda., Belo Horizonte, Minas Gerais, BRA), coletou-se 100 µL de sangue através de uma punção do plexo retro-orbital. O sangue foi adicionado em um tubo de 1,5 mL e centrifugado por 10 minutos na velocidade de 450 RCF (força centrífuga relativa) e temperatura de 4 °C (graus celsius) para separação dos hemocomponentes. Em seguida, coletou-se o plasma presente na fase superior da separação e estocou em freezer -20 °C até a sua utilização para quantificação de quimiocina e citocinas, quantificação de NETs (neutrophil extracellular traps) e de marcadores plasmáticos de lesões

de órgãos. Posteriormente, homogeneizou-se as hemácias e leucócitos e transferiu 50 µL para um novo tubo de 1,5 mL para realização do procedimento de citometria de fluxo e determinação do número total de células em câmara de Neubauer.

### 3.5 Coleta e processamento de lavado peritoneal

Camundongos foram anestesiados com administração intramuscular de solução contendo cloridrato de cetamina 10 % (Agener União, São Paulo, São Paulo, BRA) e xilazina 10% (Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda., Londrina, Paraná, BRA). Posteriormente, injetou-se 1,5 mL de PBS (*phosphate buffered saline*) na cavidade peritoneal, realizou-se homogeneização, e coletou-se um volume de aproximadamente 1 mL, que foi adicionado em tubo de 1,5 mL. Em seguida a solução foi centrifugada a 450 RCF por 5 minutos a 4 °C, para coleta do sobrenadante, que foi acondicionado em -20 °C até realização da quantificação de citocinas e quimiocinas. Posteriormente, as hemácias presentes no *pellet* de células foram lisadas utilizando solução de lise com cloreto de amônio (solução 1x: 4,01 g de NH<sub>4</sub>Cl; 0,18 g de EDTA; e 0,42 g de NaHCO<sub>3</sub> em 500 mL de água destilada e pH = 7,4) e as células foram utilizadas para procedimento de citometria de fluxo e determinação do número total de células em câmara de Neubauer.

### 3.6 Coleta e processamento de órgãos

Após anestesia dos camundongos, como descrita no subtópico anterior, realizou-se a perfusão sistêmica através da injeção de 20 mL de solução contendo PBS e 1000 UI de heparina por 100 mL no ventrículo direito e incisão do átrio esquerdo, para saída do sangue e fluido perfundido.

Para citometria, o pulmão esquerdo foi coletado e acondicionado em 1 mL de solução de digestão enzimática contendo 1 mg/mL de colagenase do tipo II (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) incompleto (Corning, Corning, Nova Iorque, EUA), e incubado por 45 minutos a 37 °C sob agitação de 100 RPM (rotações por minuto). Após incubação, a digestão foi inibida com adição de 1 mL de RPMI com 10% de soro fetal bovino (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), e macerada em peneiras de 100 µM (Corning, Corning, Nova Iorque, EUA) para se obter uma solução contendo células únicas. As hemácias presentes no filtrado foram lisadas utilizando solução de lise com cloreto de amônio (previamente descrita), e as células foram utilizadas para procedimento de citometria de fluxo e determinação do número total de células em câmara de Neubauer.

Para quantificação de proteínas, os pulmões, coração, fígado e rins foram coletados em tubos de 2,0 mL e congelados a -20 °C em 200 uL de solução contendo PBS e inibidor de protease (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). Posteriormente o material foi processado utilizando esferas de metal e homogeneizador automático TissueLyser II, na frequência de 30 movimentações por segundo durante 3 minutos (Qiagen, Bodenseeallee, Stockach, DEU). O macerado foi centrifugado a 10.000 RCF por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços e acondicionado em -20 °C até realização da quantificação de citocinas e quimiocinas.

### 3.7 Determinação da concentração de quimiocinas e citocinas

Após coleta do lavado peritoneal, plasma e tecidos, as concentrações de citocinas e quimiocinas TNF-alfa, IL-6, CXCL1, CXCL2 e IFN-gama foram determinadas através de ensaio imunoenzimático ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando kits comerciais e seguindo o protocolo do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota USA). Simplificadamente, o método consistiu no revestimento com anticorpos específicos para a citocina a ser analisada em placa de 96 poços, através de incubação por 16h em temperatura de 4°C. Em seguida, realizou-se lavagem para retirada de anticorpos não ligados a placa, com solução de PBS e Tween 0,5% (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA); bloqueio de ligações inespecíficas com solução de PBS e 0,5% BSA (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) por 2h em temperatura ambiente e mesma lavagem descrita anteriormente. Após, adicionou-se 50 uL de amostras a serem quantificadas, além da curva de calibração e controle negativo, e incubou-se em temperatura de 4 °C durante 16 horas. Em seguida, realizou-se mais uma lavagem e adicionou-se anticorpos de detecção. Após 2 h de incubação em temperatura ambiente, a placa foi lavada e adicionou-se solução de estreptoavidina por 30 minutos em temperatura ambiente. Por fim, realizou-se mais uma vez a lavagem e adicionou-se substrato TMB (tetrametilbenzidina; Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), e após 15 minutos de reação em temperatura ambiente, adicionou-se solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M), para inibição da reação. A absorbância do produto colorido formado pela reação foi medida em equipamento de espectrofotometria Spectramax 250 em comprimento de onda de 450 nm (Molecular Devices, San Jose, California, EUA). As concentrações de citocinas e quimiocinas foram expressas em picogramas por mL (pg/mL) ou em nanogramas por mL (ng/mL). No caso da determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas de tecidos, a quantificação por ELISA foi normalizada através da quantidade de proteína total quantificada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (SMITH et al., 1985), que consiste na reação de ligações peptídicas com Cobre (Cu<sup>+2</sup>) o reduzindo (Cu<sup>+</sup>), o qual promove a complexação de duas moléculas de BCA e alteração da cor da solução. Após a adição das amostras, curva de calibração e controle negativo, a reação ocorreu a 37 °C por 30 minutos. Em seguida a coloração da solução foi

quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 561 nm, no equipamento Spectramax 250 (Molecular Devices, San Jose, California, EUA).

### 3.8 Quantificação de bactérias

Amostras de sangue e lavado peritoneal foram diluídas para quantificação de bactérias viáveis. No caso do lavado peritoneal, as diluições foram de 1:100, 1:1000, e 1:10000, já o sangue foi utilizado puro ou na diluição de 1:10. Sem seguida, as diluições foram semeadas em placas de Petri contendo meio Agar Müller-Hinton (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jersey, USA) e incubadas a 37°C por 18 horas. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi registrado e considerado equivalente ao número de bactérias viáveis nas amostras avaliadas. Os resultados foram expressos em Log de UFC por mL (UFC/mL), levando em consideração o fator de diluição.

### 3.9 Quantificação de marcadores plasmáticos de lesões de órgãos

As concentrações plasmáticas de marcadores de lesões de órgãos, como ureia (BUN, *blood urea nitrogen*), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinados através de kits laboratoriais (BioClin, Belo Horizonte, Minas Gerais, BRA). Os resultados foram expressos de acordo com a recomendação do fabricante.

### 3.10 Quantificação de NETs

A quantidade de NETs foi determinada pela concentração de DNA livre celular (cf-DNA) ligado a MPO. Resumidamente, foi utilizada uma placa black/clear bottom (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) revestida com anticorpos específicos para MPO, através de incubação de 50 µL de solução PBS contendo anti-MPO 1:100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), por 16h em temperatura de 4 °C. Em seguida, a placa foi lavada com solução de PBS e Tween 0,5% (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), e incubada com solução de bloqueio contendo 100 µL de PBS e BSA 1% por 2 h em temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a placa e incubou-se 50 µL de amostras por 16 h em temperatura de 4 °C. Após nova lavagem, adicionou-se curva de calibração composta por DNA e o reagente fluorescente Quant-iT™ PicoGreen® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Após 5 minutos de incubação em temperatura de 37 °C, foi feita a leitura da fluorescência utilizando FlexStation 3 (Molecular Devices, San Jose, California, EUA), com

excitação de 488 nm e detecção de emissão em 525 nm. As concentrações de NETs foram expressas em nanogramas por mL (ng/mL).

### 3.11 Citometria de fluxo

A suspensão de células únicas provenientes do sangue, tecido pulmonar ou cultura de células foram adicionadas em placas de 96 poços com fundo esférico e incubadas com 50 µL de solução de PBS contendo 1% de soro fetal bovino e 2 µL de anticorpo Mouse BD Fc Block™ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jersey, USA), por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 50 µL de solução de PBS contendo 1% de soro fetal bovino, anticorpos para antígenos extracelulares na concentração de 1:300 e corante de viabilidade celular na concentração indicada pelo fabricante. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, centrifugou-se as amostras a 450 RCF por 5 minutos na temperatura de 4 °C, e adicionou-se 200 µL de PBS contendo 1% de soro fetal bovino. Os dados de fluorescência foram adquiridos no citômetro de fluxo BD FACSCanto II ou BD FACSVersé (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jersey, USA). Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jersey, USA). Anticorpos ou corantes utilizados: BD FcBlock, Fixable Viability Dye eFluor 780, BV421 ou V500 (eBioscience), Ly6G BV421, CXCR2 PE, CD45.2 BV421, CD3e FITC, Ly6G APC, Ly6C PerCP, CD19 FITC, CD8a V500, CD4 PerCP-Cy5.5, NK1.1 APC-Cy7, CCR2 BV421, PD-L1 PE-Cy7, CD11b APC, CD11b APC-Cy7, CD45 APC, CD45 APC-Cy7.

### 3.12 Isolamento e cultura de neutrófilos

Coletou-se fêmures e tíbias de camundongos após eutanásia por dose excessiva de anestesia, como descrito anteriormente. Posteriormente, coletou-se as células da medula óssea através da expiração de RPMI na cavidade os ossos, com a utilização de uma seringa e agulha. Em seguida, as hemácias foram lisadas, como descrito anteriormente, e a suspensão de células em PBS foram adicionadas em gradiente de Percoll (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), composto por 3 mL de Percoll 72 % e montado acima de 3 mL de Percoll 65 %, seguindo o protocolo de diluição do fabricante. O gradiente de separação em conjunto com as células foi centrifugado por 30 minutos na velocidade de 500 RCF na temperatura de 23 °C. Por fim, as células polimorfonucleares, presentes entre os gradientes de 72 % e 65%, foram coletadas, lavadas com 10 mL de PBS, ressuspensas em meio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) incompleto (Corning, Corning, Nova Iorque, EUA).

Após contagem e verificação da pureza do isolamento por citometria de fluxo. Adicionou-se 250.000 células/poço em placa de 96 poços de fundo esférico e as estimulou por

4 horas em temperatura de 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, com ou sem os estímulos: LPS 1000 ng/mL (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e IFN-gama 10 ng/mL (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA).

### **3.13 Isolamento de leucócitos de sangue periférico e multiplexação para single cell RNA sequencing**

Camundongos foram anestesiados por inalação contendo 1,5 % de isoflurano e coletou-se 100 µL de sangue periférico em um tubo de 1,5 mL, como descrito anteriormente no tópico 3.4. Posteriormente, incubou-se 10 µL de microesferas magnéticas revestidas com anticorpo anti-CD45 murino (Miltenyi Biotec, Cambridge, Massachusetts, EUA) com o sangue por 15 minutos a 4 °C. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de PBS com 0,04 % de BSA não acetilado (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e centrifugou-se na velocidade de 450 RCF por 5 minutos a 4 °C. O *pellet* de células foi ressuscitado em 1 mL de solução de PBS com 0,04 % de BSA e os leucócitos totais (células CD45<sup>+</sup>) foram enriquecidas por seleção positiva em colunas magnéticas LS (Miltenyi Biotec, Cambridge, Massachusetts, EUA). Em seguida, as hemácias remanescentes foram lisadas, como descrito anteriormente no tópico 3.4. A pureza e a manutenção da proporção de leucócitos após o isolamento por citometria de fluxo (Figura 10).

Após determinação do número de células de cada amostra, iniciou-se o protocolo de multiplexação de amostras utilizando os reagentes e metodologia da empresa 10X Genomics (protocolo 3'CellPlex, referência: CG000391). Inicialmente, lavou-se as células com 1 mL de solução de PBS com 0,04 % de BSA e centrifugou-se na velocidade de 400 RCF por 5 minutos a 4°C. Em seguida, incubou-se 100 µL dos oligonucleotídeos de multiplexação com a amostra por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com 1 mL de solução de PBS com 0,04 % de BSA e centrifugadas na velocidade de 400 RCF por 5 minutos a 4°C. O número de células foi determinado e 6.000 células de cada amostra foram combinadas na proporção de 1:1, totalizando 5 amostras por combinação e 30.000 células. As amostras foram combinadas em grupos (descrito posteriormente), contendo no grupo 1: células de 1 controle e 4 camundongos sépticos; e no grupo 2: também células de 1 controle e 4 camundongos sépticos.

### **3.14 Single cell RNA sequencing**

Inicialmente certificou-se que a viabilidade celular das amostras multiplexadas, como descrito anteriormente, era superior a 90 %. Em seguida, utilizou-se 14.000 células em uma linha de encapsulamento do equipamento Chromium Controller (10x genomics, Pleasanton,

Califórnia, EUA), e realizou-se a construção das bibliotecas com o kit de reagentes Chromium Single Cell 3' v3.1 (10x genomics, Pleasanton, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas utilizando kit HiSeq 3000/4000 e sequenciador HiSeq 4000 (Illumina, San Diego, California, USA).

Todas as etapas da construção da biblioteca de expressão gênica de células únicas foi devidamente checada por controles de qualidade. Durante a construção da biblioteca foi determinado a quantidade de cDNA no fluorímetro Qubit (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA). Também foi determinado o tamanho dos fragmentos de cDNA, o tamanho dos fragmentos de cDNA após a construção da biblioteca de expressão gênica (valores de referência = 400-600 pb) e da construção da biblioteca de 3'CellPlex de multiplexação celular (valores de referência = 200 pb) utilizando bioanalisador Agilent 2100 (Santa Clara, Califórnia, EUA).

### 3.15 Processamento dos dados de single cell RNA sequencing

Os arquivos brutos BLC (binary base call) provenientes do sequenciador da Illumina HiSeq 4000 foram demultiplexados pelo Cell Ranger e convertidos em arquivos FASTQ utilizando a função *mkfastq*. As sequências de leitura (*reads*) foram então alinhadas contra a versão mm10 do genoma do *Mus musculus* utilizando o pipeline *cellranger count* do programa Cell Ranger (versão 6.1.2) fornecidos pela 10xGenomics para a realização do alinhamento, filtragem, contagem de barcode e identificador molecular único (UMI, *unique molecular identifier*).

As amostras foram organizadas em 3 grupos principais para comparações posteriores: control (ctl), sepsis survivor (ss) e sepsis non-survivor (snv). Os arquivos brutos (barcodes, features e matriz de contagens) de cada amostra foram lidos no R usando a função *Read10x* do pacote Seurat V4 (HAO et al., 2021), resultando em uma matriz de contagens com 32285 genes e 8248 células. O objeto Seurat foi criado com a função *CreateSeuratObject*, considerando os parâmetros *min.cells* = 3 e *min.features* = 200, resultando em um objeto com 15354 genes (linhas) e 7266 células (colunas). A qualidade das células foi analisada considerando os parâmetros *nFeatures\_RNA* (número de genes expressos), *nCount\_RNA* (número de contagens por célula) e *percent.mt* (percentual de expressão de genes mitocondriais). Um filtro de pré-processamento de qualidade das células foi aplicado considerando *nFeatures\_RNA* entre 200 e 3000, *nCount\_RNA* < 10000 e *percent.mt* < 10, e a qualidade das células foi verificada novamente.

A etapa de normalização dos dados, identificação dos genes mais variáveis e escalonamento foi realizada utilizando a função *SCTransform* (HAFEMEISTER; SATIJA, 2019) levando em consideração a regressão da variável *percent.mt* durante a regressão linear.

Posteriormente a análise de componente principal (PCA) foi aplicada ao dado escalonado e posteriormente a técnica de redução dimensional *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) foi realizada utilizando 40 PCAs. A integração dos dados foi realizada pela função *RunHarmony* do pacote Harmony (KORSUNSKY et al., 2019) levando em consideração os diferentes grupos (ctl, ss e sns). Após a integração, a redução dimensional foi realizada novamente, seguida do agrupamento das células realizado a partir das funções *FindNeighbors* e *FindClusters*.

A anotação das subpopulações celulares foi realizada através da combinação dos programas de anotação automática *scMRMA* (LI et al., 2022), *scType* (IANEVSKI; GIRI; AITTOKALLIO, 2022) e anotação manual utilizando marcadores celulares disponíveis nos bancos de dados *PanglaoDb* (FRANZÉN; GAN; BJÖRKEGREN, 2019) e *CellMarker* (ZHANG et al., 2019), bem como marcadores informados na literatura.

A identificação dos marcadores diferencialmente expressos de cada subpopulação celular foi realizada entre os grupos sns e ss utilizando a função *FindMarkers*. Apenas os marcadores que passaram dos pontos de corte de  $\text{min.pct} = 0.1$  e  $\text{logfc.threshold} = 0.25$  foram considerados significantes.

Para uma maior exploração dos dados e suas subpopulações celulares, posteriormente foram realizadas filtragem dos dados para subpopulações celulares específicas. Para isto, o objeto *Seurat* foi filtrado para a subpopulação de interesse e a função *DietSeurat* foi utilizada para limpar o objeto *Seurat* das análises anteriores. Posteriormente foram realizadas novamente desde as análises de normalização até a identificação de marcadores diferencialmente expressos, conforme descrito anteriormente.

### 3.17 qPCR

Células foram coletas e armazenadas em tampão de lise celular e o RNA foi extraído por kit comercial (RNeasy Micro Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha). Em seguida, uma vez obtido o RNA seguindo a recomendação do fabricante, realizamos a síntese de cDNA utilizando o kit de transcrição reversa de mRNA em cDNA – High-Capacity (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Após a realização do cDNA, a reação quantitativa por PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOne Plus Real-Time PCR System, usando o sistema de fluorescência SYBR-green® Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Primers para amplificação de *Hif1a*: forward 5' ACCTTCATCGGAAACTCC 3' e reverse 5' CTGTTAGGCTGGGAAAAG 3'; e *Cd274*: forward 5' GCATTATATTCACAGCCTGC 3' e reverse 5' CCCTTCAAAGCTGGTCCTT 3'.

### 3.18 Análise estatística

A análise estatística da curva de sobrevida de camundongos submetidos à sepse foi analisada utilizando o teste Mantel-Cox logrank. Os demais resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de correção Bonferroni, ou por teste de distribuição t de Student. Todas as análises adotaram o nível de significância de  $p < 0,05$ , e foram realizadas no software Prism9 (GraphPad, San Diego, Califórnia, EUA).

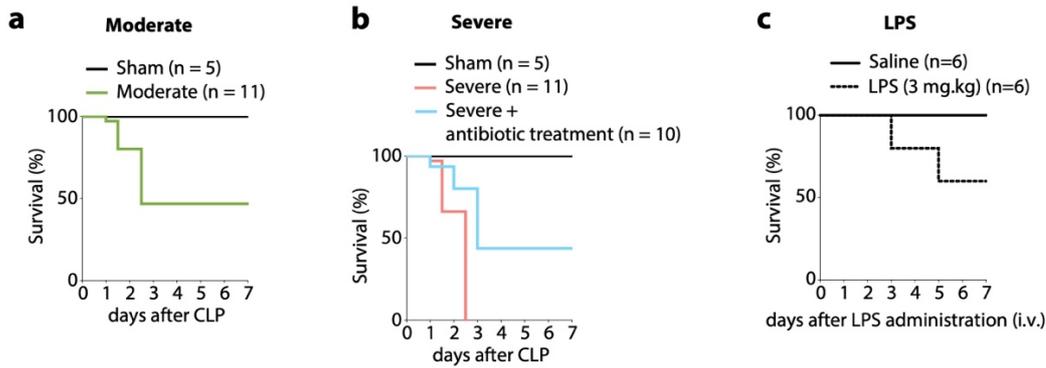
## 4. Resultados

### 4.1 Camundongos isogênicos criados nas mesmas condições experimentais apresentam diferentes desfechos a sepse de mesma intensidade

A indução de sepse de mesma intensidade em camundongos acarreta diferentes respostas e suscetibilidades. É demonstrado que camundongos sépticos não sobreviventes apresentam aumento das concentrações de mediadores inflamatórios e de marcadores de lesões de órgãos em relação a camundongos sépticos sobreviventes (CRACIUN et al., 2014). Além disso, camundongos sépticos preditos a não sobreviverem apresentam aumento do número de bactérias e suas células polimorfonucleares apresentam menor capacidade de fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (CHISWICK et al., 2015). Explorando esta abordagem metodológica, nosso objetivo foi identificar novos alvos terapêuticos para a sepse, através da determinação dos mecanismos moleculares e celulares relacionados com a resposta imunológica associados com a suscetibilidade de camundongos isogênicos submetidos a sepse de mesma intensidade.

Apesar de nosso grupo de pesquisa apresentar extensa experiência em modelos experimentais de sepse, não havíamos explorado a comparação da resposta entre camundongos sépticos sobreviventes e não sobreviventes. Neste sentido, inicialmente realizamos a padronização desta abordagem em nossas condições experimentais.

Observamos que a indução de sepse com intensidade moderada, pelo modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP), em camundongos C57BL/6J isogênicos, com a mesma idade, sexo e mantidos nas mesmas condições ambientais, promoveu uma taxa de mortalidade de 50 % (Figura 1a). Além disso, quando induzimos sepse com intensidade grave, observamos que a mortalidade de 100 % (Figura 1b) foi reduzida para uma taxa de 50 % quando realizamos tratamento com antibiótico ertapeném sódico (Figura 1b). Utilizando o modelo de endotoxemia pela administração de LPS, observamos uma taxa de mortalidade de aproximadamente 40 % (Figura 1c). Em conjunto, observamos que camundongos semelhantes apresentam diferentes desfechos quando submetidos semelhantemente a modelos de sepse.



**Figura 1: Camundongos isogênicos apresentam diferentes desfechos a sepse de mesma intensidade.**

Taxa de sobrevivência da indução de sepse pelo modelo de ligação de perfuração do ceco (CLP) de **a**, intensidade moderada e **b**, de intensidade grave com a ausência ou presença de tratamento com antibiótico ertapeném sódico 30 mg/kg 6 h após a cirurgia, e de 12 h em 12 h por 3 dias. **c**, taxa de sobrevivência após a administração de 3 mg/kg de LPS intravascular. Dados representativos de 3 experimentos independentes.

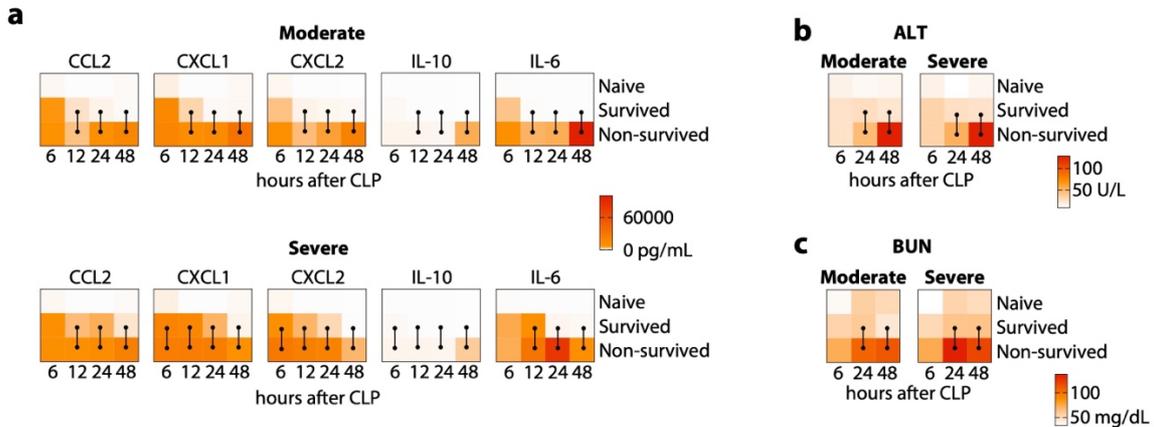
#### 4.2 Camundongos não sobreviventes apresentam inflamação sistêmica persistente, aumento de marcadores de lesões de órgãos e bacteremia

Em seguida, utilizamos a indução de sepse por CLP de intensidade moderada e grave seguida de tratamento com antibiótico, com o objetivo de caracterizar a cinética de produção de mediadores inflamatórios e o desenvolvimento de disfunções de órgãos em camundongos sobreviventes e não sobreviventes.

Padronizamos a coleta de sangue periférico da forma que os animais permaneceram vivos após o procedimento. Desta forma, foi possível através do acompanhamento da sobrevivência da indução de sepse, categorizar as amostras em um grupo composto por plasma coletado de camundongos sépticos sobreviventes e outro grupo composto por plasma coletado de camundongos não sobreviventes. Inicialmente, observamos que apesar do aumento das concentrações de citocinas CCL2, CXCL1, CXCL2, IL-10 e IL-6 após 6 h da indução de sepse de intensidade moderada em camundongos sépticos em relação aos controles, não observamos diferença de concentrações entre os grupos de camundongos sobreviventes e não sobreviventes. Contudo, 12 h, 24 h, e 48 h após indução de sepse, observamos diminuição das concentrações destas citocinas em camundongos sobreviventes em relação a camundongos não sobreviventes (Figura 2a).

No modelo de sepse grave seguido de tratamento com antibiótico, observamos aumento das concentrações de CXCL1, CXCL2 e IL-10 após 6 h da indução de sepse em camundongos não sobreviventes em comparação aos sobreviventes, as quais permaneceram aumentadas até o tempo de 48 h. No que diz respeito as concentrações de CCL2 e IL-6,

observamos nesta intensidade de sepse os mesmos resultados apresentados pelo modelo com intensidade moderada (Figura 2a).

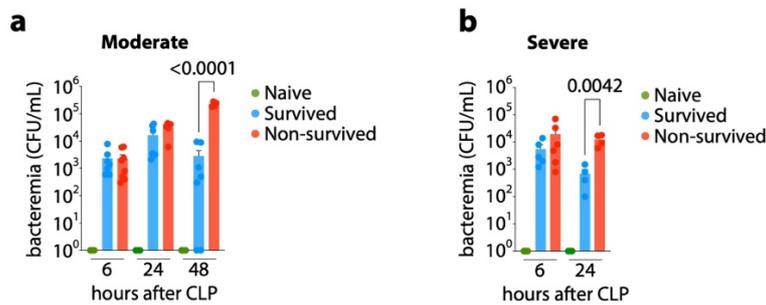


**Figura 2: Camundongos não sobreviventes apresentam inflamação sistêmica persistente e aumento de marcadores de lesões de órgãos.**

**a**, Heatmap da concentração de citocinas e quimiocinas plasmáticas de camundongos controles ( $n = 5$ ), sobreviventes ( $n = 5$ ), e não sobreviventes ( $n = 3-5$ ), após 6 h, 12 h, 24 h e 48 h da indução de sepse moderada e sepse letal seguida de tratamento com antibiótico. Heatmap da concentração plasmática de **b**, ALT (alanina aminotransferase) e **c**, BUN (*blood urea nitrogen*) de camundongos controles ( $n = 5$ ), sobreviventes ( $n = 5$ ), e não sobreviventes ( $n = 3-5$ ), após 6 h, 24 h e 48 h da indução de sepse moderada e sepse letal seguida de tratamento com antibiótico. Dois círculos ligados por uma linha, representa comparações que foram significativas no teste estatístico de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de correção Boferroni, levando em consideração o nível de significância de  $p < 0,05$ . Dados representativos de 2 experimentos independentes com resultados similares.

Além disso, avaliamos as concentrações de marcadores plasmáticos de lesão renal e hepática, BUN e ALT, respectivamente. Após 6 h da indução de sepse de intensidade moderada ou grave seguida de tratamento com antibiótico, não observamos diferenças nas concentrações destes marcadores entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes (Figura 4b e 4c). Porém, após 24 h e 48 h, observamos que camundongos não sobreviventes apresentaram maiores concentrações destes marcadores em relação aos camundongos sobreviventes, em ambas as intensidades de sepse (Figura 2b e 2c).

Indivíduos com deficiência em controlar o crescimento bacteriano apresentam maior probabilidade de apresentarem sepse e também apresentam um pior prognóstico (ANGUS et al., 2001). Assim, determinamos as quantidades de unidades formadoras de colônia (CFU) em nossas condições experimentais. Não observamos diferença na bacteremia após 6 h e 24 h da indução de sepse de intensidade moderada (Figura 3a) ou 6 h após sepse grave seguida de tratamento com antibiótico (Figura 3b). Contudo, observamos diferença na bacteremia entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes 48 h após a indução de sepse de intensidade moderada (Figura 3a) e 24 h após indução de sepse de intensidade grave seguida de tratamento com antibiótico (Figura 3b).



**Figura 3: Camundongos não sobreviventes apresentam aumento de bacteremia.**

Quantificação de unidades formadoras de colônia (CFU) de camundongos controles, sobreviventes, e não sobreviventes, após 6 h, 24 h e 48 h da indução de **a**, sepse moderada e **b**, sepse letal seguida de tratamento com antibiótico. O valor da diferença estatística foi indicado em comparações com nível de significância de  $p < 0,05$  para teste estatístico de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de correção Bonferroni. Dados representativos de 2 experimentos independentes com resultados similares.

Em conjunto, nossos dados demonstram que o modelo de sepse de intensidade moderada ou grave seguida de tratamento com antibiótico promove semelhante resposta inicial em camundongos isogênicos, com mesma idade, sexo e mantidos nas mesmas condições ambientais. No entanto, mesmo os camundongos e a resposta inicial à indução de sepse serem semelhantes, após este período observamos diferentes respostas e desfechos.

### 4.3 Concentração plasmática de IL-6 é um preditor de sobrevivência e correlaciona-se com a concentração de marcadores de lesões de órgãos

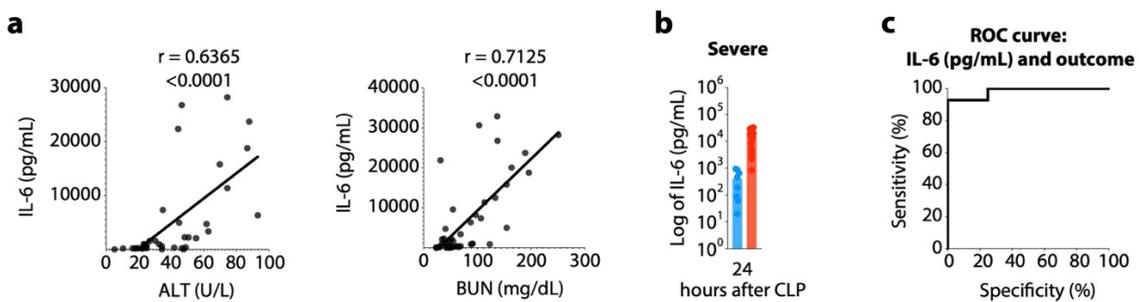
Com base no conjunto de resultados anteriores, e similaridade com o procedimento padronizado de tratamento de sepse na clínica, utilizamos o modelo de sepse por CLP de intensidade grave seguida de tratamento com antibiótico nos próximos experimentos.

Em seguida, necessitávamos determinar um biomarcador para identificar camundongos sépticos preditos a sobreviverem e não sobreviverem, para possibilitar a avaliação de parâmetros relacionados a doença, no foco infeccioso primário e em órgãos. Compartimentos importantes para observarmos mecanismos relacionados com o controle da infecção e promoção de lesões teciduais.

Entre as citocinas analisadas, as concentrações plasmáticas de IL-6, entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes, foram as mais diferentes, principalmente no tempo de 24 h após indução de CLP (Figura 4a). Além disso, as concentrações de IL-6 se correlacionaram positivamente com as concentrações de ALT e BUN (Figura 4a), e as concentrações desta

citocina já foram utilizadas em semelhantes sistemas de predição do desfecho da sepse experimental (CHISWICK et al., 2015; REMICK et al., 2002).

Em vista disso, as concentrações de IL-6 no tempo de 24 h após indução de sepse por CLP de intensidade grave seguida de tratamento com antibiótico (Figura 4b), foram utilizadas para a realização de uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (Figura 4c). A curva ROC, é uma representação gráfica que demonstra a capacidade de classificação binária de um fator classificador (ZOU; O'MALLEY; MAURI, 2007). Em resultado, observamos que as concentrações plasmáticas de IL-6 superiores a 4165 pg/mL foram capazes de especificamente identificar camundongos não sobreviventes, e as concentrações interiores a 2790 pg/mL de identificar camundongos sobreviventes (Tabela 1).



**Figura 4: IL-6 é um preditor de sobrevivência e correlaciona-se com a concentração de marcadores de lesões de órgãos.**

**a**, Correlação entre concentração plasmática de IL-6 e ALT ou BUN, no tempo de 24 h após a indução de sepse grave seguida de tratamento com antibiótico. **b**, concentração de IL-6 entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes após 24 h da indução de sepse grave seguida de tratamento com antibiótico, utilizada para realização de **c**, curva ROC levando em consideração o desfecho.

**Tabela 1: Resultado da análise de curva ROC da concentração de IL-6 e desfecho de camundongos submetidos a sepse grave seguida de tratamento com antibiótico**

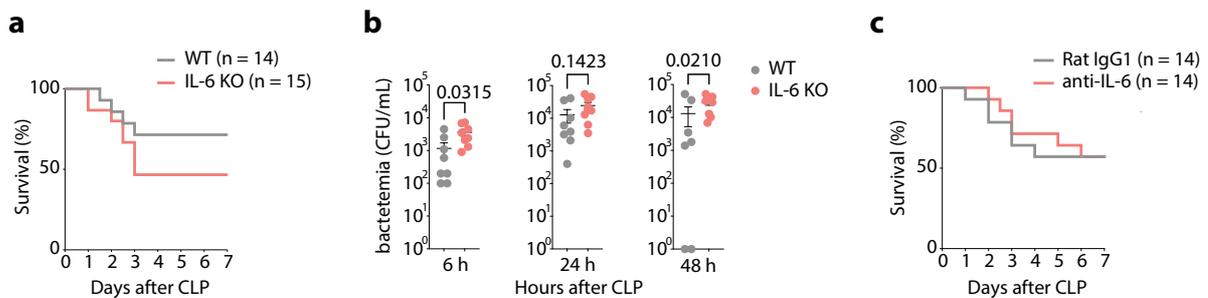
IL-6 (pg/mL)	Sensitivity (%)	95% CI	Specificity (%)	95% CI
41.33	100,0	78,47% to 100,0%	12,50	0,6412% to 47,09%
75.24	100,0	78,47% to 100,0%	25,00	4,442% to 59,07%
138.9	100,0	78,47% to 100,0%	37,50	13,68% to 69,43%
327.6	100,0	78,47% to 100,0%	50,00	21,52% to 78,48%
556.8	100,0	78,47% to 100,0%	62,50	30,57% to 86,32%
744.1	100,0	78,47% to 100,0%	75,00	40,93% to 95,56%
855.0	92,86	68,53% to 99,63%	75,00	40,93% to 95,56%
909.2	92,86	68,53% to 99,63%	87,50	52,91% to 99,36%
1589	92,86	68,53% to 99,63%	100,0	67,56% to 100,0%
<b>2790</b>	<b>85,71</b>	<b>60,06% to 97,46%</b>	<b>100,0</b>	<b>67,56% to 100,0%</b>
<b>4165</b>	<b>78,57</b>	<b>52,41% to 92,43%</b>	<b>100,0</b>	<b>67,56% to 100,0%</b>
6595	71,43	45,35% to 88,28%	100,0	67,56% to 100,0%
10350	64,29	38,76% to 83,66%	100,0	67,56% to 100,0%
14150	57,14	32,59% to 78,62%	100,0	67,56% to 100,0%
17300	50,00	26,80% to 73,20%	100,0	67,56% to 100,0%
19430	42,86	21,38% to 67,41%	100,0	67,56% to 100,0%
21905	35,71	16,34% to 61,24%	100,0	67,56% to 100,0%
25990	28,57	11,72% to 54,65%	100,0	67,56% to 100,0%
28484	21,43	7,571% to 47,59%	100,0	67,56% to 100,0%
29699	14,29	2,538% to 39,94%	100,0	67,56% to 100,0%
31800	7,143	0,3664% to 31,47%	100,0	67,56% to 100,0%

Posteriormente, em razão da concentração plasmática de IL-6 ser um preditor de desfecho de sepse, e correlacionar-se com a concentração de marcadores de lesões de órgãos, avaliamos se a ausência ou bloqueio de IL-6 era capaz de diminuir a suscetibilidade a sepse, em nosso modelo experimental.

Inicialmente observamos que camundongos geneticamente deficientes para IL-6 submetidos ao modelo de sepse de intensidade grave seguida de tratamento com antibiótico, são mais suscetíveis em comparação a camundongos WT (Figura 5a). Além disso, camundongos deficientes para IL-6 apresentaram maior bacteremia 6 h e 48 h após a indução de sepse em relação aos devidos controles (Figura 5b). Estes dados suportam dados prévios da literatura que demonstram o papel crucial da IL-6 nos estágios iniciais da infecção, participando do controle bacteriano. Uma vez que é demonstrado que camundongos deficientes para IL-6 submetidos a infecção por *Escherichia coli* ou Influenza apresentam menor recrutamento de neutrófilos e menor controle do agente infeccioso (DALRYMPLE et al., 1996; DIENZ et al., 2012).

Procurando contornar estas limitações, realizamos tratamento de camundongos sépticos com anticorpos neutralizantes anti-IL-6 após 6 h da indução do CLP, e permanecemos realizando o tratamento diariamente por 3 dias. Contudo, não observamos diferença na taxa de sobrevivência (Figura 5c).

Em conjunto, estes dados demonstraram que as concentrações plasmáticas de IL-6 podem ser utilizadas como um preditor de sobrevivência e correlaciona-se com as concentrações de marcadores de lesões de órgãos. Porém a deficiência de IL-6 ou sua neutralização após 6 h da indução de sepse, não acarreta melhora na suscetibilidade de camundongos submetidos ao modelo de CLP.



**Figura 5: Deficiência ou neutralização de IL-6 não acarreta melhora na suscetibilidade de camundongos a sepse.**

**a**, Avaliação da taxa de sobrevivência e **b**, bacteremia de camundongos WT e deficientes para IL-6 submetidos ao modelo de sepse por CLP de intensidade grave seguida de tratamento com antibiótico. **c**, Avaliação da sobrevivência de camundongos tratados via intravenosa, com anti-IL6 ou rat IgG1 (20 µg/camundongo) 6 h, e diariamente por 3 dias, após submetidos ao CLP de intensidade grave seguida de tratamento com antibiótico. Dados de dois experimentos independentes com resultados similares. O valor da diferença estatística foi indicado em comparações com nível de significância de  $p < 0,05$  para teste estatístico t-test.

#### 4.4 Camundongos preditos a não sobreviverem apresentam aumento das concentrações de citocinas no foco infeccioso e em órgãos

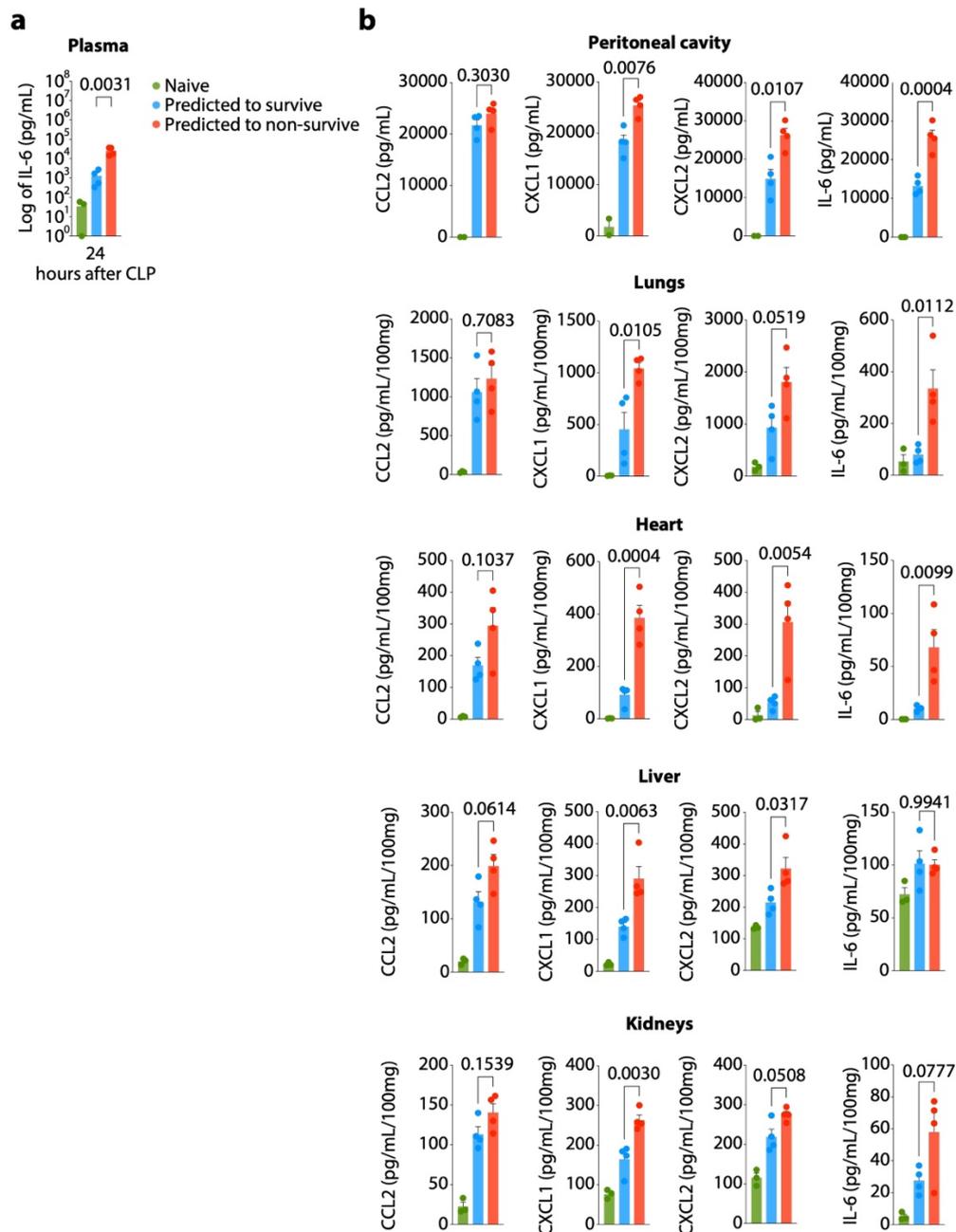
Baseando-se nos resultados anteriores, categorizamos camundongos sépticos em preditos a sobreviverem e não sobreviverem de acordo com suas concentrações de IL-6 plasmáticas após 24 h da indução de sepse (Figura 6a). Em resultado a isso, analisamos as concentrações de citocinas na cavidade peritoneal, o foco primário da infecção, e em órgãos. Esses parâmetros são importantes para observarmos mecanismos relacionados com o controle da infecção e promoção de lesões teciduais.

Na cavidade peritoneal, observamos que camundongos preditos a não sobreviverem apresentaram aumento das concentrações de CXCL1, CXCL2 e IL-6 em comparação com camundongos preditos a sobreviverem no tempo de 24 horas após a indução de sepse (Figura 6b).

Em órgãos, assim como na cavidade peritoneal, não observamos diferenças nas concentrações de CCL2 entre camundongos preditos a sobreviverem e não sobreviverem (Figura 8b). Seguindo as mesmas comparações, observamos aumento das concentrações de

CXCL1 e CXCL2 nos pulmões, coração, fígado e rins, e aumento das concentrações de IL-6 nos pulmões e coração de camundongos preditos a não sobreviverem (Figura 6b).

De forma geral, camundongos não sobreviventes apresentam aumento das concentrações de citocinas no foco infeccioso e em órgãos, o que é similar ao observado anteriormente na circulação sanguínea (Figura 2a).



**Figura 6: Camundongos preditos a não sobreviverem apresentam aumento da concentração de citocinas no foco infeccioso e em órgãos.**

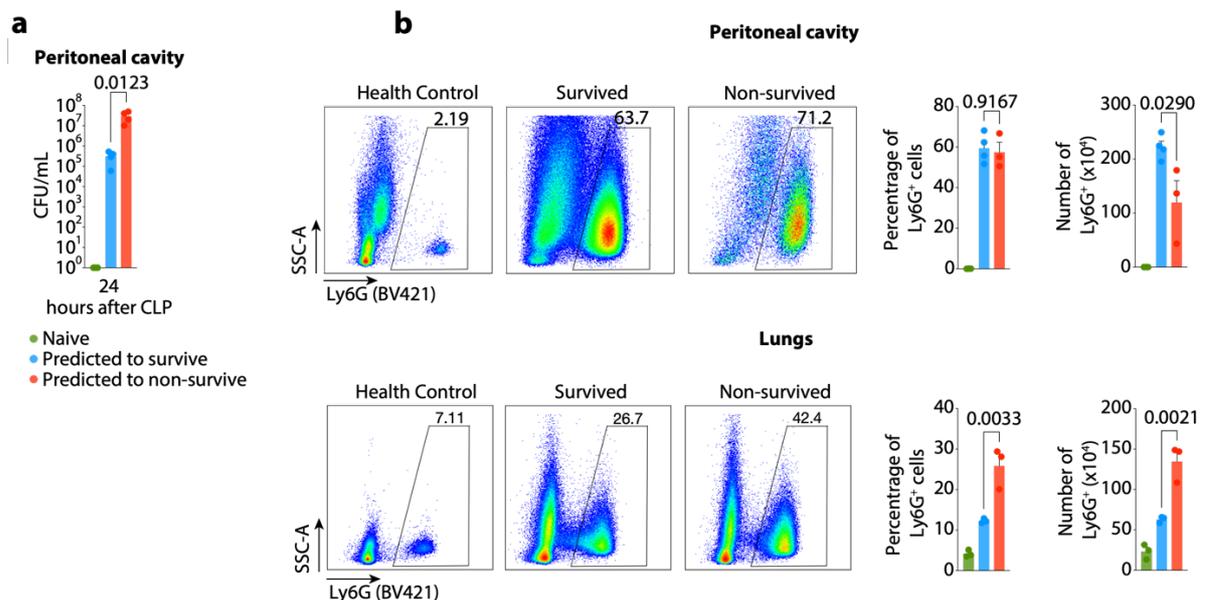
a, concentração plasmática de IL-6 utilizada para categorizar camundongos sépticos em preditos a sobreviverem e não sobreviverem, no tempo de 24 h após indução de sepse. b, concentrações de CCL2, CXCL1, CXCL2, IL-6, na cavidade peritoneal, pulmões, coração, fígado e rins de camundongos controles, sépticos preditos a sobreviverem ou morrerem no tempo de 24h após sepse. O valor das comparações com diferença estatística entre

concentrações de citocinas de camundongos preditos a sobreviverem e não sobreviverem foi inserido no gráfico. Utilizou-se teste estatístico de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de correção Bonferroni. Dados representativos de 3 experimentos independentes com resultados similares.

#### 4.5 Camundongos preditos a não sobreviverem apresentam diminuição do número de neutrófilos e aumento do número de bactérias no foco inicial de infecção, além de aumento do número de neutrófilos nos pulmões

Anteriormente, observamos que camundongos não sobreviventes apresentaram maior quantidade de bactérias no sangue após 24 horas da indução de sepse grave seguida de tratamento com antibiótico (Figura 5b). Após dosagem de IL-6 plasmática e predição de desfecho, observamos que camundongos preditos a não sobreviverem também apresentaram maior quantidade de bactérias no foco primário de infecção em comparação a camundongos preditos a sobreviverem (Figura 7a).

Em vista que a migração de neutrófilos para o foco infeccioso é importante para o controle bacteriano, e também a sua migração para órgãos é associada com lesões teciduais na sepse (ALVES-FILHO et al., 2008; SÔNEGO et al., 2016; SOUTO et al., 2011), avaliamos a quantidade destas células em nosso contexto experimental, através de citometria de fluxo. Observamos que camundongos preditos a não sobreviverem apresentaram menor quantidade de neutrófilos no foco primário da infecção em relação aos preditos a sobreviverem, após 24 horas da indução de sepse (Figura 7b). Além disso, no mesmo tempo, observamos aumento da quantidade de neutrófilos nos pulmões de camundongos preditos a não sobreviverem (Figura 7c).



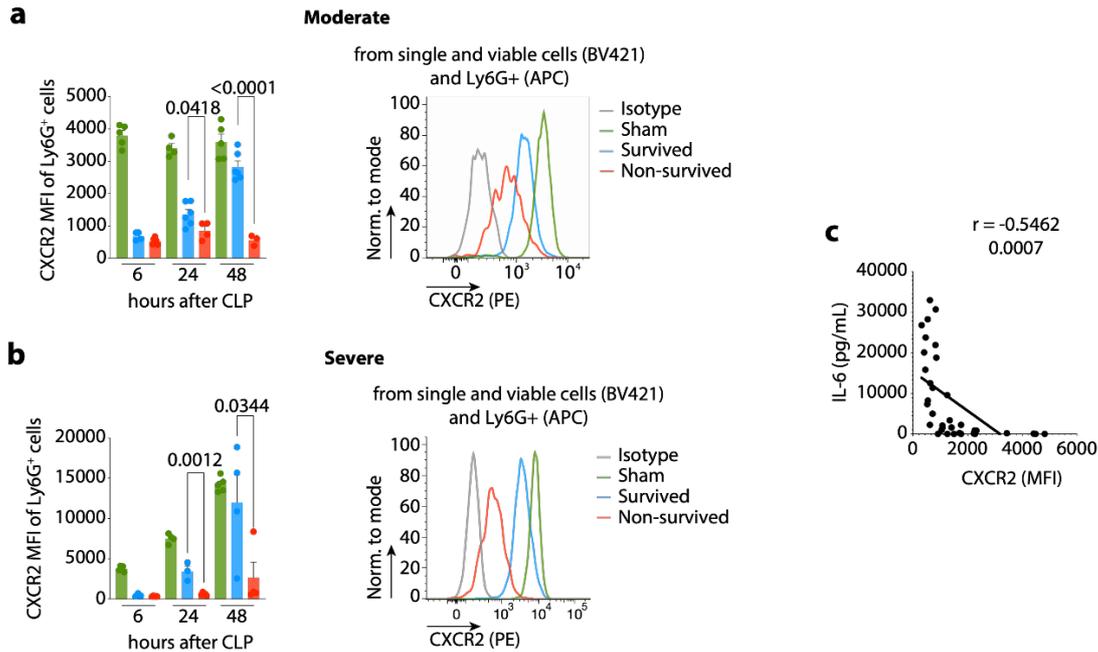
**Figura 7: Camundongos não sobreviventes apresentam diminuição do número de neutrófilos e aumento do número de bactérias no foco inicial de infecção, além de aumento do número de neutrófilos nos pulmões 24 h após a indução de sepse por CLP.**

**a**, quantificação de unidades formadoras de colônia (CFU) no foco infeccioso de camundongos controles, preditos a sobreviverem e não sobreviverem, após 24 h da indução de CLP de intensidade grave seguida de tratamento com antibiótico. Quantificação da quantidade de neutrófilos por citometria presentes na **b**, cavidade peritoneal e **c**, tecido pulmonar de camundongos controles, preditos a sobreviverem e não sobreviverem, após 24 h da indução de CLP de intensidade grave seguida de tratamento com antibiótico. O valor das comparações com diferença estatística entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes foi inserido no gráfico. Utilizou-se teste estatístico de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de correção Bonferroni. Dados representativos de 2 experimentos independentes.

Dados anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a migração de neutrófilos de camundongos sépticos encontra-se comprometida pela internalização de um de seus principais receptores de quimiocinas, o CXCR2 (RIOS-SANTOS et al., 2007). Desta forma, analisamos a expressão do CXCR2 na superfície de neutrófilos circulantes de camundongos sobreviventes e não sobreviventes a sepse.

Utilizando citometria de fluxo, observamos semelhante diminuição da expressão de CXCR2 na superfície de neutrófilos circulantes de camundongos sobreviventes e não sobreviventes no tempo de 6 h após a indução de sepse moderada (Figura 8a) ou de sepse letal seguida de tratamento com antibiótico (Figura 8b). Entretanto, após 24 h e 48 h da indução de ambas as intensidades de sepse, enquanto os neutrófilos de camundongos sobreviventes reestabeleceram progressivamente a expressão de CXCR2, os neutrófilos de camundongos não sobreviventes permaneceram com baixa expressão de CXCR2 em sua superfície (Figura 8a e 8b).

Da mesma forma que ALT e BUN, a correlação entre a concentração de IL-6 plasmática e a expressão de CXCR2 na superfície de neutrófilos foi significativa, sendo que o aumento da concentração de IL-6 é inversamente proporcional a expressão de CXCR2 (Figura 8c).

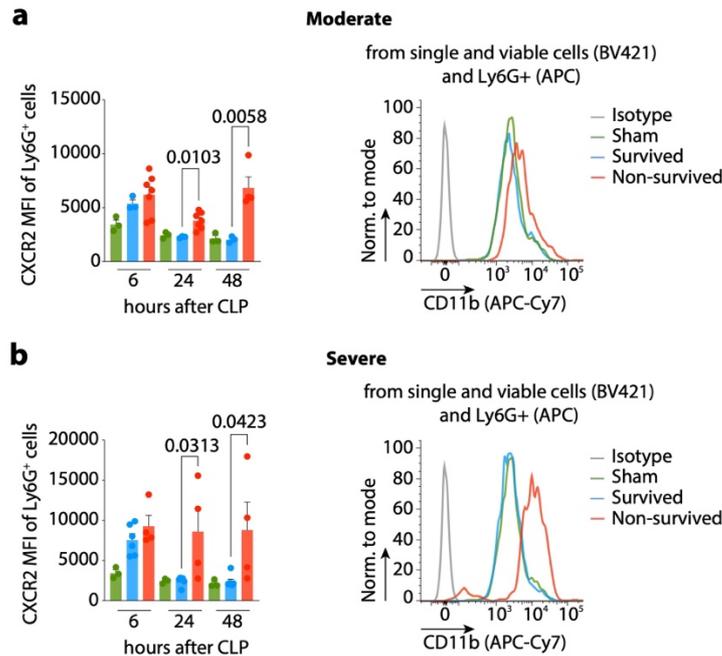


**Figura 8: Neutr3filos de camundongos s3pticos n3o sobreviventes apresentam menor express3o de CXCR2 em sua superf3cie 24 h ap3s a indu33o de sepse por CLP.**

An3lise de citometria avaliando a express3o de CXCR2 (MFI, *mediam of florescence intensity*), em neutr3filos circulantes previamente selecionados pela express3o de Ly6G, c3lulas 3nicas e vi3veis, de camundongos sobreviventes e n3o sobreviventes ap3s a indu33o de **a**, sepse moderada e **b**, sepse letal seguida de tratamento com antibi3tico. O valor das compara33es com diferen3a estat3stica entre camundongos sobreviventes e n3o sobreviventes foi inserido no gr3fico. Utilizou-se teste estat3stico de an3lise de vari3ncia (ANOVA), seguida pelo teste de corre33o Bonferroni. **c**, correla33o entre concentra33o plasm3tica de IL-6 e express3o de CXCR2 (MFI), no tempo de 24 h ap3s a indu33o de sepse grave seguida de tratamento com antibi3tico. Dados representativos de 3 experimentos independentes.

Em seguida, avaliamos a express3o de CD11b em neutr3filos, pois 3 uma mol3cula que se correlaciona com a ativa33o destas c3lulas (COSTANTINI et al., 2010). Ap3s 6 h de sepse moderada (Figura 9a) ou sepse letal seguida de tratamento com antibi3tico (Figura 9b), apesar do aumento da express3o de CD11b em neutr3filos de camundongos s3pticos em rela33o a controles, n3o se observou diferen3a na express3o de CD11b entre neutr3filos de camundongos sobreviventes e n3o sobreviventes. Por outro lado, em 24 h e 48 h ap3s a indu33o de ambos modelos de sepse, observamos que neutr3filos de camundongos n3o sobreviventes se mantiveram com aumento da express3o de CD11b (Figura 9a e 9b).

Em conjunto, os dados demonstram que camundongos preditos a n3o sobreviverem apresentam diminui33o do n3mero de neutr3filos e aumento do n3mero de bact3rias no foco inicial de infec33o. Al3m disso, tamb3m apresentam aumento do n3mero de neutr3filos nos pulm3es. Em vista disso, a diminui33o da express3o de CXCR2 e aumento da express3o de CD11b em neutr3filos est3o associados a estes fen3menos observados de migra33o celular em camundongos n3o sobreviventes a sepse.



**Figura 9: Neutr3filos de camundongos s3pticos n3o sobreviventes apresentam maior express3o de CD11b em sua superf3cie 24 h ap3s a indu3o de sepse por CLP.**

An3lise de citometria avaliando a express3o de CD11b (MFI, *mediam of florescence intensity*), em neutr3filos circulantes previamente selecionados pela express3o de Ly6G, c3lulas 3nicas e vi3veis, de camundongos sobreviventes e n3o sobreviventes ap3s a indu3o de **a**, sepse moderada e **b**, sepse letal seguida de tratamento com antibi3tico. O valor da diferen3a estat3stica entre camundongos sobreviventes e n3o sobreviventes foi inserido no gr3fico. Utilizou-se teste estat3stico de an3lise de vari3ncia (ANOVA), seguida pelo teste de corre3o Bonferroni. Dados representativos de 3 experimentos independentes.

At3 este momento, implementamos uma nova abordagem para analisar a resposta individual de camundongos submetidos a sepse pelo modelo de CLP. Observamos que camundongos isog3nicos, com a mesma idade, sexo e mantidos nas mesmas condi3es ambientais, apresentam diferentes desfechos a sepse de mesma intensidade. Neste sentido, avaliamos as respostas destes camundongos s3pticos sobreviventes e n3o sobreviventes, e observamos que:

- Camundongos isog3nicos e submetidos semelhantemente a sepse de mesma intensidade apresentam os mesmos par3metros inflamat3rios e de les3es de 3rg3os na fase inicial da sepse. Por3m, posteriormente a este tempo, o grupo de camundongos sobreviventes e n3o sobreviventes passam a apresentar diferen3as nestes par3metros analisados;
- Camundongos n3o sobreviventes apresentam inflama3o sist3mica persistente, aumento da concentra3o de marcadores de les3es de 3rg3os e bacteremia, al3m disso tamb3m apresentam aumento da concentra3o das citocinas avaliadas no foco infeccioso e em 3rg3os;

- Camundongos preditos a não sobreviverem apresentam diminuição do número de neutrófilos e aumento do número de bactérias no foco inicial de infecção 24 horas após a indução de sepse, além de aumento do número de neutrófilos nos pulmões. Além disso, observamos diminuição da expressão de CXCR2 e aumento da expressão de CD11b em neutrófilos de camundongos não sobreviventes.

A partir destas conclusões, em seguida nos interessamos em avaliar as diferenças de respostas dos camundongos isogênicos sobreviventes e não sobreviventes submetidos a sepse de mesma intensidade, após o período inicial do modelo. Neste sentido, avaliando os mecanismos celulares e moleculares que promovem diferenças de desfecho em camundongos sépticos, nossos próximos objetivos foram identificar e avaliar a frequência de populações de leucócitos e determinar a diferença de expressão gênica destas populações entre camundongos sépticos sobreviventes e não sobreviventes, através da metodologia de *single cell RNA sequencing* (scRNAseq).

#### 4.6 Implementação do single cell RNA sequencing

Como se tratava de uma tecnologia não implementada no Brasil, realizamos a aquisição e implementação do sistema de scRNAseq da 10X Genomics para conseguirmos realizar nossos objetivos.

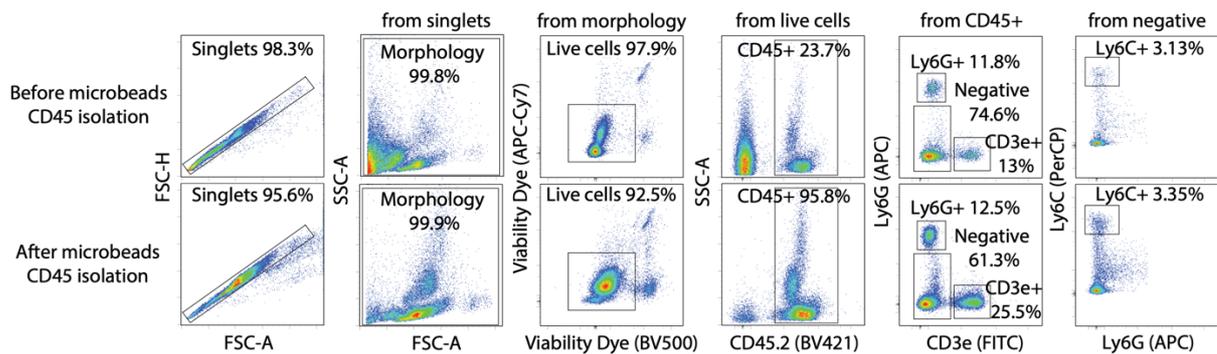
Em um primeiro momento, coletamos sangue periférico após 12 horas da indução de sepse grave seguida de tratamento com antibiótico, e isolamos células CD45 positivas e viáveis através de separador de células por citometria de fluxo, metodologia também utilizada em outros estudos envolvendo scRNAseq (ALVES DE LIMA et al., 2020; RUSTENHOVEN et al., 2021). Concomitantemente a separação de células, determinamos as concentrações plasmáticas de IL-6 e de marcador de lesão renal (BUN), e selecionamos 4 camundongos preditos a sobreviverem, 4 camundongos preditos a não sobreviverem, e também foram inseridos em nossas análises 2 camundongos saudáveis como controles. Além disso, como os camundongos permaneceram vivos, acompanhamos a sobrevivência para certificar o desfecho de cada camundongo e recolocá-lo na categoria correta, caso fosse necessário.

Para tornar o experimento menos custoso, utilizamos um sistema de multiplexação de amostras, que adiciona uma marca gênica individual nas células de cada camundongo para identificação de sua origem. Permitindo a realização de um experimento com vários camundongos e vários grupos experimentais em uma menor quantidade de poços do sistema de scRNAseq. Desta forma, selecionamos os camundongos que seriam incluídos na análise de scRNAseq e adicionamos esta marca gênica em suas células antes de as combinarmos na

proporção de 1:1. Em seguida, inserimos cada grupo de amostras em um poço do sistema e realizamos todos os processos de preparo da biblioteca de expressão gênica de células únicas utilizando o equipamento Chromium, e posterior realização de protocolos para preparo de fragmentos de cDNA para sequenciamento no HiSeq 4000. Este esquema metodológico está exemplificado na Figura 12a, e detalhado na seção de metodologias.

Todas a etapas da construção da biblioteca de expressão gênica de células únicas foi devidamente checada por controles de qualidade, como descrito no tópico de metodologias. Contudo, mesmo obtendo excelentes resultados nos controles de qualidade, obtivemos baixo rendimento de células (poço 1: 432 células e poço 2: 356 células), o que impossibilitou subsequentes análises.

Em um segundo momento, realizamos o mesmo procedimento de coleta de sangue periférico após 12 horas da indução de sepse grave seguida de tratamento com antibiótico, e isolamos células CD45 positivas utilizando separação de células magneticamente, por se tratar de um método mais rápido do que utilizado anteriormente, diminuindo as chances de termos baixo rendimento de células causada por morte celular. Além disso, este método de isolamento garantiu uma pureza adequada e a manutenção da proporção de leucócitos (Figura 10).



**Figura 10: Isolamento de células CD45 positivas de sangue periférico**

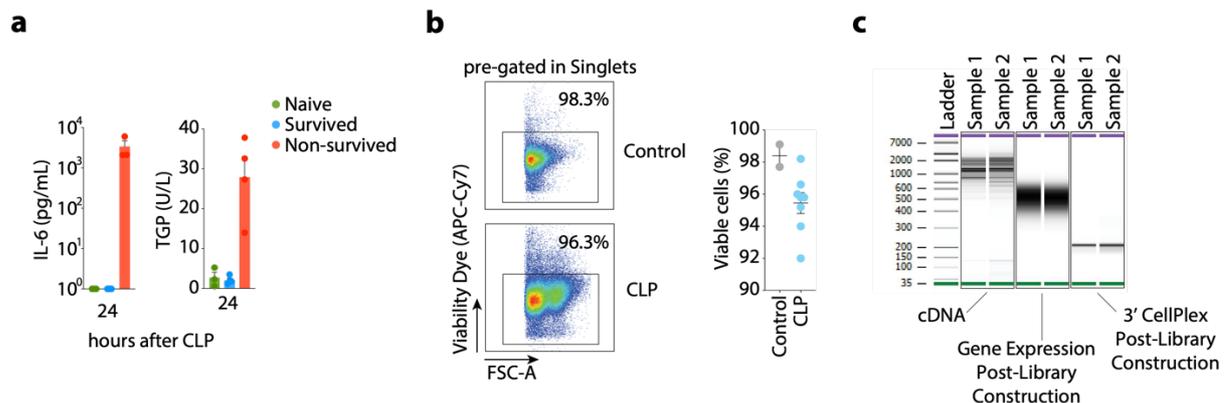
Análise de citometria de amostras de sangue periféricos de camundongos, antes e após o isolamento magnético de células CD45 positivas utilizando microesferas magnéticas revestidas com anticorpo anti-CD45 murino.

Em seguida, realizamos a construção da biblioteca de expressão gênica de células únicas seguindo a mesma abordagem realizada anteriormente. Coletamos leucócitos de 2 camundongos saudáveis e 8 camundongos submetidos a sepse que foram agrupados em sobreviventes ( $n = 4$ ) e não sobreviventes ( $n = 4$ ), após o resultado do acompanhamento de sobrevivência por 7 dias. Além disso, para confirmar o desfecho de sobrevivência dos camundongos, determinamos as concentrações plasmática de IL-6 e marcador plasmático de lesão hepática, após 24 horas da indução de sepse (Figura 11a).

Novamente, todas a etapas da construção da biblioteca de expressão gênica de células únicas foi devidamente checada por controles de qualidade. Inicialmente, antes de inserir as

células no sistema de scRNAseq foi determinado que viabilidade celular era maior que 90% (Figura 11b). Em seguida, as amostras foram multiplexadas em dois grupos de amostras e inseridas em dois poços do sistema de scRNAseq, contendo no poço 1 (Amostra 1) – 1 controle e 4 animais sépticos; e no poço 2 (Amostra 2) – 1 controle e 4 animais sépticos. Durante a construção da biblioteca foi determinado a quantidade de cDNA na Amostra 1 = 14,8 ng/ $\mu$ L e na Amostra 2 = 12,6 ng/ $\mu$ L. Também foi determinado o tamanho dos fragmentos de cDNA após a construção da biblioteca de expressão gênica (valores de referência = 400-600 pb) e da construção da biblioteca de multiplexação celular (valores de referência = 200 pb) (Figura 11c). De acordo com os resultados obtidos podemos observar que nossas amostras se enquadraram dentro dos parâmetros de controles de qualidade.

Em seguida, realizamos o sequenciamento e processamento dos dados das bibliotecas de scRNAseq. Em resultados, observamos um número adequado de células para realização das análises subsequentes, descrito no tópico de metodologias.

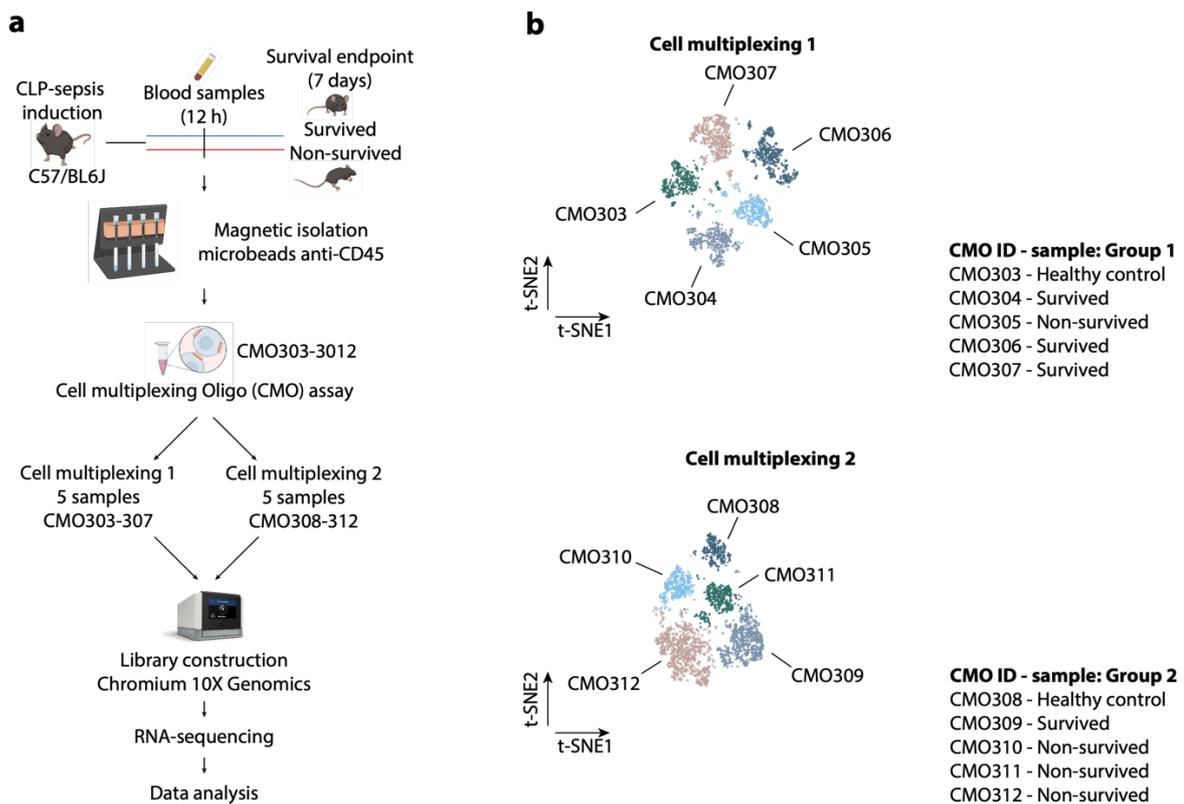


**Figura 11: Controles de qualidade do preparo da biblioteca de expressão gênica de células únicas e da biblioteca de multiplexação.**

a, concentrações plasmáticas de IL-6 e TGP entre os grupos de camundongos saudáveis (n = 2), sobreviventes (n = 4) e não sobreviventes (n = 4). b, representação concatenada da análise e frequência de células viáveis determinada por citometria de fluxo do grupo de camundongos saudáveis (n = 2) e camundongos sépticos (n = 8). c, análise em bioanalisador das amostras 1 e 2 referentes a poços utilizados no single cell RNA sequencing. Após o padrão de tamanho molecular, observa-se a determinação do tamanho dos fragmentos de duas linhas de corrida contendo cDNA não processados, em seguida duas linhas de corrida contendo fragmentos do cDNA já processados que representa a biblioteca de expressão gênica finalizada, e por fim, duas linhas de corrida contendo fragmentos referentes a biblioteca de 3'CellPlex (multiplexação celular).

## 4.7 Camundongos não sobreviventes a sepse apresentam aumento da frequência de neutrófilos imaturos

Após a implementação da metodologia de scRNAseq, seguimos com o nosso objetivo de identificar populações de leucócitos e determinar a frequência destas populações em relação aos desfechos de sepse. Como descrito anteriormente no tópico 4.6, isolamos leucócitos de camundongos sobreviventes e não sobreviventes 12 h após indução do modelo de sepse por CLP de intensidade grave seguida de tratamento com antibiótico. Esse tempo foi escolhido por se tratar de uma fase intermediária entre o início (6 horas) e presença mais acentuada (24 horas) de diferenças em eventos inflamatórios entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes (Figuras 4-5, 8-11). Posteriormente, os leucócitos isolados foram submetidos ao processo de multiplexação e realizamos a metodologia de scRNAseq (Figura 12<sup>a</sup> e 12b).



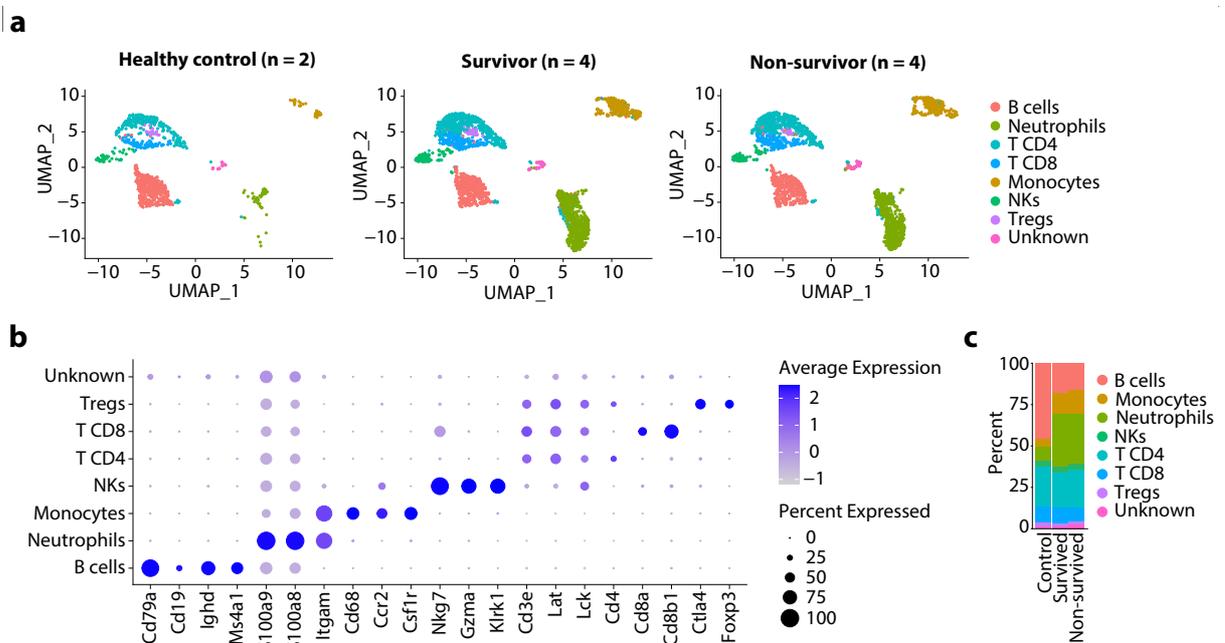
**Figura 12: Representação metodológica e multiplexação das amostras submetidas ao *single cell RNA sequencing***

**a**, representação metodológica da realização da coleta e isolamento de leucócitos e realização da multiplexação e single cell RNA sequencing. **b**, representação dos resultados obtidos da multiplexação de amostras. Descrição mais detalhada pode ser encontrada em metodologias.

Após a realização do processamento dos dados, checagem de qualidade e identificação das amostras multiplexadas (Figura 12b), 7266 células foram obtidas para posterior análise. A projeção dimensional UMAP (*uniform manifold approximation and projection*) dessas populações

destacou o aparecimento de 8 *clusters* de potenciais subpopulações leucocitárias (Figura 13a). Realizamos então a identificação desses *clusters* pela análise da expressão de genes canônicos comumente utilizados como marcadores de populações de leucócitos (Figura 13b). Deste modo, populações de neutrófilos (S100a8, S100a9 e Itgam), monócitos (Itgam, Cd68, Ccr2, Csf1r), células NK (Nkg7, Gzma, Nlrk1), células B (Cd79a, Cd19, Ighd e Ms4a1), células T CD4 positivas (Cd3e, Lat, Lck e Cd4), células T CD8 positivas (Cd3e, Lat, Lck, Cd8a e Cd8b1), e células T reguladoras (Cd3e, Lat, Lck, Cd4, Ctl4 e Foxp3) foram identificadas (Figura 13a).

A análise estatística entre camundongos sépticos e não sépticos (controles) revelou um aumento da frequência de neutrófilos e monócitos e uma diminuição de células B em camundongos submetidos a indução de CLP. Porém, não observamos diferença significativa na distribuição dos leucócitos no sangue quando comparamos camundongos preditos a sobreviverem ou não da sepse (Figura 13c).



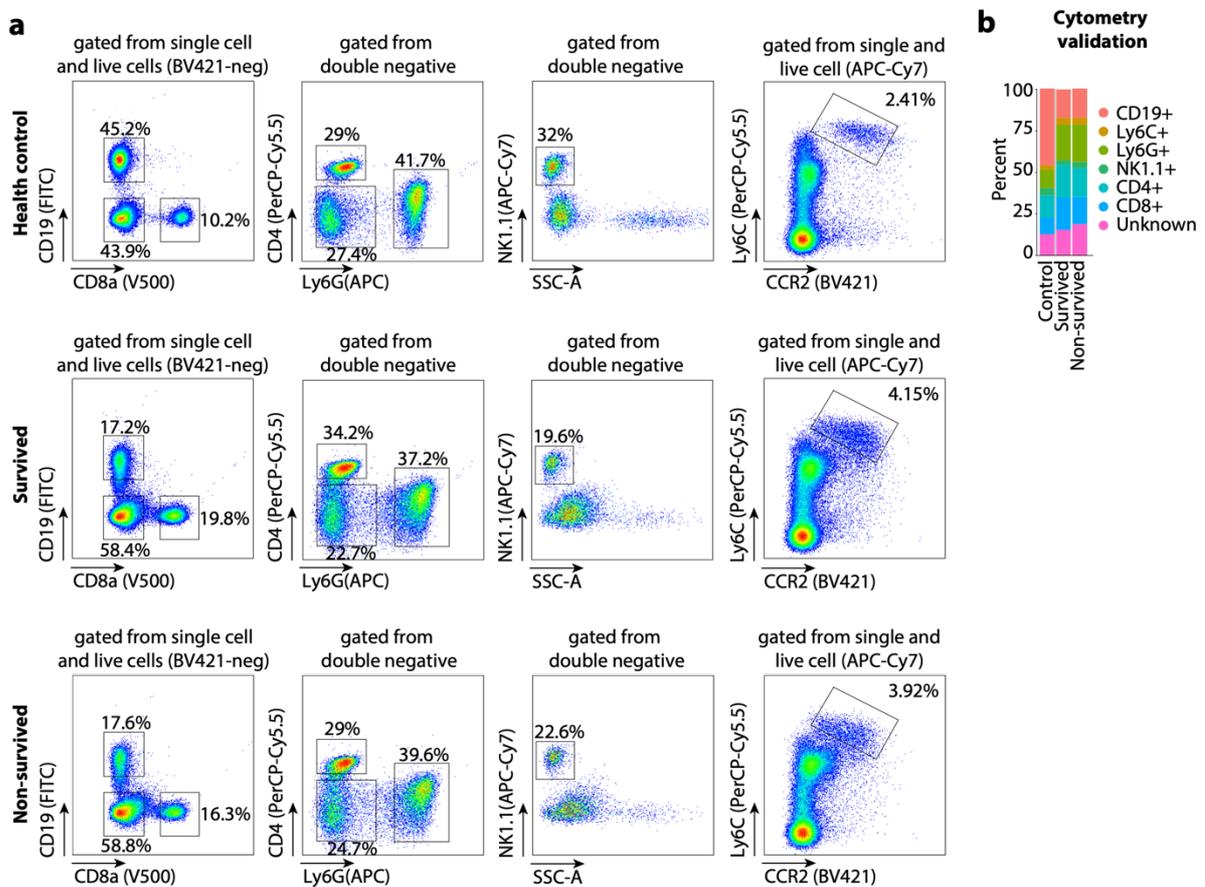
**Figura 13: Redução dimensional e identificação de populações de leucócitos de camundongos controles, sobreviventes e não sobreviventes a sepse.**

**a**, redução dimensional por *uniform manifold approximation and projection* (UMAP) dos dados de scRNAseq obtidos de leucócitos de camundongos controles, sobreviventes e não sobreviventes após 12 horas da indução de sepse. **b**, representação da frequência e quantidade de expressão gênica de genes utilizados para a identificação de populações de leucócitos. **c**, frequência de populações de leucócitos observadas em camundongos controles, sépticos sobreviventes e não sobreviventes.

Em seguida, com o objetivo de validar os dados obtidos no scRNAseq utilizamos a técnica de citometria de fluxo. Em resultado observamos que as frequências de populações de leucócitos observadas (Figura 14b) foram semelhantes aquelas obtidas pela metodologia de scRNAseq (Figura 13c). Em camundongos controles, a população de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) compreendem em média 45,7 %, monócitos (Ly6C<sup>+</sup>) 2,6 %, neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>) 11 %, células

NKs (NK1.1<sup>+</sup>) 4,43 %, linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>) 13,46 % e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) 9,97 %. Em camundongos sobreviventes, a população de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) compreendem em média 17,92 %, monócitos (Ly6C<sup>+</sup>) 3,95 %, neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>) 20,78 %, células NKs (NK1.1<sup>+</sup>) 2,69 %, linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>) 20,5 % e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) 19,61 %. Em camundongos não sobreviventes, a população de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) compreendem em média 15,76 %, monócitos (Ly6C<sup>+</sup>) 4,6 %, neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>) 23,72 %, células NKs (NK1.1<sup>+</sup>) 3,74 %, linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>) 15,9 % e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) 15,54 %.

Esses resultados indicam que o processo de englobamento celular realizado no estudo de sequenciamento manteve a proporcionalidade de células coletadas presentes na circulação sanguínea no momento da coleta.



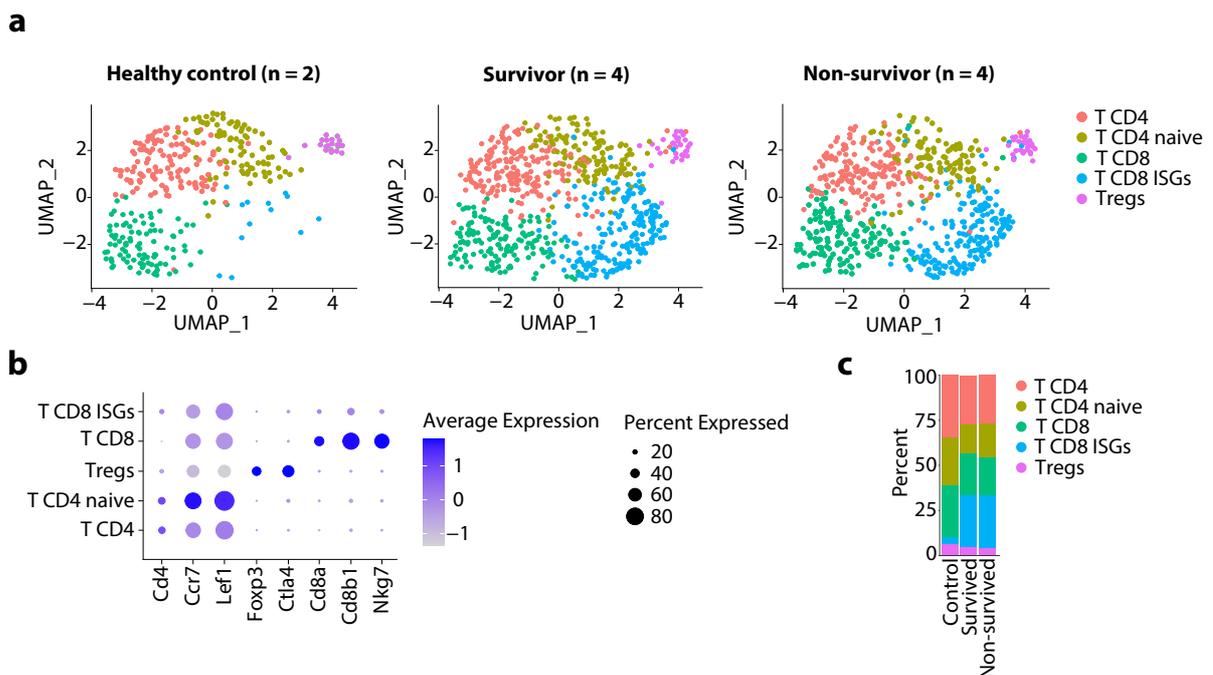
**Figura 14: Validação por citometria de fluxo da frequência de leucócitos obtidos pela metodologia de scRNAseq.**

**a**, representação de *dotplot* da estratégia de gating utilizada para a identificação das diferentes subpopulações de leucócitos isoladas de camundongos submetidos a indução de sepse por CLP após 12 h. **b**, frequência de populações de leucócitos de camundongos controles e sépticos sobreviventes e não sobreviventes após 12 horas da indução de sepse. Dados foram gerados através de análises de citometria de fluxo e foram repetidos ao menos duas vezes, independentemente, com resultados similares.

Posteriormente, realizamos uma nova redução dimensional especificamente para cada população de leucócitos, com o objetivo de caracterizar ainda melhor e determinar as frequências de subpopulações de leucócitos entre os nossos grupos amostrais.

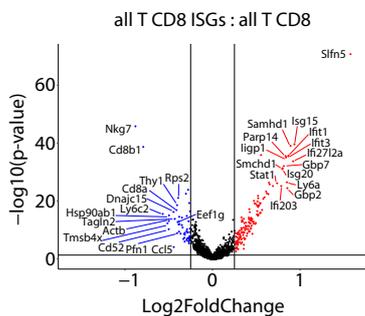
Inicialmente, as populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e Treg foram agrupadas isoladamente e submetidas a redução dimensional por UMAP (Figura 15a). Em seguida, avaliando a expressão de genes canônicos comumente utilizados como marcadores de subpopulações de linfócitos (Figura 15b), identificamos *clusters* de células T CD4 positivas (*Cd4*), T CD4 naives (*Cd4*, *Ccr7* e *Lef1*), T CD8 positivas (*Cd8a*, *Cd8b1* e *Nkg7*), T CD8 interferon-stimulated genes (ISGs) (*CD8a*, *CD8b1* e *Nkg7*) e células T reguladoras (Tregs) (*Foxp3* e *Ctla4*) (Figura 15a e 15b) utilizando o pacote de identificação de populações celulares: *sctype*. Para ilustrar a identificação do *cluster* de células T CD8 ISGs pelo pacote *sctype*, determinamos a expressão diferencial de genes entre as populações de células T CD8 ISGs e T CD8, e observamos o aumento da expressão de vários genes estimulados pela sinalização de interferon (ISGs) do tipo I ou do tipo II (LIU et al., 2012), como: *Isg15*, *Ifit1*, *Ifit3*, *Samhd1*, *Parp14*, *Iigp1*, *Gbp7*, *Ifi203*, *Isg20*, *Gbp2*, *Stat1* e *Slfn5* (Figura 16).

Em seguida, avaliamos a frequência das populações de linfócitos e não observamos diferenças entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes (Figura 15c). Porém, interessante observamos aumento da frequência da população de células T CD8 ISGs e uma redução das outras populações de linfócitos em camundongos sépticos em relação aos controles (Figura 15c).



**Figura 15: Camundongos sépticos apresentam aumento da frequência de linfócitos T CD8 interferon stimulated genes (ISGs).**

**a**, redução dimensional por *uniform manifold approximation and projection* (UMAP) especificamente de linfócitos T de camundongos controles, sobreviventes e não sobreviventes após 12 horas da indução de sepse. **b**, representação da frequência e quantidade de expressão gênica de genes utilizados para a identificação de populações de linfócitos T. **c**, frequência de populações de linfócitos T observadas em camundongos controles, sépticos sobreviventes e não sobreviventes.



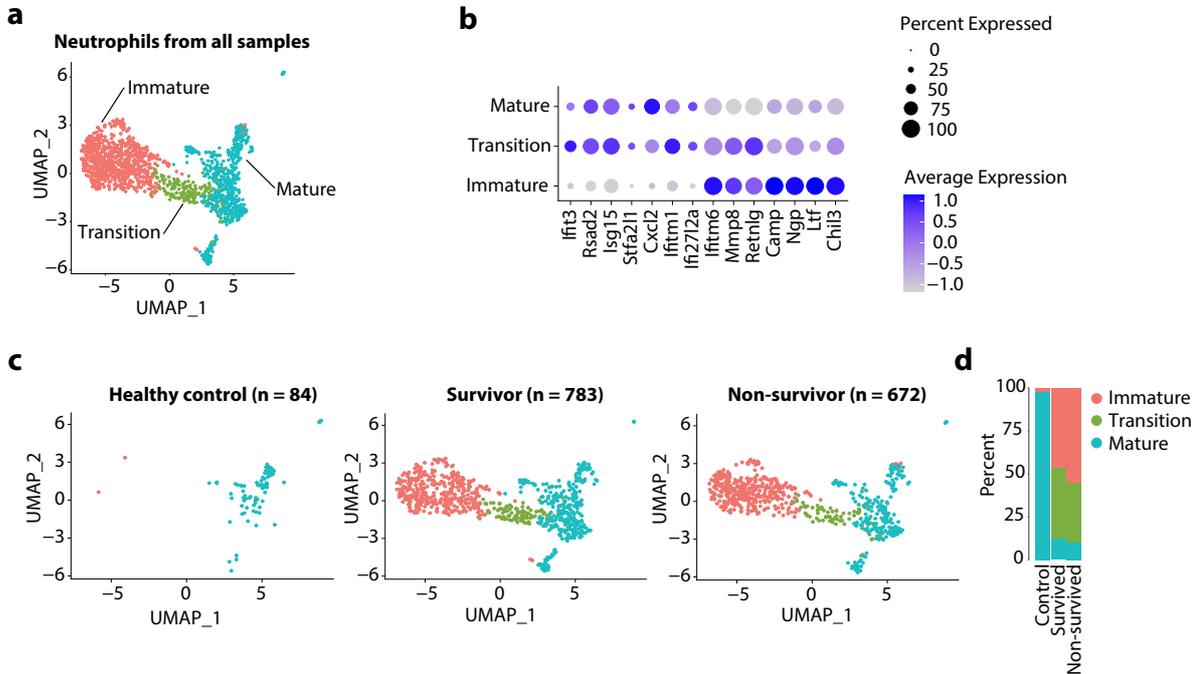
**Figura 16: Expressão diferencial de genes entre populações de linfócitos T CD8 ISGs e linfócitos T CD8.**

Representação da expressão diferencial de genes por volcano plot da comparação entre linfócitos T CD8 ISGs e linfócitos T CD8. Identificou-se os 15 genes mais e menos expressos com valor de  $p < 0,05$  e frequência de expressão maior que 10%.

Posteriormente, tentamos realizar a mesma análise para monócitos, células B e células NK, porém devido ao baixo número de células, não observamos a formação de *clusters* para definição de subtipos celulares. No entanto, após nova redução dimensional em neutrófilos, observamos 3 subpopulações, que de acordo com o perfil de expressão de genes (Figura 17b) (GRIESHABER-BOUYER et al., 2021; XIE et al., 2020), foram identificadas como: neutrófilos imaturos (*Ifitm6*, *Mmp8*, *Retnlg*, *Camp*, *Ngp*, *Lft* e *Chil3*), de transição (*Ifit3*, *Rsad2*, *Isg15*, *Ifitm1*, *Mmp8* e *Retnlg*) e maduros (*Ifit3*, *Rsad2*, *Isg15*, *Cxcl2* e *Ifitm1*) (Figura 17a). A análise da frequência destas subpopulações em nossos grupos amostrais revelou um aumento da frequência de neutrófilos imaturos em camundongos sépticos não sobreviventes em relação aos sobreviventes (Figura 17c e 17d).

Em conjunto, observamos que camundongos sépticos apresentam aumento da frequência de neutrófilos, monócitos e células T CD8 ISGs e diminuição da frequência de linfócitos B, em comparação com camundongos controles. Na análise entre os camundongos sobreviventes e não sobreviventes, observamos que os não sobreviventes apresentam aumento da frequência de neutrófilos imaturos. Esses dados sugerem um aumento da hematopoiese de

emergência nestes camundongos que apresentam um pior prognóstico (BOETTCHER et al., 2012; PERIASAMY et al., 2016).



**Figura 17: Camundongos não sobreviventes apresentam aumento da frequência de neutrófilos imaturos quando comparados aos preditos a sobreviverem após a 12 h da indução de sepse.**

**a**, redução dimensional por *uniform manifold approximation and projection* (UMAP) especificamente de neutrófilos após 12 horas da indução de sepse por CLP. **b**, representação da frequência e quantidade de expressão gênica de genes utilizados para a identificação de populações neutrófilos. **c**, UMAP e **d**, frequência de populações de neutrófilos observadas em camundongos controles, sépticos sobreviventes e não sobreviventes.

#### 4.8 Camundongos não sobreviventes apresentam aumento de vias relacionadas a apoptose em populações de linfócitos T CD4, T CD4 naive, T CD8 e Tregs, e linfócitos T CD8 ISGs apresentam aumento de vias responsáveis pela expressão de PD-L1

Nosso próximo objetivo foi determinar os genes diferencialmente expressos (DEGs) em populações de leucócitos entre nossos grupos amostrais. Não foi possível realizar essa análise nas populações de células NK, devido ao pouco número de células.

Através da análise de enriquecimento de vias de sinalização a partir de genes diferencialmente expressos utilizando a ferramenta *Enrichr* (CHEN et al., 2013), observamos em células T CD4<sup>+</sup> de camundongos não sobreviventes um aumento da expressão de genes

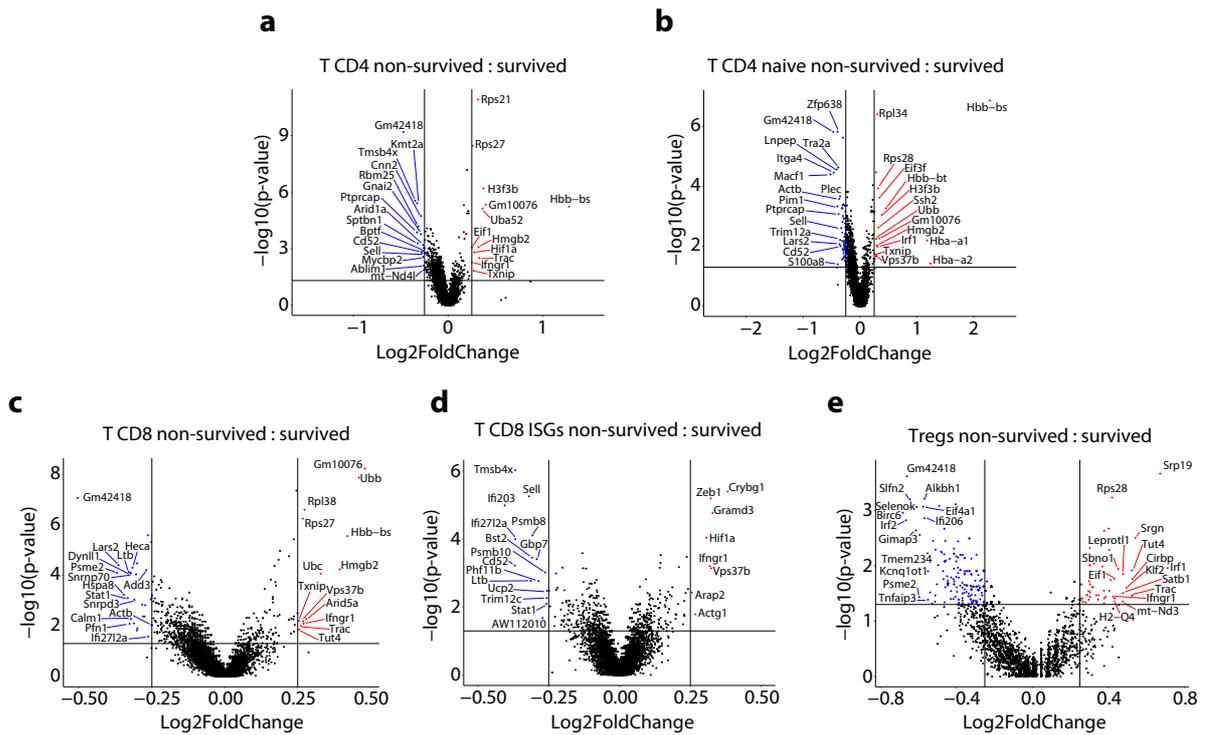
relacionados com vias de apoptose (*Txnip* e *Hmgb2*) e ativação via IFN-gama (*Txnip*, *Ifngr1* e *Hif1a*) (Figura 18a e Tabela 2, em anexos).

Em células T CD4<sup>+</sup> naive de camundongos não sobreviventes observamos aumento da expressão de genes relacionados com vias de apoptose (*Txnip*, *Irf1* e *Hmgb2*) e de resposta a interferons (*Txnip*, *Ifit3* e *Irf1*). Por outro lado, observamos a redução da expressão de genes relacionados com as vias de sinalização de IL-2 (*Pim1*, *Ltb*, *Sell* e *Plec*) e IL-6 (*Pim1*, *Ltb* e *Itga4*), além de observar menor expressão de Cd28 (Figura 18b e Tabela 3, em anexos).

Em células T CD8<sup>+</sup> de camundongos não sobreviventes observamos aumento da expressão de genes relacionados com vias de apoptose (*Ifngr1*, *Txnip* e *Hmgb2*) e sinalização via interferon (*Ifnrn1* e *Txnip*). Por outro lado, observamos a redução da expressão de genes relacionados com as vias de sinalização de IFN-gama (*Stat1*, *Psme2* e *Calm1*) (Figura 18c e Tabela 4, em anexos). Em células T CD8 ISGs de camundongos não sobreviventes observamos aumento da expressão de genes relacionados com via de sinalização de PD-L1 e IFN-gama (*Ifngr1* e *Hif1a*) (Figura 18d e Tabela 5, em anexos). Interessantemente, observamos diminuição na expressão de Cd52 em células todas as células T analisadas até agora (Figura 18 e Tabelas 2-5, em anexos).

Em células Tregs de camundongos não sobreviventes observamos aumento da expressão de genes relacionados com via de apoptose (*Stab1*, *Ifngr1*, *Irf1* e *Btg3*), TNF-alfa (*Irf1*, *Btg3*, *Klf2* e *Elf1*) e IFN-gama (*Ifngr1* e *Irf1*). Por outro lado, observamos a redução da expressão de genes relacionados com as vias de sinalização de TLRs (*Map2k2*, *Tnfaip3* e *Ikbke*), TCR (*Map2k2*, *Araf* e *Cd74*) e interleucinas (*Il2rb*, *Mknk2* e *Araf*) (Figura 18e e Tabela 6, em anexos).

Em conjunto, observamos em camundongos não sobreviventes que células T CD4<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> naive, T CD8<sup>+</sup> apresentam a expressão de genes relacionados com a via de apoptose, já as células T CD8<sup>+</sup> ISGs, observamos aumento da expressão de genes relacionado com vias de sinalização relacionadas com a expressão de PD-L1 e em células Tregs aumento da expressão de genes relacionados com a sinalização de apoptose e diminuição da ativação via TLRs e TCR.



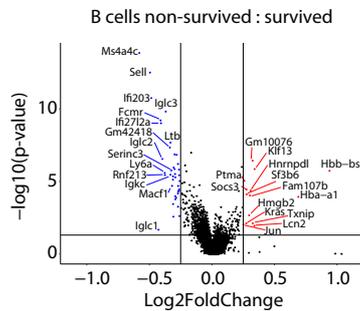
**Figura 18: Camundongos não sobreviventes apresentam aumento de vias relacionadas a apoptose em populações de linfócitos T CD4, T CD4 naive, T CD8 e Tregs, e linfócitos T CD8 ISGs apresentam aumento de vias responsáveis pela expressão de PD-L1**  
 Representação da expressão diferencial de genes por *volcano plot* da comparação entre **a**, células T CD4; **b**, T CD4 naive; **c**, T CD8; **d**, T CD8 ISGs; **e**, Tregs de camundongos não sobreviventes em relação aos sobreviventes. Identificou-se os 15 genes mais e menos expressos com valor de p maior que 0,05 e frequência de expressão maior que 10%.

#### 4.9 Células B de camundongos não sobreviventes apresentam um fenótipo de ativação via citocinas, aumento de genes relacionados com apoptose e diminuição de sinalização via BCR.

Através da análise de enriquecimento de vias de sinalização utilizando a ferramenta *Enrichr* (CHEN et al., 2013), observamos em células B de camundongos não sobreviventes o aumento de expressão de genes diferencialmente expressos envolvidos com a via de transcrição de STA3 (*Kras*, *Hmgb2*, *Socs3*, *Ptma* e *Jun*) e SMAD1 (*Txnip*, *Socs3*, *Ptma* e *Klf13*) e de sinalização de apoptose (*Jun*, *Txnip* e *Hmgb2*), via ativação de IFN-gama (*Socs3* e *Txnip*), e TNF-alfa e IL-6 (*Socs3* e *Jun*) (Figura 19 e Tabela 7). Por outro lado, observamos a redução da expressão de genes relacionados com as vias de sinalização de interferon (*Ifit2*, *Bst2*, *Isg15*, *Irf2* e *Herc6*) e via (BCR) receptor de célula B (*Ighd*, *Cd79b*, *Iglc2*, *Igkc* e *Iglc3*) (Figura 19 e Tabela 7).

Desta forma, através do enriquecimento de vias de sinalização observamos que células B de camundongos não sobreviventes apresentam o aumento da expressão de genes

relacionados com vias de ativação celular por citocinas, aumento de genes relacionados com apoptose e diminuição de sinalização via BCR.



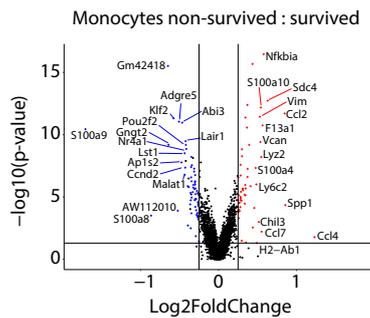
**Figura 19: Avaliação de genes diferencialmente expressos em células B entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes.**

Representação da expressão diferencial de genes por *volcano plot* da comparação entre células B de camundongos não sobreviventes em relação aos sobreviventes. Identificou-se os 15 genes mais e menos expressos com valor de p maior que 0,05 e frequência de expressão maior que 10%.

#### 4.10 Monócitos de camundongos não sobreviventes apresentam aumento da produção de mediadores inflamatórios.

Avaliando o enriquecimento de vias de sinalização relacionados com os genes diferencialmente expressos utilizando a ferramenta *Enrichr* (CHEN et al., 2013), observamos que monócitos de camundongos não sobreviventes apresentam o aumento de genes relacionados com a produção de quimiocinas pró-inflamatórias (*Ccl2*, *Ccl4*, *Ccl7* e *Cxcl10*) e alarminas (*S100a10*, *S100a11* e *S100a4*), além de vias de sinalização por TNF-alfa (*Nfkbia*, *Hif1a*, *Ccl2*, *Ccl7*, *Cxcl10* e *Sod2*) e IFN-gama (*C3ar1*, *Edn1*, *Nfkbia*, *Hif1a*, *Ccl2*, *Ccl7* e *Cxcl10*). Por outro lado, observamos a redução da expressão de genes relacionados com a produção de alarminas (*S100a8* e *S100a9*), migração celular (*Pecam1*, *Itga4* e *Itgal*), menor resposta a IFN-gama (*Ifngr1*, *Cfb* e *Samhd1*), e a TNF-alfa (*Btg2*, *Btg1*, *Nr4a1*, *Ptpr*, *Klf4*, *Klf2* e *Cebpb*) (Figura 20 e tabela 8).

De forma geral, apesar do concomitante aumento e diminuição da expressão de genes relacionados com as vias de sinalização ativadas por TNF-alfa e IFN-gama. É observado que monócitos de camundongos não sobreviventes apresentam aumento da produção de mediadores inflamatórios.



**Figura 20: Avaliação de genes diferencialmente expressos em monócitos entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes.**

Representação da expressão diferencial de genes por *volcano plot* da comparação entre monócitos de camundongos não sobreviventes em relação aos sobreviventes. Identificou-se os 15 genes mais e menos expressos com valor de p maior que 0,05 e frequência de expressão maior que 10%.

#### 4.11 Neutrófilos maduros de camundongos não sobreviventes apresentam aumento da capacidade inflamatória, sinalização via IFN-gama, expressão de Hif1a e Cd274 (PD-L1)

Por fim, avaliamos os genes diferencialmente expressos em populações de neutrófilos maduros e imaturos entre camundongos sépticos sobreviventes e não sobreviventes. Não analisamos a população de neutrófilos em transição devido a baixa quantidade de células.

Através da análise de enriquecimento de vias de sinalização realizada na ferramenta online *Enrichr* (CHEN et al., 2013), observamos em neutrófilos maduros de camundongos não sobreviventes o aumento da expressão Ccl3 e de genes relacionados com a sinalização de TNF-alfa via NFκB (*Ccl4*, *Cxcl3*, *Cxcl2*, *Jun*, *Ier3*, *Tnfaip3* e *Nfkbia*), e sinalização de IFN-gama (*Rapgef6*, *Hif1a* e *Nfkbia*). Por outro lado, observamos a redução da expressão de *Il1b* e genes relacionados com a migração celular (*Cxcr2*, *Itgal* e *Itgb2*) (Figura 21a e Tabela 9).

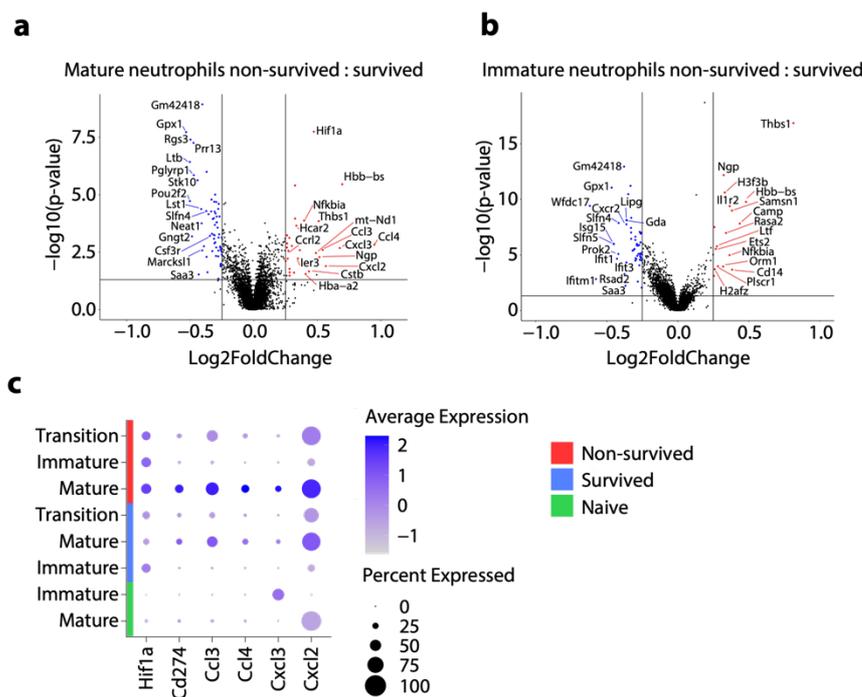
Em neutrófilos imaturos de camundongos não sobreviventes, observamos o aumento da expressão de genes relacionados com a vias de sinalização de TNF-alfa (*Nfkbia*, *Ets2* e *Map3k8*) e IL-1beta (*Il1r2*, *Map3k8* e *Nfkbia*). Observamos a redução da expressão de genes relacionados com a via de sinalização de interferons (*Ifit3*, *Ifit1*, *Ifitm1*, *Isg15*, *Isg20* e *Irf7*), migração celular (*Cxcr2* e *Cd44*), e relacionadas com a degranulação de neutrófilos e produção de metaloproteinasas (*Ctss*, *Mmp8* e *Mmp9*) (Figura 21b e Tabela 10).

De forma geral, nossos dados sugerem que neutrófilos maduros de camundongos não sobreviventes apresentaram aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios por meio da sinalização de TNF-alfa e IFN-gama, e apresentaram menor produção de moléculas relacionadas com a migração celular em relação a neutrófilos maduros de camundongos sobreviventes. Além disso, neutrófilos imaturos de camundongos não sobreviventes

apresentam aumento de sinalização via TNF-alfa e IL-1beta, contudo apresentam menor sinalização via interferons, migração celular, degranulação e produção de metaloproteinases.

Em relação as populações de neutrófilos e grupos amostrais, os neutrófilos maduros de camundongos não sobreviventes apresentam maior expressão gênica de *Ccl3*, *Ccl4*, *Cxcl3* e *Cxcl2*, sugerindo que possuem maior capacidade inflamatória (Figura 21c).

É descrito que a ativação de HIF-1alfa em neutrófilos acarreta o aumento de sua sobrevivência e produção de NETs (HANNAH et al., 1995; MCGETTRICK; O'NEILL, 2020). Além disso, a sinalização de IFN-gama pode promover a expressão de HIF-1alfa e ambos são capazes de induzir a expressão de PD-L1 (DING et al., 2021; NOMAN et al., 2014; PARRA-IZQUIERDO et al., 2019). Em neutrófilos, o aumento da expressão de PD-L1, ocasionada pela sinalização por IFN-gama, apresenta um papel deletério na sepse, promovendo lesões pulmonares (WANG et al., 2021). Neste contexto, além de observarmos aumento da sinalização de IFN-gama e expressão de *Hif1a* em neutrófilos maduros de camundongos não sobreviventes, também observamos uma maior expressão de *Cd274*, gene que codifica a proteína PD-L1 (Figura 21c). Desta forma, neutrófilos maduros de camundongos não sobreviventes apresentaram aumento da capacidade inflamatória, sinalização via IFN-gama, expressão de *Hif1a* e *Cd274* (PD-L1).



**Figura 21: Avaliação de genes diferencialmente expressos em populações de neutrófilos maduros e imaturos entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes.**

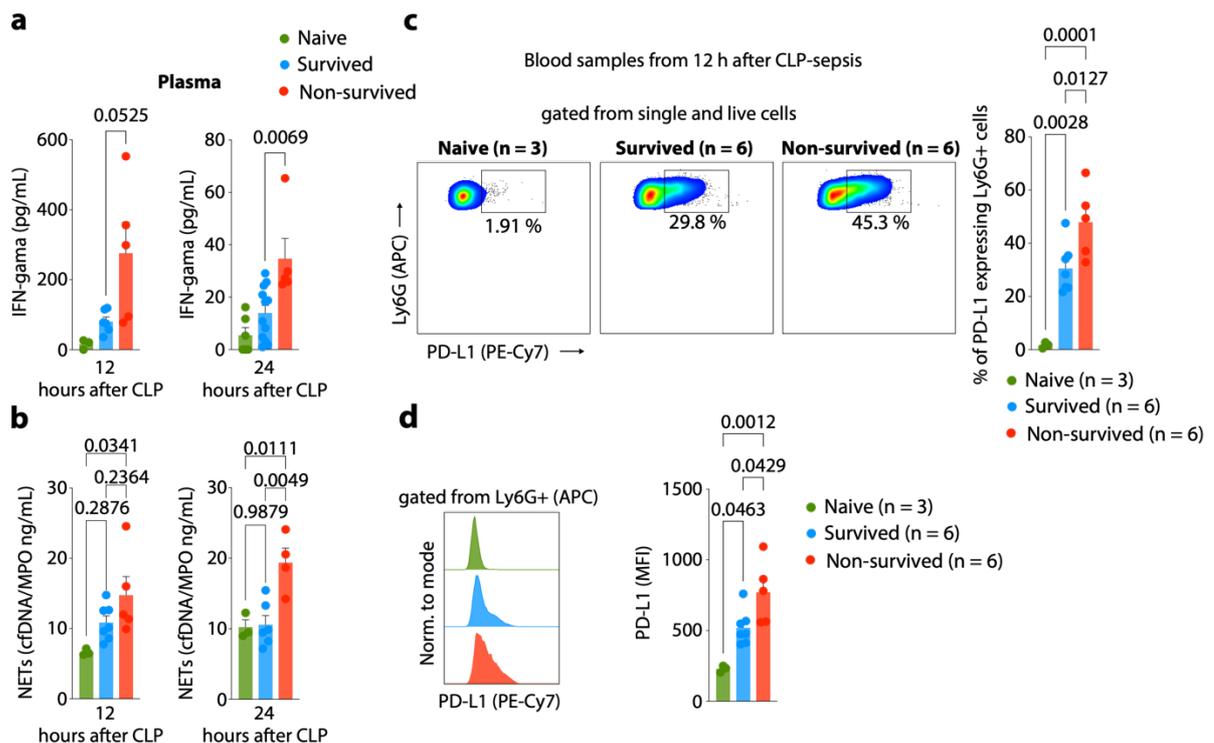
Representação da expressão diferencial de genes por *volcano plot* da comparação entre **a**, neutrófilos maduros de camundongos não sobreviventes aos sobreviventes, e **b**, neutrófilo imaturos de camundongos não sobreviventes em relação aos sobreviventes. Identificou-se os 15 genes mais e menos expressos com valor de p maior que 0,05 e frequência de expressão

maior que 10%. **c**, representação em *dotplot* avaliação da expressão de genes selecionados em populações de neutrófilos de camundongos sépticos sobreviventes e não sobreviventes.

#### 4.12 Camundongos não sobreviventes apresentam aumento de IFN-gama plasmático e aumento da expressão de PD-L1 em neutrófilos

Sabendo que a expressão de genes relacionados com a sinalização de IFN-gama, como por exemplo *Hif1a* e *Cd274*, estava aumentado em neutrófilos de camundongos não sobreviventes, e que em resposta a isso é descrito o aumento da expressão de PD-L1 nestas células e aumento da produção de NETs (HANNAH et al., 1995; MCGETTRICK; O'NEILL, 2020; WANG et al., 2021). Em seguida, avaliamos a produção e expressão destas moléculas em camundongos sépticos sobreviventes e não sobreviventes. Inicialmente, observamos que camundongos sépticos não sobreviventes apresentaram aumento da produção plasmática de IFN-gama (Figura 22a) e aumento da produção de NETs (Figura 22b) em comparação com camundongos sobreviventes. Além disso, neutrófilos de camundongos não sobreviventes apresentaram aumento da expressão de PD-L1 em relação aos sobreviventes após 12 horas da indução de sepse (Figura 22c e 22d).

Desta forma, demonstramos que camundongos não sobreviventes apresentaram aumento de IFN-gama e NETs plasmáticas, além de apresentarem aumento da expressão de PD-L1 em neutrófilos.



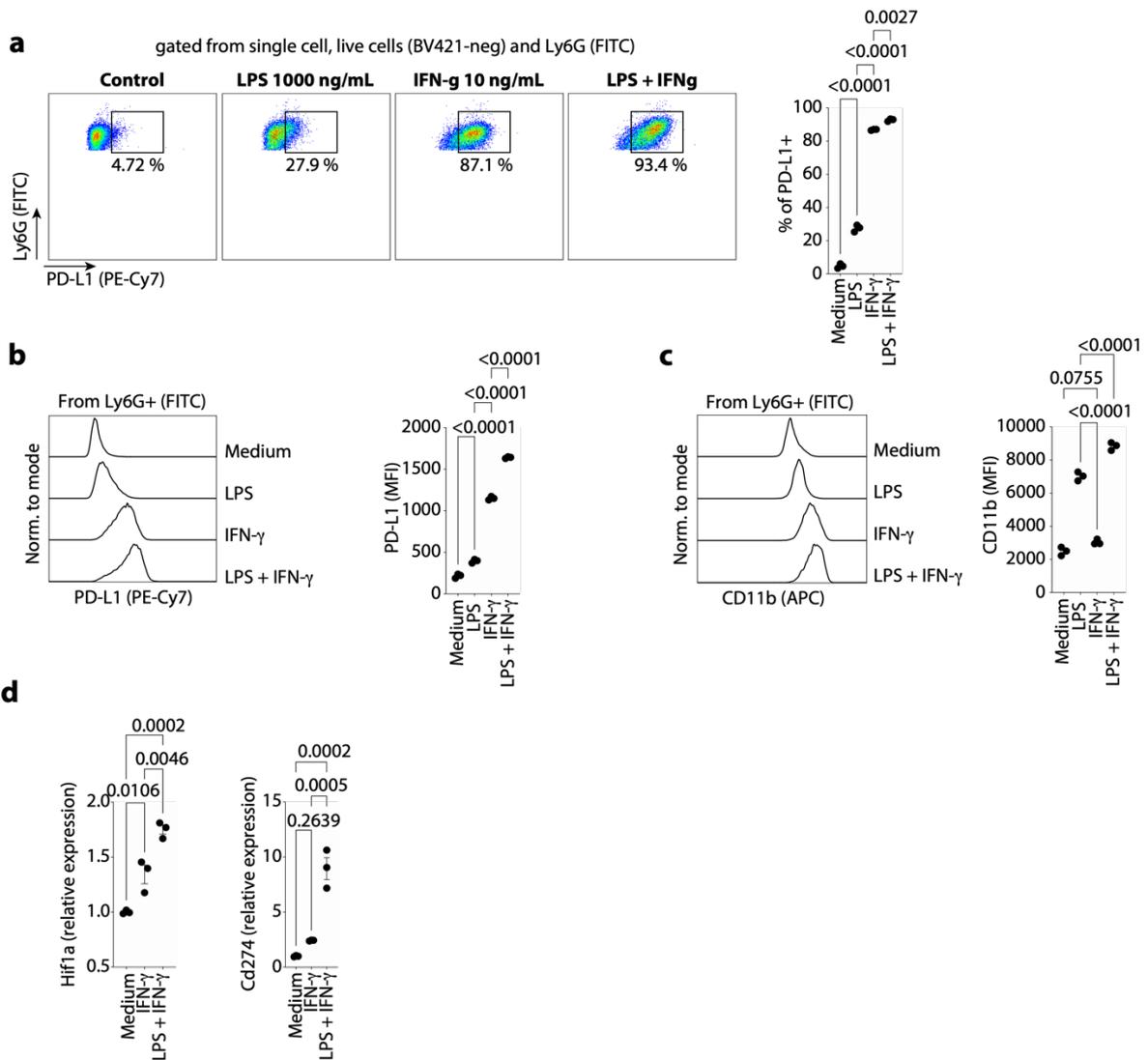
**Figura 22: Camundongos não sobreviventes apresentam aumento de IFN-gama e NETs plasmáticos e aumento da expressão de PD-L1 em neutrófilos.**

**a**, concentração plasmática de IFN-gama **b**, e NETs em camundongos sobreviventes e não sobreviventes após 12 e 24 horas da indução de sepse. **c**, frequência e **d**, MFI (*median of fluorescence intensity*) da expressão de PD-L1 em neutrófilos de camundongos sobreviventes e não sobreviventes após 12 horas da indução de sepse. O valor da diferença estatística entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes foi inserido no gráfico. Utilizou-se teste estatístico de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de correção Bonferroni. Dados representativos de 2 experimentos independentes.

**4.13 IFN-gama induz a expressão de PD-L1 e Hif1a em neutrófilos, e camundongos deficientes para IFN-gama apresentam menor indução de PD-L1 em neutrófilos e são menos suscetíveis a sepse**

Para confirmar que IFN-gama é capaz de induzir a expressão de PD-L1 em neutrófilos, realizamos isolamento destas células a partir da medula óssea, e observamos que o tratamento com LPS ou IFN-gama foram capazes de induzirem a expressão de PD-L1 após 4 horas de estímulo (Figura 23a e 23b). Além disso, observamos que o tratamento em conjunto com LPS e IFN-gama potencializou o aumento da expressão de PD-L1 (Figura 23a e 23b). Também avaliamos a expressão de CD11b, um marcador de ativação celular e observamos o seu aumento após os tratamentos com LPS e LPS em conjunto com IFN-gama (Figura 23c).

Além disso, por qPCR, observamos que os tratamentos com IFN-gama e LPS em conjunto com IFN-gama foram capazes de promoverem o aumento da expressão de *Cd274*, o gene que codifica PD-L1, e também promoverem o aumento a expressão de *Hif1a*, corroborando com nossos resultados observados na análise de scRNAseq (Figura 23d).

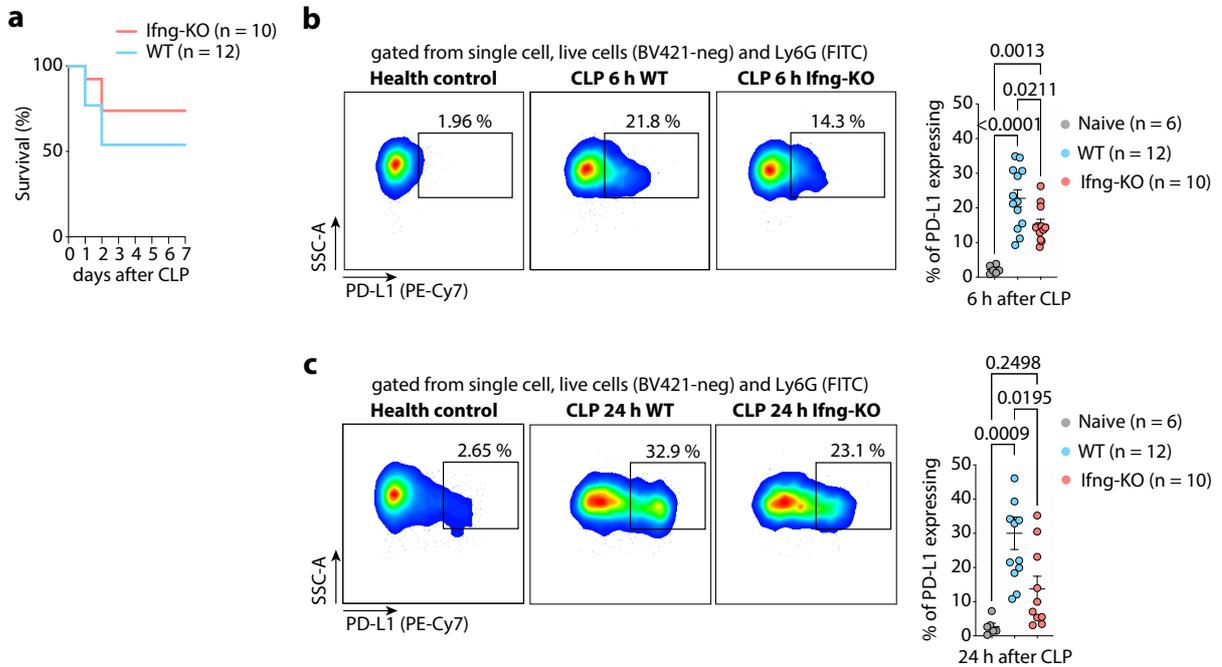


**Figura 23: IFN-gama induz a expressão de PD-L1 e *Hif1a* em neutrófilos.**

Avaliação da **a**, frequência e **b**, MFI da expressão de PD-L1 em neutrófilos tratados ou não com LPS e IFN-gama após 4 horas. **c**, MFI da expressão de CD11b em neutrófilos tratados ou não com LPS e IFN-gama por 4 horas. **d**, expressão gênica relativa de *Hif1a* e *Cd274* normalizada pela expressão de *Gapdh* em neutrófilos tratados ou não com LPS e IFN-gama por 4 horas. O valor da diferença estatística entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes foi inserido no gráfico. Utilizou-se teste estatístico de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de correção Bonferroni. Dados representativos de 2 experimentos independentes.

Para transportar esses dados para experimentos *in vivo*, utilizamos camundongos deficientes para IFN-gama e observamos que a deficiência desta citocina foi correlacionada com uma menor expressão de PD-L1 em neutrófilos em comparação com camundongos WT, após 6 e 24 horas da indução de sepse (Figura 24b e 24c). Interessantemente, a deficiência de IFN-gama resultou em uma melhora de 50 % na taxa de sobrevivência dos animais submetidos ao CLP (Figura 24a). Em conjunto, estes estudos iniciais sugerem que IFN-gama e LPS são capazes de induzirem a produção de PD-L1 e *Hif1a* em neutrófilos. Além de que

camundongos deficientes para IFN-gama foram menos suscetíveis a sepse e apresentaram uma menor indução de PD-L1 em neutrófilos.



**Figura 24: Camundongos deficientes para IFN-gama são menos suscetíveis a sepse e apresentam menor indução de PD-L1 em neutrófilos.**

**a**, avaliação da taxa de sobrevivência e camundongos WT e deficientes para IFN-gama submetidos a indução de sepse. **b-c**, avaliação da frequência de expressão de PD-L1 em neutrófilos de camundongos WT e deficientes para IFN-gama após 6 e 24 horas da indução de sepse. O valor da diferença estatística entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes foi inserido no gráfico. Utilizou-se teste estatístico de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de correção Bonferroni. Dados representativos de 2 experimentos independentes.

## 5. Discussão

Ao longo das últimas décadas, a sepse tem se caracterizado pela alta incidência e mortalidade dos pacientes acometidos. Em 2017, a Organização Mundial da Saúde incentivou o aperfeiçoamento da prevenção, diagnóstico, e a implementação de novos tratamentos para a sepse (REINHART et al., 2017). Apesar das inúmeras tentativas de intervenções imunoterapêuticas tendo como alvos moléculas chave em sua fisiopatologia, nenhuma abordagem apresentou resultados clínicos satisfatórios. (REINHART et al., 2017).

Neste estudo buscamos estratégias de aprofundar os conhecimentos dos mecanismos fisiopatológicos da sepse com o objetivo de identificar novos alvos terapêuticos. Utilizando modelos experimentais de sepse em camundongos isogênicos, com mesma idade, sexo e mantidos nas mesmas condições ambientais, exploramos as causas que promovem a diferença de resposta imune entre os camundongos sobreviventes e não sobreviventes. Nossas observações suportam dados prévios da literatura de que a dosagem de IL-6 plasmática pode ser utilizada para a predição e segregação de camundongos suscetíveis ou não durante a sepse experimental. Nos embasando nessas informações, demonstramos que os camundongos preditos a não sobreviverem apresentam sustentação da inflamação sistêmica, aumento generalizado de lesões teciduais e a falha no controle microbiano. Mecanicamente, esses eventos foram associados com a diminuição do número de neutrófilos no foco inicial de infecção e com o aumento significativo de neutrófilos nos pulmões. Através da realização de single cell RNA-Seq do sangue periférico desses camundongos, observamos um aumento de transcritos induzidos pela sinalização do IFN-gama em neutrófilos maduros, que podem estar relacionados com a alta expressão de Hif1a e Cd274 (PD-L1) e pior prognóstico em camundongos não sobreviventes.

Para estudar os mecanismos fisiopatológicos da sepse, utilizamos modelos experimentais que mimetizam as alterações clínicas tipicamente observadas em pacientes sépticos: assim trabalhamos com o modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e de endotoxemia. O modelo de CLP possibilita-se o estudo de mecanismos de resistência a infecção através da avaliação da ativação do sistema imune e quantificação de bactérias (RITTIRSCH et al., 2009; RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007). Dentre os principais achados, descrevemos similaridades entre os modelos de CLP (com ou sem a utilização de antibióticos) e endotoxemia, o que sugere também aplicação dos mecanismos de tolerância ao dano em nosso contexto experimental (REMICK et al., 2000).

Uma série de artigos publicados pelo grupo de pesquisa do professor Daniel Remick explorou as diferenças biológicas apresentadas por camundongos sobreviventes e não sobreviventes durante a sepse induzida por CLP seguida de tratamento com antibiótico. De maneira similar ao que observamos em nosso estudo, foi demonstrado que camundongos não sobreviventes apresentaram aumento das concentrações de IL-6 após 6 e 24 horas da indução de sepse em comparação com camundongos sobreviventes (CHISWICK et al., 2015; REMICK

et al., 2002). Além disso, houve aumento das concentrações de marcadores plasmáticos de lesões hepáticas e renais, que se correlacionaram com as concentrações de IL-6 (CRACIUN et al., 2014). No estudo de Chriswick et al., as concentrações de IL-6 no tempo de 24 horas foram utilizadas para predição de morte e, nesta condição, camundongos com concentrações superiores a 3130 pg/mL foram categorizados como preditos a não sobreviverem. Os autores demonstraram que camundongos preditos a sucumbirem apresentaram aumento do número de bactérias e aumento na quantidade de células na cavidade peritoneal. Avaliando as células infiltradas na cavidade peritoneal, observaram que macrófagos e células polimorfonucleares de camundongos preditos a não sobreviverem apresentaram menor capacidade de fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (CHISWICK et al., 2015). Em conjunto com nossos achados, sugere-se que a falta de eficiência em controlar a infecção é uma possível causa para a manutenção do quadro hiperinflamatório em camundongos que sucumbem a sepse.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a indução de sepse de intensidade moderada promove uma eficiente migração de neutrófilos e monócitos para o foco inflamatório e conseqüentemente controle da infecção. Entretanto, camundongos submetidos a sepse de intensidade grave, apresentaram uma menor migração de neutrófilos e monócitos para o foco da infecção, além do aumento da concentração de mediadores inflamatórios, bacteremia e lesões de órgãos. Concomitantemente, estes camundongos apresentam aumento da migração de neutrófilos e monócitos para órgãos, como os pulmões. Nestas localidades, através da produção de seus mediadores, como por exemplo a produção de NETs, neutrófilos podem contribuir com a promoção de lesões teciduais (ALVES-FILHO et al., 2010; CEBINELLI et al., 2021; CZAIKOSKI et al., 2016; RIOS-SANTOS et al., 2007; SOUTO et al., 2011). Uma explicação para essa diferença de migração é que neutrófilos de camundongos submetidos a sepse de intensidade grave apresentaram uma maior internalização de um de seus principais receptores de quimiocinas, o CXCR2, mediado pela excessiva produção de seus ligantes, sinalização via TLRs e óxido nítrico (ALVES-FILHO et al., 2010; ALVES-FILHO; SPILLER; CUNHA, 2010; RIOS-SANTOS et al., 2007). Em nossos dados, observamos que neutrófilos de camundongos não sobreviventes apresentam menor expressão de CXCR2 correlacionando-se com a produção de IL-6, ajudando a explicar a menor migração destas células para o foco infeccioso em um contexto de aumento de quimioatraentes e a ineficiência do controle da infecção. Concomitantemente a isso, o aumento da inflamação sistêmica acarretando maior ativação e disfunção endotelial, pode explicar a nossa observação de aumento da migração de neutrófilos para os pulmões de camundongos não sobreviventes, e aumento de lesões teciduais (CHELAZZI et al., 2015).

Camundongos preditos a sucumbirem apresentaram a produção exacerbada de mediadores inflamatórios, tais como a citocina IL-6. Qing e colaboradores demonstraram que a indução de estresse agudo promove a produção de IL-6 e culmina em maior mortalidade de camundongos em modelos de endotoxemia (QING et al., 2020). O mesmo resultado foi

reproduzido nos modelos de CLP em nosso laboratório (dados não mostrados). A indução de sepse em animais deficientes para IL-6 resultou em maior suscetibilidade, o que sugeriu um papel protetor e não deletério dessa citocina. Dados similares foram previamente publicados após infecção por *Escherichia coli* e Influenza (DALRYMPLE et al., 1996; DIENZ et al., 2012). Esses resultados devem ser interpretados com cautela, visto que a ausência global de IL-6 desde o nascimento interfere nos mecanismos de hematopoiese e pode acarretar modificações fisiológicas relacionadas com a quantidade e qualidade das células circulantes e residentes que irão controlar a disseminação bacteriana. Em busca de contornar esse viés e tornar nossos experimentos mais aplicáveis no contexto clínico, realizamos o bloqueio da IL-6 com anticorpos neutralizantes 6 h após a indução de sepse. Porém, não observamos diferenças significativas entre os grupos. Estes dados estão de acordo com os observados por Riedemann e colaboradores que demonstraram que o tratamento com quantidade similar de anti-IL-6 só possui efeito protetor caso administrado até, no máximo, 4 horas da exposição microbiana (RIEDEMANN et al., 2003). Em conjunto, estes resultados demonstram que embora as concentrações plasmáticas de IL-6 possam ser utilizadas como prognóstico da sepse, sua utilização terapêutica permanece bastante restrita à fase da infecção que o paciente se encontra. Com a relação a diferença de suscetibilidade dos camundongos isogênicos utilizados em nossos estudos, é possível sugerir que diferentes respostas intrínsecas relacionadas com a promoção da inflamação podem determinar o desfecho de camundongos a sepse em nosso contexto experimental.

Em busca de um melhor conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares relacionados com o desfecho de camundongos sépticos, identificamos e avaliamos a frequência de populações de leucócitos e determinamos a diferença de expressão gênica destas populações entre camundongos sépticos sobreviventes e não sobreviventes por *single cell RNA sequencing* (scRNAseq). Atualmente, esta técnica se tornou uma abordagem preferencial para estudar heterogeneidade de populações e perfis de ativação celular associados a doenças (CHEN et al., 2019). Pelo uso do scRNA-Seq, observamos que camundongos sépticos apresentam aumento da proporcionalidade de neutrófilos e monócitos e diminuição de células B, conforme descrito anteriormente (VENET et al., 2010). Não observamos diferença na frequência destas células entre camundongos sobreviventes e não sobreviventes, porém células B de camundongos não sobreviventes apresentaram um enriquecimento de vias de sinalização relacionadas com um fenótipo de ativação via citocinas, aumento de genes relacionados com apoptose e diminuição de sinalização via BCR. Em estudos anteriores, foi demonstrado que as células B de animais sépticos adquirem um fenótipo de exaustão e produção de IL-10 (SUZUKI et al., 2016; VENET; MONNERET, 2018).

Em camundongos preditos como não sobreviventes observamos uma elevada e persistente produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. De acordo com estes dados, observamos que monócitos desses animais apresentaram aumento da expressão de genes

relacionados com a sinalização promovida pela ativação via TNF-alfa e IFN-gama. Anteriormente, nosso grupo havia demonstrado que a diminuição da emigração de monócitos inflamatórios para a periferia resultou em menor inflamação sistêmica e lesões teciduais, acarretando menor suscetibilidade de morte na sepse (CEBINELLI et al., 2021). Em elegante estudo realizado em humanos demonstrou-se que monócitos produzem mediadores pró-inflamatórios contribuindo com a inflamação sistêmica exacerbada na sepse, mas também se reprogramam para um estado imunossupressor e de tolerância a endotoxinas, regulado pela expressão de HIF-1alfa (SHALOVA et al., 2015). Tendo-se em vista as observações similares em nosso *dataset*, sugerimos que a reprogramação dos monócitos inflamatórios para um estado imunossupressor está correlacionada com a maior probabilidade de morte na sepse.

A análise da frequência de distribuição de linfócitos T não revelou diferenças significativas entre os grupos, no entanto, houve enriquecimento de populações de células T CD8<sup>+</sup> ISGs em camundongos sépticos em relação aos controles. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> ISGs são subpopulações de células T que apresentam aumento da expressão de genes relacionados com a via de sinalização de Interferons do tipo 1 ou 2 (BUANG et al., 2021; CHEN et al., 2022). Em nosso contexto experimental não avaliamos a produção de Interferons do tipo 1, porém observamos aumento da concentração de IFN-gama em camundongos sépticos, o que pode explicar o aumento da frequência desta população de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Da mesma forma, genes relacionados com vias apoptóticas foram enriquecidos em populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> naive, T CD8<sup>+</sup> e Tregs. Estes resultados estão de acordo com dados previamente publicados a literatura (BOOMER et al., 2011; GUIGNANT et al., 2011; SPEC et al., 2015; VENET; MONNERET, 2018). Consistentemente, observamos diminuição da expressão de Cd52 nas populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> naive, T CD8<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> ISGs de camundongos não sobreviventes. É descrito que ativação de CD52 na membrana de linfócitos contribui com sinais coestimuladores importantes para ativação e proliferação celular. Além disso, essa molécula pode ser liberada e na sua forma solúvel interage com Siglec 10 (*sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 10*) e inibe a ativação e proliferação de linfócitos T. No contexto de tratamento, o anti-CD52, alemtuzumab, é utilizado em pacientes com leucemia linfóide aguda, doenças autoimunes e transplantados (ZHAO et al., 2017). Desta forma, o aumento da expressão de genes relacionados com a via de apoptose e diminuição da expressão de Cd52, é sugerido que camundongos não sobreviventes apresentam uma diminuição da quantidade e função de subpopulações de linfócitos T durante a sepse.

Em seguida exploramos as populações de neutrófilos em nossos grupos amostrais e observamos o aumento da frequência de neutrófilos imaturos no sangue periférico de camundongos não sobreviventes em relação aos sobreviventes, o que pode retratar o aumento da hematopoiese de emergência, como já é descrito anteriormente em outros estudos (BOETTCHE et al., 2012; PERIASAMY et al., 2016). Neutrófilos imaturos apresentam menor capacidade fagocítica e de eliminação de patógenos, em relação a neutrófilos maduros. Além

disso, apresentam aumento da meia vida por conta de menor suscetibilidade a apoptose, sua migração é menos eficiente em comparação com neutrófilos maduros que possuem maior capacidade de produzirem IL-10 (DRIFTE et al., 2013). Em nossos estudos, observamos que os neutrófilos imaturos de camundongos preditos como não sobreviventes apresentaram aumento de sinalização das vias de TNF-alfa e IL-1b e menor enriquecimento das vias de interferons, migração celular, degranulação e produção de metaloproteinases. Desta forma, nossos resultados suportam dados anteriores de que o aumento de neutrófilos imaturos está associado com um pior prognóstico de sepse (DAIX et al., 2018; GUÉRIN et al., 2014).

Quando analisamos as diferenças transcricionais entre os neutrófilos maduros, demonstramos aumento de genes responsáveis pela via de sinalização de IFN-gama, aumento de expressão de *Hif1a* e *Cd274*, gene de PD-L1 em camundongos não sobreviventes. Confirmamos por citometria que camundongos não sobreviventes apresentaram aumento de PD-L1 em neutrófilos, e estes camundongos também apresentaram aumento das concentrações plasmáticas de IFN-gama e NETs. É descrito na literatura que LPS e IFN-gama são capazes de induzirem a expressão HIF1-alfa em macrófagos. Além de também estimularem a expressão de PD-L1 em macrófagos e neutrófilos (NOMAN et al., 2014; PARRA-IZQUIERDO et al., 2019; WANG et al., 2021). No entanto, não foi determinado se a indução da expressão de PD-L1 por IFN-gama é dependente de HIF-1alfa em neutrófilos ou em outras populações celulares. Em nossos dados observamos que a ativação de neutrófilos isolados da medula óssea com IFN-gama foi capaz de induz a expressão de *Hif1a* e *Cd274* (PD-L1), sugerindo estes dois eventos acontecem concomitantemente e que a indução de PD-L1 pode ser dependente de HIF-1alfa.

O aumento da expressão ou estabilização de HIF-alfa em neutrófilos é capaz de aumentar a liberação de NETs e também promover inibição de apoptose (HANNAH et al., 1995; MCGETTRICK; O'NEILL, 2020). Em modelo de endotoxemia com LPS, foi demonstrado que a deleção de *Hif1a* em células mieloides (*Hif1a*-flox *Lysm*-Cre) aumentou a sobrevivência de camundongos (PEYSSONNAUX et al., 2007). Contudo, a expressão de enzima CRE *recombinase* dependente da região promotora de *Lysm* acarreta a recombinação de genes em neutrófilos e também em monócitos e macrófagos. Desta forma, não é possível saber se resultado observado no estudo de Peyssonnaux et al, 2007 é dependente da ausência de *Hif1a* em neutrófilos ou macrófagos, ou se seria dependente de ambas as células. Além disso, utilizando modelo de sepse induzida por CLP, foi demonstrado que camundongos deficientes para PD-L1 especificamente em neutrófilos (*Cd274*-flox *S100a8*-Cre) são menos suscetíveis a sepse. Neste mesmo estudo, foi observado que a expressão de PD-L1 em neutrófilos acarretou redução de apoptose desse tipo celular e por conseguinte, favoreceu as lesões pulmonares (WANG et al., 2021). Avaliando as consequências da ausência de IFN-gama em nosso contexto experimental, observamos que camundongos deficientes para esta citocina foram menos suscetíveis a sepse. Na literatura, demonstra-se que a ausência de IFN-gama promove menor

suscetibilidade a sepse por diminuir a resposta pró-inflamatória (ROMERO et al., 2010). Além disso, também observamos que camundongos deficientes para IFN-gama apresentaram menor indução de PD-L1 em neutrófilos. Desta forma, nossos dados sugerem que a sinalização via IFN-gama induz a expressão de Hif1a e PD-L1 em neutrófilos que podem acarretar a diminuição de apoptose e aumento da produção de NETs.

Dentre as limitações do presente trabalho, destaca-se a ausência de avaliação da resposta de camundongos condicionalmente deficientes para *Hif1a* em neutrófilos (Ly6G-CRE), assim como a investigação do papel de Hif-1alfa na função de neutrófilos em nossas condições experimentais. A investigação da fonte inicial de IFN-gama, além da validação do efeito causal entre a sinalização de IFN-gamma, e indução de PD-L1 e Hif-1alfa seria fundamental para reforçar as nossas conclusões e a aplicação de nossos resultados na clínica.

Em conjunto, nossos resultados contribuíram para uma melhor compreensão da fisiopatologia da sepse e sugerem a modulação negativa de IFN-gama, PD-L1 e HIF-1alfa como potenciais novos alvos terapêuticos para a sepse.

## 6. Sumário

- Camundongos isogênicos criados nas mesmas condições experimentais apresentam diferentes desfechos a sepse de mesma intensidade.
- Camundongos não sobreviventes apresentam inflamação sistêmica persistente, aumento de marcadores de lesões de órgãos e bacteremia.
- Concentração plasmática de IL-6 é um preditor de sobrevivência e correlaciona-se com a concentração de marcadores de lesões de órgãos.
- A deficiência ou neutralização de IL-6 não acarreta melhora na suscetibilidade de camundongos a sepse.
- Camundongos preditos a não sobreviverem apresentam aumento da concentração de citocinas no foco infeccioso e em órgãos.
- Camundongos preditos a não sobreviverem apresentam diminuição do número de neutrófilos e aumento do número de bactérias no foco inicial de infecção, além de aumento do número de neutrófilos nos pulmões.
- Neutrófilos de camundongos não sobreviventes apresentam menor expressão de CXCR2.
- Camundongos sépticos apresentam aumento da frequência de neutrófilos e monócitos, e diminuição nas frequências de células B.
- Camundongos não sobreviventes apresentam aumento da frequência de neutrófilos imaturos.
- Camundongos sépticos apresentam aumento da frequência da população de células T CD8 ISGs e uma redução das outras populações de linfócitos.
- Camundongos não sobreviventes apresentam aumento de vias relacionadas a apoptose em populações de linfócitos T CD4, T CD4 naive, T CD8 e Tregs, e linfócitos T CD8 ISGs apresentam aumento de vias responsáveis pela expressão de PD-L1.
- Células B de camundongos não sobreviventes apresentam um fenótipo de ativação via citocinas, aumento de genes relacionados com apoptose e diminuição de sinalização via BCR.
- Monócitos de camundongos não sobreviventes apresentam aumento da produção de mediadores inflamatórios.
- Neutrófilos maduros de camundongos não sobreviventes apresentam aumento da capacidade inflamatória, sinalização via IFN-gama, expressão de Hif1a e Cd274 (PD-L1).
- Camundongos não sobreviventes apresentam aumento de IFN-gama plasmático e aumento da expressão de PD-L1 em neutrófilos.

- IFN-gama induz a expressão de PD-L1 e Hif1a em neutrófilos, e camundongos deficientes para IFN-gama apresentam menor indução de PD-L1 em neutrófilos e são menos suscetíveis a sepse.

## 7. Conclusões

Nossos resultados demonstraram que camundongos isogênicos, com a mesma idade, sexo e mantidos nas mesmas condições ambientais, apresentam diferentes desfechos a sepse de mesma intensidade. Inicialmente, camundongos apresentam os mesmos parâmetros inflamatórios e de lesões de órgãos na fase inicial da sepse. Porém, posteriormente a este tempo, o grupo de camundongos sobreviventes e não sobreviventes passam a apresentar diferenças nestes parâmetros analisados. Sendo que camundongos não sobreviventes apresentam manutenção da elevada inflamação sistêmica, aumento de lesões de tecidos e descontrole da infecção, associado com a diminuição do número de neutrófilos no foco inicial de infecção, e aumento do número de neutrófilos em pulmões. Além disso, camundongos não sobreviventes apresentam alteração na ativação de várias populações de leucócitos, contribuindo para o estado pró-inflamatório e em algumas células, contribuindo para diminuição de suas funções efetoras e aumento de apoptose. Entre os leucócitos analisados, observamos que a população de neutrófilos maduros apresenta aumento da sinalização induzida por IFN-gama promovendo o aumento da expressão de Hif1a e Cd274 (PD-L1) em camundongos não sobreviventes. Estas moléculas podem promover a alteração da atividade de neutrófilos contribuindo com o pior prognóstico da sepse. Nesse sentido, estes dados sugerem que a modulação negativa de IFN-gama, PD-L1 e HIF-1alfa podem ser potenciais novos alvos terapêuticos para a sepse.

## 8. Referências

1. ADIB-CONQUY, M.; CAVAILLON, J.-M. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. **Thrombosis and haemostasis**, v. 101, n. 1, p. 36–47, jan. 2009.
2. ALMEIDA, N. R. C. DE et al. Análise de tendência de mortalidade por sepse no Brasil e por regiões de 2010 a 2019. **Revista de Saúde Pública**, v. 56, p. 25, 22 abr. 2022.
3. ALVES DE LIMA, K. et al. Meningeal  $\gamma\delta$  T cells regulate anxiety-like behavior via IL-17a signaling in neurons. **Nature Immunology**, v. 21, n. 11, p. 1421–1429, 14 nov. 2020.
4. ALVES-FILHO, J. C. et al. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 30 Suppl 1, p. 3–9, out. 2008a.
5. ALVES-FILHO, J. C. et al. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 30 Suppl 1, p. 3–9, out. 2008b.
6. ALVES-FILHO, J. C. et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature Medicine**, v. 16, n. 6, p. 708–712, 16 jun. 2010.
7. ALVES-FILHO, J. C.; SPILLER, F.; CUNHA, F. Q. Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 34 Suppl 1, p. 15–21, set. 2010.
8. ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical care medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303–10, jul. 2001.
9. ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe Sepsis and Septic Shock. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 840–851, 29 ago. 2013.
10. BAKER, C. C. et al. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery**, v. 94, n. 2, p. 331–5, ago. 1983.
11. BISWAS, S. K.; LOPEZ-COLLAZO, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 10, p. 475–487, out. 2009.
12. BOETTCHER, S. et al. Cutting Edge: LPS-Induced Emergency Myelopoiesis Depends on TLR4-Expressing Nonhematopoietic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 12, p. 5824–5828, 15 jun. 2012.
13. BONE, R. C.; SIBBALD, W. J.; SPRUNG, C. L. The ACCP-SCCM Consensus Conference on Sepsis and Organ Failure. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1481–1483, jun. 1992.
14. BOOMER, J. S. et al. Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. **JAMA**, v. 306, n. 23, p. 2594, 21 dez. 2011.
15. BUANG, N. et al. Type I interferons affect the metabolic fitness of CD8<sup>+</sup> T cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1980, 31 mar. 2021.
16. CEBINELLI, G. C. M. et al. CCR2-deficient mice are protected to sepsis by the disruption of the inflammatory monocytes emigration from the bone marrow. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 109, n. 6, p. 1063–1070, 5 jun. 2021.

17. CERRA, F. B. The systemic septic response: multiple systems organ failure. **Critical care clinics**, v. 1, n. 3, p. 591–607, nov. 1985.
18. CHELAZZI, C. et al. Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. **Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 26, 1 dez. 2015.
19. CHEN, E. Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 128, 15 dez. 2013.
20. CHEN, W. et al. Chronic type I interferon signaling promotes lipid-peroxidation-driven terminal CD8+ T cell exhaustion and curtails anti-PD-1 efficacy. **Cell Reports**, v. 41, n. 7, p. 111647, nov. 2022.
21. CHISWICK, E. L. et al. Acute-Phase Deaths from Murine Polymicrobial Sepsis Are Characterized by Innate Immune Suppression Rather Than Exhaustion. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 8, p. 3793–3802, 15 out. 2015.
22. COSTANTINI, C. et al. Neutrophil activation and survival are modulated by interaction with NK cells. **International Immunology**, v. 22, n. 10, p. 827–838, 1 out. 2010.
23. CRACIUN, F. L. et al. Early Murine Polymicrobial Sepsis Predominantly Causes Renal Injury. **Shock**, v. 41, n. 2, p. 97–103, fev. 2014.
24. CZAİKOSKI, P. G. et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. **PLoS one**, v. 11, n. 2, p. e0148142, 2016.
25. DAIX, T. et al. Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. **Chest**, v. 154, n. 3, p. 617–627, set. 2018.
26. DALRYMPLE, S. A. et al. Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic Escherichia coli infection. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 8, p. 3231–3235, ago. 1996.
27. DIENZ, O. et al. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. **Mucosal Immunology**, v. 5, n. 3, p. 258–266, 1 maio 2012.
28. DING, X. et al. The relationship between expression of PD-L1 and HIF-1 $\alpha$  in glioma cells under hypoxia. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 14, n. 1, p. 92, 12 dez. 2021.
29. DRIFTE, G. et al. Innate Immune Functions of Immature Neutrophils in Patients With Sepsis and Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome\*. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 3, p. 820–832, mar. 2013.
30. FRANZÉN, O.; GAN, L.-M.; BJÖRKEGREN, J. L. M. PanglaoDB: a web server for exploration of mouse and human single-cell RNA sequencing data. **Database**, v. 2019, 1 jan. 2019.
31. FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 2, p. 231–241, 15 jan. 2007.
32. FUNK, D. J.; PARRILLO, J. E.; KUMAR, A. Sepsis and Septic Shock: A History. **Critical Care Clinics**, v. 25, n. 1, p. 83–101, jan. 2009.

33. GLEADLE, J. M.; RATCLIFFE, P. J. Induction of Hypoxia-Inducible Factor-1, Erythropoietin, Vascular Endothelial Growth Factor, and Glucose Transporter-1 by Hypoxia: Evidence Against a Regulatory Role for Src Kinase. **Blood**, v. 89, n. 2, p. 503–509, 15 jan. 1997.
34. GRIESHABER-BOUYER, R. et al. The neutrotime transcriptional signature defines a single continuum of neutrophils across biological compartments. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 2856, 17 maio 2021.
35. GUÉRIN, E. et al. Circulating Immature Granulocytes With T-Cell Killing Functions Predict Sepsis Deterioration\*. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 9, p. 2007–2018, set. 2014.
36. GUIGNANT, C. et al. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. **Critical Care**, v. 15, n. 2, p. R99, 2011.
37. HAFEMEISTER, C.; SATIJA, R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, p. 296, 23 dez. 2019.
38. HANNAH, S. et al. Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. **FEBS Letters**, v. 372, n. 2–3, p. 233–237, 25 set. 1995.
39. HAO, Y. et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. **Cell**, v. 184, n. 13, p. 3573–3587.e29, jun. 2021.
40. HOTCHKISS, R. S. et al. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. **Nature medicine**, v. 15, n. 5, p. 496–7, maio 2009.
41. HOTCHKISS, R. S. et al. Sepsis and septic shock. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. June, p. 16045, 2016.
42. IANEVSKI, A.; GIRI, A. K.; AITTOKALLIO, T. Fully-automated and ultra-fast cell-type identification using specific marker combinations from single-cell transcriptomic data. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1246, 10 mar. 2022.
43. JIANG, L. et al. Prompt Antiviral Action of Pulmonary CD8+ TRM Cells Is Mediated by Rapid IFN- $\gamma$  Induction and Its Downstream ISGs in the Lung. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 22 fev. 2022.
44. KELLY-SCUMPIA, K. M. et al. B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 8, p. 1673–1682, 1 ago. 2011.
45. KORSUNSKY, I. et al. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. **Nature Methods**, v. 16, n. 12, p. 1289–1296, 18 dez. 2019.
46. KUBES, P. Introduction: The complexities of leukocyte recruitment. **Seminars in Immunology**, v. 14, n. 2, p. 65–72, abr. 2002.
47. KUMAR, A. et al. Early combination antibiotic therapy yields improved survival compared with monotherapy in septic shock: a propensity-matched analysis. **Critical care medicine**, v. 38, n. 9, p. 1773–85, set. 2010.

48. LE TULZO, Y. et al. Early Circulating Lymphocyte Apoptosis in Human Septic Shock Is Associated with Poor Outcome. **Shock**, v. 18, n. 6, p. 487–494, dez. 2002.
49. LEENTJENS, J. et al. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 186, n. 9, p. 838–45, 1 nov. 2012.
50. LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 4, p. 1250–1256, abr. 2003.
51. LI, H. et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. **The Lancet**, v. 395, n. 10235, p. 1517–1520, maio 2020a.
52. LI, J. et al. scMRMA: single cell multiresolution marker-based annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 2, p. e7–e7, 25 jan. 2022.
53. LI, S.-Y. et al. Transcriptional insights into the CD8<sup>+</sup> T cell response in mono-HIV and HCV infection. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 96, 24 dez. 2020b.
54. LIU, S.-Y. et al. Systematic identification of type I and type II interferon-induced antiviral factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 11, p. 4239–4244, 13 mar. 2012.
55. MAXWELL, P. H. et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. **Nature**, v. 399, n. 6733, p. 271–275, maio 1999.
56. MCGETTRICK, A. F.; O'NEILL, L. A. J. The Role of HIF in Immunity and Inflammation. **Cell Metabolism**, v. 32, n. 4, p. 524–536, out. 2020.
57. MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate Immunity. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338–344, 3 ago. 2000.
58. MOK, D. Z. L. et al. The effects of aging on host resistance and disease tolerance to SARS-CoV-2 infection. **The FEBS Journal**, v. 288, n. 17, p. 5055–5070, 17 set. 2021.
59. MONNERET, G. et al. Marked elevation of human circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 7, p. 2068–2071, jul. 2003.
60. NASCIMENTO, D. C. et al. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. **Critical care medicine**, v. 38, n. 8, p. 1718–25, ago. 2010.
61. NASCIMENTO, D. C. et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14919, 4 abr. 2017.
62. NOMAN, M. Z. et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 5, p. 781–790, 5 maio 2014.
63. OHH, M. et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the  $\beta$ -domain of the von Hippel–Lindau protein. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 7, p. 423–427, 9 jul. 2000.

64. OPAL, S. M. et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. **Critical care medicine**, v. 25, n. 7, p. 1115–24, jul. 1997.
65. OPAL, S. M. et al. Systemic Host Responses in Severe Sepsis Analyzed by Causative Microorganism and Treatment Effects of Drotrecogin Alfa (Activated). **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 1, p. 50–58, 1 jul. 2003.
66. OPAL, S. M. et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. **JAMA**, v. 309, n. 11, p. 1154–62, 20 mar. 2013.
67. PARIKH, S. M. Dysregulation of the angiopoietin–Tie-2 axis in sepsis and ARDS. **Virulence**, v. 4, n. 6, p. 517–524, 15 ago. 2013.
68. PARRA-IZQUIERDO, I. et al. Lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  team up to activate HIF-1 $\alpha$  via STAT1 in normoxia and exhibit sex differences in human aortic valve interstitial cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 9, p. 2168–2179, set. 2019.
69. PERIASAMY, S. et al. An Immature Myeloid/Myeloid-Suppressor Cell Response Associated with Necrotizing Inflammation Mediates Lethal Pulmonary Tularemia. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 3, p. e1005517, 25 mar. 2016.
70. PEYSSONNAUX, C. et al. Cutting Edge: Essential Role of Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  in Development of Lipopolysaccharide-Induced Sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 12, p. 7516–7519, 15 jun. 2007.
71. QING, H. et al. Origin and Function of Stress-Induced IL-6 in Murine Models. **Cell**, v. 182, n. 2, p. 372–387.e14, jul. 2020.
72. RANIERI, V. M. et al. Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 22, p. 2055–2064, 31 maio 2012.
73. RAUCH, P. J. et al. Innate Response Activator B Cells Protect Against Microbial Sepsis. **Science**, v. 335, n. 6068, p. 597–601, 3 fev. 2012.
74. REINHART, K. et al. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 5, p. 414–417, 3 ago. 2017.
75. REMICK, D. G. et al. COMPARISON OF THE MORTALITY AND INFLAMMATORY RESPONSE OF TWO MODELS OF SEPSIS: LIPOPOLYSACCHARIDE VS. CECAL LIGATION AND PUNCTURE. **Shock**, v. 13, n. 2, p. 110–116, fev. 2000.
76. REMICK, D. G. et al. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 17, n. 6, p. 463–7, jun. 2002.
77. RIEDEMANN, N. C. et al. Protective Effects of IL-6 Blockade in Sepsis Are Linked to Reduced C5a Receptor Expression. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 503–507, 1 jan. 2003.

78. RIOS-SANTOS, F. et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 175, n. 5, p. 490–7, 1 mar. 2007.
79. RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 31–36, 1 jan. 2009.
80. RITTIRSCH, D.; HOESEL, L. M.; WARD, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 137–143, 1 jan. 2007.
81. ROMERO, C. R. et al. The role of interferon- $\gamma$  in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 4, p. 725–735, out. 2010.
82. RUDD, K. E. et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200–211, jan. 2020.
83. RUSTENHOVEN, J. et al. Functional characterization of the dural sinuses as a neuroimmune interface. **Cell**, v. 184, n. 4, p. 1000–1016.e27, fev. 2021.
84. SCHNEIDER, D. S.; AYRES, J. S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 11, p. 889–95, 2008.
85. SEMENZA, G. L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. **Cell**, v. 148, n. 3, p. 399–408, fev. 2012.
86. SHALOVA, I. N. et al. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 484–498, 2015.
87. SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801, 23 fev. 2016.
88. SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, out. 1985.
89. SÔNEGO, F. et al. Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 26 abr. 2016.
90. SOUTO, F. O. et al. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 183, n. 2, p. 234–42, 15 jan. 2011.
91. SPEC, A. et al. T cells from patients with Candida sepsis display a suppressive immunophenotype. **Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 15, 20 dez. 2015.
92. STEARNS-KUROSAWA, D. J. et al. The pathogenesis of sepsis. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 19–48, 2011.
93. SUZUKI, K. et al. Reduced Immunocompetent B Cells and Increased Secondary Infection in Elderly Patients With Severe Sepsis. **Shock**, v. 46, n. 3, p. 270–278, set. 2016.
94. TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, mar. 2010.

95. TAMAYO, E. et al. Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. **Journal of Critical Care**, v. 27, n. 4, p. 415.e1-415.e11, ago. 2012.
96. TANG, D. et al. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 158–175, set. 2012.
97. VENET, F. et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)/CD25 (+)/CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. **Intensive care medicine**, v. 35, n. 4, p. 678–86, abr. 2009.
98. VENET, F. et al. EARLY ASSESSMENT OF LEUKOCYTE ALTERATIONS AT DIAGNOSIS OF SEPTIC SHOCK. **Shock**, v. 34, n. 4, p. 358–363, out. 2010.
99. VENET, F.; MONNERET, G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 2, p. 121–137, 11 fev. 2018.
100. VINCENT, J.-L.; DE BACKER, D. Circulatory Shock. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 18, p. 1726–1734, 31 out. 2013.
101. WANG, G. L. et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 12, p. 5510–5514, 6 jun. 1995.
102. WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 3, p. 1230–1237, jan. 1995.
103. WANG, J. et al. Upregulated PD-L1 delays human neutrophil apoptosis and promotes lung injury in an experimental mouse model of sepsis. **Blood**, v. 138, n. 9, p. 806–810, 2 set. 2021.
104. WEBER, G. F. et al. Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. **Science**, v. 347, n. 6227, p. 1260–1265, 13 mar. 2015.
105. WILLEMEN, Y. et al. Engineering monocyte-derived dendritic cells to secrete interferon- $\alpha$  enhances their ability to promote adaptive and innate anti-tumor immune effector functions. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, 2015.
106. XIAO, W. et al. A genomic storm in critically injured humans. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 13, p. 2581–2590, 19 dez. 2011.
107. XIE, X. et al. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection. **Nature Immunology**, v. 21, n. 9, p. 1119–1133, 27 set. 2020.
108. YIPP, B. G.; KUBES, P. NETosis: how vital is it? **Blood**, v. 122, n. 16, p. 2784–2794, 17 out. 2013.
109. ZHANG, X. et al. CellMarker: a manually curated resource of cell markers in human and mouse. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D721–D728, 8 jan. 2019.
110. ZHAO, Y. et al. The immunological function of CD52 and its targeting in organ transplantation. **Inflammation Research**, v. 66, n. 7, p. 571–578, 10 jul. 2017.

111. ZHENG, Y. et al. PD-L1+CD8+ T cells enrichment in lung cancer exerted regulatory function and tumor-promoting tolerance. **iScience**, v. 25, n. 2, p. 103785, fev. 2022.
112. ZOU, K. H.; O'MALLEY, A. J.; MAURI, L. Receiver-Operating Characteristic Analysis for Evaluating Diagnostic Tests and Predictive Models. **Circulation**, v. 115, n. 5, p. 654–657, 6 fev. 2007.

## 9. Anexos

### 9.1 Lista de tabelas

**Tabela 2: Expressão diferencial de genes da comparação entre células T CD4 de camundongos não sobreviventes e sobreviventes**

Genes	p_val	avg_log2FC
9930111J21Rik2	0.000945496509802149	-0.250637629212175
Ighm	0.000922862188473967	-0.257295247446919
mt-Nd4l	0.014013180734052	-0.257470632236534
Ablim1	0.00806478179536673	-0.258169497719382
Mycbp2	0.0027633926041946	-0.264042226371382
Arid1a	0.000642482189918748	-0.264949867194581
Bptf	0.00132120937315147	-0.265706184171216
Sell	0.00182367227376631	-0.275728610175005
Cd52	0.00146148950033568	-0.283752405174952
Cnn2	1.87281842472677e-05	-0.285729683319843
Gnai2	0.000174525185278095	-0.287444795518143
Rbm25	6.74237802970108e-05	-0.314806482003679
Sptbn1	0.000531112069151478	-0.322671661364154
Kmt2a	3.898211402442e-06	-0.327450853036552
Ptprcap	0.000139636945871573	-0.330038198398542
Tmsb4x	2.89059098570972e-06	-0.349045811575205
Gm42418	6.53557434898962e-10	-0.472316184864743
Eif1	0.000878029532215974	0.250526019633466
Ifngr1	0.00549662741355127	0.251932173295378
Rps27	3.52460698492444e-09	0.260166279074381
Txnip	0.0150836606380587	0.272198390353497
Hif1a	0.00158107310760671	0.276233430014991
Rps21	1.21716040384219e-11	0.31615961442775
Hmgb2	0.00083907479784916	0.321341392166609
Trac	0.00318390318621345	0.328579761493878
Uba52	7.52891906224414e-06	0.363931333594305
H3f3b	6.46544430591028e-07	0.372843178275608
Gm10076	4.66421825709873e-06	0.398150470917448
Hbb-bs	5.94246526265638e-06	1.27826294372709

**Tabela 3: Expressão diferencial de genes da comparação entre células T CD4 naive de camundongos não sobreviventes e sobreviventes**

Genes	p_val	avg_log2FC
Hbb-bs	1.31643711173169e-07	2.28699293240425
Rpl34	3.89585145685464e-07	0.306206093574826
Zfp638	1.4841962086408e-06	-0.393821013369148
Gm42418	1.50231354597898e-06	-0.471155488954055
Rnf111	2.33622612950828e-06	-0.298720311158575
Tra2a	2.31656592585521e-05	-0.38455809204018
Lnpep	2.70900882818447e-05	-0.411379384753453
Rpl39	3.35086334634355e-05	0.281930154309125
Itga4	3.47816665414308e-05	-0.462945374023968
Macf1	3.92936671851716e-05	-0.518527262654969
Rps28	0.000115476824794213	0.319484077149396
Plec	0.00021178250673825	-0.350965534407351
Eif3f	0.000236867759240217	0.343144580797058
Actb	0.000258582519530898	-0.365053709190348
Cpsf6	0.000393321682348125	-0.290727520405045
Kif21b	0.000425048847461391	-0.306912948145983
Setd5	0.000438243321683705	-0.266065466170775
Pim1	0.000462018514071335	-0.395657671848765
Nsd1	0.000526363701613409	-0.318203966724453
Hbb-bt	0.000535311102919768	0.45517119853117
Sugt1	0.000543760929497944	-0.308932115782635
Rpl36a	0.000692967464995628	0.25645484660176
Srsf1	0.000696392330580942	-0.258028147105357
Ptprcap	0.000825506854733165	-0.377077749534572
H3f3b	0.000888338470002065	0.385744732204082
Pak2	0.00096507479366765	-0.302958214738002
Atf7ip	0.00116544643910521	-0.290222551887152
Dnaja1	0.00118351177040938	-0.278343795949212
Dgka	0.0015289558369956	-0.305690103090483
Tmsb4x	0.00171385155055994	-0.260571879989461
Ep400	0.00227327337400376	-0.257247960493704
Ssh2	0.00232864224390236	0.324648237179669
Sell	0.00244271823301649	-0.33071096951451
S100a10	0.00348863976525488	-0.311865417452355
Csde1	0.003671752302098	-0.254255023162321
Btla	0.00398973395027744	-0.258771053205295
Hnrnpul2	0.00400558464015115	-0.256102145930346
Ankrd44	0.0046947150248218	-0.25530114928772

<b>Herc1</b>	0.00473585210737158	-0.252465164123606
<b>Rasa3</b>	0.00486746634735733	-0.275501046180386
<b>Gm10076</b>	0.00543136480833372	0.343144580797058
<b>Ubb</b>	0.00564788316814887	0.287291346063541
<b>Trim12a</b>	0.00607838377040905	-0.350752291477263
<b>Hba-a1</b>	0.00636280120858775	1.17993292344118
<b>Ltb</b>	0.00638514608260625	-0.265025311085423
<b>Atp1a1</b>	0.00656001423909166	-0.31677997760532
<b>Arhgap45</b>	0.00687765021371231	-0.293745711967959
<b>Chd4</b>	0.00774149699823031	-0.277921893609346
<b>Lars2</b>	0.00855153097274814	-0.359033533795953
<b>Nufip2</b>	0.00883438495401031	-0.281895359299433
<b>Hmgb2</b>	0.00939853967213188	0.298232158921484
<b>Laptm5</b>	0.00949570106209959	-0.27869392215913
<b>St8sia4</b>	0.00950634638135785	-0.253890752224673
<b>Cd52</b>	0.00984032338992383	-0.343769201067386
<b>Irf1</b>	0.0102038880173523	0.308711083733184
<b>Fam169b</b>	0.010685502442648	-0.252958477529298
<b>Nipbl</b>	0.0108175330394519	-0.274607855041767
<b>Pdia3</b>	0.0113529530892588	-0.252159864145557
<b>Smc4</b>	0.011895858275682	-0.250329419779615
<b>Kdm5a</b>	0.0120368412126392	-0.304339004482157
<b>Ripor2</b>	0.0127223173149066	-0.278343795949212
<b>Ywhab</b>	0.0128508340965979	-0.258771053205295
<b>Rac2</b>	0.0132088090389949	-0.252958477529298
<b>Hnrnpu</b>	0.013939678137622	-0.293689554122841
<b>Slc25a36</b>	0.0156082129384177	-0.253313558761927
<b>Il7r</b>	0.0171780668802458	-0.286743790805614
<b>Slfn8</b>	0.0178012169020023	0.257104749730367
<b>Txnip</b>	0.0186646291041017	0.292833802664833
<b>Mycbp2</b>	0.0206243298173504	-0.263512991023417
<b>Vps37b</b>	0.0213106265505238	0.293176121522974
<b>Ifit3</b>	0.0214690299697748	0.277055390339286
<b>Ncl</b>	0.0218704282846566	-0.278068446193459
<b>Cd28</b>	0.0230010934107712	-0.255339059577717
<b>Add3</b>	0.0248419741396167	-0.286743790805614
<b>Fam107b</b>	0.0267427033825997	0.261401431355522
<b>Top2b</b>	0.0276633229792635	-0.313202553160863
<b>Ablim1</b>	0.0303583398565132	-0.268387640328001

Hba-a2	0.0378789244142068	1.24005108783295
S100a8	0.0401384438663307	-0.389862999800465

**Tabela 4: Expressão diferencial de genes da comparação entre células T CD8 de camundongos não sobreviventes e sobreviventes**

Genes	p_val	avg_log2FC
Trim12c	0.00075384464770127	-0.250606943911163
Igtp	0.00934803691205631	-0.251461718474443
Strn3	4.88809103021732e-06	-0.252246664478709
D8Erttd738e	0.000897115197236862	-0.253856815361123
Cd52	0.0265710757296566	-0.262746732849152
Igkc	2.5800118605734e-06	-0.263798950123488
Gbp9	6.33909809987009e-05	-0.26973794612987
Gbp2	0.00152467046983085	-0.27292124328901
Gimap4	0.00428035687280148	-0.274930615350193
Tmsb4x	0.00424322401489321	-0.280318381058474
Shisa5	0.00143980063763637	-0.283354763208628
Ccnd2	0.0127116060322449	-0.299736265095137
Sfr1	3.35061552974311e-05	-0.30050735454991
Ifi2712a	0.0152398133800944	-0.301766800322508
Add3	9.22968092881451e-05	-0.304392269729332
Snrpd3	0.000929855448030331	-0.310034416306109
Actb	0.0079591687237704	-0.311560270537069
Heca	5.00472386179064e-05	-0.316467849668937
Calm1	0.00528106552276868	-0.321804553559054
Snrnp70	8.31084923006161e-05	-0.322525360489306
Dynll1	8.05242838677409e-05	-0.323100942001384
Pfn1	0.00828790382514245	-0.3263089845853
Ltb	7.17319152550638e-05	-0.329364358886538
Stat1	0.000794160346829678	-0.332754492806192
Hspa8	0.00059117936141424	-0.346056076467305
Lars2	3.94066462580795e-05	-0.364462059535933
Psme2	8.00709125980149e-05	-0.36960944610356
Gm42418	8.76673785033823e-08	-0.50406481624451
Txnip	0.00629631537687464	0.254274091096138
Tut4	0.0139483460035911	0.254851074704686
Trac	0.00999107785595147	0.261534917544055
Rps27	5.72095182498411e-07	0.267968894132538

Vps37b	0.00657757459748433	0.26889216236915
Ifngr1	0.00815133159387963	0.27028821661926
Rpl38	2.51007862162431e-07	0.273651927727777
Arid5a	0.0052506960337562	0.279507513368534
Ubc	8.65975093947463e-05	0.329131984565507
Hmgb2	5.82608437974603e-05	0.394227012787392
Hbb-bs	2.80406757198601e-06	0.420699224148583
Ubb	1.37592200754499e-08	0.460206362399074
Gm10076	5.95722071611338e-09	0.480568346878028

**Tabela 5: Expressão diferencial de genes da comparação entre células T CD8 ISGs de camundongos não sobreviventes e sobreviventes**

	p_val	avg_log2FC
Ucp2	0.00331899247273857	-0.25541745342522
Trim12c	0.00539149607692982	-0.257113174430825
Stat1	0.00791760509883183	-0.258525197312071
Psmb10	0.00094640930662402	-0.262386688202687
AW112010	0.020596907999612	-0.271939959055686
Phf11b	0.00171536600303043	-0.285542747950551
Gbp7	0.000385883028781862	-0.292058226768279
Psmb8	7.83602104878225e-05	-0.307485484475414
Bst2	0.00034996193900051	-0.308346223081331
Ltb	0.00169636624254307	-0.313349849283808
Sell	5.55572327415381e-06	-0.319284401649632
Ifi2712a	0.000100226240620658	-0.367975780557562
Tmsb4x	9.38705095322053e-07	-0.368353660640294
Cd52	0.000599099940158685	-0.369515023739693
Ifi203	1.02583303985823e-05	-0.405140120678804
Arap2	0.00372708504875346	0.255420853125335
Actg1	0.0161873872355127	0.267322310351623
Hif1a	9.14722272594665e-05	0.306194083501701
Ifngr1	0.000618468501420917	0.319156694784794
Zeb1	6.37135233501311e-06	0.321740516707686
Vps37b	0.00072398327339594	0.323477411198496
Gramd3	1.71766247620931e-05	0.328470508233573
Crybg1	4.01321236810107e-06	0.381732983454039

**Tabela 6: Expressão diferencial de genes da comparação entre células Tregs de camundongos não sobreviventes e sobreviventes**

Genes	p_val	avg_log2FC
Lmo4	0.0123206994283382	-0.255257055242075
Zfp68	0.0123206994283382	-0.255257055242075
Babam1	0.0123206994283382	-0.255257055242075
Spag7	0.0123206994283382	-0.255257055242075
Trappc12	0.0123206994283382	-0.255257055242075
Togaram1	0.0123206994283382	-0.255257055242075
Ggps1	0.0123206994283382	-0.255257055242075
Mzt1	0.0123206994283382	-0.255257055242075
Thoc1	0.0123206994283382	-0.255257055242075
Pacs1	0.0123206994283382	-0.255257055242075
Nipsnap3b	0.023795796527219	-0.255257055242075
Ing4	0.023795796527219	-0.255257055242075
Herc2	0.023795796527219	-0.255257055242075
Fbrs	0.023795796527219	-0.255257055242075
Terf2ip	0.023795796527219	-0.255257055242075
Zfp266	0.023795796527219	-0.255257055242075
Tex264	0.023795796527219	-0.255257055242075
Pym1	0.023795796527219	-0.255257055242075
Adam17	0.023795796527219	-0.255257055242075
Cdc42ep3	0.023795796527219	-0.255257055242075
Npc1	0.023795796527219	-0.255257055242075
Pggt1b	0.023795796527219	-0.255257055242075
Cyfp1	0.0454336465254592	-0.255257055242075
Gnpnat1	0.0454336465254592	-0.255257055242075
Msrb1	0.0454336465254592	-0.255257055242075
Arl6ip1	0.0343163859686335	-0.263895973515947
Ate1	0.0176244510691537	-0.265852170481273
Smarca4	0.030791426876085	-0.265852170481273
BE692007	0.0185334998856476	-0.274622380109006
Xpa	0.0249655286608562	-0.274622380109006
Trim27	0.0249655286608562	-0.274622380109006
Ndufa11	0.0402792127697203	-0.274622380109006
Srp14	0.0228158869101218	-0.282001910474603
Atp2a2	0.0145995731424451	-0.283900193697016
Trmt11	0.0274092261584344	-0.283900193697016
Ebna1bp2	0.0274092261584344	-0.283900193697016
S100pbp	0.0274092261584344	-0.283900193697016

<b>Kif1b</b>	0.0274092261584344	-0.283900193697016
<b>Rbm28</b>	0.0274092261584344	-0.283900193697016
<b>Tmem30a</b>	0.0274092261584344	-0.283900193697016
<b>Nfyb</b>	0.0274092261584344	-0.283900193697016
<b>Scyl2</b>	0.0274092261584344	-0.283900193697016
<b>Uimc1</b>	0.0274092261584344	-0.283900193697016
<b>Ccnl2</b>	0.0438074305254674	-0.291496198673402
<b>Fdx2</b>	0.00632475537380601	-0.29373120305671
<b>Asnsd1</b>	0.0123856985930612	-0.29373120305671
<b>Tubb2a</b>	0.0123856985930612	-0.29373120305671
<b>Polr2h</b>	0.0123856985930612	-0.29373120305671
<b>Cks2</b>	0.0238367915445244	-0.29373120305671
<b>Pdzd8</b>	0.0238367915445244	-0.29373120305671
<b>Araf</b>	0.0238367915445244	-0.29373120305671
<b>Med12</b>	0.0238367915445244	-0.29373120305671
<b>Miga1</b>	0.0454026570984382	-0.29373120305671
<b>Igkc</b>	0.0454026570984382	-0.29373120305671
<b>Atp5d</b>	0.0471705856428047	-0.29373120305671
<b>Smc3</b>	0.0425184334254426	-0.297829771270331
<b>Dph3</b>	0.0186195880837159	-0.30061758864195
<b>Mknk2</b>	0.0339385140116582	-0.30061758864195
<b>Topors</b>	0.0238277562246279	-0.310246289839727
<b>Pcm1</b>	0.0238277562246279	-0.310246289839727
<b>Fam32a</b>	0.0238277562246279	-0.310246289839727
<b>Tap2</b>	0.0423006572165085	-0.310246289839727
<b>Ostc</b>	0.0443926269651189	-0.310246289839727
<b>Wipf1</b>	0.0481050552523616	-0.315264364606352
<b>Arl5a</b>	0.0446731375865315	-0.318822184019541
<b>Actr2</b>	0.023500951781533	-0.319476615893266
<b>Mrpl23</b>	0.0335691505150205	-0.319476615893266
<b>Pdcd11</b>	0.00743151860491635	-0.32042606972213
<b>Hdlbp</b>	0.0142533165928078	-0.32042606972213
<b>Zscan29</b>	0.0142533165928078	-0.32042606972213
<b>Acp1</b>	0.0142533165928078	-0.32042606972213
<b>Mrpl2</b>	0.0142533165928078	-0.32042606972213
<b>Syt11</b>	0.0266742173120742	-0.32042606972213
<b>Ssbp3</b>	0.0266742173120742	-0.32042606972213
<b>Tia1</b>	0.0266742173120742	-0.32042606972213
<b>Vdac3</b>	0.0274092261584344	-0.32042606972213

Ube2e1	0.0489375492040234	-0.320426069722131
Mga	0.0229478670191146	-0.324663062608601
Gnb2	0.0403494361224243	-0.324663062608601
Ipcef1	0.0403494361224243	-0.324663062608601
Dnajc2	0.0352192335407611	-0.32820342031385
Klhl9	0.00319685086025996	-0.331205908475373
Glyr1	0.00319685086025996	-0.331205908475373
Rad23b	0.0124247737599283	-0.331205908475373
Copg1	0.0124247737599283	-0.331205908475373
Coro7	0.0124247737599283	-0.331205908475373
Gm20559	0.0317459976166443	-0.334564920565288
Fkbp1a	0.0486599285196224	-0.334564920565288
Fip1l1	0.0357239644936144	-0.337358135456968
Nabp1	0.0124585847657266	-0.345011708000404
Thap3	0.0124585847657266	-0.345011708000404
Hspd1	0.0226941598580041	-0.345011708000404
Uso1	0.0226941598580041	-0.345011708000404
Sidt2	0.0226941598580041	-0.345011708000404
Gatad2b	0.0225515916808287	-0.34697322433369
Mau2	0.0296303070013164	-0.34697322433369
Rybp	0.00726971475403204	-0.356049979452852
Rbm7	0.00726971475403204	-0.356049979452852
Zfp800	0.01388512618898	-0.356049979452852
Copz1	0.01388512618898	-0.356049979452852
AI413582	0.01388512618898	-0.356049979452852
Tnfsf10	0.0142533165928078	-0.356049979452852
Mfsd10	0.0266800610699919	-0.356049979452852
Tcf20	0.0124850976275355	-0.357084540300979
Abrac1	0.0221024438421496	-0.357084540300979
Nsd1	0.0307681028889103	-0.35868664489748
Rbl1	0.0063725676806052	-0.367731784500487
Larp1b	0.0063725676806052	-0.367731784500487
Paip2	0.0201983488469619	-0.367731784500487
Phf20l1	0.0247974239337874	-0.367731784500487
Fgfr1op2	0.0317504502604858	-0.367731784500487
Arf5	0.0384170040776338	-0.367731784500487
Atp6v1g1	0.0426198211167321	-0.367731784500487
Pou2f2	0.047408216391574	-0.367731784500487
Prdx2	0.00634027557045078	-0.378959039923741

<b>Ppp1r11</b>	0.0118687852243971	-0.378959039923741
<b>Dock11</b>	0.0118687852243971	-0.378959039923741
<b>Hivep2</b>	0.0226981776387305	-0.378959039923741
<b>Cdv3</b>	0.0163692415036354	-0.387097109367418
<b>Dgka</b>	0.0409737269045709	-0.387097109367418
<b>Dhx9</b>	0.0468179470052082	-0.387097109367418
<b>Asxl2</b>	0.0468179470052082	-0.387097109367418
<b>Hspa8</b>	0.0406600346906384	-0.387909666438117
<b>Alyref</b>	0.00362971010662983	-0.390815397613528
<b>Cd7</b>	0.00709308547230547	-0.390815397613528
<b>Fam126a</b>	0.0134967093473545	-0.390815397613528
<b>Gpr83</b>	0.0107939537027881	-0.391578526454855
<b>Sp100</b>	0.0295705766318057	-0.396300936697258
<b>Ttc14</b>	0.0243861892860606	-0.397479127894539
<b>Eif3m</b>	0.00672280468575473	-0.400153262192865
<b>Tlk1</b>	0.00828599247082197	-0.400153262192865
<b>BC005537</b>	0.0158592810320903	-0.400153262192865
<b>Taldo1</b>	0.000771146736422948	-0.403355694231208
<b>Cbx3</b>	0.0362814011967571	-0.40520648991915
<b>Ms4a6b</b>	0.0190696125496562	-0.410376121908981
<b>Pan3</b>	0.00489441889973828	-0.412125903858941
<b>Sesn1</b>	0.00604604200764976	-0.412125903858941
<b>Eny2</b>	0.00604604200764976	-0.412125903858941
<b>Fam104a</b>	0.0112782928086643	-0.412125903858941
<b>Map2k2</b>	0.0215793077008683	-0.412125903858941
<b>Lcp1</b>	0.0215793077008683	-0.412125903858941
<b>Bcl11b</b>	0.0396248273666733	-0.415037499278844
<b>Rasa3</b>	0.0174680695449858	-0.415666261564189
<b>Kmt2c</b>	0.0162346260654892	-0.426625473554056
<b>Arhgap30</b>	0.0285683045204295	-0.428032294768301
<b>Hsp90aa1</b>	0.0397330742647048	-0.42913232916463
<b>Coro1a</b>	0.00746623015633716	-0.435087052302252
<b>Ltb</b>	0.0211250542891505	-0.442079125960568
<b>H2-T22</b>	0.0185825552101775	-0.443680637733786
<b>Herc1</b>	0.0204735529637313	-0.444547381551318
<b>Ppp1r21</b>	0.0204735529637313	-0.444547381551318
<b>Spn</b>	0.0215793077008683	-0.444547381551318
<b>Ikbke</b>	0.0226981776387305	-0.444547381551318
<b>Btg1</b>	0.015412172019341	-0.44790213318447

Wasf2	0.00799386270807089	-0.455194625750826
Cd74	0.00355020576903117	-0.457929593472065
Esf1	0.0243676229052323	-0.457929593472065
Kmt2e	0.00847423696564151	-0.459654273941526
Ly6a	0.0456460645604723	-0.461707932709501
Sptan1	0.00213842970275485	-0.462889017540827
Mbnl3	0.00824021843988738	-0.462889017540827
Trim30a	0.0061994943824663	-0.463656204499023
Gdi2	0.0174131574949057	-0.467267458051401
Il2rb	0.0124328748622124	-0.469752721440996
Abcf1	0.0057523042080126	-0.476256241278656
Esyt2	0.00554278021731355	-0.479941288086512
Dcaf8	0.000828918151411657	-0.490351071164443
H2-T23	0.00975055596220955	-0.494843702403827
Srsf5	0.0215765977507248	-0.501314938879079
Atp5g1	0.00512654033720682	-0.509087633746029
Zfp91	0.0343146871570097	-0.51068973834253
Psmb10	0.0445426478489601	-0.512121693835662
Aak1	0.00355020576903117	-0.522059930891781
Klf6	0.0481730638674806	-0.527388450488973
Neb	0.0303019592868207	-0.5376567859428
Kcnq1ot1	0.0125332307304618	-0.549338590990435
Tnfaip3	0.0410512786360319	-0.549338590990435
Tmem234	0.00596400054039303	-0.551331722839876
Alkbh1	0.000614159067459946	-0.567404129336852
Ifi206	0.00137761349759404	-0.567404129336852
Eif4a1	0.000852260203130517	-0.574182661967914
4930523C07Rik	0.00276671072859681	-0.592518720977318
Psme2	0.0368279740242069	-0.595142280603559
Selenok	0.000867422699909497	-0.608739884004282
Gimap3	0.00228309923034122	-0.612618843624022
Slfn2	0.000627203598614742	-0.644571989859311
Gm42418	0.000240647060404812	-0.660513533728333
Irf2	0.00150253315697532	-0.665412333141172
Birc6	0.00110172502093414	-0.681392263404249
Plac8	0.000186397265563291	-0.827163403137784
Hbb-bt	0.0390761816589982	0.253756592245783
Med13l	0.0217690391504046	0.256759080407307
Gosr2	0.0217690391504046	0.256759080407307

Zfp622	0.0217690391504046	0.256759080407307
Cndp2	0.0417315734141612	0.256759080407307
Trim11	0.0386247886293181	0.263034405833794
Rps27	0.0451152127311171	0.268214644939474
Pten	0.0458236243141764	0.28177096841538
Cpne3	0.0337810664086617	0.288313814282152
Bcor	0.0337810664086617	0.288313814282152
Rpl36	0.0286896316302722	0.29552412348271
Mrps24	0.0410622668257788	0.297283967786704
Rpl37a	0.0189792296499614	0.299492738375158
Gstp1	0.00477396908509539	0.302562770020431
Bicd11	0.00974378732175663	0.302562770020431
Mzt2	0.00974378732175663	0.302562770020431
Zmat2	0.0363784438361644	0.303645468038142
Rps21	0.0216292815677958	0.304278367824949
Rps15a	0.0299501533914995	0.304580851323466
Camk2d	0.0242769770706878	0.317394878146101
Rcc2	0.0242769770706878	0.317394878146101
Cenpa	0.0242769770706878	0.317394878146101
Qrich1	0.00910134574412464	0.324839690307266
Stk10	0.0339700694287898	0.336812331973342
Ppp1cc	0.0409737269045709	0.346865996637265
Eef1b2	0.0340998605497932	0.348686432261633
Selenos	0.0102979821025511	0.369233809665719
Ubb	0.0280561712244046	0.377011160257438
Csnk2a1	0.0478394938365805	0.377454316470688
Glr3	0.00233815028184208	0.37851162325373
Btg3	0.0386666934267436	0.37851162325373
Pnpla8	0.0362022715405959	0.386107628230115
Rps29	0.00213298063836261	0.402509964540017
Cstb	0.00516529312983063	0.40485771939644
Ubac2	0.0283572686360682	0.405759685690833
Gm10076	0.0181098022845468	0.412070007575977
Rps28	0.0005828090486993	0.420163398564902
Ifngr1	0.0361577212128298	0.425817338032086
Eif1	0.0170309309393001	0.433089409082086
H2-Q4	0.0387551098450278	0.434328837887604
Sbno1	0.0113733391076637	0.452562193264615
mt-Nd3	0.0442672189608953	0.476149013582231

Satb1	0.0312121602851406	0.477293555523172
Leprotl1	0.0140959322314753	0.477940069108219
Klf2	0.024837789484435	0.496168091705466
Trac	0.0344821193477651	0.523743758721344
Tut4	0.012063927797422	0.524627492311543
Cirbp	0.0173234350231959	0.52729865589797
Srgn	0.0031229154091966	0.542631003014836
Srp19	0.000215792693972321	0.672910199996859
Irf1	0.0109649234383592	0.712121523188728

**Tabela 7: Expressão diferencial de genes da comparação entre células B de camundongos não sobreviventes e sobreviventes**

Genes	p_val	avg_log2FC
Hbb-bs	1.83548660229053e-06	0.939409039269314
Hba-a1	0.000114713018370958	0.690657520814324
Klf13	1.3961243706864e-06	0.341123984823651
Txnip	0.00773117127468125	0.326747251907511
Gm10076	3.67042433831343e-07	0.32579860077322
Hnrnpdl	4.28573040006615e-05	0.309141599174316
Fam107b	9.18909843543782e-05	0.302993494860005
Hmgb2	0.00214266839693779	0.296798236782662
Sf3b6	7.75434015400332e-05	0.277986023416297
Socs3	3.59251391322339e-05	0.276323567153203
Kras	0.0078027149272327	0.274578429966787
Ptma	9.08928082517796e-06	0.258988302652657
Jun	0.00941249677627836	0.251584275072087
Ms4a4c	1.36310755206306e-14	-0.580389448254488
Sell	3.09861391055228e-13	-0.494742537511805
Ifi203	1.76568657960108e-11	-0.484379667531704
Fcmr	6.15267973320794e-10	-0.410069970268963
Ifi2712a	9.61241375746681e-10	-0.406794838236102
Iglc2	2.79628800720916e-07	-0.395749295116936
Ly6a	2.5866494435314e-06	-0.377374033327039
Rnf213	3.63251201066216e-06	-0.375257945151591
Iglc3	1.52081905505536e-10	-0.36915369841113
Gm42418	4.60961996592095e-08	-0.335943774049872
Ltb	2.09910835030866e-08	-0.33153057383774
Igkc	3.40930506138678e-06	-0.331303176053022

Serinc3	1.74774698925316e-06	-0.324241512218836
Macf1	2.01047458170117e-05	-0.318101136345733
Ighd	7.48947868210754e-06	-0.311515388249152
Ifi209	4.45820573049798e-06	-0.310602607759558
Isg15	0.000362546166625878	-0.309647194039364
Slfn5	0.00268296797389064	-0.307575907367979
Phf11b	1.08722731576956e-06	-0.30574459321804
Irf2	1.41063504442321e-06	-0.29840174156685
Rnase6	1.36585006089562e-07	-0.298329853033019
Crlf3	3.06542220903193e-06	-0.294632009322843
Pou2f2	0.000104344891782757	-0.292860946989896
Cst3	5.21424821958031e-06	-0.292103675433019
H2-T23	0.000169900223814622	-0.291812323097282
Bst2	0.000130242539110936	-0.28579659669629
Smim14	1.45809885304378e-07	-0.282516227736008
BE692007	6.70314918135243e-05	-0.271702190671567
Ly86	0.00054733054951031	-0.271018547196028
H2-K1	6.22733455010403e-07	-0.270886987593889
Trim30a	4.82285556581813e-05	-0.269646395718796
Ifi214	2.04635221238189e-05	-0.269533043132536
Cd79b	4.4475926197478e-05	-0.263618436558006
Herc6	1.5259352328423e-06	-0.26234771923941
Shisa5	3.56938044379174e-05	-0.261883492845709
Kmt2a	3.73042408190484e-06	-0.261130949604357
Ifit2	0.00244636653213163	-0.259655677237867
Fchsd2	9.37235873278121e-06	-0.257617788869816

**Tabela 8: Expressão diferencial de genes da comparação entre monócitos de camundongos não sobreviventes e sobreviventes**

Genes	p_val	avg_log2FC
Cfb	0.0350630384709242	-0.250524833508638
Rsad2	0.0482003408004629	-0.251054762951875
Klf3	7.00768902248208e-06	-0.251999879647701
Jund	3.31759618222439e-05	-0.255136949418442
Clec4a3	5.56138755060037e-05	-0.25615977472955
Msn	2.61254168200868e-05	-0.25660691547497
Ankrd44	2.51860426980396e-05	-0.258805977299153
Hsp90ab1	0.000618951741780622	-0.258871134281387

<b>Pecam1</b>	0.000392206545207663	-0.261392980986071
<b>Anp32a</b>	0.000441251414898891	-0.261579709425302
<b>Samhd1</b>	4.1272524397554e-05	-0.262557632295941
<b>Fgr</b>	5.48334492181406e-06	-0.262636338633672
<b>Macf1</b>	2.82499406277014e-05	-0.263688731702612
<b>Rasgrp2</b>	4.74620144333847e-06	-0.265885291309606
<b>Fcgr4</b>	0.000382220191388253	-0.26714358661538
<b>Hspa8</b>	0.000193405852715857	-0.270755442897847
<b>Laptm5</b>	0.000308680155261247	-0.271696665666056
<b>Ncf1</b>	3.28510855189607e-06	-0.276469094092241
<b>Klf4</b>	0.000265530558661914	-0.280397300098422
<b>Ifngr1</b>	0.000114795345229843	-0.286126063662386
<b>Stk10</b>	1.45761218009763e-05	-0.287168645787098
<b>Btg1</b>	0.013912872999478	-0.292452839096448
<b>Trem14</b>	5.84827271440248e-06	-0.295833506914226
<b>Celf2</b>	2.05407160868473e-06	-0.296257960069257
<b>Rgs2</b>	6.18217308668807e-05	-0.297024586479001
<b>Dusp16</b>	1.45546223036385e-05	-0.298305437002125
<b>Unc119</b>	1.74845346750369e-07	-0.299541520097285
<b>Spn</b>	1.00545963005974e-06	-0.300647174800185
<b>Btg2</b>	5.53781621901113e-07	-0.301339114881022
<b>Ripor2</b>	7.13845787908346e-07	-0.302539601826167
<b>Ptprc</b>	1.77727843018973e-05	-0.304868159029622
<b>Csf1r</b>	2.30255819568332e-06	-0.307096013945488
<b>Bin2</b>	5.32387212032015e-08	-0.312114259837638
<b>Rsrp1</b>	9.06800965885876e-08	-0.312829298039859
<b>Ear2</b>	1.07311447604016e-06	-0.322542811108503
<b>Vsir</b>	1.77885307970248e-06	-0.32317218590205
<b>Krt80</b>	7.34247313834385e-09	-0.32664238333313
<b>Myo1g</b>	4.03510699637304e-06	-0.331475164879344
<b>Cbfa2t3</b>	2.78238643854176e-08	-0.341631557552583
<b>Ptpre</b>	1.11338917267193e-05	-0.34537662130996
<b>Itgal</b>	5.4811737551028e-07	-0.346192286879027
<b>Neat1</b>	0.000204194886864539	-0.34729289264301
<b>Cytip</b>	6.1258261991853e-09	-0.347462281270855
<b>Fabp4</b>	6.16946576475517e-06	-0.35002750804622
<b>Serinc3</b>	2.66992874711827e-07	-0.350247771035008
<b>Cebpb</b>	3.96592541009523e-08	-0.351199174133713
<b>H2-K1</b>	1.82281706472621e-05	-0.356315060156141

Hspa5	0.00323296098151378	-0.356523179457119
Msrb1	4.66259247470338e-06	-0.358932397393693
Itga4	3.88055219593864e-05	-0.362787270960713
Ceacam1	1.5967232874462e-06	-0.380539304600712
Pglyrp1	3.28341111958893e-07	-0.382416077709646
Apoe	0.00193445962065694	-0.392774472127756
Prr13	1.34832709999051e-06	-0.394537047179805
Nr4a1	1.38789453320364e-09	-0.412678226404922
Cd9	1.27958931814039e-08	-0.418981510048272
Pou2f2	6.61617181413796e-10	-0.419483404310036
Lair1	3.29184060215697e-10	-0.422658726938112
Ccnd2	4.40220798103689e-08	-0.426391773652214
Malat1	1.62767787254626e-07	-0.434243201404487
Lst1	3.07111385011688e-09	-0.434463114169119
Abi3	1.07978245717512e-11	-0.465330547938642
Ap1s2	1.68636662302263e-08	-0.474943250836834
Adgre5	9.02789018929914e-12	-0.506667974744412
AW112010	0.000126750428853285	-0.522981044013372
Klf2	4.84673929639548e-12	-0.576281617413613
Gngt2	6.48564254977675e-10	-0.641295147417317
Gm42418	3.06737472080991e-16	-0.648092039109626
S100a8	0.000312929448460169	-0.864184665125634
S100a9	3.56284527157878e-11	-1.70610290516139
Aoah	1.75562381527102e-05	0.250463208823492
Clec4d	0.000175593102263186	0.252479408511831
Capza2	2.62689203462017e-07	0.253100484289554
Ctsl	7.04941157600783e-06	0.257188739700279
Hif1a	0.00050446347817411	0.258806282528563
Pnp	0.000103236887765442	0.25988003790695
Tnip3	3.03259735143389e-05	0.262079746321129
Tgfb1	2.79320980474283e-05	0.269991074442605
Ms4a4c	0.000130753757416706	0.270923847178614
Edn1	6.49336612013178e-05	0.278600663223262
Slfn2	2.6109396627479e-08	0.280937430511695
C3ar1	9.6938494300226e-06	0.280983899086
Clec4a2	1.72529160473031e-05	0.281917619767242
Rpl36a1	1.87200304265898e-07	0.282323390561229
S100a11	1.25331927916918e-05	0.284019430963129
Ccr1	3.83749246867817e-06	0.286836872411342

<b>Serp1</b>	1.9553285485478e-05	0.294360304401842
<b>AA467197</b>	0.0327352773331078	0.297018087296455
<b>Atp6v0c</b>	1.4832612813035e-09	0.300168988268887
<b>Slc31a2</b>	5.30232943274987e-09	0.300331688155118
<b>Gna13</b>	2.21166974148521e-06	0.307393372232587
<b>Rnh1</b>	2.15380465368085e-06	0.312845158814318
<b>Id2</b>	2.86699252145354e-06	0.314051284455897
<b>H1f0</b>	6.58251504793335e-06	0.33419606341744
<b>Lgals3</b>	3.47590654642865e-05	0.336426870474627
<b>Glrx</b>	1.07936151868799e-06	0.342314042836106
<b>Ifitm2</b>	4.183583661841e-12	0.343738137532218
<b>Crip1</b>	7.35023058043061e-06	0.344359766502661
<b>Fn1</b>	2.04102080732041e-06	0.347515356934345
<b>H2-Eb1</b>	0.0452068024351909	0.350186354928876
<b>Gm10076</b>	2.68423911099594e-11	0.364105582155742
<b>H3f3b</b>	4.11063335228446e-13	0.369803224986252
<b>Tmsb10</b>	2.45223250935216e-07	0.371535401803574
<b>Clec4e</b>	5.56469239859973e-08	0.372977302447874
<b>Sod2</b>	6.52985410124112e-10	0.392389945162964
<b>Mt1</b>	1.34605430401628e-06	0.410087369498468
<b>Sec61g</b>	2.11362305793828e-16	0.435155290562884
<b>Hp</b>	0.0028243912664016	0.43860182206568
<b>Cxcl10</b>	7.56861240143901e-05	0.457344720429008
<b>S100a4</b>	4.6505837754381e-08	0.475693770734692
<b>Ly6c2</b>	9.76011574201699e-07	0.484592175691428
<b>H2-Ab1</b>	0.0484974498401294	0.490846275265254
<b>Chil3</b>	0.00102120508308515	0.515453292831545
<b>Vim</b>	3.62329487527409e-12	0.528708351367433
<b>Vcan</b>	3.91474586155307e-10	0.536573248102367
<b>S100a10</b>	6.60873496222149e-13	0.541340764815642
<b>Lyz2</b>	6.24965921144482e-09	0.547041258984539
<b>Ccl7</b>	0.00606084375182601	0.551947443493193
<b>F13a1</b>	1.78214607520509e-11	0.56400288208551
<b>Nfkbia</b>	3.47125851689653e-17	0.578621340601554
<b>Sdc4</b>	1.87943997699447e-13	0.629667505304462
<b>Ccl2</b>	1.97791545523548e-12	0.846756412032357
<b>Spp1</b>	4.46601431529132e-05	0.855748019940706
<b>Ccl4</b>	0.0167007550846383	1.23025187258746

**Tabela 9: Expressão diferencial de genes da comparação entre neutrófilos maduros de camundongos não sobreviventes e sobreviventes**

<b>Genes</b>	<b>p_val</b>	<b>avg_log2FC</b>
Spn	0.00405807847612228	-0.251379415374826
Myo1f	0.00073936429951487	-0.252485200779503
Cdc42se1	0.00301698291202966	-0.253513868819275
Ehd1	0.0118627423120122	-0.260060054588197
Dusp1	0.0103162292041891	-0.260253557745937
Cxcr2	0.0131083200260249	-0.26044247872321
Igkc	0.00247340644922148	-0.260878140825537
Ifit3b	0.00199522016461934	-0.26182355045366
Gm31814	0.130047375266289	-0.262720170206014
Marcks	0.00180834001591639	-0.265486137317029
Rin3	8.85994507040579e-05	-0.269431261950465
Arhgap30	0.000529775714405633	-0.271905258211307
Fgr	2.51414285166644e-05	-0.275441108812047
Capzb	0.000733350784730151	-0.277129419917608
Emp3	0.0454260220259592	-0.278030230205896
Lbr	0.00272216017064877	-0.278279163868991
Gpsm3	4.15926693549187e-05	-0.279500579243956
Itgb2	0.00485136734108129	-0.279744189344845
G0s2	0.0556582713802288	-0.28095680749903
Nadk	0.000272172719500438	-0.284148909650816
Gda	0.000158773887234452	-0.290978283693353
Pik3cd	8.93444838988528e-05	-0.291658193670191
Cst3	0.000159879342612997	-0.292402810482018
Sp100	2.07866962619012e-05	-0.294825472748874
Slc16a6	0.00198062720593678	-0.295219597882015
Lars2	0.00464211514996507	-0.297465354621578
Trim30d	6.57313242152348e-05	-0.30098599582531
Ankrd44	0.00118447234007174	-0.303093088732474
Mob1a	9.91145978654997e-06	-0.303673922817039
Ifitm1	0.000207340321401134	-0.306186967422774
Stfa2l1	0.180067103305309	-0.307357573772314
Gm19951	5.45271390025237e-05	-0.307764528456372
Ifi204	0.000582324594785003	-0.308933692365335
Trim30b	0.00130574470421174	-0.309325042443989
Fgd4	2.0236846538439e-05	-0.311327395355137

<b>Efhd2</b>	0.000830095231450924	-0.312806948245098
<b>Trim30a</b>	0.000561674095966415	-0.31354323934788
<b>Btg2</b>	0.000107363872702288	-0.314054944228927
<b>Pgd</b>	0.000113712526265574	-0.322896238335542
<b>Il1b</b>	0.00284889984128979	-0.32577476159351
<b>Adgre5</b>	0.000504056425502714	-0.328493185514269
<b>Tsc22d3</b>	1.63411781846641e-05	-0.332054397512378
<b>Gpcpd1</b>	5.37146735326514e-05	-0.335177371373755
<b>Itgal</b>	0.000617190795025591	-0.34459511957474
<b>Irf7</b>	7.06522697005485e-05	-0.355774369398101
<b>Ifi2712a</b>	0.0238859947212362	-0.364286574749548
<b>Selp1g</b>	1.01522853233583e-06	-0.370731805607838
<b>Prok2</b>	0.00508165429936116	-0.371202870479869
<b>Slfn4</b>	5.17027622965397e-05	-0.373184554531168
<b>Csf3r</b>	0.00175912030952858	-0.391970254378124
<b>Gm42418</b>	1.17083776330968e-09	-0.404701746252865
<b>Marcks11</b>	0.00266198693440996	-0.405461427099311
<b>Neat1</b>	0.000176213733639484	-0.41039641731134
<b>Lst1</b>	4.22057858862164e-05	-0.413382083100782
<b>Saa3</b>	0.029749091879291	-0.432934436456084
<b>Stk10</b>	2.35412109447441e-06	-0.441630867937973
<b>Pglyrp1</b>	1.40362149495009e-06	-0.472234407714979
<b>Prr13</b>	5.5558357004798e-08	-0.474018012136899
<b>Gngt2</b>	0.00065411285982427	-0.485938727597464
<b>Rgs3</b>	3.99103225924247e-08	-0.497707070247879
<b>Pou2f2</b>	1.89369345237239e-05	-0.502393246641899
<b>Ltb</b>	3.74920714282192e-07	-0.502645092998049
<b>Gpx1</b>	1.88964325044299e-08	-0.532577530094931
<b>S100a8</b>	0.00771582244342431	0.25116891534489
<b>Rps13</b>	0.569817739586221	0.25141165870052
<b>Rpl19</b>	0.437332945275502	0.254005082303257
<b>Jun</b>	0.0586670169813362	0.258780431716573
<b>Srsf5</b>	0.0020049406908201	0.261012475453815
<b>Rab8b</b>	0.000585698576684779	0.261737368039977
<b>Hbb-bt</b>	0.00131119255397036	0.262093990790479
<b>Rps5</b>	0.429016022814252	0.264808355845235
<b>Lmnb1</b>	0.00608639200636589	0.267342445219997
<b>Gm10076</b>	0.00275809229769272	0.271913269353375
<b>Eef1a1</b>	0.324249953051398	0.274039845175348

<b>Pik3ap1</b>	0.000755879377863837	0.27963148093871
<b>Rapgef6</b>	0.0333758373557816	0.281424596635709
<b>Emb</b>	0.0169199779200049	0.281483716212855
<b>mt-Atp6</b>	0.0241645089570376	0.282104447140607
<b>Asprv1</b>	0.72903542985483	0.283682005834983
<b>Tnfaip3</b>	0.00171141861154629	0.300304054129281
<b>Mt1</b>	0.524823447269518	0.306670960056135
<b>Esdc</b>	0.0824354915140171	0.308369713480052
<b>Hdc</b>	0.0247209450932053	0.316996834833289
<b>Rps28</b>	0.51778537223526	0.318562538997914
<b>Rplp0</b>	0.132326676995687	0.318860715945209
<b>Fth1</b>	0.0748058482786132	0.320336338780842
<b>Rps27</b>	0.0703828796209765	0.323266887550297
<b>H3f3b</b>	3.98280935744064e-06	0.324785256275177
<b>Gns</b>	0.000109811437529472	0.325240828928198
<b>Cstdc4</b>	0.315399650639497	0.326252697841408
<b>Hcar2</b>	0.000223639231296932	0.335062898853799
<b>Ier3</b>	0.005998548021039	0.347470203038234
<b>Ccr12</b>	0.00259397322084003	0.362079620048539
<b>Rpl12</b>	0.0847758429566267	0.375501199831217
<b>Nfkbia</b>	0.000133522190648648	0.395823344212868
<b>Hba-a1</b>	0.08831157737752	0.401862110531111
<b>Hba-a2</b>	0.0284647588511257	0.408192789493994
<b>Camp</b>	0.0657271446535965	0.42339647320307
<b>Cstb</b>	0.0217598351254536	0.434078914338997
<b>Ltf</b>	0.146153141642118	0.472337209317337
<b>Hif1a</b>	1.81881712299344e-08	0.472489350906844
<b>mt-Nd1</b>	0.00344426547096699	0.489151630790405
<b>Thbs1</b>	0.000142090460509222	0.511221291439509
<b>Ngp</b>	0.00520798986086945	0.516700519217324
<b>Ccl3</b>	0.00252490780518578	0.541675794968246
<b>Cxcl2</b>	0.0127771171829853	0.566776928569814
<b>Cxcl3</b>	0.00210125448607263	0.676642426136614
<b>Hbb-bs</b>	3.53508656003264e-06	0.696105018005279
<b>Ccl4</b>	0.00149874593830392	0.94838395472867

**Tabela 10: Expressão diferencial de genes da comparação entre neutrófilos imaturos de camundongos não sobreviventes e sobreviventes**

Genes	p_val	avg_log2FC
Gbp2	5.97441952978095e-06	-0.251238008787322
Neat1	3.33641508524262e-05	-0.2529757691292
Hspa5	0.00894842689996495	-0.253246621954969
Cd52	1.03093253780927e-07	-0.256778602312929
Rplp1	1.8125781821274e-05	-0.258629917078806
Vim	8.52018144707827e-06	-0.260135776712292
Ctss	1.22381335998703e-07	-0.260604351545373
Cmah	7.45847370028873e-07	-0.261805424792544
Rsrp1	7.69156802581e-06	-0.264076113119221
Apobec3	1.34679070562226e-05	-0.264410362602464
Nfam1	2.67840234777141e-05	-0.265435094983921
Marcks	2.76863547985714e-05	-0.26581067805264
Crispld2	8.55658494480258e-06	-0.267260395835686
Msrb1	8.60609713225422e-08	-0.267637437234395
Ddx60	8.66277340934968e-05	-0.270431959729288
Tgfb1	1.29467919032332e-06	-0.271795944909312
Taldo1	8.24958438651539e-06	-0.276714311980937
Fabp5	1.47178107099322e-06	-0.279720173030694
Stfa2l1	0.00256630066718757	-0.280840527476775
Ifi204	1.21350073825558e-05	-0.284658095846361
Pgd	1.03270104132573e-06	-0.287053494490568
Samhd1	1.39234756964328e-06	-0.287960862991365
Ly6e	2.39585831394018e-05	-0.291915109542454
Isg20	2.00079601059351e-05	-0.296262987178121
Baz1a	2.31060547747786e-07	-0.297684270904492
Ly6c2	3.27549724078204e-05	-0.297971591991461
Rpl12	4.57113976238045e-07	-0.298463895371392
Oasl2	2.89372554160183e-06	-0.304505702159225
Mmp8	3.50612788143614e-06	-0.308783557452743
Irf7	4.17659655361098e-06	-0.317779359517003
Cd44	4.66572073162323e-09	-0.327225190974642
Sell	3.61453462548196e-07	-0.327610241030908
Herc6	9.74566382612799e-08	-0.327982982291447
Prr13	3.71858688828181e-08	-0.32860566756532
Malat1	6.06290614270497e-12	-0.332031918050083
Mmp9	3.38413023899962e-11	-0.348333144795996
Gda	7.87931419351875e-09	-0.357109036738776
Ifit3	4.78291144719527e-05	-0.360886395905207

<b>Cxcr2</b>	1.76735797660765e-08	-0.361093525332405
<b>Lipg</b>	7.24474821551435e-09	-0.361127930153562
<b>Saa3</b>	0.00602358982864976	-0.3678230946643
<b>Rsad2</b>	0.000542453409255523	-0.374915955809265
<b>Gm42418</b>	1.11940269442282e-13	-0.377566645467423
<b>Slfn4</b>	1.33971298154758e-08	-0.416257790437455
<b>Prok2</b>	8.26150215498824e-06	-0.418045511124064
<b>Ifit1</b>	2.23896224210847e-05	-0.427577273296716
<b>Slfn5</b>	1.06742746181454e-06	-0.449571738995043
<b>Isg15</b>	9.85711643906013e-07	-0.451688059596817
<b>Gpx1</b>	8.69182056316155e-12	-0.465190640865421
<b>Ifitm1</b>	0.00149833165845887	-0.574752115105049
<b>Wfdc17</b>	3.85113836813084e-10	-0.617933199649296
<b>Mt1</b>	0.000782044478389596	0.25323072397169
<b>Map3k8</b>	3.15949227310405e-08	0.256925489966417
<b>H2afz</b>	0.000195622702812875	0.259049085619913
<b>Ets2</b>	2.89273317709058e-06	0.267366745171568
<b>Ltf</b>	1.72639703987423e-06	0.27511384187014
<b>Plscr1</b>	0.00010619448121698	0.282354550940217
<b>Orm1</b>	0.000113213722325466	0.318770424088768
<b>Ngp</b>	6.4956317124561e-13	0.322611825812724
<b>H3f3b</b>	2.42414180426586e-11	0.330709498853179
<b>Rasa2</b>	1.05959751120406e-07	0.339418919625547
<b>Nfkbia</b>	1.04399619174864e-05	0.364246743714174
<b>Il1r2</b>	4.11712666742853e-10	0.36477623674599
<b>Samsn1</b>	1.02793788034785e-09	0.381190780103937
<b>Cd14</b>	0.000213023348560492	0.382648464061297
<b>Camp</b>	1.49508222088663e-08	0.436434225340605
<b>Hbb-bs</b>	1.67367730330888e-10	0.479985150239835
<b>Thbs1</b>	1.3656430181532e-17	0.813009351479649

## 9.2 Aprovação do comitê de ética no uso de animais



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

CEUA  
FMRP-USP  
Comitê de Ética no Uso de Animais  
Registrações: (Ribeirão Preto) (Ribeirão Preto)



### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Determinação dos mecanismos moleculares e celulares associados com o desfecho da sepse utilizando a tecnologia de single cell RNA sequencing*”, registrado com o número **151/2019**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 26 de agosto de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 468 camundongos C57Bl 6 machos pesando 20g oriundos do Serviço de Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Vigência da autorização: 26/08/2019 a 01/02/2023.

We certify that the Protocol *n° 151/2019*, entitled “*Determination of molecular and cellular mechanisms associated with sepsis outcome using single cell RNA sequencing*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *08/26/2019*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 468 male C57Bl 6 mice weighing 20g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 02/01/2023.

Ribeirão Preto, 26 de agosto de 2019

**Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales**  
Coordenadora da CEUA-FMRP – USP

### 9.3 Prêmios recebidos durante o período de doutorado

1. Prêmio melhor apresentação de pôster - The mechanisms involved in differential responses and outcomes of identical mice to sepsis (15th World Congress on Inflammation – Roma, Itália, 2022).
2. Menção honrosa pela aula - Single Cell RNA sequencing: Aplicações e Aspectos Metodológicos (XIV Curso de Inverno do Programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, FMRP, USP – Ribeirão Preto, Brasil, 2022).
3. Prêmio BD Young Talent (Becton Dickinson company e XLVI Anual Congress of the Brazilian Society of Immunology, São Paulo, Brasil, 2022).
4. Travel Award (Spring Course in Advanced Immunology - ImmunoArgentina 2022, International Union of Immunological Societies - Córdoba, Argentina, 2022).
5. Menção honrosa pela apresentação de pôster - Dissecting the mechanisms involved in differential responses and outcomes of identical mice to sepsis (53° Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics - Online, Brasil, 2021).

### 9.4 Artigos publicados durante o período de doutorado

1. Trugilo, Kleber Paiva; **Cebinelli, Guilherme Cesar Martelossi**; Pereira, Érica Romão; Okuyama, Nádia Calvo Martins; Cezar-Dos-Santos, Fernando; Castilha, Eliza Pizarro; Flauzino, Tamires; Hoch, Valéria Bumiller-Bini; Watanabe, Maria Angelica Ehara; Guembarovski, Roberta Losi; De Oliveira, Karen Brajão. Haplotype Structures and Protein Levels of TGFB1 in HPV Infection and Cervical Lesion: A Case-Control Study. **Cells**, 2023.
2. Silva, Camila Meirelles S.; Wanderley, Carlos Wagner S.; Veras, Flavio Protasio; Gonçalves, Augusto Velozo; Lima, Mikhael Haruo Fernandes; Toller-Kawahisa, Juliana Escher; Gomes, Giovanni Freitas; Nascimento, Daniele Carvalho; Monteiro, Valter V. Silva; Paiva, Isadora Marques; Almeida, Cícero José Luíz Ramos; Caetité, Diego Brito; Silva, Juliana Costa; Lopes, Maria Isabel Fernandes; Bonjorno, Letícia Pastorelli; Giannini, Marcela Cavichioli; Amaral, Natalia Brasil; Benatti, Maíra Nilson Santana, Rodrigo Carvalho; Damasceno, Luis Eduardo Alves; Silva, Bruna Manuella Souza; Schneider, Ayda Henriques; Castro, Icaro Maia Santos; Silva, Juan Carlo Santos; Vasconcelos, Amanda Pereira; Gonçalves, Tiago Tomazini; Batah, Sabrina Setembre Rodrigues, Tamara Silva; Costa Victor Ferreira Pontelli, Marjorie Cornejo Martins, Ronaldo; B. Martins, Timna Varela; Espósito, Danillo Lucas Alves; **Cebinelli, Guilherme Cesar Martelossi**; Da Fonseca, Benedito Antônio Lopes; Leiria, Luiz Osório Silveira; Cunha, Larissa Dias Arruda, Eurico; Nakaia, Helder I. Fabro, Alexandre Todorovic; Oliveira, Rene D. R. Zamboni, Dario S. Louzada-Junior, Paulo; Cunha,

- Thiago Mattar; Alves-Filho, José Carlos Farias; Cunha, Fernando Queiroz; Gasdermin-D activation by SARS-CoV-2 triggers NET and mediate COVID-19 immunopathology. **Critical Care**, 2022.
3. Sakita, Juliana Y; Elias-Oliveira, Jefferson; Carlos, Daniela; De Souza Santos, Emerson; Almeida, Luciana Yamamoto; Malta, Tathiane M; Brunaldi, Mariângela O; Albuquerque, Sergio; Araújo Silva, Cleide Lúcia; Andrade, Marcus V; Bonato, Vania L D; Garcia, Sergio Britto; Cunha, Fernando Queiroz; **Cebinelli, Guilherme Cesar Martelossi**; Martins, Ronaldo B; Matthews, Jason; Colli, Leandro; Martin, Francis L; Uyemura, Sergio A; Kannen, Vinicius. Mast cell-T cell axis alters development of colitis-dependent and colitis-independent colorectal tumours: potential for therapeutically targeting via mast cell inhibition. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, 2022.
  4. Damasceno, Luis Eduardo Alves; **Cebinelli, Guilherme Cesar Martelossi**; Fernandes, Mariane Font; Nascimento, Daniele Carvalho; Públio, Gabriel Azevedo; Vinolo, Marco Aurélio Ramirez; Oliveira, Sergio Costa; Sparwasser, Tim; Cunha, Thiago Mattar; Cunha, Fernando Queiroz; Alves-Filho, José Carlos. STING is an intrinsic checkpoint inhibitor that restrains the TH17 cell pathogenic program. **Cell Reports**, 2022.
  5. De Lima, Mikhael Haruo Fernandes; Hiroki, Carlos Hiroji; De Fátima Borges, Vanessa; **Cebinelli, Guilherme Cesar Martelossi**; Santos, Jessica; Rosa, Marcos Henrique; Silva, Camilla Meireles S; Wanderley, Carlos Wagner S; Gonçalves, Augusto Velozo; Silva Quirino, Gustavo Fernando; Zamboni, Dario S; Cunha, Thiago M; Filho, José-Carlos A; Cunha, Fernando Q. Sepsis-induced immunosuppression is marked by an expansion of a highly suppressive repertoire of FOXP3 +T regulatory cells-expressing TIGIT. **Journal Of Infectious Diseases**, 2021.
  6. Alves De Lima, Kalil; Rustenhoven, Justin; Da Mesquita, Sandro; Wall, Morgan; Salvador, Andrea Francesca; Smirnov, Igor; **Martelossi Cebinelli, Guilherme**; Mamuladze, Tornike; Baker, Wendy; Papadopoulos, Zach; Lopes, Maria Beatriz; Cao, William Sam; Xie, Xinmin Simon; Herz, Jasmin; Kipnis, Jonathan. Meningeal  $\gamma\delta$  T cells regulate anxiety-like behavior via IL-17a signaling in neurons. **Nature Immunology**, 2020.
  7. **Cebinelli, Guilherme Cesar Martelossi**; Lima, Kalil Alves; Silva Castanheira, Fernanda Vargas E; Hiroki, Carlos Hiroji; Monteiro, Valter Vinícius Silva; Lima, Mikhael Haruo Fernandes; Nascimento, Daniele Carvalho Bernardo; Alves Filho, José Carlos; Cunha, Thiago Mattar Cunha, Fernando De Queiroz. CCR2-deficient mice are protected to sepsis by the disruption of the inflammatory monocytes emigration from the bone marrow. **Journal Of Leukocyte Biology**, 2020.
  8. Fabrício O Souto, Fernanda V S Castanheira, Silvia C Trevelin, Braulio H F Lima, **Guilherme Cesar Martelossi Cebinelli**, Walter M Turato, Maria Auxiliadora-Martins,

- Anibal Basile-Filho, Jose Carlos Alves-Filho, Fernando Q Cunha. Liver X Receptor Activation Impairs Neutrophil Functions and Aggravates Sepsis. **The Journal of Infection Diseases**, 2019.
9. Alexandre Kanashiro, Carlos Hiroji Hiroki, Denise Morais da Fonseca, Alexander Birbrair, Raphael Gomes Ferreira, Gabriel Shimizu Bassig, Mirian D. Fonseca, Ricardo Kusuda, **Guilherme Cesar Martelossi Cebinelli**, Katiussia Pinhoda Silva, Carlos Wagner Wanderley, Gustavo Batista Menezes, José Carlos Alves-Filho, André Gustavo Oliveira, Thiago M. Cunha, André Sampaio Pupo, Luis Ulloa, Fernando Queiroz Cunha. The role of neutrophils in neuro-immune modulation. **Pharmacological Research**, 2019.
  10. Castanheira, Fernanda Vargas E Silva; De Lima, Kalil Alves; **Cebinelli, Guilherme Cesar Martelossi**; Sônego, Fabiane ; Kanashiro, Alexandre; Colon, David-Fernando; Borges, Vanessa; Czaikoski, Paula Giselle; Mota, José Mauricio; Cunha, Thiago Mattar; Alves-Filho, José Carlos; Liew, Foo Y.; Cunha, Fernando Queiroz. **CCR5-Positive Inflammatory Monocytes are Crucial for Control of Sepsis**. **SHOCK**, 2019.

### 9.5 Estágio no exterior realizado durante o período de doutorado

Estágio de 6 meses no laboratório do professor Jonathan Kipnis no Departamento de Neurociências – Center for Brain Immunology and Glia (BIG) – University of Virginia – Charlottesville, Estados Unidos da América.