

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

Rafaela Vaz Sousa Pereira

**Deposição de DNA no fígado como um mecanismo acessório para  
o controle da infecção sistêmica**

Belo Horizonte

2016

Rafaela Vaz Sousa Pereira

**Deposição de DNA no fígado como um mecanismo acessório para  
o controle da infecção sistêmica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Belo Horizonte

2016

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunobiofotônica localizado no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Também foram utilizados o laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia e o Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro do Departamento de Microbiologia, localizados no ICB-UFMG. Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG, CNPq e INCT Dengue.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Gustavo, pela oportunidade e por toda confiança depositada em mim. Por sua dedicação e motivação que fizeram com que eu sempre me esforçasse mais. Agradeço imensamente por todos ensinamentos, paciência e por sua participação tão importante em minha formação;

Ao grupo Imunobiofotônica, por toda ajuda, aprendizado e amizade. É muito mais gratificante ir trabalhar sabendo que tenho vocês ao lado, deixando tudo tão mais divertido e legal;

À Brenda, grande amiga e co-autora deste trabalho, por toda ajuda e amizade ao longo deste período. Este trabalho também é seu e sua contribuição foi essencial;

À Denise Carmona, minha primeira orientadora, que me aceitou em seu laboratório de braços abertos. Obrigada pelo carinho, paciência e atenção durante todos esses anos;

Aos amigos do NEI, pelo convívio diário e momentos de descontração;

Ao Pedro, por toda paciência, companheirismo e apoio em todos os momentos. Muito obrigada por estar sempre presente e tornar tudo tão mais fácil. Agradeço também à sua família, pela amizade e carinho de sempre;

À minha família, que mesmo com a distância estiveram sempre comigo. Por todo amor e apoio, essencial para eu seguir em frente. Agradeço imensamente o incentivo e esforço para minha formação profissional;

Aos professores, funcionários e colegas da Pós Graduação em Biologia Celular por todo apoio e companheirismo;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho;

À Deus, por me iluminar e abençoar minha trajetória.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE ILUSTRAÇÃO .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUÇÃO .....	12
2. JUSTIFICATIVA .....	16
3. OBJETIVOS .....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos Específicos .....	17
4. METODOLOGIA.....	18
4.1 Animais experimentais.....	18
4.2 Modelo de sepse .....	18
4.3 Contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) .....	19
4.4 Dosagem de citocinas .....	20
4.5 Teste de depuração do verde indocianina (cardiogreen).....	20
4.6 Microscopia confocal intravital.....	20
4.7 Tratamentos farmacológico e com anticorpo.....	21
4.8 Histologia do fígado .....	21
4.9 Quantificação bioquímica de lesão hepática por dosagem de alanina aminotransferase (ALT) no soro .....	21
4.10 Análise Estatística .....	22
4.11 Desenho Experimental .....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1 CLP induz propagação bacteriana no sangue e fígado de uma maneira tempo-dependente.....	23
5.2 CLP causa uma resposta inflamatória sistêmica.....	25

5.3 Animais sépticos apresentam disfunção hepática e mortalidade de 80%....	27
5.4 CLP causa deposição progressiva de DNA extracelular no fígado .....	29
5.5 DNA extracelular no fígado apresenta diferentes padrões de deposição ....	31
5.6 DNA extracelular observado no fígado não é NETs.....	33
5.7 DNA extracelular não é proveniente da necrose de hepatócitos.....	35
5.8 A administração intravenosa de DNase reduz o DNA extracelular no fígado .....	37
5.9 Tratamento com DNase não altera o perfil inflamatório dos animais sépticos .....	39
5.10 A administração de DNase altera a disseminação bacteriana no sangue, mas não no fígado .....	41
6. DISCUSSÃO .....	43
7. CONCLUSÕES .....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

KCs – Células de Kupffer  
NK – Células Natural Killer  
NKT – Células Natural Killer T  
CEBIO – Centro de Bioterismo da UFMG  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DAMP – Padrão molecular associado a dano  
NETs – Armadilhas extracelulares de neutrófilos  
CLP – Ligadura e perfuração cecal  
CETEA – Comitê de ética em experimentação animal  
i.p. – Intraperitoneal  
CFU – Unidades formadoras de colônias  
BHI – Brain heart infusion  
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*  
IL – Interleucina  
i.v. – Intravenoso  
DNAse – Desoxirribonuclease  
U – Unidades  
PBS – Salina tamponada com fosfato  
ALT – Alanina aminotransferase  
ANOVA – Análise de variância  
PE – Ficoeritrina  
PECAM-1 - *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*  
H&E – Hematoxilina e Eosina  
APAP – Acetaminofeno, paracetamol  
LPS – Lipopolissacarídeo  
Cf-DNA – *Cell free DNA*

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Ilustração 1: Procolo experimental para realização de ligadura e perfuração cecal (CLP).....	19
--	----



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aumento progressivo da carga bacteriana no sangue e fígado de animais sépticos .....	24
Figura 2. Animais sépticos apresentam níveis elevados de citocinas no soro ....	26
Figura 3. Comprometimento da função hepática e mortalidade de 80% em animais submetidos a cirurgia de CLP. ....	28
Figura 4. Deposição de DNA extracelular no fígado de animais sépticos 12 e 24 horas após cirurgia de CLP .....	30
Figura 5. Três diferentes padrões de DNA extracelular no fígado de animais sépticos: Aglomerados de DNA, DNA difuso e DNA intravascular .....	32
Figura 6. Deposição de DNA extracelular no fígado não altera na ausência de neutrófilos .....	34
Figura 7. Animais sépticos não apresentam lesão hepática evidente. ....	36
Figura 8. Redução do DNA extracelular no fígado pelo tratamento com DNase	38
Figura 9. Os níveis de citocinas séricas não alteram com tratamento de DNase	40
Figura 10. Tratamento com DNase altera a disseminação bacteriana no sangue, mas não no fígado.....	42

## RESUMO

O fígado é essencial para a manutenção da homeostase corporal. Dentre suas diversas funções fisiológicas, ele exerce papel importante na detecção e remoção de patógenos da circulação, sendo um órgão-chave na relação hospedeiro/microbiota. Os macrófagos hepáticos (Células de Kupffer) exercem um papel fundamental na captura de patógenos circulantes, porém mecanismos acessórios devem existir especialmente em situações onde há uma demanda emergencial devido à uma infecção sistêmica. Neste contexto, o DNA é conhecido por ser uma molécula com potencial antimicrobiano, função que foi conservada ao longo da evolução e existe em inúmeras espécies. Considerando isso, nosso objetivo foi determinar se um contexto infeccioso generalizado poderia induzir a liberação de DNA no fígado, e qual seria o papel da liberação intrahepática de DNA no curso da infecção. De fato, demonstramos que durante a sepse polimicrobiana induzida por ligadura e perfuração cecal há deposição de DNA extracelular no fígado de maneira generalizada, que progride com o curso da infecção. O DNA acumulado no fígado parece não ser derivado de neutrófilos (NETs) ou diretamente de hepatócitos em necrose, já que não observamos morte celular durante a sepse. A remoção enzimática do DNA durante a doença causou um aumento significativo na bacteremia em tempos tardios de infecção, apesar de não ter alterado a resposta inflamatória dos animais. Em conjunto, nossos dados demonstram que a deposição de DNA no fígado durante a sepse, possivelmente exercida ativamente por hepatócitos viáveis, pode ser um mecanismo acessório para controle da bacteremia durante a infecção sistêmica.

## **ABSTRACT**

The liver is essential for maintaining body homeostasis. Among its various physiological functions, the liver plays an important role in detection and removal of pathogens from the circulation, being a major organ in the host / microbiota interaction. The liver macrophages (Kupffer cells) play a key role in the capture of circulating pathogens, but there should be accessory mechanisms acting in emergency situations such as systemic infection. In this context, DNA is known to be a molecule with antimicrobial activity, and this function has been evolutionarily conserved and retained in several species. Considering this, our goal was to determine whether a systemic infection could induce the release of DNA in the liver and to determine the consequences of intrahepatic DNA deposition during infection. As expected, we demonstrated there is a widespread DNA deposition within the liver during polymicrobial sepsis, which progressed through the course of infection. Our data indicates that such accumulated DNA was not derived from neutrophils (NETS) or from necrotic hepatocytes, since we did not observe hepatocyte death during sepsis. Enzymatic removal of DNA during disease caused a significant increase in bacteremia at late timepoints of infection, however, no influence on the inflammatory response was observed. Taken together, our data demonstrate there is deposition of DNA in the liver during sepsis, possibly deriving from viable hepatocytes, which could be acting as an additional mechanism for controlling bacterial spread during systemic infection.

## 1. INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão vital para o funcionamento do organismo e realiza inúmeras funções essenciais. Dentre elas estão funções metabólicas, catabólicas, excretoras, secretoras, de síntese e de armazenamento, as quais são realizadas principalmente pelos hepatócitos, que compõem 70-80% da massa hepática. O fígado é capaz de controlar a homeostase de glicose, sintetizar albumina e fatores da coagulação, remover amônia do sangue, armazenar glicogênio, triglicerídeos, ferro e vitaminas, e sintetizar e secretar a bile. Também possui um papel importante na degradação e detoxificação de compostos, tanto endógenos quanto exógenos, como hormônios esteroides, proteínas séricas, fármacos, toxinas, contaminantes ambientais, álcool e até produtos de degradação bacteriana originados do trato gastrointestinal (THOMSON & KNOLLE, 2010). Além disso, o fígado é um componente importante na defesa contra infecção por via sanguínea, participando da detecção e clearance de patógenos. Isto o torna uma das primeiras linhas de defesa imunológica entre o organismo e o ambiente externo (JENNE & KUBES, 2013).

A capacidade do fígado para detectar e responder a microorganismos é devido à sua anatomia, localização e às populações celulares que residem nele. Ele foi selecionado especificamente para maximizar a vigilância imunológica, uma vez que é continuamente exposto a patógenos no sangue, derivados tanto da circulação sistêmica quanto do intestino. Situado em uma confluência hemodinâmica, o fígado é banhado por 30% do volume sanguíneo corpóreo a cada minuto, sendo 80% sangue originado da veia porta, pouco oxigenado e rico em nutrientes absorvidos no intestino e os 20% restantes, sangue oxigenado fornecido pela artéria hepática. Essa mistura sanguínea circula pelo fígado lentamente, em baixa pressão e tensão de oxigênio, através de uma enorme rede de vasos capilares de parede fina chamados sinusoides. Na vasculatura hepática também se encontram a maior população de macrófagos residentes, conhecidos como células de Kupffer (KCs), a maior densidade de células natural Killer (NK) e células T natural Killer (NKT), e a maior rede de células reticulo-endotelial do

corpo. As células de Kupffer e as células endoteliais – que constituem o sistema reticulo-endotelial - em conjunto detectam e capturam patógenos diretamente da circulação (JENNE & KUBES, 2013).

A função imunológica do fígado vem sendo bastante estudada atualmente, incluindo seu papel de “filtro” contra microrganismos comensais que escapam do intestino. Em doenças nas quais a barreira epitelial que separa a microbiota intestinal do ambiente endógeno estéril é rompida, levando ao escape dos microrganismos do lúmen intestinal, o fígado age como uma segunda barreira, filtrando as bactérias que chegam pelo sistema porta e evitando sua entrada na circulação sistêmica (BALMER *et al.*, 2014; ZEMP *et al.*, 2014). Entretanto, se o órgão estiver lesado sua capacidade de *clearance* de comensais do sangue é prejudicada, o que pode levar a uma propagação sistêmica de bactérias. É o que acontece, por exemplo, na cirrose terminal, um caso de insuficiência hepática, onde a causa mais comum de morte são infecções, a maioria derivada de organismos comensais orais ou intestinais (GUSTOT *et al.*, 2009; ARVANITI *et al.*, 2010).

A posição do fígado na circulação sanguínea, ideal para que ele desempenhe suas funções tanto metabólicas quanto imunológicas, faz ao mesmo tempo que este órgão esteja sujeito a injúrias. Uma vez que todo o sangue da veia porta passa primeiro pelo fígado, ele está continuamente exposto a insultos de ordem nutricional, bem como toxinas e patógenos (SMITH & ADAMS, 2011; TUJIOS & FONTANA, 2011; NESSELER *et al.*, 2012; NASTOS *et al.*, 2014). E, considerando todas as funções atribuídas ao fígado, é de se esperar que as injúrias e doenças que o comprometam tenham grande importância médica e frequentemente coloquem a vida de indivíduos em risco. Na sepse por exemplo, a disfunção hepática é reconhecida como um dos componentes que contribuem para a severidade da doença (NESSELER *et al.*, 2012).

A sepse é caracterizada como uma resposta inflamatória sistêmica frente à uma infecção. Ela é uma síndrome complexa e dinâmica, que apresenta ampla heterogeneidade entre pacientes (HOTCHKISS & KARL, 2003; BONE *et al.*, 2009). Apesar de inúmeras pesquisas nesse campo, a fisiopatologia da sepse

ainda não é totalmente entendida e, dessa forma, ainda representa um dos maiores desafios para cientistas e médicos. Devido à alta taxa de mortalidade de 40%-60% e à falta de tratamentos eficazes, a sepse é considerada um grande problema de saúde pública e resulta em altos custos financeiros (ANGUS *et al.*, 2001). As causas de sepse são diversas, sendo a pneumonia responsável por cerca de metade dos casos, seguida por infecções intra-abdominais e do trato urinário (ANGUS *et al.*, 2001; VINCENT *et al.*, 2009). Com relação aos agentes, a sepse pode ser causada por bactérias, gram-positivas ou gram-negativas, fungos e vírus. Considerando a complexidade e gravidade da sepse, é de grande interesse definir seus mecanismos fisiopatológicos, de forma a auxiliar no desenvolvimento de novas terapias para esta doença.

Nosso grupo de pesquisa tem focado no estudo do fígado como órgão-chave em diversas condições patológicas. Demonstramos recentemente que durante a lesão hepática induzida por medicamentos há um tráfego e um acúmulo aberrante de DNA no citoplasma de hepatócitos, causando uma deposição de DNA extracelular na microcirculação hepática. Essa deposição de DNA hepático está associada à inflamação e acúmulo de neutrófilos no fígado durante a lesão (MARQUES *et al.*, 2015). O excesso de DNA extracelular pode ser explicado pela grande quantidade de material genético presente em hepatócitos, e tal abundância de material genético pode ter diferentes causas. Primeiro, por serem células que realizam a maioria das funções metabólicas e secretoras atribuídas ao fígado, os hepatócitos possuem uma enorme quantidade de mitocôndrias em seu citoplasma, contendo múltiplas cópias do genoma mitocondrial. Segundo, por razões ainda pouco entendidas, hepatócitos podem conter até 16 cópias do genoma acumuladas em seus núcleos, sendo em sua grande maioria, células poliploides (KUDRYAVTSEV *et al.*, 1993; GUPTA, 2000; GENTRIC *et al.*, 2012).

O DNA está normalmente armazenado no núcleo das células eucarióticas e no interior das mitocôndrias, e sua presença em locais anormais como no meio extracelular, no citoplasma ou em endossomos pode desencadear a ativação do sistema imune (PALUDAN & BOWIE, 2013). Dessa forma, o DNA, além do seu papel genético, pode ser considerado um DAMP (damage-associated molecular

pattern; padrão molecular associado a dano). DAMPs compreendem um grupo vasto de moléculas endógenas que podem ser liberadas por qualquer tipo celular quando encontrado sob estresse ou em processo de morte. Dessa forma, sinalizam perigo e/ou dano celular, sendo capazes de recrutar células efetoras para o sítio de injúria (KONO & ROCK, 2008; CHEN & NUNEZ, 2010; BEYER *et al.*, 2012; PUGIN, 2012). O DNA (nuclear ou mitocondrial) é um dos DAMPs mais bem descritos, pois atua como um potente indutor de inflamação e está envolvido em uma série de doenças autoimunes como o lúpus sistêmico eritematoso (BARRAT *et al.*, 2005; PALUDAN & BOWIE, 2013).

Além de sua propriedade imunoestimulatória, inúmeros estudos apontam que o DNA desempenha também função bactericida, conservada de invertebrados até vertebrados, como humanos e peixes (PALIC *et al.*, 2007; NG *et al.*, 2013; NG *et al.*, 2015). Sua capacidade antimicrobiana é bem conhecida para as armadilhas extracelulares de neutrófilos (neutrophil extracellular traps; NETs). NETs são redes compostas por fibras de DNA genômico envolvido por proteínas de grânulos de neutrófilos (BRINKMANN *et al.*, 2004).

As NETs previnem a disseminação bacteriana do sítio de infecção, inativam fatores de virulência e matam os microrganismos invasores (BRINKMANN & ZYCHLINSKY, 2012). O mecanismo microbicida permanece controverso (MENEGAZZI *et al.*, 2012) e muitos trabalhos que visaram elucidar o componente bactericida das NETs focaram no papel das proteínas associadas ao DNA, incluindo histonas (RICHARDS *et al.*, 2001; PARSEGHIAN & LUHRS, 2006), calprotectina (URBAN *et al.*, 2009) e catepsina G (LAPPANN *et al.*, 2013). Entretanto, recentemente foi demonstrado que o esqueleto de DNA por si só pode desempenhar função microbicida (HALVERSON *et al.*, 2015), uma vez que é um quelante eficiente de cátions presentes na superfície bacteriana, causando perda de integridade da membrana, o que leva à lise e morte celular (MULCAHY *et al.*, 2008).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Considerando que o DNA pode atuar como um agente antimicrobiano eficaz; que o fígado contém uma enorme quantidade de DNA; e que pode liberá-lo durante a lesão hepática, nos perguntamos se diante de um contexto infeccioso haveria também liberação de DNA no fígado e, se sim, qual seria o impacto da deposição de DNA no curso da infecção. Com isso, buscamos elucidar um mecanismo acessório no controle da infecção de forma a auxiliar no melhor entendimento da fisiopatologia da sepse.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar se ocorre liberação de DNA extracelular no fígado durante a sepse e determinar seu papel no controle da infecção

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Reproduzir o modelo de sepse polimicrobiana por ligadura e perfuração cecal (CLP) em camundongos;
2. Avaliar a dinâmica de liberação de DNA no fígado durante a sepse;
3. Investigar as possíveis fontes de DNA extracelular no fígado;
4. Avaliar as consequências da remoção de DNA por meio da administração de DNase

## **4. METODOLOGIA**

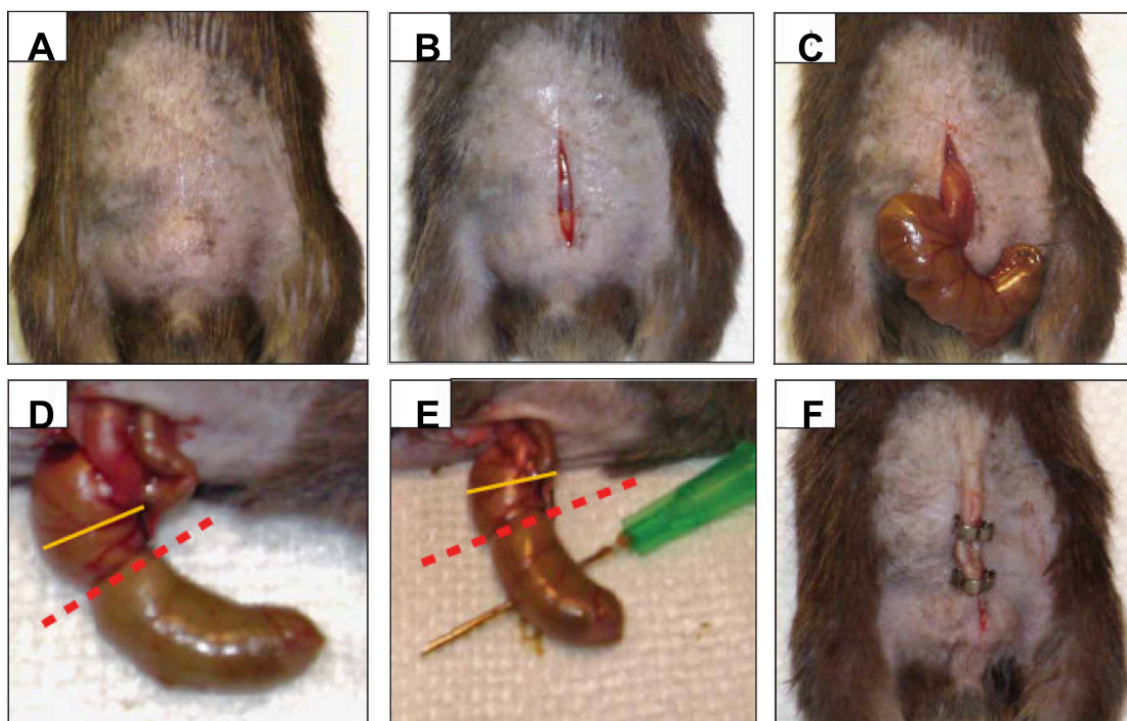
### **4.1 Animais experimentais**

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, de 11 a 13 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais foram acondicionados em grupos de cinco por micro isolador, com ração (Labina) e água ad libitum, em condições controladas de temperatura (25°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h). Durante três dias os animais foram vermifugados com Ivermectina na concentração de 0,002%, adicionado em água. Após o intervalo de 5 dias os experimentos se iniciaram. Os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA protocolo 288 / 2015).

### **4.2 Modelo de sepse**

A sepse polimicrobiana foi induzida por ligadura e perfuração cecal (*cecal ligation and puncture*; CLP) (Ilustração 1). Resumidamente, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de uma mistura de 15 mg/kg de xilazina e 80 mg/kg de ketamina. Após a retirada dos pelos da parte ventral da região abdominal, utilizando creme depilatório, seguida de antissepsia com álcool 70%, os animais foram submetidos a uma laparotomia na altura do terço posterior sobre a linha alba, pela incisão de aproximadamente dois centímetros no abdômen, abrangendo a pele e a musculatura abdominal. O ceco foi cuidadosamente exposto e obstruído com a utilização de um fio de algodão (120 2000Jardas) abaixo da válvula ileocecal, porém a continuidade intestinal foi mantida. Uma agulha de calibre 18G foi utilizada para trespassar o ceco uma vez, e uma pequena quantidade de fezes foi extravasada pelos dois orifícios gerados. O ceco foi recolocado no abdômen e a cavidade abdominal fechada em sutura realizada com fio (5-0) em 2 planos: musculatura e pele. Os animais foram colocados sob luz incandescente para manutenção da temperatura corpórea e, quando recuperados da anestesia, foram devolvidos às suas caixas com o livre acesso a água e ração. Os animais sham-operados (Controle) foram submetidos

aos mesmos procedimentos, com exceção da ligação e perfuração cecal. Todos os animais receberam uma injeção subcutânea de 1 ml de solução salina estéril.



Rittirsch et al, Nat Protoc 2009

**Ilustração 1: Procolo experimental para realização de ligadura e perfuração cecal (CLP)**

#### **4.3 Contagem de unidades formadoras de colônias (CFU)**

A propagação bacteriana durante diferentes tempos pós CLP foi avaliada por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) no sangue e no homogenato de fígado (parte do fígado homogeneizada em salina estéril). Utilizamos a técnica de microgota, na qual diluições seriadas do homogenato do fígado e do sangue foram plaqueadas em placas com ágar Brain Heart Infusion (BHI) em triplicata (20 $\mu$ l/amostra). As placas foram incubadas à 37°C por aproximadamente 8 horas. Após o término de incubação, as colônias foram contadas e o número de CFU determinado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{CFU:} \quad \frac{\text{Número de colônias}}{\text{Diluição das amostras} \times \text{volume inoculado}}$$

#### **4.4 Dosagem de citocinas**

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante dos reagentes utilizados (R&D Systems, USA). Placas de ELISA foram cobertas com anticorpos policlonais anti-IL-6 e anti-IL-10 e incubadas a 4°C overnight. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes, a reação foi bloqueada com albumina bovina 1% (Sigma Chemical Co., USA) e as placas foram deixadas em agitador horizontal durante 1 hora a temperatura ambiente. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com as amostras de soro dos camundongos. Após incubação, anticorpos policlonais biotinizados são adicionados e, seguido o tempo de incubação a detecção é feita utilizando-se estreptoavidina e OPD como substrato. A leitura é realizada a 492nm.

#### **4.5 Teste de depuração do verde indocianina (cardiogreen)**

O verde indocianina é um corante que não sofre transformação química e é rapidamente excretado pelo fígado e, sendo assim, a dosagem do clearance desta substância é uma forma de avaliar a função hepática. Desta forma, os animais receberam via i.v. uma solução de 20 mg/Kg de verde indocianina (Cardiogreen, Sigma Aldrich) diluído em água de injeção estéril. Após 20 minutos, os animais foram anestesiados, eutanasiados e o soro coletado. As amostras foram diluídas e a absorbância medida em 800 nm em leitor de microplacas (Versa Max Microplate reader). O resultado obtido foi comparado a uma curva padrão e expresso em verde indocianina ( $\mu\text{g/ml}$ ).

#### **4.6 Microscopia confocal intravital**

A microscopia intravital do fígado de camundongos foi realizada utilizando um microscópio confocal Nikon Ti C2 e corantes fluorescentes, a fim de observar a distribuição e quantificar o DNA extracelular no fígado. A deposição de DNA foi visualizada através da injeção i.v. de uma sonda para DNA (Sytox Green 5 mM; 2  $\mu\text{l}$ /animal). A microvasculatura hepática foi visualizada por injeção i.v. de anti-PECAM1 conjugado a ficoeritrina (PE; 4  $\mu\text{g}$ /animal). Para realizarmos as imagens in vivo usamos um pequeno suporte de acrílico para posicionarmos o camundongo

anestesiado e expusemos um lóbulo do fígado a uma distância adequada da objetiva. Após esta pré-montagem, o camundongo recebeu os corantes fluorescentes por via i.v. Em seguida, foram feitas imagens de diferentes áreas do tecido hepático. As quantificações de DNA extracelular foram feitas utilizando o programa ImageJ.

#### **4.7 Tratamentos farmacológico e com anticorpo**

Desoxiribonuclease I (DNASE I; Sigma-Aldrich) foi administrada por via intravenosa (i.v.; 1000 U/dose) duas horas após a cirurgia de CLP e posteriormente de 6 em 6 horas até a eutanásia dos animais. Para depleção dos neutrófilos adotamos uma metodologia já padronizada em nosso grupo e adotada também em outros trabalhos, que é a depleção de neutrófilos por injeção de anticorpo anti-Ly6G (DALEY *et al.*, 2008). A depleção foi realizada por meio de duas injeções i.v. de anticorpo anti-Ly6G (100 µg/dose, clone 1A8; BioXCell), 12 horas antes da cirurgia e no momento da cirurgia. Todos os reagentes foram dissolvidos em PBS estéril.

#### **4.8 Histologia do fígado**

Após eutanásia dos camundongos, o fígado foi removido, lavado com salina e seu lobo inferior fixado em formol 4% tamponado. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em soluções de álcool etílico, banhadas em xilol e incluídas em blocos de parafina histológica. Cortes teciduais de 5 µm de espessura foram obtidos utilizando um micrótomo e corados com hematoxilina & eosina. A visualização dos cortes foi feita em um microscópio óptico BX41 (Olympus) e as imagens obtidas utilizando uma câmera Moticam 2500 (Motic) e o software Motic Image Plus 2.0ML.

#### **4.9 Quantificação bioquímica de lesão hepática por dosagem de alanina aminotransferase (ALT) no soro**

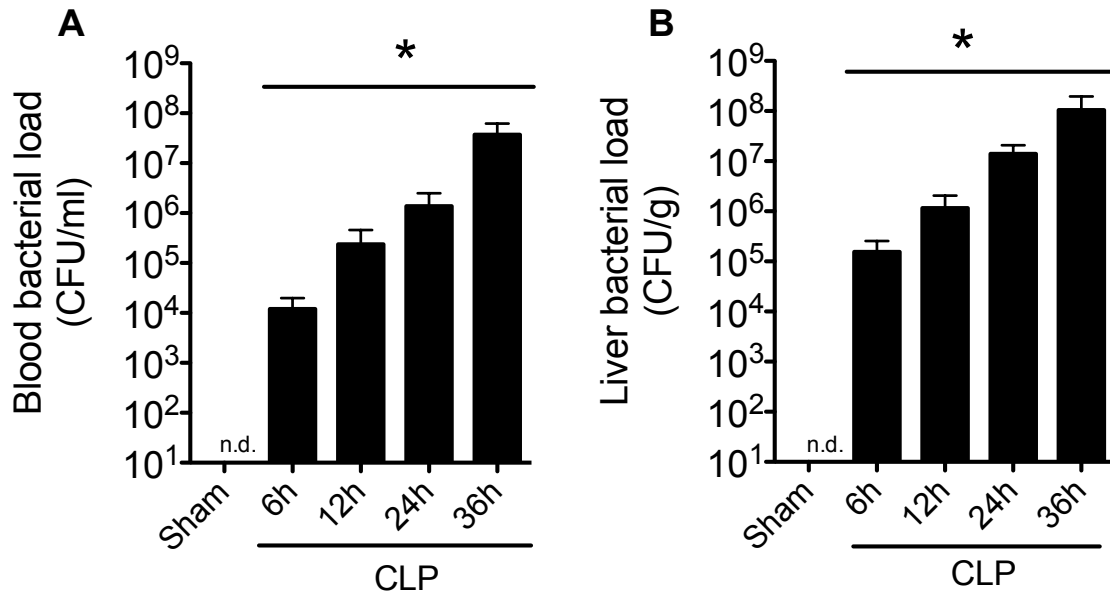
Para determinar a atividade de alanina aminotransferase (ALT) no soro utilizamos o kit transaminase ALT cinético (Bioclin). O ensaio cinético é o método recomendado pela International Federation of Clinical Chemistry. Para realização



## 5. RESULTADOS

### 5.1 CLP induz propagação bacteriana no sangue e fígado de uma maneira tempo-dependente

Como primeiro passo para padronização do modelo, fizemos uma cinética para avaliar a disseminação bacteriana por meio do número de unidades formadoras de colônias (CFU) no sangue e no fígado de animais submetidos a CLP (6, 12, 24 e 36 horas). Observamos que CLP causa disseminação bacteriana no sangue com translocação para o fígado, que aumenta conforme o tempo após a cirurgia. Seis horas após CLP, foram detectadas aproximadamente  $1,2 \times 10^4$  CFU/ml no sangue e  $1,5 \times 10^5$  CFU/g no fígado; valores que aumentam para  $3,7 \times 10^7$  CFU/ml e  $1,0 \times 10^8$  CFU/g, respectivamente, na 36<sup>a</sup> hora. Camundongos sham-operados não apresentaram níveis detectáveis de CFU. Os tempos intermediários de 12 e 24 horas pós-cirurgia foram os tempos determinados para as análises seguintes.

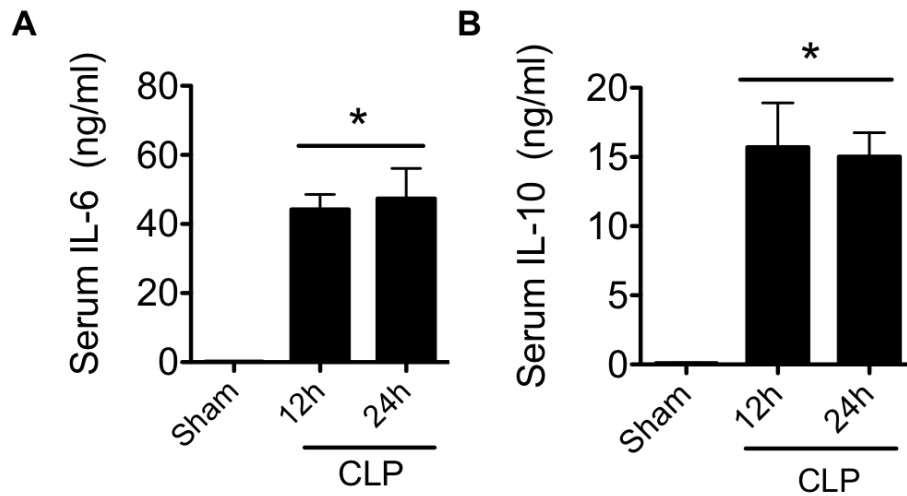


**Figura 1. Aumento progressivo da carga bacteriana no sangue e fígado de animais sépticos**  
 Propagação bacteriana avaliada por meio de Unidades formadoras de colônias (CFU) do sangue (A) e fígado (B) dos animais Sham-operados e animais submetidos a cirurgia de CLP, nos tempos de 6, 12, 24 e 36 horas após a cirurgia. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo sham.



## **5.2 CLP causa uma resposta inflamatória sistêmica**

Para estimarmos o grau de inflamação sistêmica durante a sepse, quantificamos os níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) e IL-10. Observamos que CLP induziu um aumento intenso dos níveis séricos de IL-6 e IL-10, chegando a aproximadamente 40ng/ml e 15ng/ml, respectivamente, na 12<sup>a</sup> hora após cirurgia. Esses valores se mantiveram elevados também na 24<sup>a</sup> hora após cirurgia. Os níveis elevados de citocinas no soro dos animais nos indica uma intensa ativação da resposta inflamatória sistêmica.

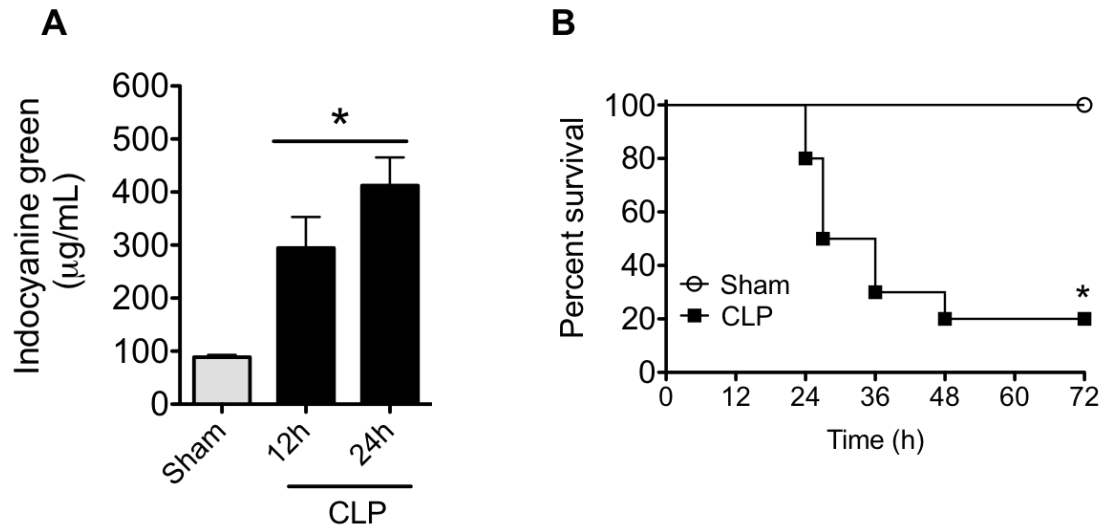


**Figura 2. Animais sépticos apresentam níveis elevados de citocinas no soro**

Dosagem sérica de citocinas de animais sépticos pela técnica de ELISA, 12 e 24 horas após cirurgia. A) Dosagem sérica de IL-6 e B) Dosagem sérica de IL-10. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham.

### **5.3 Animais sépticos apresentam disfunção hepática e mortalidade de 80%**

Sabendo que a sepse pode levar ao comprometimento da função hepática e que isso tem grande influência na sobrevivência do hospedeiro, buscamos determinar esses parâmetros em nosso modelo. O verde de indocianina é um corante que se liga à proteínas do sangue e é removido da circulação exclusivamente pelo fígado, constituindo um método estabelecido para avaliar função hepática. Por meio do teste de depuração do verde de indocianina, observamos um prejuízo na função hepática dos animais submetidos CLP. Após 20 minutos da injeção intravenosa do corante, animais sépticos ainda apresentavam níveis elevados do corante no soro, 12 e 24 horas após a cirurgia, quando comparados aos animais sham). Isto indica que animais com sepse tem clearance ineficaz do corante e, portanto, há um prejuízo da função hepática durante a doença. Ao avaliar a mortalidade de animais submetidos a CLP, observamos que até a 48<sup>a</sup> hora após a cirurgia 80% dos animais morreram, sendo que, após esse tempo, a sobrevivência se manteve. Nossos resultados indicam que nosso modelo mimetiza uma sepse grave, que inclui perda de função hepática.

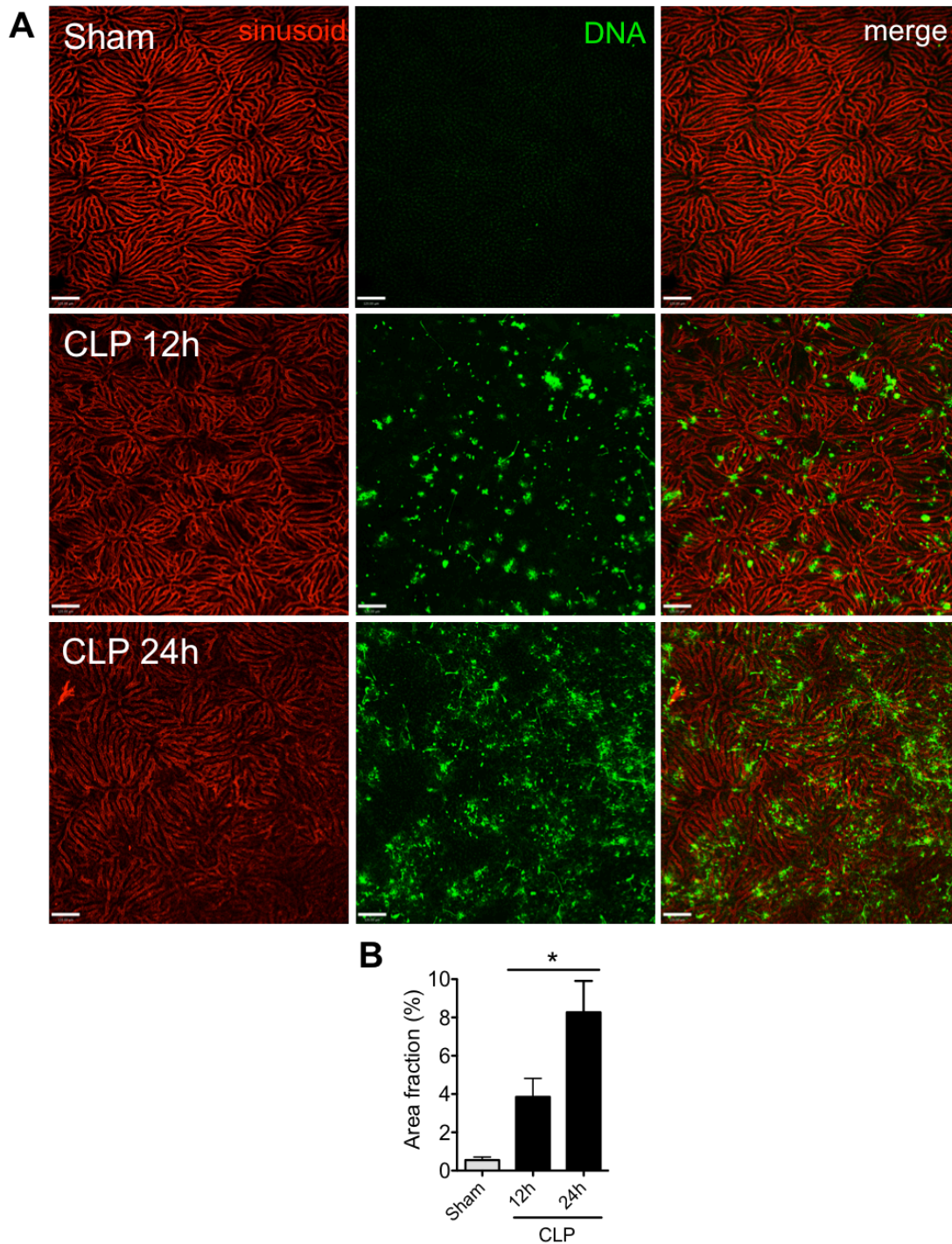


**Figura 3. Comprometimento da função hepática e mortalidade de 80% em animais submetidos a cirurgia de CLP.**

A) Função hepática analisada por meio da depuração do verde de indocianina na circulação de animais sépticos e Sham-operados, 12 e 24 horas pós cirurgia de CLP. B) Curva de sobrevivência após a cirurgia de CLP, monitorados por 3 dias. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham.

#### **5.4 CLP causa deposição progressiva de DNA extracelular no fígado**

Para avaliarmos se havia de fato liberação de DNA durante a sepse, nós utilizamos a técnica de microscopia intravital, que nos permite visualizar a microvasculatura hepática em tempo real. A presença de DNA extracelular no fígado foi visualizada utilizando uma injeção i.v. de anticorpo anti-PECAM-1 conjugado à PE para visualização dos sinusoides hepáticos (em vermelho) e de Sytox Green para visualização do DNA extracelular (em verde). Como podemos observar na FIG. 4A, ocorre acúmulo de DNA intravascular no fígado nos animais submetidos a CLP por 12 horas, sendo que esta deposição de DNA foi ainda mais evidente na 24<sup>a</sup> hora. Animais sham não apresentaram nenhuma deposição de DNA no fígado. Na figura 4B, confirmamos um aumento progressivo na deposição de DNA no fígado durante esse tempo após a quantificação usando o programa ImageJ. No tempo de 12 horas após cirurgia, o DNA extracelular corresponde a aproximadamente 4% da área total analisada, sendo que no tempo de 24 horas esse valor dobra, chegando a aproximadamente 8% da área total.



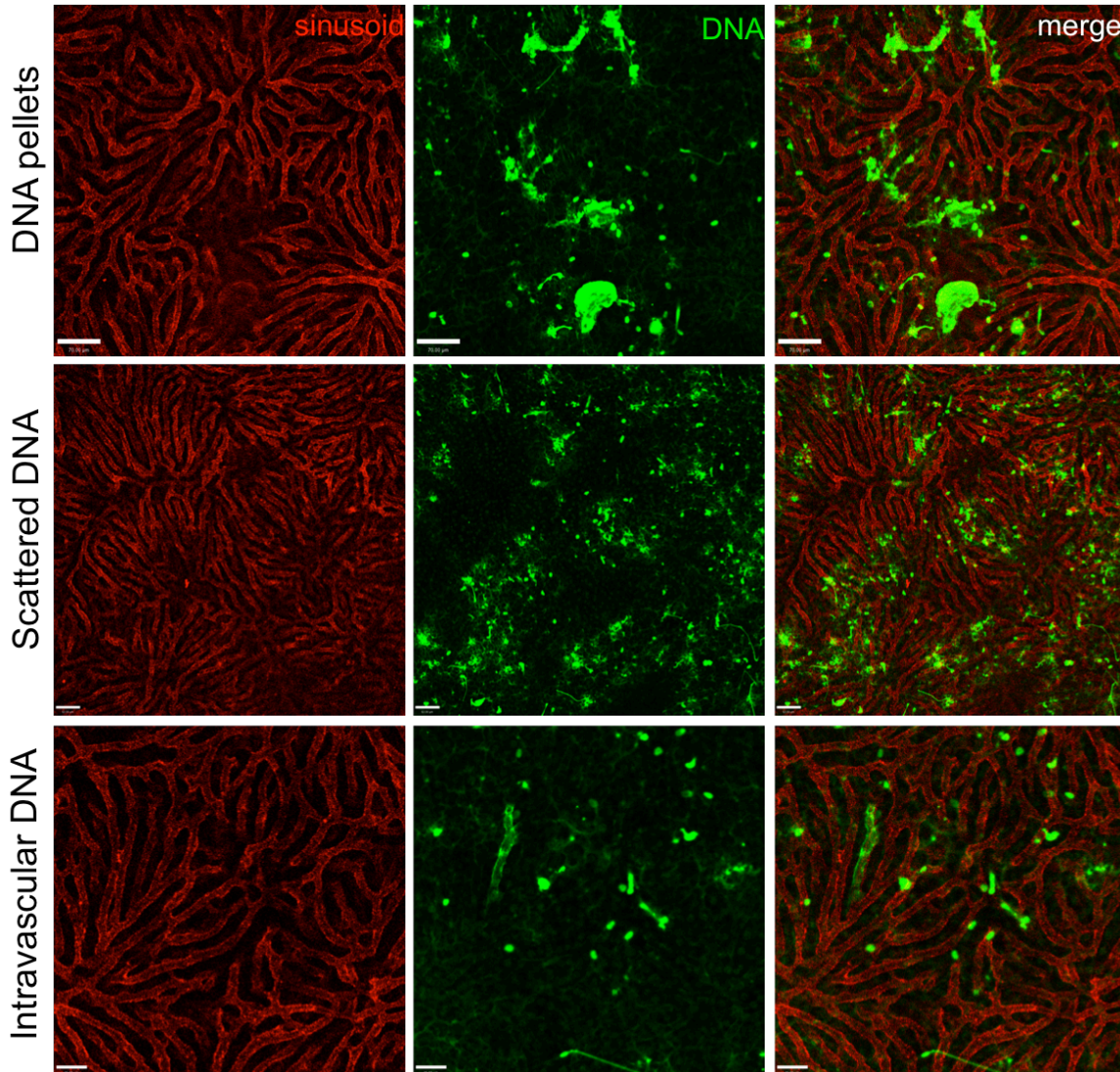
**Figura 4. Deposição de DNA extracelular no fígado de animais sépticos 12 e 24 horas após cirurgia de CLP**

A) Microscopia intravital do fígado de animais sham-operados e que foram submetidos à cirurgia de CLP, evidenciando sinusóides (vermelho) e DNA extracelular (verde). A barra de escala representa 120µm. B) Quantificação digital da área coberta por DNA utilizando o programa ImageJ.

\* p < 0,05 em relação ao grupo sham.

### **5.5 DNA extracelular no fígado apresenta diferentes padrões de deposição**

Ao analisar a deposição progressiva de DNA no fígado de animais sépticos, percebemos que existia três diferentes padrões de deposição de DNA. Foi observado uma deposição mais concentrada, formando um aglomerado de DNA, com tamanhos variáveis; um padrão mais difuso, formando uma espécie de rede que abrange uma área mais extensa da vasculatura hepática e DNA intravascular, visualizado nitidamente dentro dos sinusoides. A presença desses diferentes padrões foram mais frequentes na 24<sup>a</sup> hora, na qual a deposição de DNA é maior.



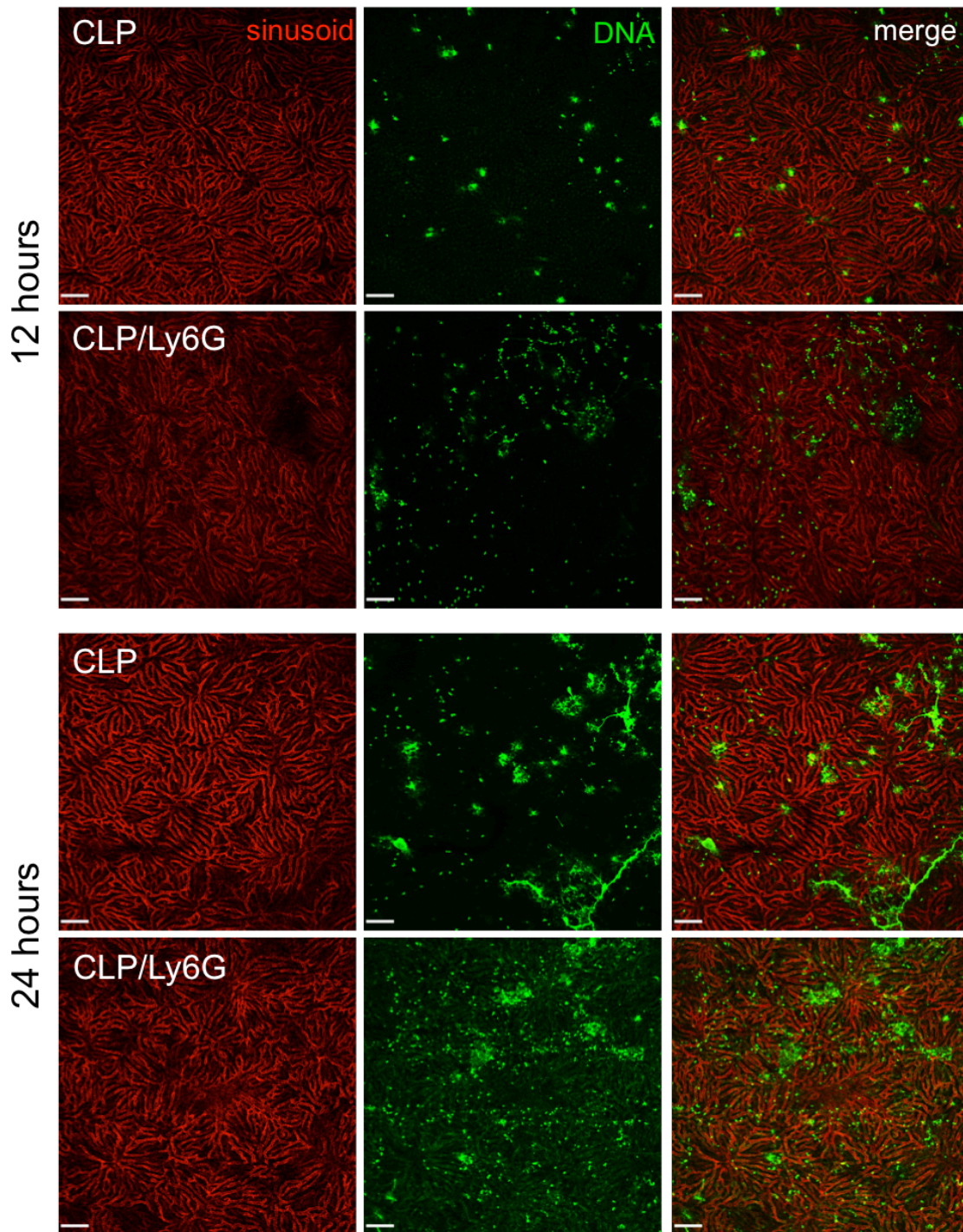
**Figura 5. Três diferentes padrões de DNA extracelular no fígado de animais sépticos: Aglomerados de DNA, DNA difuso e DNA intravascular**

Microscopia intravital do fígado evidenciando diferentes padrões de DNA, incluindo aglomerados de DNA (primeira linha; a barra de escala representa 70 $\mu$ m), DNA difuso (segunda linha; 62  $\mu$ m) e DNA intravascular (terceira linha; 36  $\mu$ m). Os sinusóides são mostrados em vermelho e o DNA extracelular em verde.



## **5.6 DNA extracelular observado no fígado não é NETs**

Visando investigar se o DNA extracelular observado no fígado é proveniente de neutrófilos ou mais precisamente, das armadilhas extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*; NETs), eliminamos os neutrófilos. Quando submetidos a cirurgia de CLP, mesmo na ausência de neutrófilos (anti-Ly6G) ainda observamos um acúmulo de DNA extracelular no fígado desses animais, tanto 12 quanto 24 horas após a cirurgia. Esse resultado nos leva a concluir que, em nosso modelo, o DNA observado no fígado não é NETs.

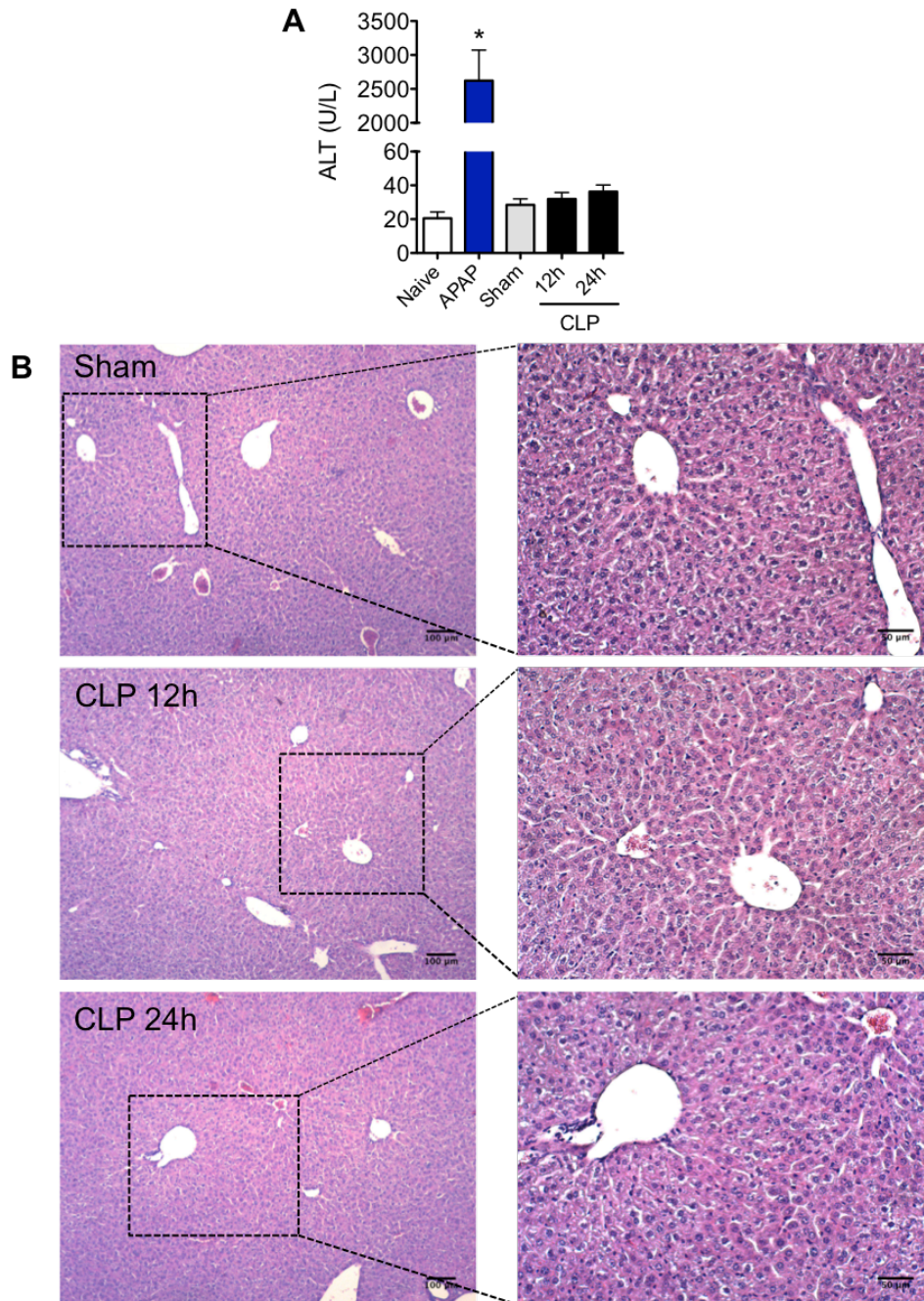


**Figura 6. Deposição de DNA extracelular no fígado não altera na ausência de neutrófilos**

Microscopia intravital do fígado de animais foram submetidos à cirurgia de CLP 12 e 24 horas após a cirurgia. Animais CLP/Ly6G tiveram neutrófilos eliminados com anticorpo anti-Ly6G (100 µg/dose, clone 1A8; BioXCell), 12 horas e imediatamente antes dos animais serem submetidos à cirurgia. Microscopia evidenciando sinusóides (vermelho) e DNA extracelular (verde).

## **5.7 DNA extracelular não é proveniente da necrose de hepatócitos**

Na busca de determinar a fonte do DNA extracelular presente no fígado, investigamos se durante a sepse poderia estar ocorrendo uma lesão hepática e, este DNA extracelular observado, ser proveniente de necrose de hepatócitos. Para isso, dosamos a atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT), de origem citoplasmática, localizada principalmente no fígado. O aumento de seus níveis séricos está associado à necrose ou dano à membrana do hepatócito. Em um modelo de lesão hepática característica, como a causada por sobredose de paracetamol (APAP), os animais apresentam níveis elevados de ALT, chegando a 2500 unidades por litro. Já no modelo de sepse podemos observar que os animais não apresentaram lesão hepática significativa, uma vez que não observamos níveis elevados de ALT 12 ou 24 horas após a cirurgia. Corroborando com o dado de ALT, a histologia do fígado destes animais evidencia um parênquima hepático bem homogêneo e bem conservado, sem indícios de lesão hepática.

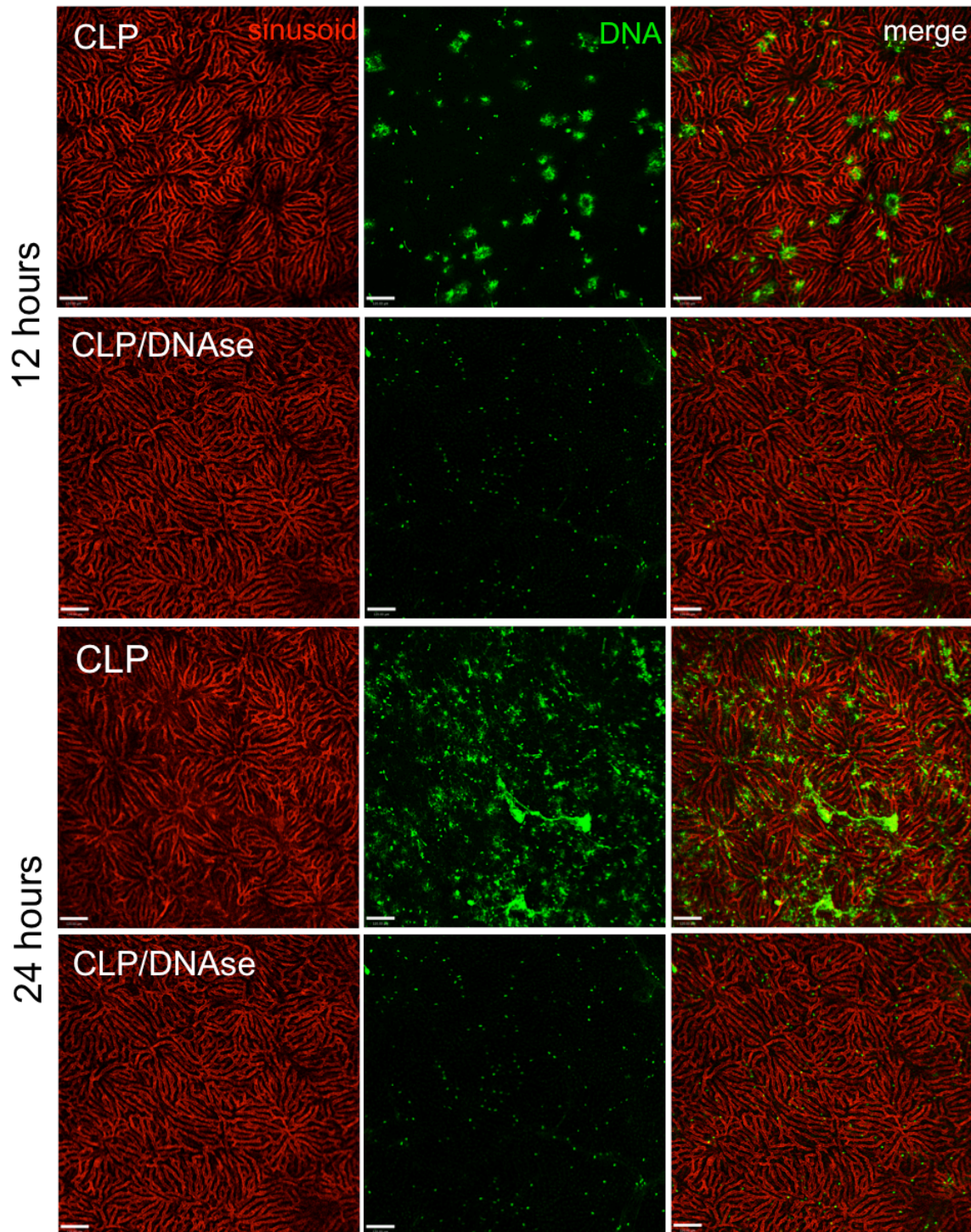


**Figura 7. Animais sépticos não apresentam lesão hepática evidente.**

A) Dosagem da atividade de ALT no soro dos animais (Kit Transaminase ALT cinético - Bioclin). APAP foi administrado por via oral (gavagem), dissolvido em salina aquecida na dose de 500mg/Kg. B) Cortes histológicos representativos do fígado de animais Sham-operados e submetidos a cirurgia de CLP. Fígados foram fixados em formaldeído e processados para histologia. Cortes de 5µm de espessura foram obtidos e corados com H&E. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo Naive.

### **5.8 A administração intravenosa de DNase reduz o DNA extracelular no fígado**

A fim eliminar o DNA para então analisar a progressão da sepse na ausência de DNA extracelular, os animais foram tratados com DNase (dose de 1000U) duas horas após a cirurgia de CLP e posteriormente de 6 em 6 horas até a eutanásia. A microscopia intravital evidencia que esse tratamento com DNase reduz de forma considerável o DNA extracelular presente no fígado de animais submetidos a CLP, tanto 12 quanto 24 horas após a cirurgia. Esses dados nos mostra que o tratamento com DNase nas doses e tempos determinados é efetivo na eliminação do DNA.

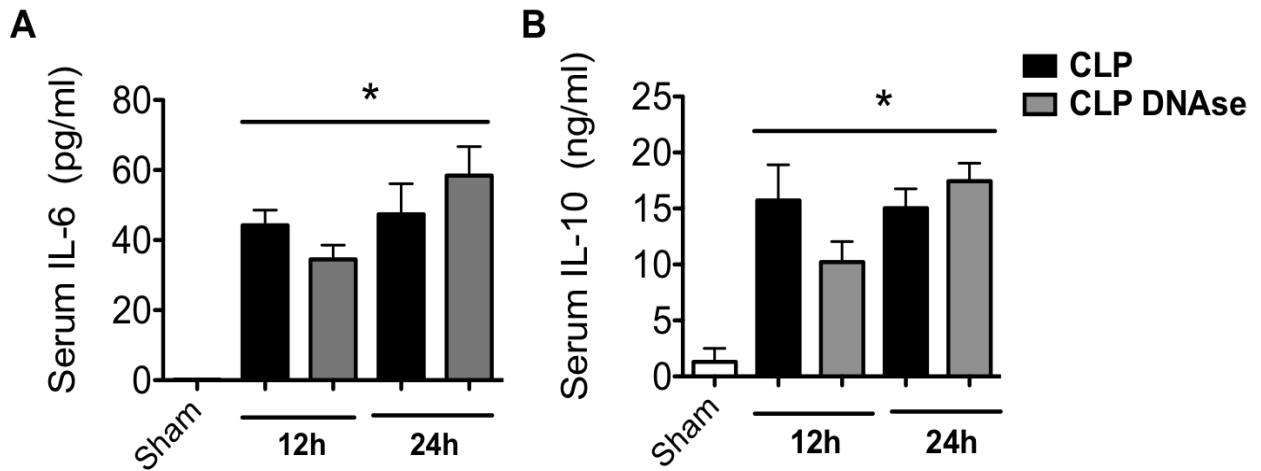


**Figura 8. Redução do DNA extracelular no fígado pelo tratamento com DNase**

Microscopia intravital do fígado de animais submetidos à cirurgia de CLP, tratados ou não com DNase. Microscopia evidenciando sinusóides (vermelho) e DNA extracelular (verde). A barra de escala representa 120 $\mu$ m.

## **5.9 Tratamento com DNase não altera o perfil inflamatório dos animais sépticos**

Para verificar se o tratamento com DNase poderia interferir na resposta inflamatória durante a sepse, dosamos novamente os níveis séricos de IL-6 e IL-10, incluindo agora animais sépticos tratados com DNase. O tratamento com DNase não foi capaz de alterar o perfil inflamatório dos animais, uma vez que nenhuma diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados com DNase foi observada nos tempos analisados. Isso nos leva a sugerir que o DNA não está contribuindo de forma significativa para o processo inflamatório gerado em nosso modelo.



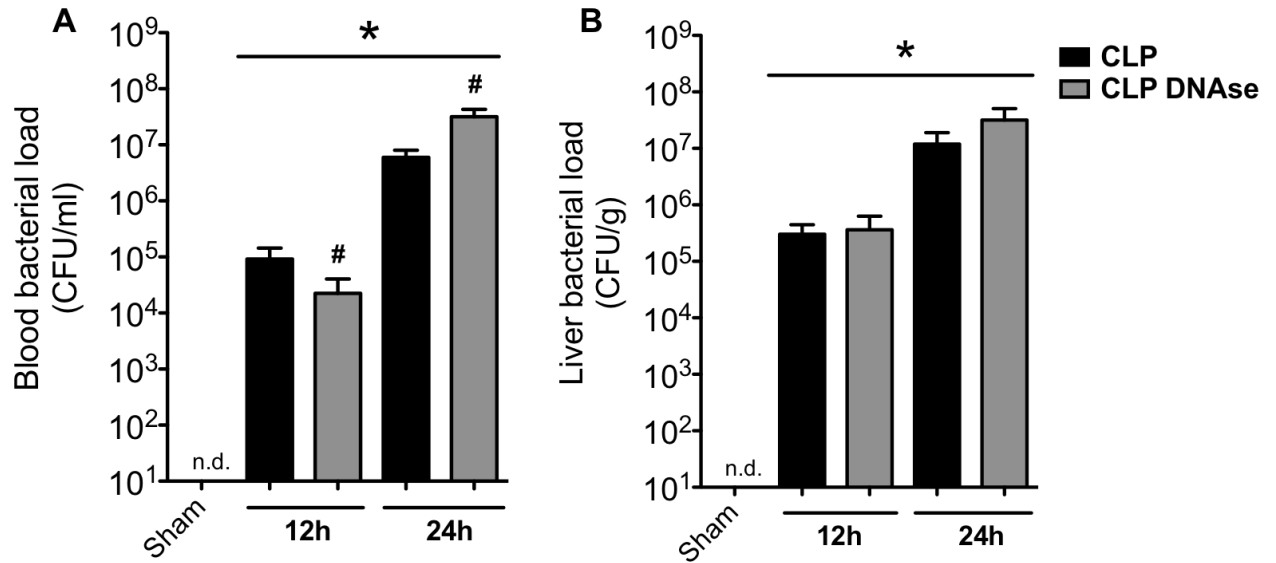
**Figura 9. Os níveis de citocinas séricas não alteram com tratamento de DNase**

Dosagem sérica de citocinas de animais sépticos tratados ou não com DNase pela técnica de ELISA, 12 e 24 horas após cirurgia. A) Dosagem sérica de IL-6 e B) Dosagem sérica de IL-10. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham.



### **5.10 A administração de DNase altera a disseminação bacteriana no sangue, mas não no fígado**

Por fim, avaliamos se a administração de DNase tem efeito na propagação bacteriana e, para isso, determinamos novamente o número CFU no sangue e no fígado dos animais. No sangue, o tratamento com DNase reduziu a bacteremia na 12<sup>a</sup> hora, enquanto que na 24<sup>a</sup> hora, por outro lado, a bacteremia foi maior. Já no fígado, a carga bacteriana dos animais que receberam DNase não foi alterada nos tempos analisados. O aumento da bacteremia observado 24<sup>a</sup> hora sugere que a deposição constante de DNA no fígado é importante no controle da disseminação bacteriana.



**Figura 10. Tratamento com DNase altera a disseminação bacteriana no sangue, mas não no fígado**

Propagação bacteriana avaliada por meio de Unidades formadoras de colônias (CFU) do sangue (A) e fígado (B) dos animais Sham-operados e animais sépticos tratados ou não com DNase, nos tempos de 12 e 24 após a cirurgia. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo sham. #  $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP do seu respectivo tempo.

## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho descrevemos um fenômeno de deposição de DNA extracelular na vasculatura hepática durante a sepse induzida por CLP. Sugerimos que o DNA intrahepático desempenha um papel na contenção da infecção, pois sua eliminação resulta em um aumento da bacteremia em tempos tardios da infecção.

Nosso estudo se iniciou com a padronização de um modelo de sepse. Diferentes modelos experimentais já foram desenvolvidos e contribuem significativamente para melhor entendimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro durante uma infecção. CLP é o modelo mais amplamente utilizado e considerado padrão ouro nas pesquisas de sepse. Além disso, é reconhecido como um dos modelos que melhor mimetiza a natureza e o curso da sepse em pacientes (BURAS *et al.*, 2005; RITTIRSCH *et al.*, 2007). Como o ceco é fisiologicamente colonizado por inúmeras bactérias comensais, sua perfuração resulta em peritonite bacteriana aguda, seguida pela liberação de diversas bactérias entéricas para o sangue e consequente ativação de resposta inflamatória sistêmica (RITTIRSCH *et al.*, 2009). Como esperado, usando o modelo de CLP induzimos uma infecção sistêmica com escape de bactérias para o sangue e fígado dos animais (Figura 1). Seis horas após a cirurgia já foi possível detectar níveis elevados de bactérias, número que aumentou rapidamente com o tempo, evidenciando a dificuldade do hospedeiro em conter a infecção.

Os níveis elevados de IL-6 (mediador pró-inflamatório) e IL-10 (mediador anti-inflamatório) no soro dos animais indicam uma perda do controle da resposta inflamatória (Figura 2), que já é bem conhecida durante da sepse. Tal desequilíbrio gera uma resposta inflamatória exagerada e disfuncional, de forma que o equilíbrio correto e a intensidade destas respostas exerce grande influência na sobrevivência do hospedeiro (BURAS *et al.*, 2005). Portanto estratégias para reestabelecer o balanço imunológico do indivíduo são de grande interesse científico e médico.

Corroborando a literatura, além do desequilíbrio da resposta inflamatória, a função hepática também estava comprometida (Figura 3, A). O fígado é um dos

diversos órgãos afetados durante a sepse e sua disfunção é um outro parâmetro que contribui para o agravamento da doença (NESSELER *et al.*, 2012). A perda de função hepática, associada ao descontrole da resposta inflamatória característica da sepse, fazem com que o quadro gerado pela CLP seja grave. Isso foi facilmente observado pela mortalidade de 80% dos animais (Figura 3, B).

Juntos, os resultados até aqui confirmam que os camundongos submetidos à CLP estão sob condições sépticas e em disfunção hepática, possibilitando a investigação da relação entre infecção sistêmica e função hepática.

Sabendo que o fígado é um órgão importante no controle de infecções por via sanguínea e que disfunções hepáticas podem estar associadas ao aumento de susceptibilidade à infecções, focamos nosso estudo nesse órgão. Buscamos, determinar se há liberação de DNA no fígado dos animais submetidos à CLP, semelhante ao observado pelo nosso grupo durante a lesão estéril por medicamento (MARQUES *et al.*, 2015). Percebemos que a medida que a infecção progredia, a liberação/acúmulo de DNA foi ainda maior (Figura 4) e os diferentes padrões de deposição apareceram (Figura 5). A deposição de DNA não foi restrita a nenhuma área específica do fígado, ocorrendo de forma generalizada em todo o órgão. Os padrões de deposição também se apresentaram de forma aleatória e ainda não sabemos se diferentes funções são atribuídas a cada um. Ainda, considerando a constante atividade da DNase sérica na remoção de ácidos nucleicos livres na circulação (LUDWIG *et al.*, 2009), a quantidade de DNA observada em nosso modelo foi o que superou a capacidade de sua eliminação por DNase, sugerindo que quantidades ainda maiores de DNA – indetectáveis em nosso sistema – ocorrem durante a sepse polimicrobiana.

A presença de DNA na vasculatura hepática já foi demonstrada durante endotoxemia induzida por LPS e sepse severa induzida por injeção de *E. Coli*. Foi demonstrado que esse DNA é liberado por neutrófilos e constitui NETs (MCDONALD *et al.*, 2012). Diferente do encontrado por McDonald e colaboradores, em nosso modelo de sepse polimicrobiana induzida por CLP, o DNA no fígado não é derivado da formação de NETs, uma vez que mesmo na ausência de neutrófilos, ainda observamos a deposição de DNA no fígado (Figura

6). Outros trabalhos recentes tem mostrado uma relação entre DNA livre circulante no sangue (cf-DNA) e doenças infecciosas, incluindo a sepse. Os níveis de cf-DNA estão elevados nestas condições, sendo sugerido inclusive, sua utilização potencial como um marcador de diagnóstico (SWARUP & RAJESWARI, 2007; MARGRAF *et al.*, 2008; LOGTERS *et al.*, 2009). Entretanto, muitos desses estudos fazem uma associação direta do cf-DNA às armadilhas extracelulares de neutrófilos, sem utilização de marcações específicas para NETs. Já Hamaguchi e colaboradores demonstraram que em bacteremia severa, induzida por CLP, o cf-DNA observado não é derivado de neutrófilos, mas principalmente de outras células do hospedeiro, apesar do exato mecanismo da sua produção não ter sido elucidado (HAMAGUCHI *et al.*, 2015). Tal estudo reforça ainda mais nosso resultado que, assim como o cf-DNA, o DNA observado no fígado também não é derivado de neutrófilo. Esses dados apontam para uma fonte alternativa de DNA extracelular, que não é derivada de células do sistema imunológico, sugerindo que células parênquimas também poderiam participar ativamente do controle da resposta infecciosa, papel até então atribuído principalmente aos leucócitos.

Considerando que o hepatócito é uma célula que carrega grande quantidade de material genético, hipotetizamos que ele poderia ser a fonte de DNA extracelular observada no fígado e que a liberação de DNA poderia estar ocorrendo por meio da necrose de hepatócitos. Analisamos se há lesão do fígado por ALT e análise histológica e, de acordo com esses dois métodos, não encontramos nenhuma necrose evidente (Figura 7). Tal resultado não exclui a participação de hepatócitos como fonte de DNA em nosso modelo. Como mostrado por Marques e colaboradores, a deposição de DNA observada no fígado após altas doses de paracetamol inicia em tempos que antecedem à necrose e, além disso, experimentos *in vitro* evidenciaram um acúmulo e tráfego de vesículas contendo DNA no citoplasma de hepatócitos sugerindo que o DNA também pode ser liberado a partir de hepatócitos por um mecanismo independente de necrose (MARQUES *et al.*, 2015). Dessa forma, é possível que o hepatócito esteja liberando DNA ativamente, por meio da formação e liberação de vesículas

contendo DNA. Porém mais experimentos são necessários para determinar com clareza a origem do DNA.

É importante notar em nosso estudo que o modelo de sepse resulta em disfunção hepática que não é acompanhada por morte celular. Corroborando isso, um estudo de autópsia de pacientes que morreram de sepse revelou uma discordância entre os exames histológicos e o grau de disfunção orgânica. O grau de lesão no coração, rim, fígado e pulmão dos pacientes não refletiu a gravidade da disfunção observada nesses órgãos (HOTCHKISS *et al.*, 1999). Especula-se que a disfunção de órgãos não acompanhada por lesão em pacientes com sepse pode ser explicada por "hibernação celular", tal como ocorre durante isquemia do miocárdio. Neste caso, a sepse poderia ativar mecanismos de defesa que reduzem processos celulares a níveis básicos e fundamentais (SAWYER & LOSCALZO, 2002; HOTCHKISS & KARL, 2003).

Considerando a carga bacteriana total durante a sepse, é razoável sugerir que o próprio DNA bacteriano poderia contribuir para o acúmulo total de DNA observado em nosso modelo. O trabalho de Hamaguchi nos dá indícios de que possivelmente bactérias não são a fonte de DNA, uma vez que o aumento de cf-DNA observado em animais submetidos a cirurgia de CLP contem quantidades insignificantes de DNA bacteriano mas principalmente DNA de hospedeiro (HAMAGUCHI *et al.*, 2015). Mesmo sabendo que o hepatócito contem a maior quantidade de DNA no fígado, outras populações celulares também podem estar contribuindo para a deposição de DNA, como células endoteliais, as quais já foram descritas sofrerem dano durante o desenvolvimento da sepse (BURAS *et al.*, 2005).

Além da utilização de um corante específico para DNA (Sytox), a redução do DNA intrahepático nos animais que receberam o tratamento com DNase (Figura 8) nos confirma que o material depositado no fígado é realmente DNA, excluindo a possibilidade de que estejamos vendo algum tipo de artefato ou algo que não seja DNA.

O tratamento com DNase como ferramenta experimental durante a sepse ainda é muito controverso na literatura e a maioria dos trabalhos utilizam esse

tratamento a fim de eliminar a participação de NETs. Já foi relatado que a administração de DNase levaria a uma piora em camundongos, agravando a sepse (MENG *et al.*, 2012). Em contraste, foi observado que NETs desempenham papel pró-inflamatório e que a administração de DNase é capaz de proteger contra o dano pulmonar (LUO *et al.*, 2014). Há ainda relato de que as NETs teriam um papel protetor na resposta imune inicial e danoso nos estágios tardios, de forma que somente a administração tardia de DNase melhoraria o curso da doença (MAI *et al.*, 2015).

Em nosso modelo, apesar da ausência do DNA extracelular não alterar a resposta inflamatória gerada no curso da sepse (Figura 9), nossos resultados indicam que o DNA extracelular exerce efeito na bacteremia (Figura 10). De fato, se o DNA depositado no fígado estiver de certa forma contribuindo para o processo inflamatório, esse efeito é indetectável em nosso modelo já que a eliminação com DNase não reduziu os níveis séricos de citocinas. Ainda não sabemos os motivos pelos quais a ausência do DNA reduziu a bacteremia em tempos iniciais, mas o aumento na 24<sup>a</sup> hora indica o possível efeito bactericida do DNA. Esses resultados demonstram que os efeitos da remoção do DNA pela administração de DNase são diferentes de acordo com o tempo analisado e que a deposição constante de DNA possa ser importante para conter a infecção.

Sabe-se que algumas bactérias patogênicas são capazes de produzir DNase extracelular, considerada uma estratégia de virulência empregada por esses patógenos para se evadirem da resposta imune inata (SUMBY *et al.*, 2005; BUCHANAN *et al.*, 2006). Considerando isso, o tratamento com DNase poderia levar a uma mudança de colonização bacteriana, favorecendo a disseminação de bactérias que não possuem a capacidade de produzir DNase a se evadirem do DNA extracelular do hospedeiro. Isso reforça ainda mais a nossa hipótese de que o DNA está atuando como mecanismo microbicida acessório.

A cultura de sangue é um método amplamente utilizado para diagnóstico de infecções sistêmicas. Entretanto, diversos estudos buscam padronizar novos métodos para garantir um diagnóstico mais preciso, uma vez que muitas bactérias não são cultiváveis e apresentam crescimento lento, parâmetros que dificultam

sua identificação pelos métodos de cultura (MANCINI *et al.*, 2010). Uma alternativa é o uso de métodos moleculares, como a identificação do DNA bacteriano por meio da amplificação por PCR em tempo real (qPCR) do gene que codifica a região 15S do RNA ribossomal, considerado marcador universal bacteriano (REIER-NILSEN *et al.*, 2009). Em nosso trabalho, utilizamos apenas método de cultura aeróbico e, considerando que parte das bactérias que habitam o intestino são anaeróbicas (GUARNER & MALAGELADA, 2003), é necessário a utilização de métodos complementares à cultura, de forma a confirmar a carga bacteriana bem como as alterações geradas pelo tratamento com DNase.

Em suma, nosso trabalho identificou a deposição de DNA extracelular como um novo processo imunológico durante a sepse. Essa estratégia parece ser um mecanismo auxiliar para o controle da infecção sistêmica, com mínimos efeitos pró-inflamatórios no hospedeiro. Nossos dados ajudam na compreensão dos mecanismos de interação microbiota-hospedeiro, sugerindo que células parenquimais podem agir em conjunto com o sistema imunológico na manutenção e restabelecimento da homeostase.



## 7. CONCLUSÕES

Podemos concluir com este trabalho que:

- Sepsis induz deposição de DNA extracelular no fígado
- O DNA extracelular depositado no fígado não é derivado de neutrófilos (NETs)
- A liberação de DNA é independente da necrose de hepatócito
- A deposição hepática de DNA pode agir como um mecanismo alternativo no controle da disseminação bacteriana durante a sepsis.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGUS, D. C.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M. R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, v. 29, n. 7, p. 1303-10, Jul 2001.

ARVANITI, V.; D'AMICO, G.; FEDE, G.; MANOUSOU, P.; TSOCHATZIS, E.; PLEGUEZUELO, M.; BURROUGHES, A. K. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p. 1246-56, 1256 e1-5, Oct 2010.

BALMER, M. L.; SLACK, E.; DE GOTTARDI, A.; LAWSON, M. A.; HAPFELMEIER, S.; MIELE, L.; GRIECO, A.; VAN VLIERBERGHE, H.; FAHRNER, R.; PATUTO, N.; BERNSMEIER, C.; RONCHI, F.; WYSS, M.; STROKA, D.; DICKGREBER, N.; HEIM, M. H.; MCCOY, K. D.; MACPHERSON, A. J. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 237, p. 237ra66, May 21 2014.

BARRAT, F. J.; MEEKER, T.; GREGORIO, J.; CHAN, J. H.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; CHANG, B.; DURAMAD, O.; COFFMAN, R. L. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. **J Exp Med**, v. 202, n. 8, p. 1131-9, Oct 17 2005.

BEYER, C.; STEARNS, N. A.; GIESSL, A.; DISTLER, J. H.; SCHETT, G.; PISETSKY, D. S. The extracellular release of DNA and HMGB1 from Jurkat T cells during in vitro necrotic cell death. **Innate Immun**, v. 18, n. 5, p. 727-37, Oct 2012.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUS, W. A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J.; COMMITTEE, A. S. C. C. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. **Chest**, v. 136, n. 5 Suppl, p. e28, Nov 2009.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 5 2004.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? **J Cell Biol**, v. 198, n. 5, p. 773-83, Sep 3 2012.

BUCHANAN, J. T.; SIMPSON, A. J.; AZIZ, R. K.; LIU, G. Y.; KRISTIAN, S. A.; KOTB, M.; FERAMISCO, J.; NIZET, V. DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. **Curr Biol**, v. 16, n. 4, p. 396-400, Feb 21 2006.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 10, p. 854-65, Oct 2005.

CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 12, p. 826-37, Dec 2010.

DALEY, J. M.; THOMAY, A. A.; CONNOLLY, M. D.; REICHNER, J. S.; ALBINA, J. E. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 1, p. 64-70, Jan 2008.

GENTRIC, G.; CELTON-MORIZUR, S.; DESDOUETS, C. Polyploidy and liver proliferation. **Clin Res Hepatol Gastroenterol**, v. 36, n. 1, p. 29-34, Feb 2012.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 512-9, Feb 8 2003.

GUPTA, S. Hepatic polyploidy and liver growth control. **Semin Cancer Biol**, v. 10, n. 3, p. 161-71, Jun 2000.

GUSTOT, T.; DURAND, F.; LEBREC, D.; VINCENT, J. L.; MOREAU, R. Severe sepsis in cirrhosis. **Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 2022-33, Dec 2009.

HALVERSON, T. W.; WILTON, M.; POON, K. K.; PETRI, B.; LEWENZA, S. DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 1, p. e1004593, Jan 2015.

HAMAGUCHI, S.; AKEDA, Y.; YAMAMOTO, N.; SEKI, M.; YAMAMOTO, K.; OISHI, K.; TOMONO, K. Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 614518, 2015.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N Engl J Med**, v. 348, n. 2, p. 138-50, Jan 9 2003.

HOTCHKISS, R. S.; SWANSON, P. E.; FREEMAN, B. D.; TINSLEY, K. W.; COBB, J. P.; MATUSCHAK, G. M.; BUCHMAN, T. G.; KARL, I. E. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. **Crit Care Med**, v. 27, n. 7, p. 1230-51, Jul 1999.

JENNE, C. N.; KUBES, P. Immune surveillance by the liver. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 996-1006, Oct 2013.

KONO, H.; ROCK, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 4, p. 279-89, Apr 2008.

KUDRYAVTSEV, B. N.; KUDRYAVTSEVA, M. V.; SAKUTA, G. A.; STEIN, G. I. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, v. 64, n. 6, p. 387-93, 1993.

LAPPANN, M.; DANHOF, S.; GUENTHER, F.; OLIVARES-FLOREZ, S.; MORDHORST, I. L.; VOGEL, U. In vitro resistance mechanisms of *Neisseria meningitidis* against neutrophil extracellular traps. **Mol Microbiol**, v. 89, n. 3, p. 433-49, Aug 2013.

LOGTERS, T.; PAUNEL-GORGULU, A.; ZILKENS, C.; ALTRICHTER, J.; SCHOLZ, M.; THELEN, S.; KRAUSPE, R.; MARGRAF, S.; JERI, T.; WINDOLF, J.; JAGER, M. Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis. **J Orthop Res**, v. 27, n. 11, p. 1401-7, Nov 2009.

LUDWIG, S.; MANNHERZ, H. G.; SCHMITT, S.; SCHAFFER, M.; ZENTGRAF, H.; NAPIREI, M. Murine serum deoxyribonuclease 1 (Dnase1) activity partly originates from the liver. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 5, p. 1079-93, May 2009.

LUO, L.; ZHANG, S.; WANG, Y.; RAHMAN, M.; SYK, I.; ZHANG, E.; THORLACIUS, H. Proinflammatory role of neutrophil extracellular traps in abdominal sepsis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 307, n. 7, p. L586-96, Oct 1 2014.

MAI, S. H.; KHAN, M.; DWIVEDI, D. J.; ROSS, C. A.; ZHOU, J.; GOULD, T. J.; GROSS, P. L.; WEITZ, J. I.; FOX-ROBICHAUD, A. E.; LIAW, P. C.; CANADIAN CRITICAL CARE TRANSLATIONAL BIOLOGY, G. Delayed but not Early Treatment with DNase Reduces Organ Damage and Improves Outcome in a Murine Model of Sepsis. **Shock**, v. 44, n. 2, p. 166-72, Aug 2015.

MANCINI, N.; CARLETTI, S.; GHIDOLI, N.; CICHERO, P.; BURIONI, R.; CLEMENTI, M. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 1, p. 235-51, Jan 2010.

MARGRAF, S.; LOGTERS, T.; REIPEN, J.; ALTRICHTER, J.; SCHOLZ, M.; WINDOLF, J. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. **Shock**, v. 30, n. 4, p. 352-8, Oct 2008.

MARQUES, P. E.; OLIVEIRA, A. G.; PEREIRA, R. V.; DAVID, B. A.; GOMIDES, L. F.; SARAIVA, A. M.; PIRES, D. A.; NOVAES, J. T.; PATRICIO, D. O.; CISALPINO, D.; MENEZES-GARCIA, Z.; LEEVY, W. M.; CHAPMAN, S. E.; MAHECHA, G.; MARQUES, R. E.; GUABIRABA, R.; MARTINS, V. P.; SOUZA, D. G.; MANSUR, D. S.; TEIXEIRA, M. M.; LEITE, M. F.; MENEZES, G. B. Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 348-60, Jan 2015.

MCDONALD, B.; URRUTIA, R.; YIPP, B. G.; JENNE, C. N.; KUBES, P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 3, p. 324-33, Sep 13 2012.

MENEGAZZI, R.; DECLEVA, E.; DRI, P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? **Blood**, v. 119, n. 5, p. 1214-6, Feb 2 2012.

MENG, W.; PAUNEL-GORGULU, A.; FLOHE, S.; HOFFMANN, A.; WITTE, I.; MACKENZIE, C.; BALDUS, S. E.; WINDOLF, J.; LOGTERS, T. T. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. **Crit Care**, v. 16, n. 4, p. R137, 2012.

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 11, p. e1000213, Nov 2008.

NASTOS, C.; KALIMERIS, K.; PAPOUTSIDAKIS, N.; TASOULIS, M. K.; LYKOUDIS, P. M.; THEODORAKI, K.; NASTOU, D.; SMYRNIOTIS, V.; ARKADOPOULOS, N. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 906965, 2014.

NESSELER, N.; LAUNEY, Y.; ANINAT, C.; MOREL, F.; MALLEDANT, Y.; SEGUIN, P. Clinical review: The liver in sepsis. **Crit Care**, v. 16, n. 5, p. 235, 2012.

NG, T. H.; CHANG, S. H.; WU, M. H.; WANG, H. C. Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. **Dev Comp Immunol**, v. 41, n. 4, p. 644-51, Dec 2013.

NG, T. H.; WU, M. H.; CHANG, S. H.; AOKI, T.; WANG, H. C. The DNA fibers of shrimp hemocyte extracellular traps are essential for the clearance of *Escherichia coli*. **Dev Comp Immunol**, v. 48, n. 1, p. 229-33, Jan 2015.

PALIC, D.; OSTOJIC, J.; ANDREASEN, C. B.; ROTH, J. A. Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. **Dev Comp Immunol**, v. 31, n. 8, p. 805-16, 2007.

PALUDAN, S. R.; BOWIE, A. G. Immune sensing of DNA. **Immunity**, v. 38, n. 5, p. 870-80, May 23 2013.

PARSEGHIAN, M. H.; LUHRS, K. A. Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity. **Biochem Cell Biol**, v. 84, n. 4, p. 589-604, Aug 2006.

PUGIN, J. How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. **Ann Intensive Care**, v. 2, n. 1, p. 27, 2012.

REIER-NILSEN, T.; FARSTAD, T.; NAKSTAD, B.; LAUVRAK, V.; STEINBAKK, M. Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. **BMC Pediatr**, v. 9, p. 5, 2009.

RICHARDS, R. C.; O'NEIL, D. B.; THIBAUT, P.; EWART, K. V. Histone H1: an antimicrobial protein of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 284, n. 3, p. 549-55, Jun 15 2001.

RITTIRSCH, D.; HOESEL, L. M.; WARD, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **J Leukoc Biol**, v. 81, n. 1, p. 137-43, Jan 2007.

RITTIRSCH, D.; HUBER-LANG, M. S.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nat Protoc**, v. 4, n. 1, p. 31-6, 2009.

SAWYER, D. B.; LOSCALZO, J. Myocardial hibernation: restorative or preterminal sleep? **Circulation**, v. 105, n. 13, p. 1517-9, Apr 2 2002.

SMITH, B. W.; ADAMS, L. A. Non-alcoholic fatty liver disease. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 48, n. 3, p. 97-113, May-Jun 2011.

SUMBY, P.; BARBIAN, K. D.; GARDNER, D. J.; WHITNEY, A. R.; WELTY, D. M.; LONG, R. D.; BAILEY, J. R.; PARNELL, M. J.; HOE, N. P.; ADAMS, G. G.; DELEO, F. R.; MUSSER, J. M. Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 5, p. 1679-84, Feb 1 2005.

SWARUP, V.; RAJESWARI, M. R. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. **FEBS Lett**, v. 581, n. 5, p. 795-9, Mar 6 2007.

THOMSON, A. W.; KNOLLE, P. A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 11, p. 753-66, Nov 2010.

TUJIOS, S.; FONTANA, R. J. Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 8, n. 4, p. 202-11, Apr 2011.

URBAN, C. F.; ERMERT, D.; SCHMID, M.; ABU-ABED, U.; GOOSMANN, C.; NACKEN, W.; BRINKMANN, V.; JUNGBLUT, P. R.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 10, p. e1000639, Oct 2009.

VINCENT, J. L.; RELLO, J.; MARSHALL, J.; SILVA, E.; ANZUETO, A.; MARTIN, C. D.; MORENO, R.; LIPMAN, J.; GOMERSALL, C.; SAKR, Y.; REINHART, K.; INVESTIGATORS, E. I. G. O. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **JAMA**, v. 302, n. 21, p. 2323-9, Dec 2 2009.

ZEMP, F. J.; WATERHOUSE, C. C.; KUBES, P. Many fences make better neighbors. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 237, p. 237fs22, May 21 2014.