

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**O Papel das células T reguladoras no  
desenvolvimento da imunossupressão  
durante a sepse grave experimental**

Daniele Carvalho Bernardo Nascimento

**Ribeirão Preto-SP  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**O Papel das células T reguladoras no  
desenvolvimento da imunossupressão durante  
a sepse grave experimental**

Daniele Carvalho Bernardo Nascimento

Ribeirão Preto-SP-Brasil  
2008

Daniele Carvalho Bernardo Nascimento

**O Papel das células T reguladoras no  
desenvolvimento da imunossupressão durante  
a sepse grave experimental**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha

Co-Orientador: Prof. Dr. João Santana da Silva

Ribeirão Preto-SP-Brasil  
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Nascimento, Daniele Carvalho Bernardo.

O papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental. Ribeirão Preto, 2006.

100 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Cunha, Fernando de Queiróz.

1. Sepse grave. 2. Imunossupressão. 3. Células T reguladoras. 4. GITR.

Daniele Carvalho Bernardo Nascimento

**O Papel das células T reguladoras no  
desenvolvimento da imunossupressão  
durante a sepse grave experimental**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências - Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

**Aprovado em 30 de Abril de 2008**

**Banca examinadora**

---

Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha  
FMRP-USP

---

Prof. Dr. Dário Simões Zamboni  
FMRP-USP

---

Prof. Dr. Reinaldo Salomão  
UNIFESP

**Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e dor do Departamento de Farmacologia e associado a área de Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da CNPq.**

## DEDICATÓRIA

### À minha amada família

Aos meus pais, **Aliomar** e **Sônia**, pelo amor, confiança, conselhos, apoio e serenidade em todas as atitudes. Por me ensinarem que honestidade, humildade e perseverança são fundamentais para que possamos crescer e sermos respeitados. Muito obrigada pela nossa família.

Aos meus irmãos, **Juliane** e **Gustavo**, meus eternos companheiros, meus cúmplices.

Obrigada pela força e pela união incondicional de vocês!

À **Deus** por estar sempre comigo.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo amor e sustentação em todos os momentos da minha vida.

Ao **Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha**, pela orientação, por permitir meu crescimento na área profissional, pela confiança em meu trabalho, pelo apoio nas decisões mais difíceis e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Um exemplo de amor, dedicação à pesquisa e competência. Obrigada!

Ao **Prof. Dr. João Santana da Silva**, pela co-orientação e auxílio para a realização desse trabalho. Agradeço imensamente por toda ajuda que me deu no início da realização desse sonho. Obrigada!

Ao **Dr. José Carlos Alves-Filho**, por todo auxílio, disponibilidade e contribuição para a realização deste trabalho, como também na minha formação. Ainda, tenho muito a agradecer à grande amigo que encontrei. Obrigada por tudo! É mesmo longe ainda temos muito a trabalhar!

Ao **Prof. Dr. Reinaldo Salomão (EPM-UNIFESP)**, pela disponibilidade de participar da minha banca examinadora e pela atenção.

Ao **Prof. Dr. Dário Simões Zamboni (FMRP-USP)**, pelo gentil fornecimento da bactéria *Legionella pneumophila*, sua colaboração que muito contribuiu para a elaboração deste estudo, além da sua disponibilidade de participar da minha banca examinadora e pela atenção.

Agradeço desde já a possível disponibilidade dos suplentes **Prof. Dr. Júlio César Voltarelli (FMRP-USP)**, **Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi (FMRP-USP)** e **Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol (UNASAU-UNESC)**.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira**, pela oportunidade de conviver com um cientista brilhante.

A minha **família**, que sempre acreditou e torceu por mim.

A **Fabiane Sônego**, pela participação durante todo o trabalho, por sua imensa ajuda em vários momentos dessa jornada e principalmente pela amizade.

A **Sandra Fukada Alves**, pela sua participação, contribuição, ajuda durante a realização deste trabalho e por sua amizade.

A **Vanessa Carregaro Pereira**, que tive a feliz oportunidade de conhecer um pouco melhor, pela sua imprescindível ajuda nos momentos que necessitei e amizade.

Ao **Marcelo Pereira**, pela contribuição nos experimentos utilizando a bactéria *Legionella pneumophila* e por sua amizade.

A **Luciana Benevides**, pela convivência, amizade e pronta disponibilidade em todos os momentos em que necessitei.

As amigas **Paula Bambim Donate, Andressa de Freitas, Daniela Dal Secco, Manuela Pucca**, pelos momentos de alegria compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Inflamação e Dor, **Francine Bianchini, Fernando Spiller, Henrique Lemos, Thiago Garlet, Daniela Carlos, Dionéia Araldi, Fabrício Souto, Silvia Trevelin, Mônica Molina, Michel Carvalho, Thiago M. Cunha, Renata Grespan, Silvio Vieira, Mani Funez, Paulo Nascimento, Waldiceu Verri Jr, Elisabeth Thing, Guilherme de Souza, Luiz Fernando Ferrari, Flávia Lima, Ana Tereza Guerrero, Rafaela Matos, Maria Orrico, Marina Suavinha, Danilo Magro**, com quem pude compartilhar momentos únicos de aprendizado, alegrias, medos, insegurança, conquistas e incentivo no desenvolvimento deste trabalho e pelas horas de lazer.

As novas alunas do laboratório de Inflamação e Dor, **Paula G. Czaikoski e Larissa Pinto** com quem pude em pouco tempo compartilhar momentos alegres, divertidos, com muita dose de trabalho.

A **Ana Kátia dos Santos**, pela amizade, convívio e auxílio técnico.

A **Giuliana Bertozzi Francisco**, por sua ajuda profissional nos ensaios de ELISA, pelo convívio e pela amizade.

A **Fabíola Leslie A. C. Mestriner**, pela sua competência, amizade e dedicação. Muito obrigada pela força nesses momentos finais.

A **Diva Amabile Montanha de Sousa**, pela sua alegria contagiante, dedicação e amizade.

Ao **Sérgio Roberto Rosa** e a **Ieda Regina dos Santos Schivo** pela atenção e pela responsabilidade.

Ao **Walter Miguel Turato**, pela amizade, perfeição, disponibilidade e carinho com que fez seu trabalho me ajudando em todos os experimentos de citometria de fluxo.

Aos funcionários do biotério do Departamento de Genética: **Júlio Siqueira, Cristiana Ribas, Rubens Campos**; e do Departamento de Farmacologia: **Eliana Barros e Maria Inês Nemoto**, pela atenção e cuidado com os animais, que foi fundamental para a qualidade deste trabalho.

Ao **Acácio Cardoso** e **Valéria Squissato** pela atenção nas resoluções burocráticas e amizade.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, que me acolheram de braços abertos e pelo convívio. Deixo aqui meu especial agradecimento a todos vocês.

Aos professores do curso de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pelo empenho constante para manter o nível de excelência de nosso curso.

À **Ana Cristina S. Ferreira**, secretária da pós-graduação, não apenas pela competência com que realiza seu trabalho e pelos anos de dedicação à nossa pós-graduação, como também pela amizade e ajuda incondicional. Obrigada por tudo!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (**FAEPA**) pela concessão dos recursos para a realização deste trabalho.

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."

(Chico Xavier)

## Sumário

✂ O Papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental

---

## SUMÁRIO

Assunto	Página
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1. SEPSE.....	02
1.1.1. Considerações gerais e definições.....	02
1.1.2. Epidemiologia.....	03
1.1.3. Fisiopatologia da Sepses.....	04
1.1.4. Imunossupressão e sepsis grave.....	05
1.2. CÉLULAS T REGULADORAS.....	06
1.2.1. Considerações gerais.....	06
1.2.2. Células T reguladoras e sepsis grave.....	12
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>14</b>
2.1. Objetivo amplo.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1. Animais.....	18

3.2.	Preparo das soluções e reagentes.....	18
3.2.1.	Solução de Tribromoetanol 2.5 %.....	18
3.2.2.	Solução de Tampão Salina-fosfato (PBS) 10X (Solução Mãe).....	19
3.2.3.	PBS 1X.....	19
3.2.4.	PBS/EDTA (1 mM).....	19
3.2.5.	Líquido de Turk.....	19
3.2.6.	Meio RPMI incompleto.....	19
3.2.7.	Meio RPMI completo.....	20
3.2.8.	Tampão de citometria de fluxo.....	20
3.2.9.	Tampão utilizado na purificação de células.....	20
3.2.10.	Tampão de lise.....	20
3.2.11.	Tampões utilizados para o ensaio de ELISA.....	21
3.3.	Modelo experimental de sepse polimicrobiana grave.....	21
3.4.	Modelo de tratamento com antibiótico.....	22
3.5.	Protocolos experimentais.....	22
3.5.1.	Perfil de animais sépticos e presença de células T reguladoras (Protocolo 1).....	22
3.5.2.	Susceptibilidade de animais sépticos a infecção não-letal por <i>Legionella pneumophila</i> (Protocolo 2).....	23
3.5.3.	Ensaio de proliferação, supressão e viabilidade celular (Protocolo 3).....	23
3.6.	Análise de sobrevivência.....	23
3.7.	Determinação da bacteremia.....	23
3.8.	Análise da massa corporal.....	24
3.9.	Determinação das concentrações séricas de aminotransferase (AST).....	24
3.10.	Quantificação de citocinas por ELISA.....	24
3.11.	Preparação de suspensão celular.....	26
3.12.	Citometria de fluxo.....	26
3.12.1.	Análise da expressão de marcadores de células T reguladoras.....	26
3.12.2.	Análise de apoptose por Anexina V.....	28
3.13.	Ensaio de proliferação de células totais por timidina ( <sup>3</sup> H).....	29
3.14.	Purificação celular para ensaio de proliferação e supressão.....	30
3.15.	Preparação e inoculação da bactéria <i>Legionella pneumophila</i> .....	31
3.15.1.	Bactéria.....	31
3.15.2.	Infecção <i>in vivo</i> .....	32

3.16.	Tratamento com anti-GITR.....	32
3.17.	Análise Estatística.....	32
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
4.1.	Perfil de camundongos C57BL/6 submetidos à sepse grave.....	35
4.1.1.	Sobrevida dos animais sépticos após tratamento com antibiótico.....	35
4.1.2.	Avaliação da bacteremia em animais sépticos tratados com antibiótico.....	36
4.1.3.	Massa corpórea de animais sépticos tratados com antibiótico.....	36
4.1.4.	Análise do parâmetro de dano tecidual em animais sépticos tratados com antibiótico.....	37
4.2.	Avaliação da susceptibilidade de animais sépticos à infecção pulmonar não-letal induzida por <i>legionella pneumophila</i> .....	42
4.3.	Cinética da frequência de células T reguladoras no foco da infecção após indução da sepse grave.....	44
4.4.	Cinética da frequência de células T reguladoras nos órgãos linfóides após a indução da sepse grave.....	49
4.5.	Avaliação das citocinas no foco da infecção.....	52
4.6.	Quantificação dos níveis séricos de citocinas durante a sepse grave.....	54
4.7.	Depleção de células T reguladoras não modula a proliferação das células T CD4 <sup>+</sup> convencionais.....	56
4.8.	As células T reguladoras apresentam papel crucial para o desenvolvimento da imunossupressão.....	63
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>APENDICE.....</b>	<b>97</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>99</b>

**LISTA DE FIGURA NO APÊNDICE**

Figura	Página
1. Padronização da dose do antibiótico Ertapenem Sódico administrada após indução da sepse polimicrobiana grave.....	98

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Sobrevida após indução da sepse polimicrobiana grave com tratamento de antibiótico.....	38
2. Determinação da bacteremia após indução da sepse polimicrobiana grave.....	39
3. Curva de massa corpórea após indução da sepse polimicrobiana grave.	40
4. Concentrações séricas de aspartato-aminotransferase após a sepse polimicrobiana grave.....	41
5. Susceptibilidade de animais sépticos a infecção pulmonar não-letal induzida por <i>Legionella pneumophila</i> .....	43
6. Estratégia de avaliação da expressão de marcadores de células T reguladoras por FACS.....	46
7. Análise da frequência de células T reguladoras no lavado peritoneal após a sepse polimicrobiana grave.....	47
8. Análise da frequência de células T reguladoras no linfonodo mesentérico (drenante) após sepse polimicrobiana grave.....	48
9. Frequência das células T reguladoras no timo após sepse polimicrobiana grave.....	50
10. Frequência de células T reguladoras no baço após sepse polimicrobiana grave.....	51
11. Quantificação de citocinas no lavado peritoneal após indução da sepse polimicrobiana grave.....	53
12. Quantificação de citocinas no sangue após indução da sepse polimicrobiana grave.....	55
13. Anti-GITR e anti-CTLA-4 não modulam a proliferação celular após a sepse polimicrobiana grave.....	59
14. Depleção de células T reguladoras não modula a proliferação de células T CD4 convencionais sépticas.....	60

15. Células T CD4 <sup>+</sup> sépticas não apresentam aumento da frequência de marcadores apoptóticos.....	61
16. Animais CD4 <sup>-/-</sup> hígdos são mais susceptíveis à infecção não letal por <i>Legionella pneumophila</i> .....	62
17. Administração do anticorpo anti-GITR aumenta a sobrevida dos animais submetidos à sepse polimicrobiana grave com tratamento de antibiótico.....	64
18. Administração de anticorpo anti-GITR modula a sobrevida de animais sépticos a infecção não-letal por <i>Legionella pneumophila</i> .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

~	Aproximadamente
Antib.	Antibiótico
APC	Célula apresentadora de antígenos
AST	Aminotransferase
BSA	Albumina derivada de soro bovino
CD	“Cluster of differentiation”
CLP	Ligadura e punção de ceco
CCR	Receptor de quimiocinas CC
CTLA-4	“Cytotoxic T lymphocyte antigen 4”
D.O.	Densidade óptica
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
FACS	citometria de fluxo
FITC	Isoticianato de fluoresceína
FOX	“Forkhead box”
Foxp3	Fator de transcrição “forkhead Box P3”
GITR	Gene relacionado à família do receptor TNF induzido por glucocorticoide
GITR-L	Ligante de GITR
Hígido	Normal “naive”
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Água Oxigenada
IDO	Enzima indoleamina 2.3-dioxigenase
IFN	Interferon
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
Leg.	<i>Legionella pneumoniae</i>
Log	Logaritmo da função matemática
Min	Minuto
NrpI	Neutropilina
NKT	Células “Natural Killer T”
OPD	1,2 ortofenilenodiamino
PBS	“Phosphate buffered salina”
PE	Ficoeritrina
Percp	Clorofilia-peridinina
RPMI	Meio de cultura para células 1640
SBF	Soro bovino fetal
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TGF-β	Fator de crescimento e transformação β
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidades formadoras de colônia
UTIs	Unidades de terapia intensiva
WT	Wide-type (animais selvagens – C57BL/6)
<sup>3</sup> H	Timidina Triciada (“Tritio”)

# Resumo e Abstract

✎ O Papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental

---

## RESUMO

NASCIMENTO, D. C. B. **O papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental.** 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Departamento de Bioquímica e Imunologia, Área de Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica decorrente de uma infecção. Na evolução do processo séptico é comum a ocorrência de uma significativa disfunção cardiovascular e extensa lesão tecidual. Observa-se também uma significativa disfunção imune que contribui para o agravamento do processo séptico e instalação de um quadro de imunossupressão. De fato, estudos recentes demonstraram que tanto em pacientes, como em modelos experimentais de sepse grave, ocorre um quadro de imunossupressão, caracterizado por aumento da frequência de células T reguladoras. Assim, nosso objetivo foi investigar a possível contribuição das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental em modelo murino. Os camundongos C57BL/6 submetidos à sepse grave, pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP), e tratados com antibiótico durante três dias, apresentaram aproximadamente 50 % de sobrevivência. Esses animais sobreviventes do processo séptico são altamente susceptíveis (mortalidade de 100 %) à infecção secundária induzida por *Legionella pneumophila*, 15 dias após a indução da CLP. A cinética da frequência de células T reguladoras ( $CD4^+CD25^+$  e  $Foxp3^+$  ou  $CD103^+$  ou  $CTLA-4^+$  ou  $GITR^+$ ) foi avaliada em tecidos distintos (lavado peritoneal, linfonodo drenante, timo e baço) e em diferentes intervalos de tempo após a indução de sepse grave. Observou-se um aumento na expressão da maioria dos marcadores de células T reguladoras em todos os tecidos analisados, no primeiro dia após a CLP. Posteriormente, a frequência de células T reguladoras reduziu significativamente, com exceção do timo que apresentou aumento em 7 e 15 dias após a CLP e do baço que apresentou aumento novamente em 15 dias após a CLP. No décimo quinto dia, observamos também uma diminuição na capacidade proliferativa das células T  $CD4^+CD25^-$  do baço estimuladas com anticorpo anti-CD3. Nesse período, o comprometimento nas células T  $CD4^+$  não foi revertido *in vitro* utilizando anticorpos anti-CTLA-4 ou anti-GITR, que inibem a atividade das células T reguladoras, sugere-se que esse comprometimento ocorra numa fase inicial do processo séptico. Desta forma, a inibição da atividade supressora das células T reguladoras pelo pré- e pós-tratamento de camundongos sépticos com anticorpo anti-GITR promoveu um aumento da resistência (~ 80 % de sobrevivência) destes animais à infecção não letal. Em conjunto os dados demonstram a contribuição das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave.

**Palavras-chave:** Sepse grave; Imunossupressão; Células T reguladoras; GITR.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, D. C. B. **The role of regulatory T cells in the development of the immunosuppression during experimental severe sepsis.** 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Departamento de Bioquímica e Imunologia, Área de Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sepsis is a systemic inflammatory response caused by infection. In the evolution of the septic process is common to occurrence of significant cardiovascular dysfunction and extensive tissue injury which contributed to the aggravation of the septic process and to the instauration of an immunosuppressive state. In fact, recent studies have shown that a state of immunosuppression was observed in both in critically ill patients and in experimental models of severe sepsis, characterized by increased expression of regulatory T cells. Thus, our aim was to investigate a possible role of regulatory T cells in immune dysfunction seen in experimental severe sepsis. Wild type mice (C57BL/6) were subjected to severe sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) and treated with antibiotic during three days after sepsis, resulting in approximately 50 % of survival. At fifteenth day post-CLP mice were highly susceptible (100 % mortality) to non-lethal secondary pulmonary infection induced by *Legionella pneumophila*. Mice were killed 1, 7, 15 and 30 days after CLP and the kinetic induction of regulatory T cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and Foxp3<sup>+</sup> or CD103<sup>+</sup> or CTLA-4<sup>+</sup> or GITR<sup>+</sup>) were determined in peritoneal exudates, lymph nodes draining, thymus and spleen. At first day post-CLP, a significant increase in expression of all regulatory T cells markers was observed in all analyzed tissues. Thereafter, the regulatory T cells population was reduced significantly, except in thymus in which the regulatory T cells population was increased on day 7 and 15 post-CLP, and in spleen in which the regulatory T cells population increased again on day 15 post-CLP. In the fifteenth day, it was observed a reduced capacity of anti-CD3 to induce spleen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells proliferation. This CD4<sup>+</sup> T cells dysfunction has not been reversed *in vitro* with the use of anti-CTLA-4 or anti-GITR, which inhibits the activity of regulatory T cells. It suggests that the dysfunction happens in an early phase of the septic process. Interestingly, pre-treatment of septic mice with anti-GITR agonistic antibody improve survival (~ 80 % survival) in to non-lethal secondary pulmonary infection induced by *L. pneumophila*. Overall, our studies demonstrated that regulatory T cells contributed to aspects of sepsis-induced development of the immunosuppression.

**Keywords:** Severe sepsis; Immunosuppression; Regulatory T cells; GITR.

# Introdução

✂ O Papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. SEPSE

### 1.1.1. Considerações gerais e definições

Sepse, do grego *sepsin* (putrefação de matérias ou tecidos orgânicos) é um processo infeccioso grave desencadeador de uma intensa resposta inflamatória sistêmica, que medeia lesões tissulares (VERONESI; FOCACCIA, 1996; HOTCHKISS et al., 2003; RIEDEMANN et al., 2003).

Por muito tempo, termos e definições imprecisas foram utilizados nos casos de sepse, dificultando a identificação do quadro real e a instauração de uma terapia precoce (RIEDEMANN et al., 2003). Neste sentido, em 1991, o *American College of Chest Physicians* (ACCP) e a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) realizaram uma conferência de consenso para uniformizar terminologias relacionadas à fisiopatologia e a terapêutica da sepse (BONE et al., 1992a; BONE et al., 1992b).

Desse modo, o termo Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) foi proposto para descrever a reação inflamatória sistêmica desencadeada pelo organismo frente a qualquer agressão infecciosa (causada por bactérias, fungos, parasitas ou vírus) ou não infecciosa (como queimadura, pancreatite, trauma, etc.). Esta resposta se manifesta por duas ou mais das seguintes condições: a) hipertemia (temperatura maior que 38°C) ou hipotermia (temperatura menor que 36°C); b) taquicardia (frequência cardíaca maior que 90 batimentos por min); c) taquipnéia (frequência respiratória maior que 20 respirações por min ou PaCO<sub>2</sub> menor que 32 mmHg); d) contagem dos leucócitos totais no sangue maior que 12.000/mm<sup>3</sup> ou mais de 10% de formas imaturas (bastões) (BONE et al., 1992a; BONE et al., 1992b).

Bacteremia foi definida pela presença de bactérias viáveis no sangue. Sugeriu-se eliminar a nomenclatura septicemia, pois existem diversos significados diferentes na literatura médica (BONE et al., 1992a; BONE et al., 1992b).

O termo sepse foi definido como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) decorrente de uma infecção. A associação desse quadro à disfunção múltipla de órgãos, hipoperfusão ou hipotensão é conhecida como sepse grave. Além disso, choque séptico foi caracterizado por um quadro de sepse com hipotensão apesar de adequada ressuscitação hídrica, associada à presença de anormalidades de perfusão que podem incluir acidose láctica, oligúria ou alteração aguda do estado mental (BONE et al., 1992a; BONE et al., 1992b).

### 1.1.2. Epidemiologia

Atualmente, a sepse grave representa a principal *causa mortis* de origem não cardíaca em UTIs no mundo, e a décima causa de morte nos EUA (ANGUS et al., 2001). Dados do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, EUA) revelaram um aumento de 139% na prevalência de sepse grave nos últimos dez anos, tendo este aumento sido atribuído a fatores, tais como: aumento do número de procedimentos invasivos para diagnóstico e monitorização de pacientes em estado grave; emergência de microrganismos resistentes a antibióticos; e finalmente, o número crescente de pacientes imunossuprimidos que aumentam a predisposição às infecções (BRUN-BUISSON et al., 2004; VICENT et al., 2006).

Estudos recentes realizados nos EUA e no Brasil revelaram que as ocorrências de sepse são estimadas em 750.000 e 400.000 casos por ano, respectivamente. O percentual de mortalidade anual em UTIs, nos EUA, é de aproximadamente 35%, enquanto que no Brasil, o percentual tende a ser mais elevado, chegando a 46.9%. (ANGUS et al., 2001;

ALBERTI et al., 2002; MARTIN et al., 2003; LINDE-ZWIRBLE; ANGUS, 2004; MOSS; MARTIN, 2004; SILVA et al., 2004). Além disso, em ambos os países os custos são calculados em aproximadamente 17 bilhões de dólares por ano (ANGUS et al., 2001; EINLOFT et al, 2002; PAES, 2004; LATIN AMERICAM SEPSIS INSTITUTE). Portanto, a sepse possui grande significância clínica e implicações financeiras, o que atrai grande interesse científico.

### 1.1.3. Fisiopatologia da Sepse

O ser humano é habitado por uma flora microbiana normal, vivendo em equilíbrio dinâmico com milhares de microrganismos existentes na pele e na mucosa do trato gastrointestinal (revisto por VERONESI; FOCACCIA, 1996). Qualquer ruptura desse equilíbrio poderá facilitar a invasão de microrganismo para um local normalmente estéril (tecido, cavidade ou fluido corporal), provocando um processo inflamatório e estabelecimento de focos de infecção e sepse (RIEDEMANN et al., 2003).

O desenvolvimento de um processo inflamatório é uma resposta normal e essencial do hospedeiro contra agentes infecciosos. Acredita-se que o início e a progressão da sepse se devam ao descontrole dessa resposta, com uma maciça e descontrolada ativação de células inflamatórias, resultando numa anarquia metabólica, na qual “*o próprio organismo não consegue controlar o que ele próprio criou*” (BONE et al., 1992a; revisto por VERONESI; FOCACCIA, 1996).

Nesse processo séptico, essas células produzem e secretam sistemicamente mediadores pró-inflamatórios, como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1), etc. Estes são responsáveis pela maioria das alterações fisiopatológicas observadas nos pacientes sépticos e nos modelos experimentais dessa patologia e, estão também correlacionados com aumento da mortalidade na sepse (BONE et al., 1997).

A liberação exacerbada inicial de mediadores pró-inflamatórios é acompanhada por uma resposta compensatória exacerbada de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 10 (IL-10), as quais, estão geralmente associadas a um aumento significativo de suscetibilidade às infecções (BONE et al., 1997). O mecanismo pelo qual a liberação sistêmica de citocinas e de outros fatores são favoráveis ao desenvolvimento do quadro de imunossupressão, esta relacionado a uma diminuição da resposta linfocitária (OSUCHOWSKI et al., 2006; VENET et al., 2005; LE TULZO et al., 2002).

#### **1.1.4. Imunossupressão e sepse grave**

O estado de disfunção imune resultante da sepse grave pode levar à morte rápida ou evoluir para um quadro de imunossupressão (ROMANI et al., 1998; BENJAMIM et al., 2005). Neste sentido, vários estudos clínicos têm demonstrado que pacientes séptico apresentam aumento da susceptibilidade a infecções secundárias, tais como pneumonia (PERL et al., 1995; RIEDEMANN et al., 2003). Alguns pesquisadores demonstraram que os pacientes, ainda no ambiente hospitalar em recuperação da sepse grave, apresentavam uma alta susceptibilidade a infecções oportunistas. Ainda, observaram que estes pacientes apresentavam uma alta mortalidade em até oito anos, por doenças relacionadas ou não às infecções (PERL et al., 1995).

Durante a sepse grave, os mecanismos desencadeadores da imunossupressão ainda não estão totalmente compreendidos. Contudo, esta condição pode ser caracterizada por uma falência do sistema imune, incluindo comprometimento nas funções de monócitos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos (revisto por SHEVACH et al., 2002).

Estudos demonstraram que em modelo experimental de sepse grave (CLP), os camundongos são susceptíveis à infecção secundária induzida por *Aspergillus fumigatus* (BENJAMIM et al., 2003) e por *Pseudomonas aeruginosa* (STEINHAUSER et al., 1999).

Steinhauser e colaboradores justificam que a imunossupressão parece ser decorrente dos altos níveis circulantes de IL-10, uma vez que o pré-tratamento dos animais infectados com anticorpo anti-IL-10 reverteu o estado de imunossupressão (STEINHAUSER et al., 1999). Corroborando estes resultados, Flohe e colaboradores demonstraram em modelo de endotoxemia induzida pela administração sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS), elevação dos níveis de IL-10 secretados pelas células dendríticas do baço. Observou-se, também, que essas células deixaram de secretar IL-12 (citocina importante na diferenciação de linfócitos T). Estas alterações, em conjunto, foram ainda associadas a uma capacidade reduzida de ativar células T CD4<sup>+</sup> (FLOHE et al., 2006).

A IL-10 pode apresentar atividade imunossupressora, pois atua na maturação e na função de apresentação de antígeno de algumas células apresentadoras de antígenos (APCs). Estudos indicam, entretanto, que a IL-10 não é o único componente da resposta imune responsável pelo efeito imunossupressor, sugerindo que as células T reguladoras apresentem um papel chave nesse processo (BHATTACHARYYA et al., 2004).

## **1.2. CÉLULAS T REGULADORAS**

### **1.2.1. Considerações gerais**

As células T reguladoras são células envolvidas na modulação da resposta imune, com ações em três principais situações: na manutenção da tolerância a antígenos próprios (PARIJS; ABBAS, 1998; SAKAGUCHI; SAKAGUCHI, 2000; MADAKAMUTIL et al, 2003), na regulação da imunopatologia desenvolvida pelos hospedeiros a diferentes patógenos (HORI, CARVALHO, DEMENGEOT, 2002; POWRIE et al., 2003) e nos transplantes de órgãos (KARIM et al., 2001).

Essas células capazes de suprimir a resposta imune foram descritas inicialmente em 1970 (GERSON; KONDO, 1970). Elas foram caracterizadas em camundongos como uma pequena população celular T CD4<sup>+</sup> (~ 5 – 10%) que apresenta co-expressão constitutiva da cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (CD25), à qual era crucial para o controle das células T autoreativas *in vivo* (SAKAGUCHI et al., 1995; TAKAHASHI et al., 1998). Uma população com fenótipo e propriedades funcionais idênticas também foi identificada no sangue periférico de humanos saudáveis ou com doença autoimune induzida por células T (LEVINGS et al., 2001; NG et al., 2001; DIECKMAN et al., 2001).

Atualmente, a descoberta do fator de transcrição forkhead Box P3 (Foxp3) como uma molécula fundamental para o desenvolvimento, função, bem como para a manutenção da atividade supressora dessas células possibilitou, juntamente com o CD25, a caracterização fenotípica das células T reguladoras naturais (FONTENOT et al., 2003; HORI; KHATTRI, 2003; WILLIAMS; RUDENSKY, 2007). Os estudos que correlacionavam a expressão de Foxp3 como um fator de transcrição inerente às células T reguladoras foram iniciados a partir de observações de que a mutação no gene que codifica Foxp3 está associada à síndrome de imunodeficiência denominada síndrome ligada ao cromossomo X de disfunção imune, poliendocrinopatia, enteropatia (IPEX em humanos ou *scurf* em camundongos). Os pacientes portadores dessa mutação apresentam doenças autoimunes em múltiplos órgãos, doença inflamatória intestinal, alergia grave incluindo dermatite atópica, alergia alimentar e infecção fatal (BRUNKOW et al., 2001; GAMBINERI et al., 2003). Evidências recentes enfatizam a importância da expressão constante de Foxp3 pelas células T reguladoras, assegurando a função supressora dessas células, as quais por sua vez, são capazes de controlar células T auto-reativas durante toda a vida dos animais. A depleção de Foxp3 resulta na geração de células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> ativadas, as quais produzem citocinas

que induzem a maturação de células dendríticas, ocasionando o desenvolvimento de doenças auto-imunes (KIM; RASMUSSEN; RUDENSKI, 2007).

De maneira semelhante ao Foxp3, hospedeiros com deficiência na produção da citocina IL-2 ou na expressão de seu receptor (CD25, cadeia  $\alpha$  ou CD122, cadeia  $\beta$ ) apresentam doença auto-imune em decorrência a um reduzido número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (HORAK et al., 1995; WILLERFORD et al., 1995). IL-2 é capaz de promover a proliferação e a sobrevivência de células T, induzindo a síntese do fator de transcrição STAT5 e a expressão de moléculas anti-apoptóticas Bcl-2 (ANTOV et al., 2003). STAT-5, por sua vez, está presente em grande quantidade em células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e sua sinalização promove a expressão de Foxp3 nessas células (BURCHILL et al., 2007).

As células T reguladoras, além da expressão constitutiva de CD25 e Foxp3, apresentam também uma variedade de moléculas de superfície, tais como: CD5<sup>high</sup>, CD103, CD62L, Cd45RB<sup>low</sup> (CD45RO em humanos) e OX40, além de outras moléculas importantes relacionadas com sua função, como CTLA-4 e receptor de TNF induzido por glucocorticóide (GITR) (revisto por NAKAMURA et al., 2001; BAECHER-ALLEN et al., 2001; JONULET; SHMITT, 2003; FEHERVARI; SAKAGUCHI, 2004; MAGGI et al., 2005). A molécula do receptor de semaforina III, chamado neutropilina (NrpI), é altamente expresso nessa população celular, no entanto a concentração dessa molécula é diminuída uma vez que as células são ativadas (MAGGI et al., 2005).

Atualmente, as células T reguladoras são divididas em dois grupos distintos: as células T reguladoras naturais e as induzidas. A primeira (células T reguladoras naturais) é produzida no timo como uma subpopulação de células T maduras e funcionais e migram para os tecidos periféricos onde exercem sua função supressora (revisto por FONTENOT; RUDENSKY, 2005). A segunda, as células T reguladoras induzidas, são originadas na

periferia, por mecanismos ainda não totalmente elucidados, embora se discuta a participação de células dendríticas e de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  na sua diferenciação (CHEN et al, 2003; FANTINI et al, 2004; revisto por MILLS, 2004; revisto por FONTENOT; RUDENSKY, 2005; MAGGI et al., 2005). As células T reguladoras induzidas incluem células T CD4<sup>+</sup> produtoras de TGF- $\beta$  solúvel (células Th3 - referindo-se à terminologia já utilizada para denominar células T auxiliares ou *helper*), as quais são capazes de inibir o desenvolvimento de doenças autoimunes (MILLS, 2004). E as células tipo 1 (Tr1), têm expressão variável de Foxp3, são dependentes da presença de IL-10 e podem inibir algumas respostas de células T *in vivo* (MILLS, 2004).

Uma questão central e que remete a muitas controversas são os mecanismos de supressão das células T reguladoras. Em geral, as células T reguladoras naturais não são capazes de suprimir a resposta imune quando recém isoladas, e necessitam da ativação através do receptor de célula T (TCR) ou de estímulos policlonais para exercer sua função supressora. Uma vez ativada, as células T reguladoras suprimem a função das células efetoras de maneira independente de antígeno, inibindo a transcrição de IL-2 pelas células alvo (THORNTON; SHEVACHI, 1998).

Além disso, estudos *in vitro* sugerem que a supressão mediada pelas células T reguladoras ocorra somente por um mecanismo dependente de contato, uma vez que camundongos deficientes para a produção dessas citocinas apresentam células T reguladoras funcionais (THORNTON; SHEVACH, 1998; JONULEIT et al., 2001). Contudo, as células T reguladoras naturais podem induzir a produção de IL-10 e TGF- $\beta$  por outras células T efetoras, fazendo com que passem a apresentar atividade supressora, denominadas células T reguladoras induzidas (DIECKMANN et al., 2002; JONULEIT et al., 2002).

Dentre os mecanismos de contato está a interação entre CTLA-4, receptor presente nas células T reguladoras, com o seu ligante o receptor CD80 ou CD86 (ou B7) nas células ativadas, resulta na supressão da resposta imune. Entretanto, há muitas controversas sobre sua atividade, estudos descrevem que a população de células  $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$  apresenta forte atividade reguladora *in vitro* e o bloqueio de CTLA-4 reduz sua atividade em animais (BIREBENT et al., 2004; MANZOTTI et al., 2002). No entanto, trabalhos demonstraram que a ausência de CTLA-4 não impede a atividade das T  $CD4^+CD25^+$  (DIECKMANN et al., 2001; JONULEIT et al., 2001; LEVINGS et al., 2001; NG et al., 2001; STEPHENS et al., 2001). Além disso, células T provenientes de camundongos geneticamente deficientes do receptor B7 podem ser suprimidas por células T reguladoras  $CD4^+CD25^+$  (MAY –JR et al., 2007). CTLA-4 presente nas células T reguladoras pode também interagir com CD80 e CD86 na superfície de células dendríticas, resultando na síntese da enzima indoleamina 2.3-dioxigenase (IDO) por essas células. Essa enzima induz a degradação do aminoácido essencial triptofano no ambiente inflamatório, levando à supressão da resposta proliferativa e inibição da produção de citocinas por células T efetoras (BRUSKO et al., 2005; MUNN et al., 2004). As evidências sugerem outro mecanismo que induz a apoptose das células alvo através da liberação de granzimas (GONDEK et al., 2005).

O GITR (gene do receptor de TNF induzido por glicocorticóide) é membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFRSF), embora esteja presente em baixos níveis em células como macrófago, células dendríticas (SHIMIZU et al., 2002) e células NKT (KIM et al., 2006), é predominantemente expresso em células T reguladoras. Seu ligante, GITR-L, é expresso na superfície de APCs e alguns subtipos de linfócitos B e, embora ainda em discussão, pode ser também expresso em células T ativadas (TONE et al., 2003). Quanto ao papel de GITR na função das células T reguladoras, trabalhos

demonstraram de forma contraditória, que o bloqueio do mesmo impede a atividade reguladora *in vitro* e *in vivo* das células T reguladoras, porém não promove eliminação dessa população celular do pool de células circulantes (SHIMIZU et al., 2002). E sua interação com o GITRL inibe a produção de citocinas e fator de crescimento celular (RONCHETTI et al., 2004). No entanto, têm demonstrado que a sinalização pelo GITR promove sinais co-estimulatórios em células T efectoras, intensificando a proliferação e sobrevivência das mesmas, além da aumentada síntese de citocinas tais como IFN- $\gamma$  e IL-2, sugerindo um duplo papel desempenhado pela ligação do GITR (RONCHETTI et al., 2004). E a expressão de GITR poderia influenciar a hiporresponsividade de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> e não somente sobre as células T reguladoras (PICCIRILLO; THORNTON, 2004). Assim, os estudos relacionados às interações de GITR e seu ligante na supressão mediada pelas células T reguladoras permanecem em aberto.

Além destes mediadores, trabalhos sugerem que o monóxido de carbono (CO) constitui também um importante mediador das células T reguladoras. O CO é produzido pela enzima microsomal heme oxidase-1 (HO-1) dessas células, e não por outros produtos de reação (Ferro ou bilirrubina). Mais especificamente o CO é capaz de bloquear produção de IL-2, uma importante citocina envolvida na proliferação dos linfócitos T convencionais (PAE et al., 2004; THORNTON; SHEVACH, 2000). Recentemente, outro mediador descrito é a IL-35, produzida pelas células T reguladoras, capazes de inibir a proliferação das células T efectoras, bem como sua produção de citocinas (COLLISON et al., 2007).

Embora, como discutido acima, existem dados da literatura sobre mecanismos pelos quais as células T reguladoras regulam a ativação do sistema imune, entretanto poucos estudos analisam os mecanismos que medeiam à inibição da atividade supressora dessas células. Em estudos recentes, observam que a presença de IL-6 modula negativamente a função das células T reguladoras (WAN; XIA; MOREL, 2007).

Dados recentes sugerem também que possivelmente existem diversos tipos de mecanismos tanto modulando negativamente a função das células T reguladoras, como também vários tipos de células reguladoras que podem apresentar diferentes mecanismos de supressão. Pesquisas mais freqüentes identificaram populações de células com capacidade reguladora, como célula reguladora inata (como: células T NK) e células reguladora adaptativa (como: células T CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) (revisto por VENET et al., 2007). Além disso, a habilidade das diferentes subpopulações de células T reguladoras de interagir com células do sistema imune inato (como macrófagos, neutrófilos e células NK), e com células da resposta imune adaptativa (como linfócitos efetores que apresentam papel central em respostas infecciosas), focalizam o provável papel de regulação da resposta imune dessas células (revisto por VENET et al., 2007).

### **1.2.2. Células T reguladoras e sepse grave**

Embora as células T reguladoras estejam envolvidas no controle de doenças auto-imunes e rejeição de transplantes, grande atenção tem sido dada à participação das células T reguladoras em doenças infecciosas. Vários trabalhos vêm demonstrando que essas células participam da resposta induzida por infecções com a função de minimizar o dano tecidual causado pela resposta inflamatória exacerbada. Adicionalmente, essas células parecem estar relacionadas a tecidos que exigem maior controle da resposta imune, como trato gastrintestinal, pulmões, fígado, olhos e pele (BELKAID; ROUSE, 2005).

Há evidências demonstrando, numa fase aguda, um aumento da expressão dessas células T reguladoras, tanto em pacientes (MONNERET et al., 2003; VENET et al., 2004; MACCONMARA et al., 2006) como em animais sépticos (SCUMPIA et al., 2006; WISNOSKI et al., 2007; CHEN et al., 2007; OFFNER et al., 2006).

Uma questão central e que remete a muitas controvérsias é o papel das células T reguladoras na fisiopatologia da sepse. Heuer e colaboradores elegantemente demonstraram que a transferência adotiva de células T reguladoras para camundongos submetidos à sepse, derivadas de camundongos hígidos, reduz a mortalidade induzida pela sepse grave (HEUER et al., 2005). No entanto, outros estudos verificaram que a administração de anticorpo anti-CD25 não altera a sobrevivência de animais submetidos à sepse grave (SCUMPIA et al., 2006, WISNOSKI et al., 2007).

Desse modo, a necessidade do esclarecimento do papel exercido pelas células T reguladoras na sepse fica evidente, uma vez que tais estudos podem favorecer o entendimento da relação imunossupressão e sepse grave.

## Objetivo

✂ O Papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental

---

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo Amplo

Estudar a participação das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental (CLP).

### 2.2. Objetivos Específicos e delineamento experimental

1. Em camundongos C57BL/6 submetidos à CLP, avaliar os seguintes parâmetros: sobrevida; contagem de bactérias no sangue; peso corporal; parâmetro de lesão tecidual (hepático – aspartato aminotransferase -AST).

2. Avaliar a susceptibilidade de camundongos sépticos à infecção secundária por *L. pneumophila*, pulmonar, não letal em animais normais, utilizando como parâmetro: a sobrevida.

3. Avaliar a frequência de células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave, utilizando como parâmetro: a expressão de diversos marcadores de células T reguladoras em diferentes tecidos e tempos após indução da sepse grave.

4. Avaliar se as células T reguladoras modulam positivamente o estado de imunossupressão em animais sépticos, utilizando os seguintes parâmetros: capacidade proliferativa de células totais do baço; participação das células T reguladoras na proliferação de células totais do baço; capacidade de proliferação das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de animais sépticos; apoptose celular; capacidade de supressão das células T reguladoras.

5. Avaliar o papel das células T reguladoras em conferir resistência ou susceptibilidade a infecção secundária em animais sépticos. Confirmando a

susceptibilidade desses animais sépticos a infecção secundária não letal, será verificado se este quadro de imunossupressão poderia ser prevenido pelo tratamento dos animais antes e depois da sepse com o anticorpo anti-GITR, já que este inibe a atividade das células T reguladoras.

# **Materiais e Métodos**

✂ O Papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental

---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

No presente estudo foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 (*wild type*, WT) e camundongos deficientes de MHCII (CD4<sup>-/-</sup>), machos e fêmeas, de 6-10 semanas de idade. Os animais eram provenientes do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Genética da FMRP-USP.

Todos os animais em experimentação foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, sob condições de temperatura (23-25°C) e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água.

Os protocolos experimentais realizados neste trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) do hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (certificado nº 023/2007) (**Anexo 1**).

#### 3.2. Preparo das soluções e reagentes

##### 3.2.1. Solução de Tribromoetanol 2.5 %

2,2,2-tribromoetanol (Sigma) .....	250 mg
Salina 0.9 % q.s.p. ....	100 mL

A solução foi aquecida a 56 °C até a dissolução total da droga;

Foi ajustado pH 7.2 e estocado a 4 °C.

**3.2.2. Solução de Tampão Salina-fosfato (PBS) 10X (Solução Mãe):**

Cloreto de Sódio (NaCl, Merck) .....	80 g
Cloreto de Potássio (KCl, Merck) .....	2 g
Fosfato de Sódio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Merck) .....	11.5 g
Fosfato de Potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Merck),.....	20 g
Água deionizada Milli-Q q.s.p. ....	1000 mL

**3.2.3. PBS 1X:**

PBS 10X .....	100 mL
Água Milli-Q q.s.p. ....	900 mL
Ajustado o pH 7.2, filtrado e estocado a 4 °C.	

**3.2.4. PBS/EDTA (1 mM):**

PBS 1X q.s.p.....	100 mL
Etilenodiaminotetracético (EDTA, Merck) .....	37.2 mg
Ajustado o pH 7.2, filtrado e estocado a 4 °C.	

**3.2.5. Líquido de Turk:**

Ácido acético glacial P.A. (Merck) .....	20 mL
Azul de metileno (Merck) .....	0.5 g
Água Milli-Q q.s.p. ....	1000 mL

**3.2.6. Meio RPMI incompleto**

Hepes (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S, Sigma) .....	2.38g
RPMI 1640 (Sigma)– 1 frasco .....	10,4 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> , Vetec) .....	2,20 g

Água de Milli-Q q.s.p. ....1000 mL

Ajustado o pH 7.2, filtrado e estocado a 4 °C.

### 3.2.7. Meio RPMI completo

Soro Bovino Fetal inativado (SBF- I, HyClone) .....10 mL

Estreptomicina/penicilina (antibiótico, Sigma) .....1 mL

Gentamicina (antibiótico, Sigma) .....10 µL

RPMI incompleto q.s.p. ....100 mL

Ajustado o pH 7.2, filtrado e estocado a 4 °C.

### 3.2.8. Tampão de citometria de fluxo (Tampão de FACS)

Glicose - D (+) glucose anidra P.A. (Dextrose) (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>, Sigma) 20 mM .....3.960 g

Albumina derivada de soro bovino(BSA, Sigma) 0,5 % .....5 g

PBS1X q.s.p. ....1000 mL

Acertado o pH 7.2, filtrado e estocado a 4 °C.

### 3.2.9. Tampão utilizado na purificação de células (Tampão de separação celular)

BSA (Sigma) 0,5 % .....5 g

EDTA (Labsynth) 2mM .....0.396 g

PBS 1X q.s.p. ....1000 mL

Ajustado pH 7.2, filtrado e estocado a 4 °C.

### 3.2.10. Tampão de lise

Cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl, Merck) .....4,01 g

EDTA (Labsynth) .....0,18 g

Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, Vetec).....0,42 g

Água de Milli-Q q.s.p. ....500 mL

Ajustado pH 7.2, filtrado e estocado a 4 °C.

### 3.2.11. Tampões utilizados para o ensaio de ELISA

#### (A) Solução de ligação (binding buffer) pH 9.0

Fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merk) .....0.1M

#### (B) Tampão de substrato pH 5.0

Ácido Cítrico (Merk) .....34.7 mM

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merk) .....66.7 mM

#### (C) Substrato

1,2 ortofenilenodiamino (OPD, Sigma) .....0.4 mg

Água oxigenada vol. 30 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Merk) .....0.4 µL

Tampão substrato q.s.p. ....1 mL

### 3.3. Modelo experimental de sepse polimicrobiana grave

Para mimetizar o quadro de sepse grave, utilizamos o modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP) originalmente descrito por Baker e colaboradores (BAKER et al., 1983) com algumas modificações. Os camundongos foram anestesiados com tribromoetanol via intraperitoneal (i.p.) 2,5 % (10 µL/ g), sendo em seguida feita uma incisão mediana de aproximadamente 1 cm no abdome. O ceco foi exposto e ligado com um fio de algodão abaixo da válvula íleo-cecal e foram realizadas duas perfurações com agulha estéril de 18G (1x18G) para induzir sepse grave (CLP), com 100 % de mortalidade. Em seguida, o ceco foi pressionado gentilmente para garantir a saída das fezes pela perfuração e recolocado no abdome, sendo a incisão suturada. Todos os animais receberam

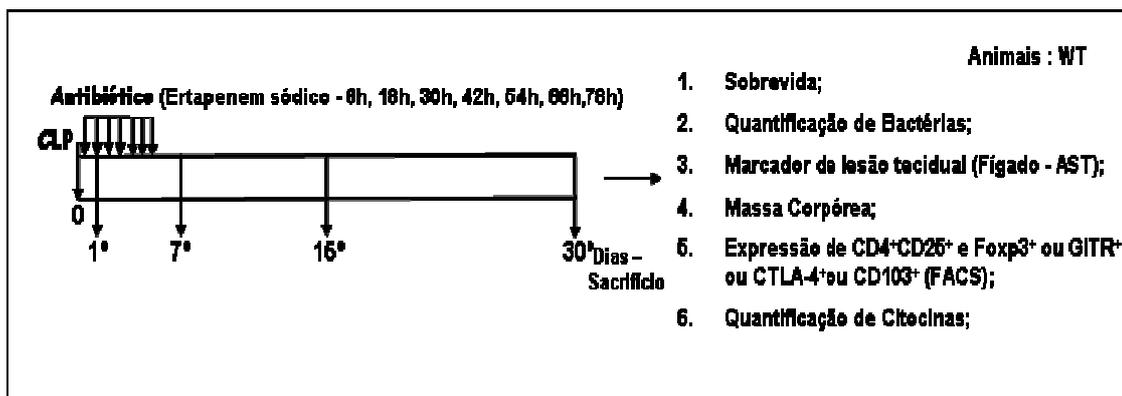
1 mL de salina subcutânea imediatamente após a cirurgia, para evitar desidratação, e coloca em presença da luz. Em média, 40 min após a cirurgia os animais já estavam recuperados do efeito do anestésico. Os animais SHAM-operados (controles) foram submetidos ao mesmo procedimento, porém sem perfurações.

### 3.4. Modelo de tratamento com antibiótico

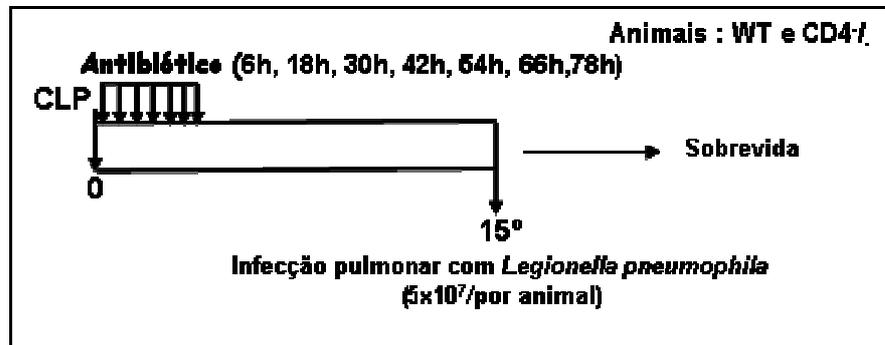
Para impedir a mortalidade de 100 % observada em modelos experimentais de sepse grave (BENJAMIM et al., 2003), os animais foram tratados, por via intraperitoneal (i.p.), com o antibiótico Ertapenem sódico (*Laboratories Merck Sharp & Dohme – Chibret Mirabet Plant Riom*) em diferentes concentrações, sendo que 20mg/ Kg foi a dose escolhida. Administrados em 6 h, e posteriormente em intervalos de 12 h até o 3º dia após a CLP (Apêndice 1).

### 3.5. Protocolos experimentais

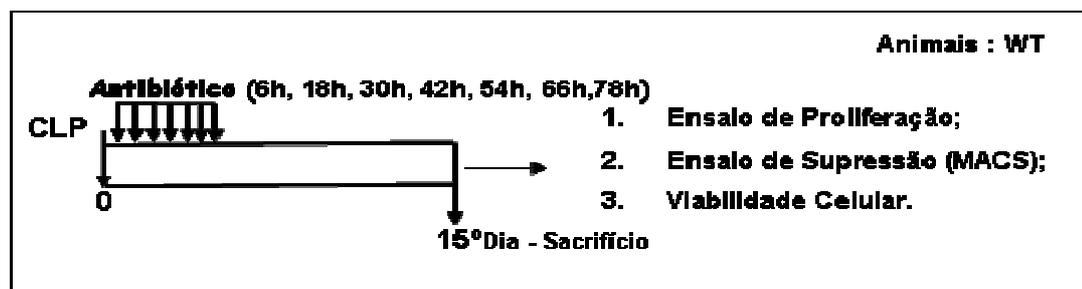
#### 3.5.1. Perfil de animais sépticos e frequência de células T reguladoras (Protocolo 1):



3.5.2. Susceptibilidade de animais sépticos a infecção não-letal por *Legionella pneumophila* (Protocolo 2):



3.5.3. Ensaio de proliferação, supressão e viabilidade celular (apoptose) (Protocolo 3):



3.6. Análise de sobrevivência

Os camundongos CD4<sup>-/-</sup> ou C57BL/6 foram monitorados, a cada 24 h, durante 10 ou 30 dias, sendo após esse prazo os animais foram sacrificados de acordo com as normas sobre uso de animais de experimentação em laboratórios. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em % de sobrevivência.

3.7. Determinação da bacteremia

A quantificação da bacteremia de animais C57BL/6 submetidos à CLP foi realizada 1 dia após a indução da sepse, com ou sem antibiótico, e posteriormente, 7, 15 ou 30 dias após a indução da sepse somente em camundongos tratados com antibiótico. Para a

quantificação de bactérias presentes na circulação, os animais foram anestesiados, tendo o sangue coletado através do plexo ocular. Todo o procedimento foi realizado sob condições estéreis. Os animais foram então sacrificados e 10  $\mu$ L do sangue com anticoagulante foi semeado, sem diluições, em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Mich). Após a semeadura, as placas foram incubadas por 18 h a 37°C e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi quantificado. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em Log de UFC/mL de sangue.

### **3.8. Análise da massa corporal**

A massa corporal dos camundongos C57BL/6 submetidos à CLP tratados com antibiótico e os controles SHAM, foram monitorados por 30 dias. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em peso em gramas.

### **3.9. Determinação das concentrações séricas de aminotransferase (AST)**

Para avaliação da função hepática, foram realizadas dosagens de AST dos soros de animais hígidos (“naive”) e animais sépticos nos dias 1, 7, 15 ou 30 após a indução da sepse. Para tanto foi utilizado o ensaio colorimétrico enzimático através do Kit transaminase AST / LABTEST Diagnóstica. O soro de animais foi processado conforme indicações do fabricante. O experimento foi realizado em triplicata e os valores foram expressos em U/ mL.

### **3.10. Quantificação de citocinas por ELISA**

As quantificações de IL-10 e IL-6 no lavado peritoneal e no sangue foram realizadas com material coletado 1, 7, 15 ou 30 dias após a indução da sepse. Após o

sacrifício dos camundongos C57BL/6, a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 mL de tampão PBS contendo EDTA (1 mM). O sangue coletado e o lavado peritoneal foram centrifugados por 10 min a 180 g.

A determinação dos níveis destas citocinas foi feita por método imunoenzimático (ELISA), como segue. Placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 µL/poço do anticorpo específico anti-IL-10 (3 µg/ mL) ou IL-6 (3 µg/ mL) (Pharmagen, San Diego, CA, USA). Estes anticorpos foram diluídos em solução de ligação (binding buffer) em pH 9.0 e incubados por 18-24 h a 4 °C. As placas foram lavadas por três vezes com PBS/Tween-20 (0.05 % Sigma). As ligações não-específicas foram bloqueadas com 100 µL de PBS/BSA 1 % durante 120 min em temperatura ambiente. As amostras e o padrão (curva-padrão) contendo as concentrações de IL-10 (5000 pg/ mL) e IL-6 (4000 pg/ mL) (Pharmagen) foram colocados nas placas (50 µL) e incubados por 18-24 h a 4 °C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50 µL dos anticorpos biotinizados específicos para cada citocina foram adicionados nas concentrações: 4 µg/ mL (IL-10) e 4µg/ mL (IL-6). Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/Tween e o conjugado avidina-peroxidase, na diluição de 1/5000, foi adicionado a cada poço. A seguir, as placas foram incubadas por 30 min. Posteriormente, elas foram lavadas com PBS/Tween e 100 µL do substrato OPD (o-fenilenediamina-dihidrocloreto; Sigma) em tampão substrato (pH 5.0) foram adicionados. A reação foi interrompida com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) e a densidade óptica (DO) foi medida a 490 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). A concentração de citocinas contidas nas amostras foi calculada a partir de uma curva padrão com 12 pontos obtida por diluição seriada, sendo as concentrações iniciais em cada curva as seguintes: 5000 pg/ mL ( IL-10) e 5000 pg/ mL (IL-6). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em picogramas/ mL.

### 3.11. Preparação de suspensão celular

Após os camundongos C57BL/6 serem sacrificados, os órgãos a serem analisados foram retirados, e colocados em tubo de propietileno de 15 mL (Falcon®) contendo 1mL de meio RPMI 1640 incompleto. A seguir, os órgãos foram divulsionados em peneira de propietileno (Falcon® - separador de células – 100 µm) com auxílio do êmbolo da seringa de 3 mL (Plastipak®), formando uma única suspensão celular. A suspensão celular do lavado peritoneal foi coletada com 3 mL de meio RPMI 1640 incompleto, e posteriormente centrifugada a 400 g por 10 min. As hemácias foram lisadas por choque hiposmótico utilizando um tampão de lise e uma nova centrifugação foi realizada. Subseqüentemente, os sedimentos celulares foram ressuspensos em 1 mL de meio RPMI 1640 completo e as células foram contadas em câmara de Neubauer.

### 3.12. Citometria de fluxo

#### 3.12.1. Análise da expressão de marcadores de células T reguladoras

As análises da expressão de alguns marcadores, no intuito de caracterizar a população de células T reguladoras, foram realizados em células recuperadas dos tecidos: lavado peritoneal, linfonodo mesentérico (drenante), timo e baço, de camundongos hígidos ou submetidos à CLP tratados ou não com antibiótico. Sendo caracterizada a expressão dos seguintes marcadores: CD4<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> ou GITR<sup>+</sup> ou CTLA-4<sup>+</sup> ou CD103<sup>+</sup>.

Como descrito anteriormente, foi preparada uma suspensão de células de cada órgão individualmente. Após centrifugação, para realizar a lise celular, as células foram ressuspensas em tampão de FACS gelado concentrando-as em  $3,0 \times 10^6$  células/ mL. Dessa suspensão de células foram retirados 100 µL ( $3,0 \times 10^5$  células) e incubados com 40 µL de Fc block, bloqueador da porção Fc de imunoglobulinas (anticorpo proveniente de sobrenadante

de hibridoma de anti-CD16/ CD32), para evitar ligações inespecíficas, por 45 min a 4 °C. Em seguida, foram adicionados com 0,5 µL (0,5 µg) de anticorpos monoclonais extracelulares não relacionados, de mesmo isotipo conjugados a PE ou PerCP (todos obtidos da BD Pharmingen, San Jose, Ca USA) por 30 min a 4 °C. Após a incubação, adicionou-se 100 µL de CITO-FIX (puro) (kit Cytotfix/Cytoperm – Pharmingen) (utilizado para fixar as células e em seguida realizar a marcação intracelular), por 15 min a 4 °C e, posteriormente as amostras foram lavadas 2 vezes com 2 mL de tampão de FACS, sendo centrifugadas a 400 g por 10 min. Após a lavagem, foram adicionados 100 µL de Penn Wash (diluído 1:100 em PBS) (kit Cytotfix/Cytoperm – Pharmingen) (utilizado como permeabilizador celular para posterior marcação intracelular), e 0,5 µL (0,5 µg) de anticorpos monoclonais intracelulares não relacionados de mesmo isotipo conjugados a PE (todos obtidos da BD Pharmingen, San Jose, Ca USA) por 45 min a 4 °C. Posteriormente as amostras foram lavadas 2 vezes com 2 mL de tampão de FACS, centrifugadas a 400 g por 10 min e ressuspensas em 100 µL de solução de formaldeído a 1 % em PBS. Após estes procedimentos, as amostras foram adquiridas em FACSort™ (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ), utilizando os canais de fluorescência 1 (FL1) para moléculas conjugadas a FITC; 2 (FL2) para aquelas conjugadas a PE; e 3 (FL3) para moléculas conjugadas a PercP. As análises foram feitas usando o programa FCS Express V3 (DE NOVO SOFTWARE), o qual permitiu analisar todas as células adquiridas (30000 eventos/ amostra), individualizadas por janelas (*Gates*) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

Os resultados foram expressos como %, número absoluto e razão (células T reguladoras/ células T CD4<sup>+</sup>) da expressão de marcadores de células T reguladoras. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.12.2 Análise de apoptose por Anexina-V

A determinação de apoptose celular foi realizada por citometria de fluxo empregando-se a marcação com Anexina-V, que é uma proteína com propriedades de ligação aos fosfolipídios como a fosfatidilserina. Em células normais a fosfatidilserina está localizada na região interna da membrana plasmática. Nos estágios iniciais de apoptose, a fosfatidilserina é translocada para a região externa da membrana, ficando exposta a marcadores celulares como a anexina-V. As células apoptóticas mantêm a integridade da membrana plasmática durante a maior parte do processo de apoptose (VERMES et al., 1995).

Desta forma, as análises de apoptose de células T CD4<sup>+</sup>, foram realizadas em células recuperadas do baço de animais no 15º dia após a indução da sepsis ou hípidos. Foi caracterizada a expressão dos seguintes marcadores: CD4<sup>+</sup> e Anexina-V.

Como descrito acima, obtivemos células do baço em concentração de  $1,0 \times 10^7$  células/ mL. Dessa suspensão de células foram retirados 100 µL ( $1,0 \times 10^6$  células) e incubados com 40 µL de Fc block, bloqueador da porção Fc de imunoglobulinas (anticorpo proveniente de sobrenadante de hibridoma de anti-CD16/ CD32), por 45 min a 4 °C. Em seguida foram adicionados 0,5 µL (0,5 µg) de CD4 conjugado a PE (anticorpo obtido da BD Pharmingen, San Jose, Ca USA) por 30 min a 4 °C. Após a incubação as amostras foram lavadas 1 vez com 3 mL de PBS 1X, sendo centrifugadas a 400 g por 10 min. Após a lavagem, adicionou-se 100 µL de tampão de Anexina-V (diluído 1:10 em água de milli-Q – Annexin Binding Buffer) (Apo Screen Kit, Birmingham, USA), e 1 µL de Anexina-V conjugado a FITC (Apo Screen Kit, Birmingham, USA) por 15 min a 4 °C. Em seguida, foram adicionados 50 µL PBS 1X. Após estes procedimentos, as amostras foram adquiridas em FACSort™ (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ), utilizando os canais de fluorescência 1 (FL1) para moléculas conjugadas a FITC; e fluorescência 2 (FL2) para

aquelas conjugadas a PE. As análises foram feitas usando o programa FCS Express V3 (DE NOVO SOFTWARE), o qual permitiu analisar todas as células adquiridas (30000 eventos/amostra), individualizadas por janelas (*Gates*) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC) ou fluorescência (FL).

A estratégia utilizada para esta análise, em que traçamos uma janela específica para linfócitos (R1), baseou-se nos parâmetros de complexidade (SSC- side light scatter) e tamanho (FSC- forward side scatter) dessa população celular. Em seguida, para melhor caracterizar a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, as células da região R1 foram distribuídas segundo os parâmetros de granulosidade e marcação para CD4, um marcador de células T CD4<sup>+</sup> de camundongos. Desta maneira, delimitamos uma população homogênea com marcação de alta intensidade para CD4<sup>+</sup> (R2), a qual corresponde aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Finalmente, as células delimitadas pelas regiões R1 e R2 foram somadas e distribuídas num parâmetro de CD4<sup>+</sup> por Anexina-V<sup>+</sup>, onde a população presente no quadrante direito superior foi considerada células T CD4<sup>+</sup> que sofreram apoptose. Os resultados foram expressos como % de expressão de Anexina-V em células T CD4<sup>+</sup>. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.13. Ensaio de proliferação de células totais por timidina (<sup>3</sup>H)

Decorrido o 15<sup>o</sup> dia após a indução da sepse experimental, o baço dos camundongos C57BL/6 submetidos à CLP com antibiótico e o controle foram retirados, e preparados segundo o protocolo descrito anteriormente.

Dessa suspensão celular obtida como descrito no **item 4.11**, foram retirados 50 µL (3,0x10<sup>5</sup> células) e colocados em placa de 96 poços, fundo chato (Corning), sendo distribuídas em triplicata. Foram adicionados 100 µL de RPMI 1640 completo ou anti-CD3 (estímulo policlonal) e 100 µL de anti-GITR (mAb DTA), anti-CTLA-4 (mAb 4F10) ou

RPMI 1640 completo. Em seguida, 2,5  $\mu\text{Ci}$  de timidina triciada -  $[^3\text{H}]$  timidina (Amersham Biosciences) em 50  $\mu\text{L}$ , adicionados após 54 h de cultura à 37 °C, em presença de  $\text{CO}_2$ . As células permaneceram em cultura por mais 18 h e, posteriormente, foram coletadas em coletor de células (Cell Harvester). A cultura teve um volume total de 250  $\mu\text{l}$  de RPMI 1640 completo. Após estes procedimentos, a leitura foi realizada no contador de cintilação  $\beta$  (Tri-Carb®), com 3000 radiações, expressando a incorporação de  $^3\text{H}$  em cintilações por min (cpm).

### 3.14. Purificação celular para ensaio de proliferação e supressão

Células totais obtidas do baço de três camundongos C57BL/6 submetidos à CLP 15 dias antes da purificação, e de camundongos hígidos, foram lavadas em tampão de separação celular. As subpopulações de células T  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  e T  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  foram separadas utilizando um kit comercial proveniente da Miltenyi Biotec (Auburn, CA).

Resumidamente, as células foram primeiramente marcadas com um coquetel de anticorpos monoclonais biotinizados específicos para camundongos: CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR $\gamma\delta$  e, subseqüentemente a suspensão celular foi incubada com *micro-beads* cobertas com biotina. Após 15 min de incubação, as células foram lavadas, 300 g por 10 min a 4-8 °C e, a população  $\text{CD4}^-$  (maior que 90 % pureza) foi separada magneticamente por MACS®-*sorting* através da seleção negativa em colunas adequadas ao número de células. Em uma segunda etapa, as células T  $\text{CD4}^+$  previamente selecionadas foram diretamente marcadas com *micro-beads* cobertas com anticorpos anti-CD25 e então obtida as subpopulações de interesse. As células T  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  foram selecionadas positivamente através da separação com colunas MACS® adequadas ao número de células (maior que 95 % pureza). A pureza de células T  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$

(células T reguladoras) foi maior que 98 % e a pureza de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (convencionais) foi maior que 96 % (**dados não mostrados**).

Desta forma, tivemos duas populações celulares: células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (convencionais) e células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (células T reguladoras). Um número constante de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> obtidas de camundongos controles foi co-cultivado na presença de diferentes números de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de diferentes grupos, utilizando estímulo anti-CD3 ou RPMI 1640 completo. Após incubação por 72 h à 37 °C em presença de 5 % CO<sub>2</sub>, timidina triciada [3H] (Amersham Biosciences) foi adicionada à cultura. A leitura foi realizada em contador de cintilação β (Tri-Carb®). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados são expressos como incorporação de <sup>3</sup>H em cintilações por min (cpm).

### 3.15. Preparação e inoculação da bactéria *Legionella pneumophila*

#### 3.15.1. Bactéria

*L. pneumophila* sorogrupo 1 foi utilizada neste estudo como ferramenta para avaliar a imunossupressão causada por evento séptico. A cepa utilizada, (CR)1326 (selvagem), cresceu a 37°C por 48 h em meio sólido (ágar) de extrato de levedura contendo carvão ativado (1 % de extrato de levedura; 1 % de ácido *N*-(2 acetoamido)-2-aminoetanosulfônico (ACES), pH 6.9; 3.3mM L-cisteína; 0,33mM de Fe(NO)<sub>3</sub>; 1.5 % de ágar bacteriológico e 0.2 % de carvão ativado). A leitura da D.O. a 600 nm das bactérias diluídas em PBS estéril foi utilizada para estimar a concentração da suspensão bacteriana.

### 3.15.2. Infecção *in vivo*

Camundongos C57BL/6 e CD4<sup>-/-</sup> hígdos submetidos à CLP (15 dias) foram anestesiados com tribromoetanol i.p. 2,5 % (10 µL/ g), e infectados via intranasal (i.n.) com 40µl da suspensão contendo 5x10<sup>7</sup> *L. pneumophila*/mL em PBS (ZAMBONI et al., 2006). O experimento foi realizado em triplicata e a sobrevida foi analisada por 10 dias, com resultados expressos em % de sobrevida, como descrito no **item 3.6**.

### 3.16. Tratamento com anti-GITR

Os camundongos C57BL/6 foram tratados com anti-GITR (1 mg/ Kg, mAb DTA), 1 hora antes da sepse experimental e no 3º, 9º e 15º dias. No 15º dia, decorrida 1 hora após o tratamento com anti-GITR, os camundongos foram submetidos à infecção secundária com *L. pneumophila*. Como controle utilizamos IgG purificado anti-Rat (1 mg/ Kg). O experimento foi realizado em triplicata e a sobrevida foi avaliada por 10 dias, e os resultados expressos em % de sobrevida, como descrito no **item 3.6**.

### 3.17. Análise Estatística

A sobrevida dos animais foi expressa como porcentagem de animais sobreviventes analisadas pelo teste Mantel-Cox logrank ( $X^2$ , *chi-squared*), e as diferenças foram consideradas significativas para  $P < 0,05$ . Assim, a % de sobrevida é igual ao número de animais vivos até o intervalo de tempo avaliado, multiplicado por 100 e dividido pelo número de animais no início do experimento. Os demais dados experimentais foram avaliados comparando-se a média dos valores encontrados, por análise de variância (*one-way ANOVA*) seguida de pós-teste (Teste de Bonferroni). O número (*n*) de animais por

grupo experimental está descrito nas figuras. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de média (S.E.M.) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de  $P < 0.05$ .

## Resultados

✂ O Papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. PERFIL DE CAMUNDONGOS C57BL/6 SUBMETIDOS À SEPSE GRAVE

#### 4.1.1. Sobrevida dos animais sépticos após tratamento com antibiótico

Com o intuito de mimetizar o que ocorre em termos fisiopatológicos com pacientes sépticos graves, porém capazes de sobreviverem a esse episódio, padronizamos, em nossas condições laboratoriais, um modelo de sepse polimicrobiana grave (CLP letal - caracterizado por induzir 100 % de mortalidade), seguido de tratamento com antibiótico. Esse modelo experimental consiste, basicamente, em perfurar o ceco do camundongo para que o conteúdo fecal extravase para a cavidade abdominal, e, dessa forma, induza uma peritonite infecciosa.

O protocolo de tratamento nos camundongos sépticos consistiu numa administração de 20 mg/ Kg de Ertapenem sódico (i.p., *Laboratories Merck Sharp & Dohme – Chibret Mirabet Plant Riom*). A primeira administração desse antibiótico foi feita 6 h após a cirurgia de CLP, e foi mantido em intervalos regulares de 12 h durante 3 dias (**Protocolo 1**), cuja curva dose-resposta está descrita em *Materiais e Métodos*. Dentro de 6 h após a sepse, coincidente com o início do tratamento, os animais já estavam com a maioria dos sinais e sintomas característicos dessa patologia (revisto por ALVES-FILHO et al., 2006). Em nossas observações, os animais sépticos não tratados com antibiótico apresentaram letargia, piloereção, secreção ocular, taquipnéia e taquicardia, com 100 % de mortalidade ao fim do segundo dia após a CLP. No entanto, os sinais da resposta sistêmica foram menos intensos após o tratamento com antibiótico (CLP-Antibiótico), com significativo aumento na taxa de sobrevida de aproximadamente 50 % (**Figura 1**).

#### 4.1.2. Avaliação da bacteremia em animais sépticos tratados com antibiótico

Posteriormente, foi avaliado o *clearance* bacteriano após a indução da sepse grave e do tratamento antimicrobiano (**Protocolo 1**). Para tal, a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) no sangue foi analisada nos dias 1, 7, 15 e 30 após a indução da sepse com antibiótico (CLP-Antibiótico). Como controle foi também determinado a UFC no 1º dia após os animais serem submetidos à CLP e não tratados com antibiótico. Como já mencionado, os animais não tratados não conseguiram sobreviver além do 2º dia após a indução da sepse grave.

Como podemos observar na **Figura 2**, os animais submetidos à CLP e tratados com antibiótico apresentaram uma maior capacidade de conter a disseminação bacteriana. No 1º dia após a CLP, a quantidade de bactérias recuperadas do sangue destes animais foi em média 1 log de UFC/ mL, número significativamente inferior àquele obtido do grupo CLP não tratado (em média 3 log de UFC/ mL). Conforme esperado, os animais sépticos submetidos ao tratamento antibiótico apresentaram o log ainda menor de bactérias no 7º e 15º dias. No fim de 30 dias, não foram detectadas bactérias viáveis no sangue. Esses resultados demonstram que animais sépticos tratados com antibiótico controlam a infecção.

#### 4.1.3. Massa corpórea de animais sépticos tratados com antibiótico

Visto que os animais submetidos à sepse polimicrobiana grave e tratados com antibiótico apresentam aumento na sobrevida, bem como maior capacidade de controlar a infecção. Posteriormente, fomos avaliar a capacidade de mantimento do peso corporal (**Protocolo 1**).

A **Figura 3** mostra que quando submetidos à sepse grave e tratados com antibiótico, os animais apresentam uma queda da massa corpórea nos primeiros dias após a infecção, mas restabelecem o peso com o decorrer do tempo. Este resultado difere do

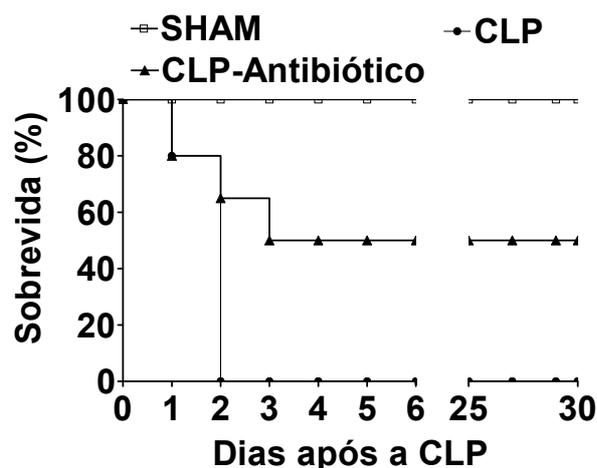
observado nos animais controles (SHAM), já que estes apresentam ganho de massa corpórea durante o período analisado.

#### **4.1.4. Análise do parâmetro de dano tecidual em animais sépticos tratados com antibiótico**

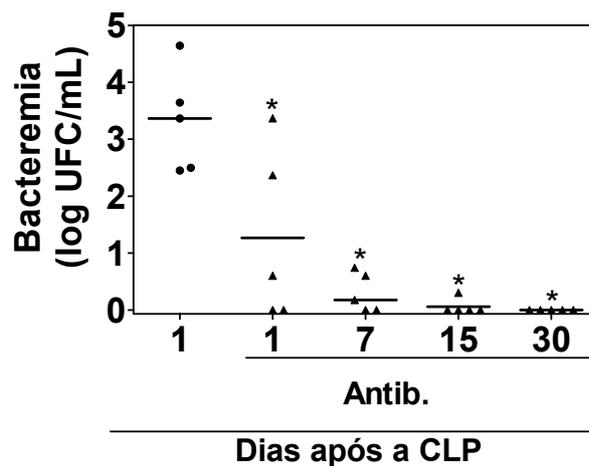
Sabendo-se que a mortalidade na sepse grave decorre, na maior parte das vezes, de lesões teciduais capazes de desencadear falência múltipla de órgãos, fomos verificar a presença de possível dano hepático, já que este órgão é um dos primeiros a serem acometidos (**Protocolo 1**).

No 1º dia após a indução da sepse grave, como pode ser observado na **Figura 4**, os animais tratados ou não com antibiótico apresentaram níveis elevados de aspartato-aminotransferase (AST) no soro, indicando a presença de lesão hepática. Contudo, os níveis deste marcador foram sendo gradativamente reduzidos no decorrer do tempo em animais tratados com o antibiótico, atingindo níveis basais no 30º dia após a CLP.

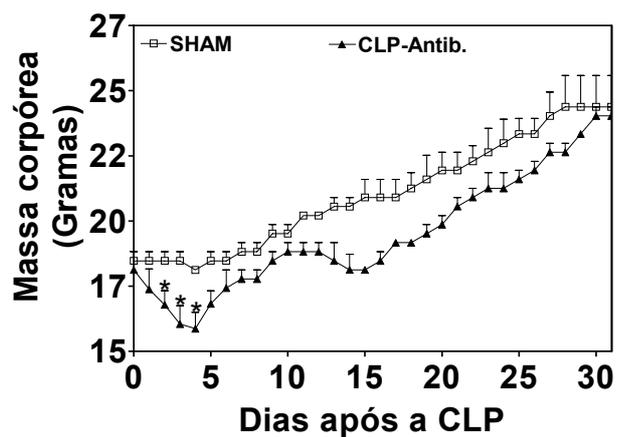
Dessa forma, esses dados em conjunto mostram que os animais sépticos tratados com antibiótico, embora apresentassem sinais clínicos da patologia, foram capazes de controlar a infecção, minimizar os sintomas e retornar aos níveis basais no máximo em 15 dias.



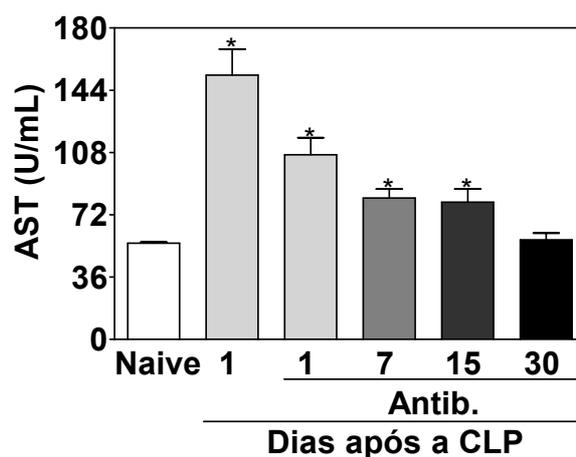
**Figura 1: Sobrevida após indução da sepse polimicrobiana grave com tratamento de antibiótico.** A sobrevivida dos animais controles e submetidos à sepse grave com ou sem tratamento de antibiótico foi determinada diariamente por um período de 30 dias. Os animais submetidos à CLP receberam duas perfurações com a agulha 18G. Os SHAM-operados não tiveram perfurações no ceco. Na 6<sup>o</sup> h após a cirurgia, os animais sépticos foram tratados com antibiótico ertapenem sódico (20mg/ Kg), e a administração mantida em intervalos de 12h, durante 3 dias. Os resultados são representativos de três experimentos. Os dados correspondem às porcentagens de sobrevivência de dez a quinze animais por grupo. A taxa de sobrevivida dos animais sépticos tratados com antibiótico é significativamente diferente dos controles ( $P < 0,001$ , Mantel-Cox logrank).



**Figura 2: Determinação da bacteremia após indução da sepse polimicrobiana grave.** A quantificação das bactérias presentes no sangue foi realizada no 1º dia após a CLP em animais tratados ou não com antibiótico. No 7º, 15º, 30º dias após a CLP, somente foi avaliada a bacteremia nos animais tratados. Os resultados são representativos de três experimentos. Os dados correspondem ao logaritmo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL das amostras de cinco animais por grupo. \* $P < 0,001$  comparado com o 1º dia após a CLP sem tratamento (ANOVA seguido de Bonferroni).



**Figura 3: Curva de massa corpórea após indução da sepse polimicrobiana grave.** A massa corpórea dos animais sépticos tratados com antibiótico e SHAM (controle) foram determinadas diariamente por um período de 30 dias. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Os dados correspondem ao peso corporal em gramas de dez a quinze animais por grupo. \*  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

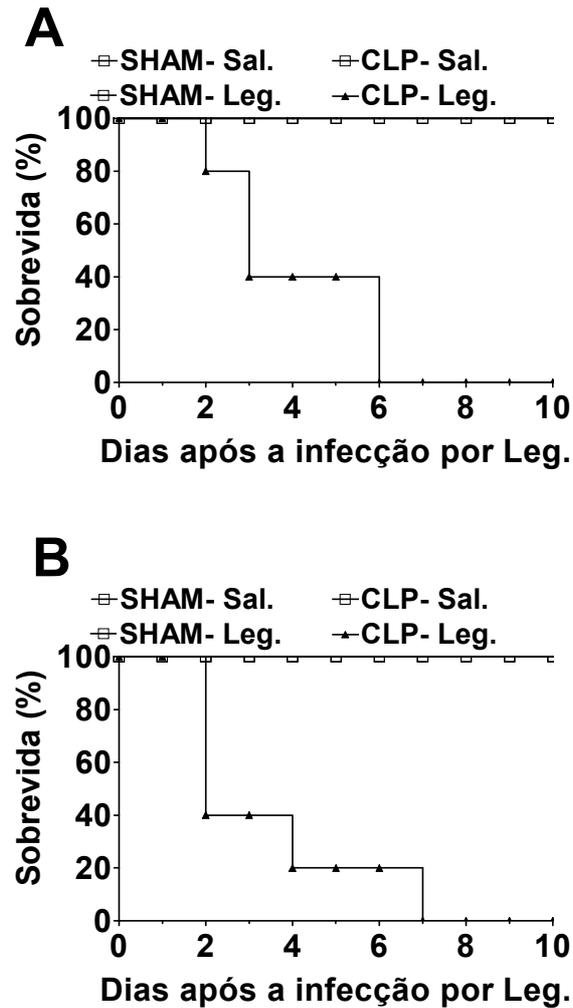


**Figura 4: Concentrações séricas de aspartato-aminotransferase após a sepse polimicrobiana grave.** As quantificações das concentrações de aspartato-aminotransferase (AST) foram realizadas com kit específico a partir de soros obtidos em 1, 7, 15 e 30 dias após a sepse grave com tratamento antibiótico, e em soros de animais controles. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Os dados correspondem às médias  $\pm$  EPM de cinco animais por grupo. \*  $P < 0,05$  indica aumento significativamente diferente em relação ao controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

#### 4.2. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE ANIMAIS SÉPTICOS À INFECÇÃO PULMONAR NÃO-LETAL INDUZIDA POR *Legionella pneumophila*.

Com o intuito de determinar o grau de susceptibilidade à infecção secundária após a sepse, os camundongos foram infectados i.n. com  $5 \times 10^7$  UFC de *L. pneumophila* no 15º dia após a indução da sepse polimicrobiana grave e, em seguida, a sobrevida analisada (**Protocolo 2**).

Após inoculação bacteriana ( $5 \times 10^7$  UFC), os camundongos sépticos tiveram 100 % de mortalidade até o sexto dia (**Figura 5, painel A**). O mesmo perfil de elevada susceptibilidade à infecção secundária também foi observado no 30º dia após a sepse grave (**Figura 5, painel B**). Entretanto, todos os controles sobreviveram ao final do 10º dia de observação. Estes dados demonstram que camundongos sobreviventes à CLP letal são susceptíveis às infecções não letais, possivelmente por estarem imunossuprimidos.



**Figura 5: Susceptibilidade de animais sépticos a infecção pulmonar não-letal induzida por *Legionella pneumophila*.** A sobrevivência dos animais controles ou infectados foi determinada diariamente por um período de 10 dias. Os animais controles ou sépticos foram inoculados i.n. com  $5 \times 10^7$  UFCs de *L. pneumophila* ou com salina 15 dias (A) e 30 dias (B) após a CLP. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Os dados correspondem às porcentagens de sobrevivência de seis a oito animais por grupo. A taxa de sobrevivência dos animais sépticos infectados foi significativamente inferior aos grupos controles ( $P < 0,001$ , Mantel-Cox logrank).

### 4.3. CINÉTICA DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T REGULADORAS NO FOCO DA INFECÇÃO APÓS INDUÇÃO DA SEPSE GRAVE

As células T reguladoras têm sido consideradas fundamentais no controle do sistema imune, principalmente em processos infecciosos. Recentemente, essas células foram descritas na sepse. Tendo isso em mente, fomos avaliar a frequência das células T reguladoras no foco da infecção em animais submetidos à sepse polimicrobiana grave (**Protocolo 1**).

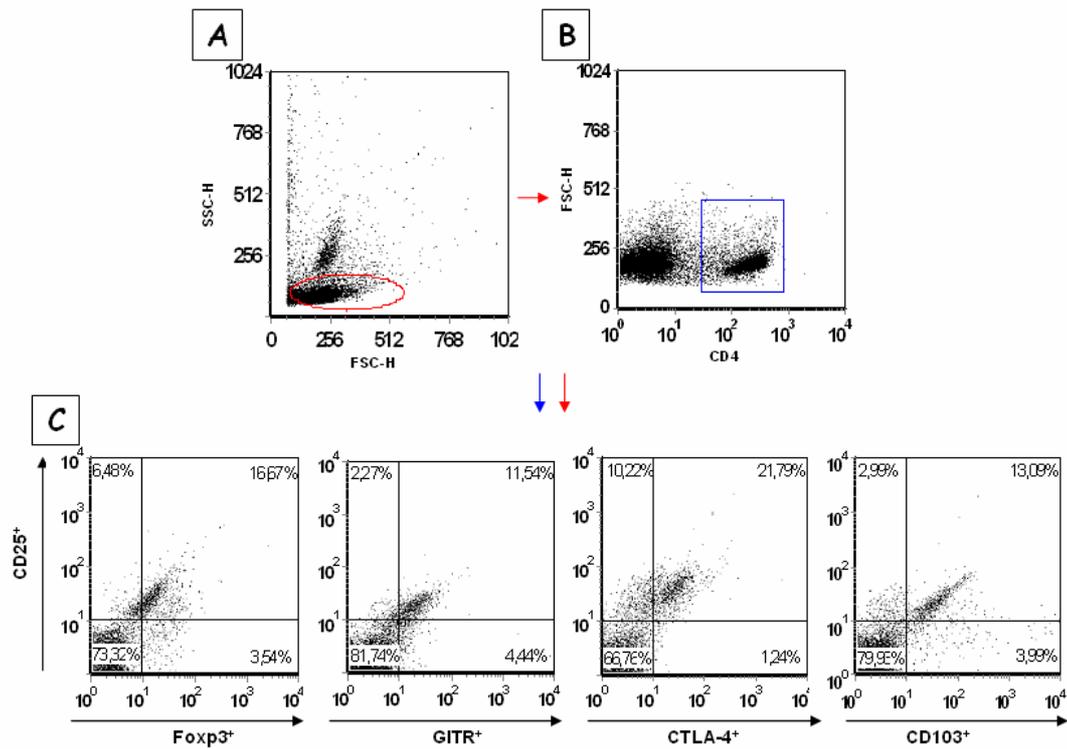
Sabendo-se ainda que a expressão de  $CD4^+CD25^+$  não é exclusiva de células T reguladoras, as populações de células T  $CD4^+CD25^+$  foram avaliadas também quanto à co-expressão de outras moléculas, como Foxp3, GITR, CTLA-4 e CD103. Foi identificada por citometria de fluxo a cinética de frequência das células T reguladoras de camundongos sépticos no período de 1, 7, 15 e 30 dias após a sepse polimicrobiana grave. Camundongos hígidos foram usados como controle.

A **Figura 6** ilustra a estratégia utilizada para essa análise, onde traçamos uma janela específica para linfócitos (R1 - vermelho), baseando-se nos parâmetros de complexidade (SSC- side light scatter) e tamanho (FSC- forward side scatter) dessa população celular (**Figura 6, painel A**). Em seguida, para melhor caracterizar a população de linfócitos T  $CD4^+$ , as células da região R1 foram distribuídas segundo os parâmetros de granulosidade e marcação para CD4, um marcador de células T  $CD4^+$  de camundongos. Desta maneira, delimitamos uma população homogênea com marcação de alta intensidade para  $CD4^+$  (R2 - azul), a qual corresponde aos linfócitos T  $CD4^+$  (**Figura 6, painel B**). Finalmente, as células delimitadas pelas regiões R1 e R2 foram somadas e distribuídas num parâmetro de  $CD25^+$  por Foxp3<sup>+</sup>, GITR<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup> ou CD103<sup>+</sup>, onde a população presente no quadrante direito superior foi considerada células T reguladoras (**Figura 6, painel C**).

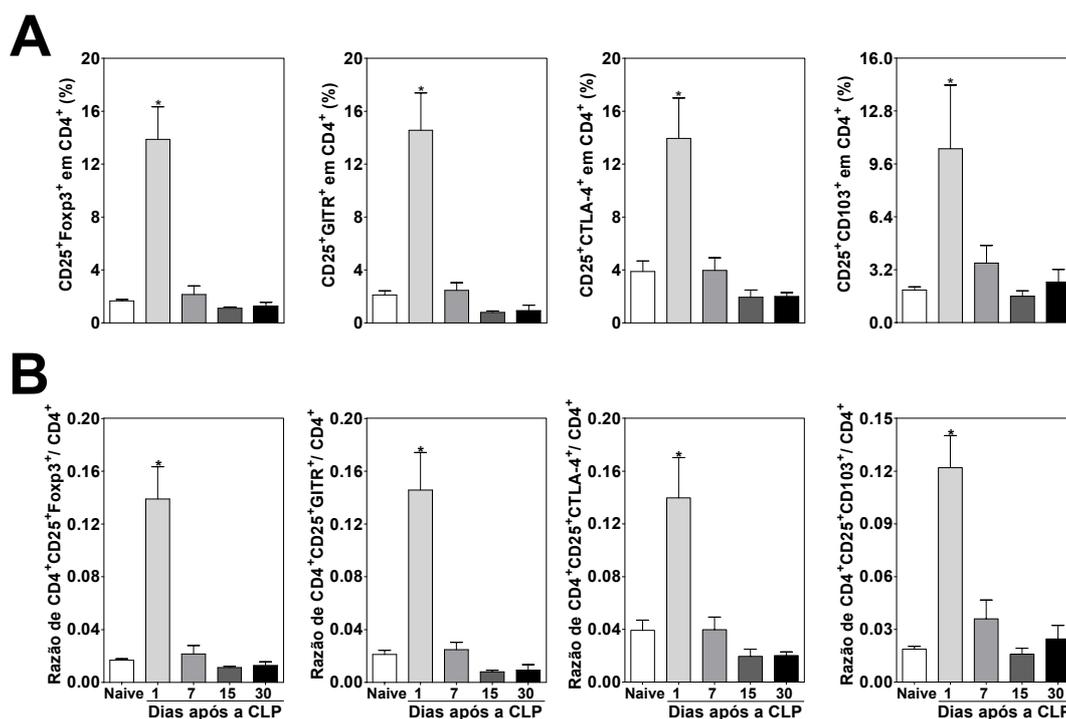
Os resultados foram apresentados em forma de gráfico de barras, indicando a percentagem de células T reguladoras e a razão da quantidade absoluta dessas células por T CD4<sup>+</sup> (**Figuras 7 e 8**).

De acordo com a **Figura 7**, no lavado peritoneal de animais sépticos observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da percentagem de células T reguladoras, indicadas pelos marcadores mencionados acima, 24 h após a indução da sepse grave (**Figura 7, painel A**). Isto foi confirmado pela elevação da razão entre células T reguladoras e linfócitos T CD4<sup>+</sup>, o qual demonstra que o número absoluto de células T reguladoras está aumentado em relação ao total de célula T CD4<sup>+</sup> no sítio avaliado (**Figura 7, painel B**). Entretanto, nos outros períodos analisados (7, 15 e 30 dias) observa-se uma gradativa diminuição que retornou ao estado basal quanto à frequência de células T reguladoras.

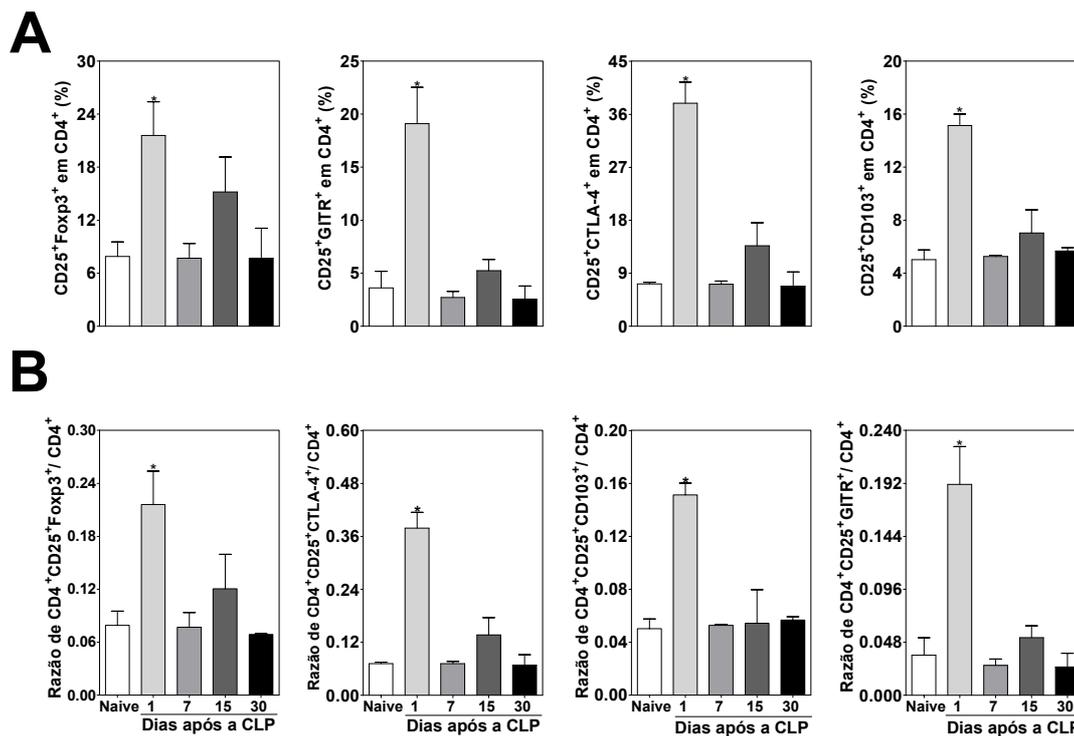
Paralelamente, no linfonodo mesentérico (drenante) presente no foco primário da infecção, foi observado um aumento significativo da frequência de células T reguladoras ( $p < 0,05$ ) somente no 1º dia após a sepse grave. A análise de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> ou GITR<sup>+</sup> ou CTLA-4<sup>+</sup> ou CD103<sup>+</sup> revelam este aumento, usando como parâmetro a percentagem e também a razão de células T reguladoras por células T CD4<sup>+</sup>, comparado com o controle (**Figura 8, painel A e B**).



**Figura 6: Estratégia de avaliação da expressão de marcadores de células T reguladoras por FACS.** Aqui esquematizado, o baço dos animais foi coletado, marcado com anti-CD4 e anti-CD25 e Fcpx3, GITR, CTLA-4 ou CD-103, e analisado por citometria de fluxo. (A) Dot plot representativo dos leucócitos totais do baço, no qual foi selecionada a janela (R1 - vermelho) para a população de linfócitos, através das características de complexidade (SSC-H) e tamanho celular (FSC-H). (B) Dot plot representativo das células da janela R1 distribuídas segundo os parâmetros de tamanho e marcação para CD4 para caracterizar a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, janela R2 (azul). (C) Dot plot representativo da combinação das janelas R1 e R2 utilizado para a análise da expressão de CD25<sup>+</sup> e Fcpx3<sup>+</sup>, GITR<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup> ou CD103<sup>+</sup> nas células T reguladoras.



**Figura 7: Análise da frequência de células T reguladoras no lavado peritoneal após a sepse polimicrobiana grave.** A análise da frequência de células T reguladoras foi realizada em 1, 7, 15 e 30 dias após a CLP seguida de tratamento antibiótico. (A) Porcentagem de expressão de alguns marcadores de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> ou GITR<sup>+</sup> ou CTLA-4<sup>+</sup> ou CD103<sup>+</sup>). (B) Razão de células T reguladoras (diferentes marcadores) por células T CD4<sup>+</sup>. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e correspondem às médias  $\pm$  SEM de três animais por grupo. \*  $p < 0,05$  indica diferença em relação ao controle (ANOVA seguido de Bonferroni).



**Figura 8: Análise da frequência de células T reguladoras no linfonodo mesentérico (drenante) após sepse polimicrobiana grave.** A análise da frequência de células T reguladoras foi realizada em 1, 7, 15 e 30 dias após a CLP com antibiótico. (A) Porcentagem de expressão de alguns marcadores de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> ou GITR<sup>+</sup> ou CTLA-4<sup>+</sup> ou CD103<sup>+</sup>). (B) Razão de células T reguladoras (diferentes marcadores) por células T CD4<sup>+</sup>. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e correspondem às médias ± SEM de três animais por grupo. \* p<0,05 indica diferença em relação ao controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

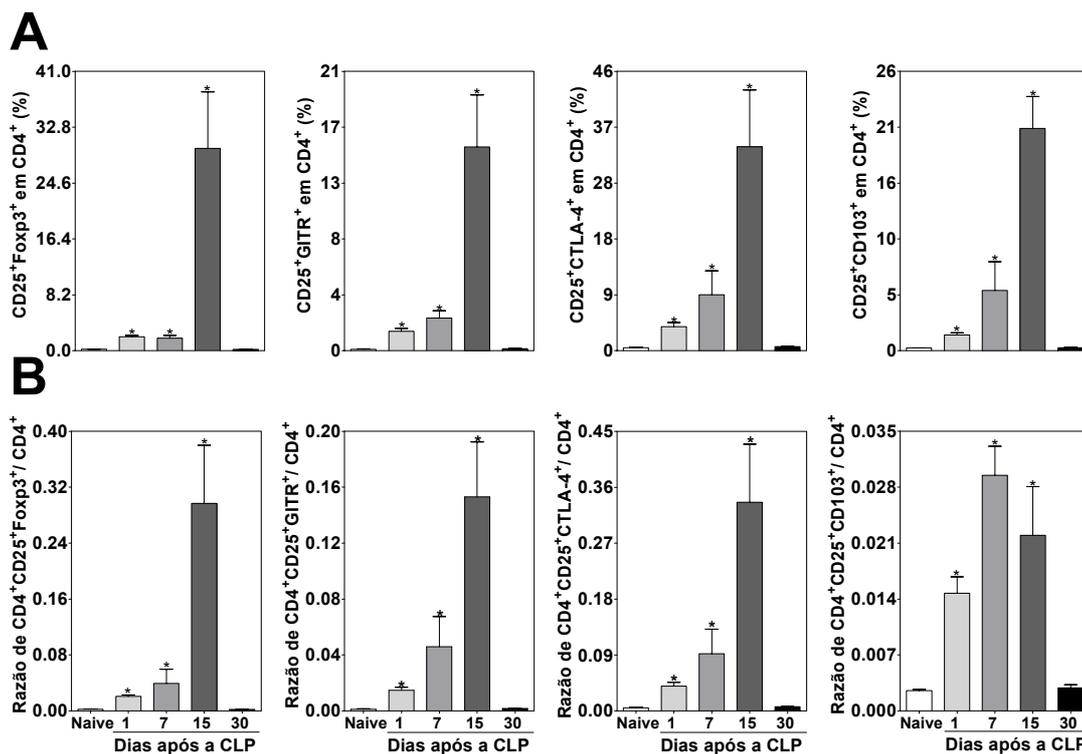
#### 4.4. CINÉTICA DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T REGULADORAS NOS ÓRGÃOS LINFÓIDES APÓS A INDUÇÃO DA SEPSE GRAVE

Para caracterizar o perfil de frequência sistêmica de células T reguladoras em camundongos submetidos à CLP nos diferentes tempos, o fenótipo das células recuperadas dos órgãos desses animais foi analisado por citometria de fluxo (**Protocolo 1**). Os resultados observados refletem tanto a percentagem de células T reguladoras positivas (**Figura 9 e 10, painel A**) quanto à razão de células T reguladoras na população de células T CD4<sup>+</sup> (**Figura 9 e 10, painel B**), comparado com o controle.

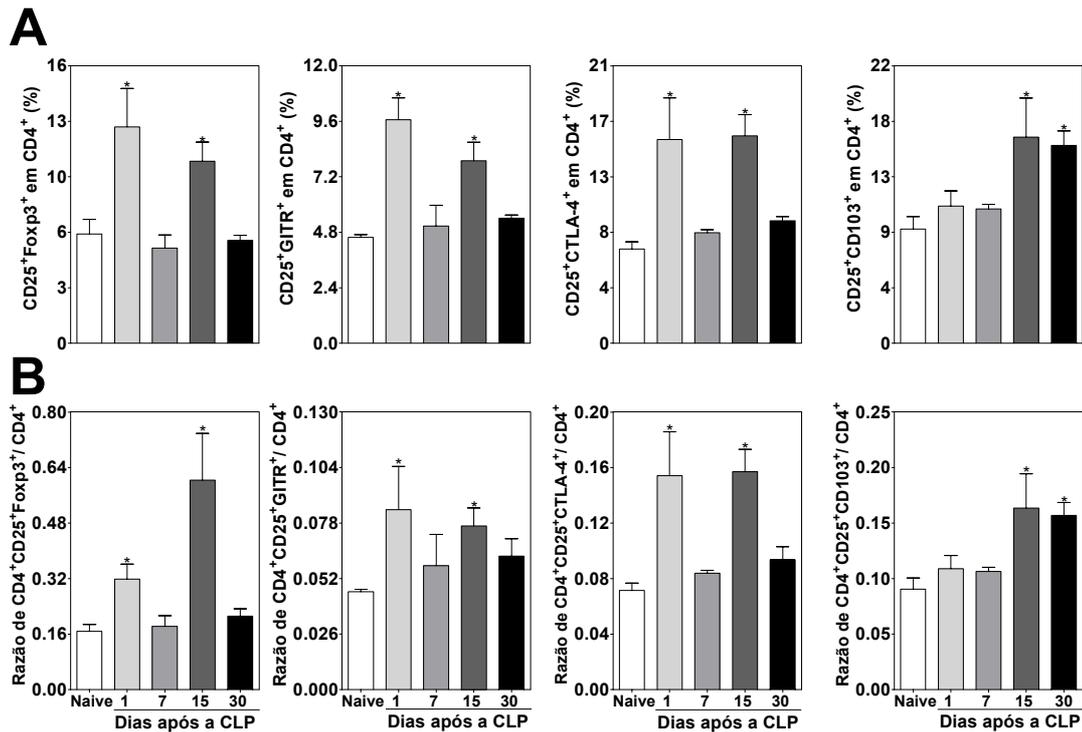
Primeiramente, comparamos com camundongos controles os animais submetidos à CLP quanto à frequência de células T reguladoras no timo. Observamos um aumento significativo de células T reguladoras por diferentes marcadores numa fase inicial (1 dia após CLP), cuja expressão permaneceu constante ao 7<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias após a cirurgia. Entretanto, notamos redução à níveis basais na frequência de células T reguladoras em 30 dias (**Figura 9**).

No baço, foi observada uma elevação significativa da frequência de células T reguladoras para a maioria dos marcadores no 1<sup>o</sup> dia, porém não mantida no 7<sup>o</sup> dia após a indução da sepse. Todavia, no 15<sup>o</sup> dia estas células apresentaram novo aumento, sendo que no 30<sup>o</sup> dia após a cirurgia, os níveis de expressão de marcadores destas células retornaram ao basal. Com exceção do CD103, o qual, apresentaram aumento somente no 15<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia após a indução da sepse grave (**Figura 10, painel A e B**).

Vale ressaltar que animais hígidos tratados com antibiótico comportam-se de maneira similar àqueles sem tratamento com relação à frequência de células T reguladoras em todos os tecidos analisados (**dados não mostrados**).



**Figura 9: Frequência das células T reguladoras no timo após sepse polimicrobiana grave.** A análise da frequência de células T reguladoras foi realizada em 1, 7, 15 e 30 dias após a CLP. (A) Porcentagem de expressão de alguns marcadores de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e Fcγp3<sup>+</sup> ou GITR<sup>+</sup> ou CTLA-4<sup>+</sup> ou CD103<sup>+</sup>). (B) Razão de células T reguladoras (diferentes marcadores) por células T CD4<sup>+</sup>. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e correspondem às médias  $\pm$  SEM de três animais por grupo. \*  $p < 0,05$  indica diferença em relação ao controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

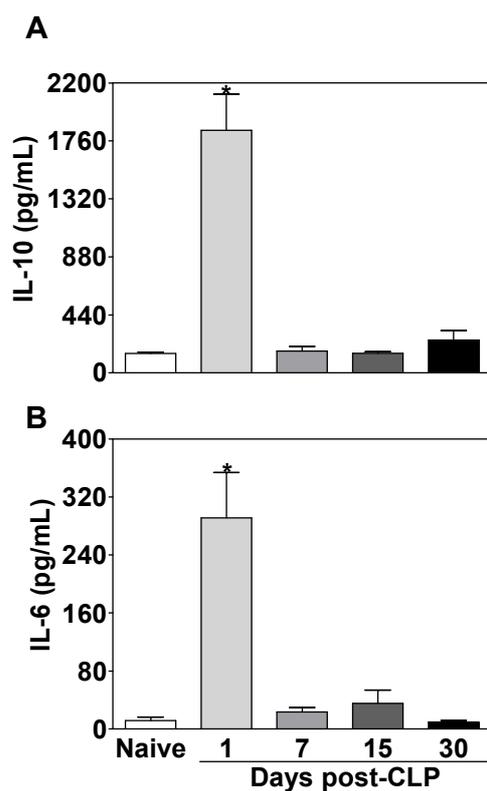


**Figura 10: Freqüência de células T reguladoras no baço após sepse polimicrobiana grave.** A análise da freqüência de células T reguladoras foi realizada em 1, 7, 15 e 30 dias após a CLP. (A) Porcentagem de expressão de alguns marcadores de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> ou GITR<sup>+</sup> ou CTLA-4<sup>+</sup> ou CD103<sup>+</sup>). (B) Razão de células T reguladoras (diferentes marcadores) por células T CD4<sup>+</sup>. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e correspondem às médias  $\pm$  SEM de três animais por grupo. \*  $p < 0,05$  indica diferença em relação ao controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

#### 4.5. AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS NO FOCO DA INFECÇÃO

Durante a modulação do processo séptico, um amplo espectro de mediadores inflamatórios é liberado no foco inflamatório na tentativa de controlar a infecção. Por ser pertinente ao nosso estudo, destacamos que a citocina IL-6, além de tentar controlar a infecção, tem papel na modulação negativa das células T reguladoras, enquanto a citocina IL-10 tem papel imunomodulador, relacionadas ao quadro de imunossupressão, por ser um dos mecanismos de supressão das células T reguladoras (revisto por LERNER, 2007; LEY et al., 2007). Dessa forma, desejando verificar o perfil dessas citocinas no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave, foram quantificados os níveis de IL-10 e IL-6 no lavado peritoneal, em 1, 7, 15 e 30 dias após a indução da sepse (**Protocolo 1**).

Na **Figura 11**, está demonstrado que os animais submetidos à CLP apresentaram no lavado peritoneal um aumento significativo dos níveis de IL-10 e IL-6 no 1º dia. Já no 7º, 15º e 30º dias estas citocinas estão praticamente em níveis basais.



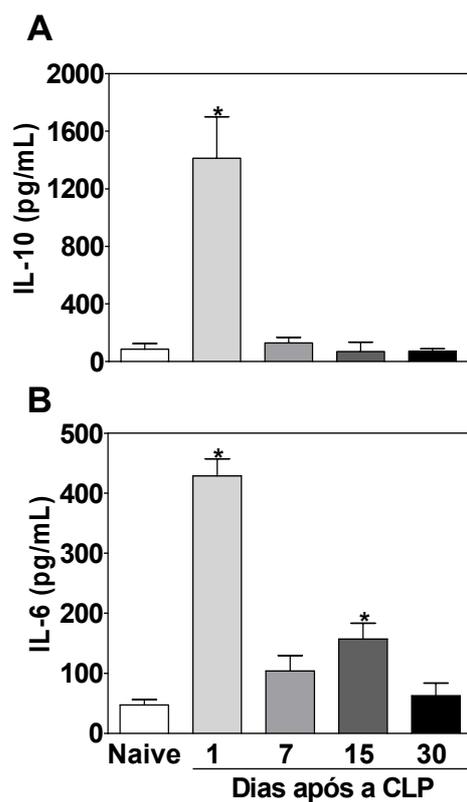
**Figura 11: Quantificação de citocinas no lavado peritoneal após indução da sepse polimicrobiana grave.** (A) IL-10 e (B) IL-6 foram quantificados por ELISA no lavado peritoneal dos animais obtidos 1, 7, 15 e 30 dias após a indução da sepse grave. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. Os dados correspondem às médias  $\pm$  EPM de cinco animais por grupo. \*  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

#### 4.6. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS DURANTE A SEPSE GRAVE

As citocinas são, reconhecidamente, importantes mediadores responsáveis pela ativação celular e amplificação da resposta inflamatória. A liberação sistêmica de mediadores inflamatórios é responsável pela maioria das alterações fisiológicas como falência múltipla de órgãos e imunossupressão, descritas em pacientes e em modelos experimentais de sepse (CAVAILLON et al., 2003; BHATTACHARYYA et al., 2004).

Na tentativa de avaliar se a sepse grave poderia alterar a produção sistêmica de citocinas, já que se observa uma disfunção imune, determinamos os níveis séricos das citocinas IL-10 e IL-6 no 1º, 7º, 15º e 30º dias após indução da sepse polimicrobiana, por ELISA (**Protocolo 1**).

Houve um aumento significativo na secreção de IL-10 no soro coletado 1 dia após a indução da sepse, detectamos o retorno da IL-10 ao nível basal nos demais períodos avaliados de 7, 15 e 30 dias, comparado com o controle (**Figura 12 - painel A**). Analogamente, a IL-6 apresentou elevação em seus níveis séricos no 1º dia e redução no 7º dia após a sepse. Interessantemente, no 15º dia o nível dessa citocina estava novamente elevado, retornando aos níveis basais no 30º dia (**Figura 12, painel B**).



**Figura 12: Quantificação de citocinas no sangue após indução da sepse polimicrobiana grave.** (A) IL-10 e (B) IL-6 foram quantificados por ELISA no soro dos animais obtido 1, 7, 15 e 30 dias após a indução da CLP. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. Os dados correspondem às médias  $\pm$  EPM de cinco animais por grupo. \*  $P < 0,05$  indica diferença significativamente superior em relação ao controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

#### 4.7. DEPLEÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS NÃO MODULA A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS T CD4<sup>+</sup> CONVENCIONAIS

A anergia de linfócitos T é um aspecto imunológico característico de indivíduos imunossuprimidos. No sentido de verificar os mecanismos de supressão instalados durante a imunossupressão causada pela sepse letal, analisamos primeiramente a capacidade de proliferação das células totais do baço de camundongos no 15º dia após a sepse grave. Nesse período houve aumento da frequência de células T reguladoras acompanhadas de um aumento da susceptibilidade à infecção por *L. pneumophila*. Células provenientes de camundongos hígidos foram usadas como controle, e os leucócitos foram cultivados por 3 dias na presença de estímulo policlonal (anti-CD3) ou apenas em meio de cultura, e posteriormente analisadas a proliferação com auxílio da incorporação de timidina triciada (<sup>3</sup>H Timidina) (**Protocolo 3**).

Observamos que, enquanto as células obtidas dos controles foram capazes de proliferar na presença de anti-CD3, as obtidas de animais sépticos apresentaram redução da atividade proliferativa na presença do mesmo estímulo (**Figura 13, painel A**).

Para verificar os mecanismos envolvidos com a imunossupressão em camundongos no 15º dia após o estímulo inicial (CLP), anticorpos anti-GITR (**Figura 13, painel B**) ou anti-CTLA-4 (**Figura 13, painel C**) foram adicionados à cultura. Ambos os anticorpos potencializaram a proliferação de células sépticas e controles, mas ainda assim permaneceu uma diferença entre os grupos. Dessa forma, mostramos que as células totais de camundongos sépticos no 15º dia encontraram-se suprimidas, mesmo com a inibição de alguns mecanismos de imunossupressão descritos.

Desta forma, foi analisada ainda a capacidade proliferativa das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, agora purificadas do baço de camundongos sépticos ao 15º dia (**Protocolo 3**).

O anticorpo anti-CD3 foi adicionado à cultura e novamente a inibição da proliferação celular foi evidenciada (**Figura 14, painel A**).

Outro ponto avaliado foi os mecanismos de supressão das células T reguladoras, decorridos 15 dias após a sepse grave (**Protocolo 3**). Como a supressão de proliferação pode ser demonstrada ao se colocar uma célula T  $CD4^+CD25^-$ , purificada por separação magnética, com adição de célula T  $CD4^+CD25^+$  (células T reguladoras) (concentração 1:1) na presença de anti-CD3 em cultura. Observamos que, as células T reguladoras de animais sépticos apresentam capacidades supressoras inalterada, comparadas com o controle (**Figura 14**).

Devido a observação de que, no 15º dia após a sepse polimicrobiana, as células T  $CD4^+$  apresentavam inabilidade da proliferação, avaliamos a viabilidade das células T  $CD4^+$  convencionais sépticas, uma vez que poderiam estar apoptóticas, o que poderia levar a um comprometimento celular. Dessa maneira, as células totais do baço foram analisadas aos 15 dias após a sepse, por citometria de fluxo. Os marcadores anexina-V e  $CD4^+$  (descrito a estratégia de análise em *Materiais e Métodos*) foram utilizados para investigação da morte celular programada.

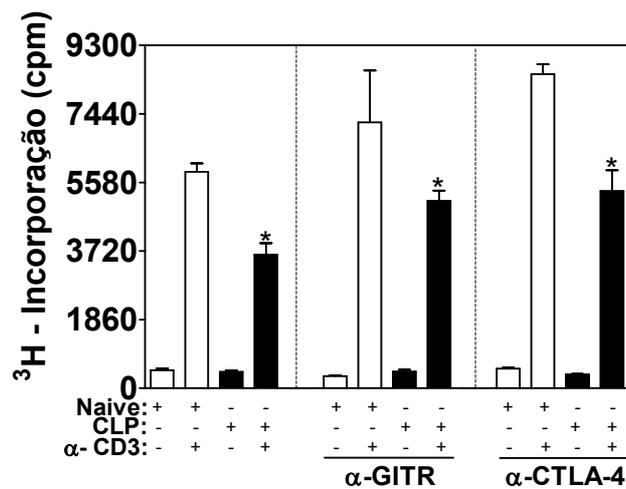
Foi possível ver, através desse experimento, células T  $CD4^+$  sem diferença significativa quanto a apoptose celular, comparada ao controle (**Figura 15**). Pela análise desses dados, excluimos a possibilidade dessas células T  $CD4^+$  sépticas estarem mortas, e por esse motivo, ter ausência de proliferação.

Importante ressaltar que as células T  $CD4^+$  são componentes centrais da resposta imune adaptativa, porque em doenças como a síndrome da imunodeficiência adquirida, a diminuição de linfócitos T  $CD4^+$  está associada com uma alta susceptibilidade a infecções (revisto por HARRINGTON & MANGAN & WEAVER, 2006). Para investigar o papel

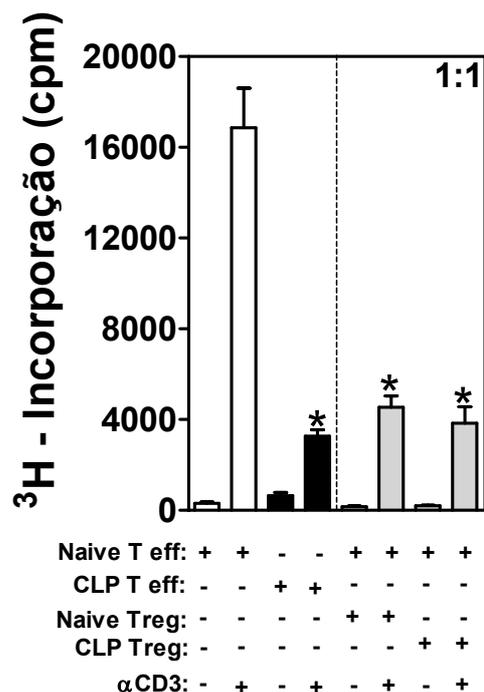
das células T CD4<sup>+</sup> na susceptibilidade à infecção por *L. pneumophila*, a sobrevida foi analisada após infecção de camundongos C57BL/6 e CD4<sup>-/-</sup> (**Protocolo 2**).

Os resultados demonstraram que camundongos CD4<sup>-/-</sup> infectados com *L. pneumophila* têm uma sobrevida em aproximadamente 50 %, ao passo que camundongos C57BL/6 infectados com essa bactéria, apresentaram 100 % de sobrevida (**Figura 16**).

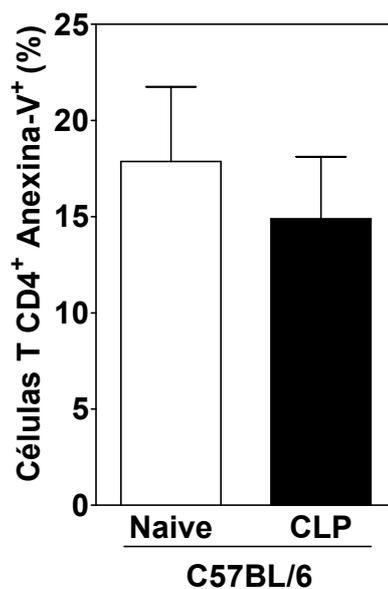
De forma geral, estes resultados enfatizam a importância das células T CD4<sup>+</sup> no controle da resposta infecciosa, pois, como demonstrado anteriormente, as células T CD4<sup>+</sup> já apresentam comprometimento no 15º dia após a sepse grave. Tal efeito pode ter tido origem na fase aguda da doença, já que a inibição das células T reguladoras *in vitro* não reverteu o efeito, conferindo imunossupressão tardia.



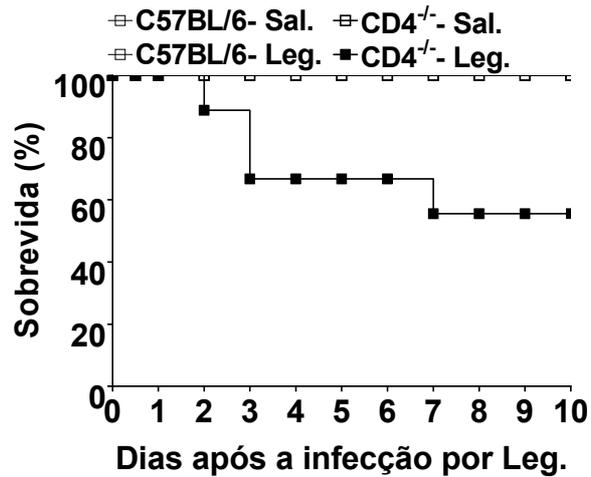
**Figura 13: Anti-GITR e anti-CTLA-4 não modulam a proliferação celular após a sepse polimicrobiana grave.** Células totais obtidas do baço de animais no 15º dia após a indução da sepse ou controles foram colocadas em cultura por 3 dias na presença de meio de cultura ou anti-CD3 (A), adicionados ou não a anticorpo anti-GITR (B) ou anti-CTLA-4 (C). Posteriormente, as células foram recuperadas e analisadas quanto a incorporação de timidina ( $^3\text{H}$ ) pelo cintilador  $\beta$ . Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Os dados correspondem às médias  $\pm$  EPM de cinco animais por grupo. \* $P < 0,05$  indica diferença em relação aos respectivos controles (ANOVA seguido de Bonferroni).



**Figura 14: Depleção de células T reguladoras não modula a proliferação de células T CD4 convencionais sépticas.** Células T  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  e  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  obtidas do baço de animais sépticos no dia 15 após a CLP foram isoladas por separação magnética e colocadas em cultura na concentração de 1:1 por 3 dias na presença de anti-CD3 ou apenas meio de cultura. Em seguida as células foram recuperadas e analisadas quanto a incorporação de timidina ( $^3\text{H}$ ) pelo cintilador  $\beta$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes, realizado em *pool* de três animais por grupo (purificação), sendo a cultura realizada em triplicata. \* $p < 0,001$  indica diferença significativa em relação às células T efetoras “naive”.



**Figura 15: Células T CD4<sup>+</sup> sépticas não apresentam aumento da frequência de marcadores apoptóticos.** Células do baço de animais no 15<sup>o</sup> dia após a indução da sepse foram analisadas quanto à frequência dos marcadores CD4 e Anexina V, por citometria de fluxo. O resultado da análise foi descrito como porcentagem de frequência de anexina V (apoptose) em células T CD4<sup>+</sup>. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. Os dados correspondem às médias  $\pm$  EPM de três animais por grupo. Não houve diferença em relação ao controle (ANOVA seguido de Bonferroni).



**Figura 16: Animais CD4<sup>-/-</sup> hígdos são mais susceptíveis à infecção não letal por *Legionella pneumophila*.** A sobrevivência foi determinada diariamente por um período de 30 dias. Os animais C57BL/6 e CD4<sup>-/-</sup> hígdos foram infectados i.n. com  $5 \times 10^7$  UFCs. Os resultados são representativos de dois experimentos. Os dados correspondem às porcentagens de sobrevivência de oito a dez animais por grupo. A taxa de sobrevivência dos animais CD4<sup>-/-</sup> infectados foi significativamente diferente da taxa dos controles ( $P < 0,001$ , Mantel-Cox logrank).

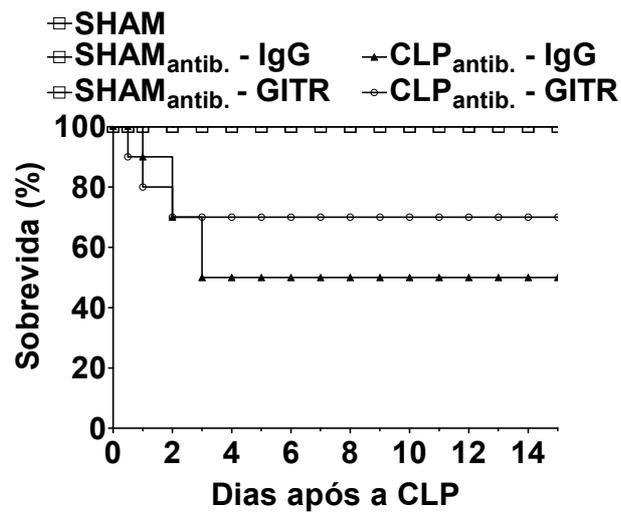
#### 4.8. AS CÉLULAS T REGULADORAS APRESENTAM PAPEL CRUCIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA IMUNOSSUPRESSÃO

Na tentativa de elucidar a ação das células T reguladoras sobre o aspecto de imunossupressão, os camundongos sépticos foram tratados com anticorpo anti-GITR ou anti-IgG (controle). As doses foram administradas 1 hora antes da CLP e no 3º, 9º e 15º dias. No último dia, 1 hora após o tratamento, os animais foram infectados com *L. pneumophila*, gerando uma segunda infecção. Juntamente, a sobrevivência dos camundongos tratados com anti-GITR frente à indução da sepse e depois da infecção secundária, foi avaliada.

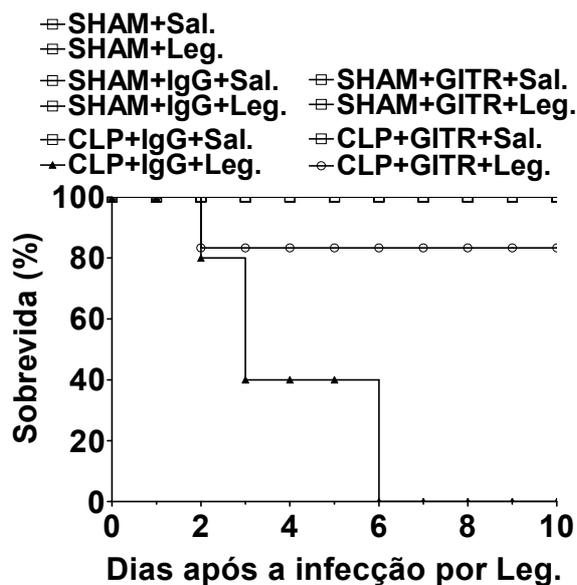
Os resultados demonstram que após a CLP a ausência de um dos mecanismos de supressão permitiu uma sobrevivência em torno de 70 %, comparados com os camundongos submetidos somente a sepse grave (50 %), ou seja, sobreviveu 20 % superior quando de células T reguladoras estavam ausentes (**Figura 17**).

Como descrito anteriormente, os camundongos foram infectados com  $5 \times 10^7$  UFCs aos 15 dias após indução da sepse grave. Aqueles camundongos tratados com anti-GITR apresentaram, de forma surpreendente e inédita, uma mortalidade de aproximadamente 15 %, enquanto que os tratados com IgG (controle), 15 dias após a CLP, estavam 100 % mortos (**Figura 18**).

Assim, o conjunto dos resultados obtidos sugere que as células T reguladoras são uma das grandes responsáveis pelo quadro de imunossupressão observado.



**Figura 17: Administração do anticorpo anti-GITR aumenta a sobrevivência dos animais submetidos à sepse polimicrobiana grave com tratamento de antibiótico.** Os animais foram tratados com anticorpo anti-GITR (1 mg/animais), 1 hora antes da CLP e 3°, 9° e 15° dias depois a esse episódio séptico. Sendo que após a CLP, os animais foram avaliados quanto à sobrevivência diariamente por um período de 10 dias. Os dados são representativos de dois experimentos. Os dados correspondem às porcentagens de sobrevivência de cinco a oito animais por grupo. A taxa de sobrevivência dos animais submetidos à CLP com administração de anti-GITR é significativamente diferente dos controles ( $P < 0,001$ , Mantel-Cox logrank).



**Figura 18: Administração de anticorpo anti-GITR modula a sobrevivência de animais sépticos a infecção não-letal por *Legionella pneumophila*.** A sobrevivência dos animais foi determinada diariamente durante 10 dias. Os animais foram tratados com anticorpo anti-GITR (1 mg/animal), 1 hora antes da CLP e posteriormente no 3º, 9º e 15º dias. No último dia, 1 hora após o tratamento, os animais foram infectados i.n. com  $5 \times 10^7$  UFCs de *L. pneumophila*. Os dados são representativos de dois experimentos. Os dados correspondem às porcentagens de sobrevivência de cinco a oito animais por grupo. A taxa de sobrevivência dos animais sépticos administrados o anti-GITR e depois infectados é significativamente diferente dos controles ( $P < 0,001$ , Mantel-Cox logrank).

## Discussão

✂ O Papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental

---

## 5. DISCUSSÃO

A sepse grave é descrita como sendo uma resposta inflamatória sistêmica resultante da inabilidade do sistema imune em controlar a infecção; condição essa que contribui para o agravamento da doença e também para instalação de um quadro de imunossupressão (COHEN et al., 2002). De fato, estudos demonstraram que, tanto em pacientes como em modelos experimentais de sepse grave, ocorre um quadro de imunossupressão (RIEDEMANN et al., 2003; BENJAMIM et al., 2003; STEINHAUSER et al., 1999). Pesquisas recentes têm caracterizado o aumento das células T reguladoras em processos infecciosos, principalmente na sepse grave (SHEVACH et al., 2002; MONNERET et al., 2003; VENET et al., 2004; BELKAID; ROUSE, 2005; OFFNER et al., 2006; MACCONMARA et al., 2006; SCUMPIA et al., 2006; WISNOSKI et al., 2007; CHEN et al., 2007).

No sentido de contribuir para o entendimento da relação entre sepse grave e imunossupressão, avaliou-se a participação das células T reguladoras na gênese da susceptibilidade à infecções secundárias, no desenvolvimento do processo séptico. Embora a sepse tenha sido amplamente descrita, o desenvolvimento da imunossupressão ainda está por ser elucidado.

A fase inicial do trabalho consistiu em desenvolver um método para obtenção de animais que tivessem sobrevivido a um episódio de sepse polimicrobiana grave. Utilizou-se, então, um modelo de indução de sepse (CLP) com taxa de mortalidade de 100%, seguido de administração de antibiótico, visando reduzir a proliferação dos patógenos. Sabendo que na 6ª hora após a cirurgia os animais apresentaram sinais clínicos característicos dessa patologia, o tratamento com o antibiótico ertapenem sódico foi mantido por 3 dias, segundo descrito por Benjamim e colaboradores com algumas

modificações (BENJAMIM et al., 2003). Foi observado que os animais sépticos tratados com antibiótico apresentaram aumento de aproximadamente 50% na sobrevida (**Figura 1**). Como esperado, nesses animais tratados com antibiótico foi observado um aumento do *clearance* bacteriano (**Figura 2**). Além disso, houve redução da massa corpórea na fase inicial da sepse grave, porém conseguiram recuperar o peso corporal com o decorrer do tempo (**Figura 3**). Em adição, analisou-se a lesão tecidual como parâmetro para demonstrar se os animais sépticos tratados com antibiótico apresentavam falência múltipla de órgãos. Verificou-se dano hepático no 1º dia após a sepse grave. Entretanto, os camundongos apresentaram redução da lesão hepática em até 30 dias após a sepse (**Figura 4**). Até aqui, o tratamento com antibiótico nos animais sépticos conferiu aumento da sobrevida e restabelecimento das alterações causadas pelo processo séptico, em pelo menos 15 dias. Estes dados são consistentes com inúmeros relatos demonstrando a efetividade do tratamento com o antibiótico Ertapenem sódico ou Imipenem sódico em aumentar a sobrevida na sepse (NATHAN et al., 1983; BENJAMIM et al., 2003; VIANNA et al., 2004; VYAS et al., 2005); apesar de um único estudo demonstrar ineficácia do tratamento (MARTIGNONI et al., 2007). Sendo um antibiótico com amplo espectro de ação bactericida contra uma variedade de microrganismos (NATHAN et al., 1983; VIANNA et al., 2004; VYAS et al., 2005), pode-se especular que a linhagem do animal, o modelo de sepse, e principalmente o esquema posológico do tratamento, pudessem gerar diferenças na sobrevida destes animais.

Por outro lado, embora os animais sépticos apresentassem bom controle da infecção primária, foram altamente susceptíveis à infecção oportunista causada pelo bacilo gram-negativo *Legionella pneumophila*, causadoras de pneumonia atípica, denominada doença do legionário, que pode ser letal especialmente em indivíduos imunocomprometidos. Um terço das pneumonias graves é causada pela infecção por *L. pneumophila*, havendo

anualmente cerca de 1 caso em cada 20.000 pessoas nos países desenvolvidos, infelizmente, com índice 10 a 50% de mortalidade (TKATCH et al., 1998). Ao inocular uma concentração de  $5 \times 10^7$  UFCs de *L. pneumophila* via i.n., 15 dias após a indução da sepse grave, os camundongos sépticos apresentaram 100% de mortalidade, ao passo que os animais hígidos sobreviveram durante todo o período de observação (**Figura 5**). Consistente com este achado, estudos demonstraram que os animais sépticos são mais susceptíveis a *Pseudomonas aeruginosa* (STEINHAUSER et al., 1999) e *Aspergillus fumigatus* (BENJAMIM et al., 2003). Assim, esses resultados, inequivocamente, demonstraram que os animais sépticos apresentaram um quadro importante de imunossupressão.

Uma vez padronizado o perfil dos camundongos sépticos susceptíveis a infecções secundárias oportunistas, o próximo passo foi avaliar a contribuição da expressão das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão. Para isso, utilizaram-se diferentes marcadores na tentativa de englobar todas as populações de células T reguladoras, dada a inexistência de marcador específico para estas células. As células T  $CD4^+CD25^+$  que co-expressam  $Foxp3^+$ ,  $GITR^+$ ,  $CTLA-4^+$  e  $CD103^+$  (revisto por NAKAMURA et al., 2001; FEHERVARI; SAKAGUCHI, 2004) foram avaliadas em diferentes tecidos. Inicialmente, analisou-se a cinética de frequência dessas células T reguladoras no sítio da infecção primária, tanto no lavado peritoneal e como no linfonodo (refletindo o que acontece no sítio de infecção), e observado aumento da expressão das células T reguladoras (pelos diferentes marcadores) somente no 1º dia após a indução da sepse polimicrobiana grave (**Figura 6 e 7**). Este resultado pode ser explicado, pois na fase inicial da sepse existe uma produção exacerbada de mediadores inflamatórios, havendo um recrutamento de diferentes células incluindo as T reguladoras (LEY et al., 2007). Estas células podem expressar CCR5 na sua superfície e migrar para tecidos periféricos

inflamados, através da interação desse receptor com a quimiocina ligante (CCL4), como descrito por Wysocki e colaboradores (WYSOCKI et al., 2005). Assim, possivelmente, esse aumento se deve à frequência das células T reguladoras na fase inicial da sepse, pois ao cessar a infecção local, os níveis normais são retomados.

Analisou-se, no timo, o fenótipo das células T reguladoras por diferentes marcadores. Houve aumento significativo na frequência dessas células no 1º dia, permanecendo elevado até o 15º dia após a sepse grave (**Figura 8**). Considerando que na sepse grave ocorre um estímulo inicial intenso capaz de promover uma descontrolada, sugeriu-se que essa disfunção comprometeria o timo provocando um aumento na diferenciação e maturação das células T reguladoras. Esse órgão, em plena atividade (do nascimento a puberdade), contribui com o repertório de células T, e, ao transcorrer dos anos, passa por um processo natural de involução, ocorrendo maturação celular em menor proporção (GRAY et al., 2006).

No baço, refletindo o que acontece sistemicamente, verificou-se um aumento da frequência de células T reguladoras no 1º dia após a indução da sepse grave, retornando aos níveis basais em 7 dias, e aumentando novamente no 15º dia após a sepse. Conforme já descrito, levou-se em consideração a avaliação de células T  $CD4^+CD25^+$  que co-expressam  $Foxp3^+$ ,  $GITR^+$ ,  $CTLA-4^+$  e  $CD103^+$ , na tentativa de abranger todas as células T reguladoras. Observou-se a mesma característica de aumento, no 1º e 15º dias, para a maioria dos marcadores. A expressão de células T  $CD4^+CD25^+CD103^+$  foi exceção, uma vez que no baço a elevação se deu no 15º e 30º dia (**Figura 9**). A explicação para esse fenômeno advém do fato do receptor  $CD103^+$  não ser um marcador específico para as células T reguladoras, mesmo quando avaliado juntamente com marcador  $CD4^+$  e  $CD25^+$ . Este receptor pode também estar presente em diferentes células, como linfócitos T ativados, linfócitos T intra-epiteliais, linfócitos T na mucosa etc. (ABBAS; LICHTMAN,

2005). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados que expressam CD25<sup>+</sup> também podem expressar CD103. Também, esse receptor é uma subunidade das integrinas (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Corroborando esses dados (com exceção do CD103), Scumpia e colaboradores e Wisnoski e colaboradores, demonstraram um aumento da frequência dessas células T reguladoras no baço no 1º dia após a indução da sepse experimental em animais (SCUMPIA et al., 2006; WISNOSKI et al., 2007). Já Venet e colaboradores, observaram este aumento da frequência de células T reguladoras no sangue periférico de humanos (VENET et al., 2004).

Adicionalmente, foi avaliada a produção das citocinas IL-6 e IL-10, visto que, respectivamente, uma interleucina tem participação na modulação negativa das células T reguladoras, enquanto a outra citocina tem papel imunomodulador relacionado ao quadro de imunossupressão. Além disso, está descrito que a IL-10 pode ser produzida pelas células Tr1 (subtipo de células T reguladoras induzidas). Essas duas citocinas estão presentes no início de processo séptico, devido à liberação exacerbada de mediadores inflamatórios (LEY et al., 2007). A princípio, avaliou-se a cinética de liberação de IL-6 e IL-10 no foco infeccioso. Houve um aumento dos níveis dessas citocinas na fase inicial do processo séptico (**Figura 10**). Esta elevação apenas na fase inicial poderia se justificar pela cessação da infecção local.

Analogamente, avaliou-se a cinética de liberação sistêmica de IL-10, onde foi observado um aumento somente na fase inicial do processo séptico (**Figura 11, painel A**). Estes resultados concordam com os de Steinhäuser e colaboradores, que apresentam aumento de IL-10 no mesmo período analisado (STEINHAUSER et al., 1999).

Quanto à cinética de liberação de IL-6, foi observado um aumento na fase inicial da sepse grave, com restabelecimento aos níveis basais em 7 dias após sepse e novo aumento

no 15º dia (**Figura 11, painel B**). Evidências recentes, além disso, sugerem que a IL-6 induzida durante a sepse pode inibir o aumento das células T reguladoras (BETTELLI et al., 2006; revisto por LERNER, 2007). De maneira interessante, nesse período a elevação de IL-6 está correlacionada ao aumento da frequência de células T reguladoras, possivelmente como uma tentativa de reduzir o aumento da frequência dessas células. No 30º dia após a CLP, a expressão dos marcadores avaliados nessas células retornou aos níveis normais.

Tendo em vista que no 15º dia após a indução da sepse grave há notável susceptibilidade à infecção secundária, nesses animais foi observado um aumento na frequência de células T reguladora. Mediante isso, o objetivo foi investigar a participação das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão, através da avaliação da capacidade proliferativa das células totais do baço frente a estímulo policlonal. A proliferação das células totais do baço estava notavelmente suprimida no dia 15 após a sepse grave (**Figura 12, painel A**). Esta supressão não foi passível de ser revertida *in vitro* utilizando anticorpos anti-GITR ou anti-CTLA-4, inibidores da atividade das células T reguladoras (**Figura 12, painel B e C**). Além do mais, houve supressão da proliferação das células T CD4<sup>+</sup> convencionais purificadas do baço dos animais sépticos (**Figura 13**).

Desta forma, notou-se que a atividade supressora das células T reguladoras desses animais sépticos estava inalterada (**Figura 13**), corroborando com os achados de Wisnoski e colaboradores, os quais demonstram, no 1º dia após a sepse, normal capacidade supressora das células T reguladoras (WISNOSKI et al., 2007). Em contradição, Scumpia e colaboradores encontraram durante a sepse aumento da capacidade supressora das células T reguladoras, no mesmo intervalo de tempo analisado (SCUMPIA et al., 2006).

Uma possível explicação para o comprometimento da resposta das células T CD4<sup>+</sup> poderia estar na viabilidade dessas células. Dados da literatura sugerem que a apoptose está

associada com a supressão, podendo ser desencadeada por mediadores anti-inflamatórios, através de mecanismos envolvidos na imunossupressão (HOTCHKISS et al., 1999; 2005). A morte celular durante a sepse já foi amplamente descrita e atualmente é considerado um fenômeno importante. Apesar de ambos os mecanismos de morte celular (necrose e apoptose) estarem ocorrendo simultaneamente durante a sepse, a forma predominante é a apoptose (HOTCHKISS et al., 1999; 2005). No presente estudo, verificou-se que os níveis de células T CD4<sup>+</sup> apoptóticas não se alteraram no 15º dia após a sepse grave (**Figura 14**). Foi demonstrado que o comprometimento das células T CD4<sup>+</sup> não se deve a apoptose celular.

Caracterizado o comprometimento das células T CD4<sup>+</sup> e excluindo a possibilidade de apoptose celular, na seqüência foi analisada a resposta de camundongos CD4<sup>-/-</sup> à infecção por *L. pneumophila*. Observou-se que os camundongos CD4<sup>-/-</sup> infectados apresentaram uma sobrevivência de 50%, comparada com a de 100% dos animais hígdos (**Figura 15**). Conseqüentemente, podemos sugerir que a interação entre o sistema imune inato e adaptativo é essencial para sobrevivência na fase inicial da sepse.

Estes dados concordam com os de Scumpia e colaboradores, que também descreveram um comprometimento das células T CD4<sup>+</sup> no 1º dia após a sepse, devido a uma diminuição da expressão de CD3ζ, acompanhada de uma possível disfunção do TCR (SCUMPIA et al., 2007). Há comprometimento de células T CD4<sup>+</sup> em outras patologias como na autoimunidade; sugerindo ocorrer em resposta a células T autoreativas (BANİYASH, 2004). Desta maneira, os resultados sugerem que o comprometimento das células T CD4<sup>+</sup> convencionais ocorra numa fase inicial da sepse.

Dados recentes sugerem que Foxp3 interage com fatores de transcrição da família Rel, fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e NF-κB, bloqueando a expressão de genes alvos inclusive para citocinas IL-2, INF-γ e IL-4 (BETTELLI; DASTRANGE; OUKKA,

2005). Células T derivadas de camundongos *scurf* que não apresentam Foxp3, mostraram aumento da atividade de NFAT e NF- $\kappa$ B. A interação NFAT e Foxp3 também foi capaz de induzir genes que codificam IL-2, CTLA-4 e GITR, promovendo a diferenciação e potente capacidade supressora das células (WU et al., 2006). Logo, a utilização de anticorpo anti-CTLA-4 ou anti-GITR, utilizados nesse trabalho, pode ser uma ferramenta crucial para inibir a atividade supressora durante a indução da resposta imune. Outros estudos vêm mostrando a utilização de anticorpos para inibição ou ativação de diferentes células como uma ferramenta importante na manipulação de ações para fins terapêuticos (revisto por SEVACH et al., 2006). O anticorpo anti-CTLA-4, por exemplo, pode agir como um inibidor de células T reguladoras por mecanismo dependente de contato *in vitro* e *in vivo*, como mencionado anteriormente (revisto por SEVACH et al., 2006).

Embora haja uma variedade de estudos demonstrando que o anti-GITR inibe as células T reguladoras *in vitro*, este mesmo anticorpo administrado *in vivo* apresenta algumas aparentes contradições quanto à sua ação, tendo, inclusive, ação inibitória para células T reguladoras e co-estimulatória para células T (SHIMIZU et al., 2002; KOHM et al., 2004). Dados que reforçam essa hipótese são aqueles que demonstram tanto expressão aumentada do receptor GITR em células T reguladoras, como sua diminuição em células T CD4 e CD8 (revisto por SEVACH et al., 2006; revisto por NOCENTINI et al., 2007).

De acordo com esses dados, a administração de anticorpo anti-GITR aumentou a sobrevivência após a sepse (**Figura 16**), corroborando com Scumpia e colaboradores, uma vez que administração *in vivo* de anticorpo anti-GITR, pode reverter parcialmente o comprometimento das células T CD4<sup>+</sup> (SCUMPIA et al., 2007).

Consistente com esses resultados, Heuer e colaboradores, utilizando anticorpo anti-GITR, demonstraram elegantemente que a transferência adotiva de células T reguladoras de animais hígidos para animais sépticos, melhora a sobrevivência pós-sepse (HEUER et al.,

2005). Com este dado, sugeriu-se que o anticorpo anti-GITR possui ação de inibir as células T reguladoras, não excluindo a co-estimulação de células T. No entanto, a co-estimulação de células T pode ocorrer durante o tratamento com anti-GITR, mas não vem a ser a principal responsável pelo aumento da sobrevivência, visto que somente a transferência de células T reguladoras competentes apresentam um mesmo papel nesse processo.

Interessantemente, pela primeira vez demonstra-se que a imunossupressão observada em camundongos submetidos à sepse foi completamente revertida após a administração de anticorpo anti-GITR *in vivo*, mostrando uma menor susceptibilidade a infecção secundária por *L. pneumophila* (**Figura 17**). Assim, sugere-se que as células T reguladoras participem do desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave.

Resumidamente, aqui sustenta-se a hipótese de que as células T reguladoras são fundamentais para o desenvolvimento da imunossupressão na fase inicial da sepse. Período esse em que a produção exacerbada dessas células promove o comprometimento das células T CD4<sup>+</sup> convencionais. Esta produção exacerbada somente é contida com o decorrer do tempo, por isso foi observado um aumento de células T reguladoras em 15 dias após a sepse. Mas, mesmo depois de conter a produção dessas células, houve permanência de um quadro de imunossupressão, porque em 30 dias após a indução da sepse houve uma susceptibilidade desses animais à infecção por *L. pneumophila*.

Desta forma, sustenta-se que as células T reguladoras são componentes principais que contribuem para o desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave. Estes resultados, portanto, contribuem, não só para um melhor entendimento dos fatores desencadeadores da imunossupressão, como também abrem caminhos para novas pesquisas na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na susceptibilidade a uma segunda infecção.

## Conclusão

✎ O Papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental

---

## 6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, sugere-se que as células T reguladoras participam do desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave, como um componente central na gênese da susceptibilidade a infecções secundárias.

## Referências

✂ O Papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental

---

## 7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Cellular and molecular immunology 5<sup>th</sup> ed., updated, 2005.

ALBERTI, C.; BRUN-BUISSON, C.; BURCHARDI, H.; MARTIN, C.; GOODMAN, S.; ARTIGAS, A.; SICIGNANO, A.; PALAZZO, M.; MORENO, R.; BOULME, R.; LEPAGE, E.; LE GALL, R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Med.**, v. 28, p. 108-121, 2002.

ALVES-FILHO, J.C.; FREITAS, A.; RUSSO, M.; CUNHA, F.Q. Toll-like receptor 4 signaling impairs neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Crit. Care Med.**, v. 34, p. 461-470, 2006.

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, p. 1303-1310, 2001.

ANTOV, A.; YANG, L.; VIG, M.; BALTIMORE, D.; VAN PARIJS, L. Essential role for STAT5 signaling in CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance. **J. Immunol.**, v. 171, p. 3435-3441, 2003.

- BAECHER-ALLEN, C.; BROWN, J. A.; FREEMAN, G. J.; HAFLER, D. A. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.*, v. 167, p. 1245-1253, 2001.
- BAKER, C. C.; CHAUDRY, I. H.; GAINES, H. O.; BAUE, A. E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery*, v. 94, p. 331-335, 1983.
- BANIYASH, M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 4, p. 675-687, 2004.
- BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunology*, v. 6, f. 4, p. 353-360, 2005.
- BENJAMIM, C. F.; HOGABOAM, C. M.; LUKACS, N. W.; KUNKEL, S. L. Septic mice are susceptible to pulmonary Aspergillosis. *Am J. Pathol.*, v. 163, p. 2605-2617, 2003.
- BENJAMIM, C. F.; LUNDY, S. K.; LUKACS, N. W.; HOGABOAM, C. M.; KUNKEL, S. L. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood*, v. 105, p. 3588-3595, 2005.
- BETTELLI, E.; DASTRANGE, M.; OUKKA, M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 102, p. 5138-5143, 2005.

- BHATTACHARYYA, S.; SEN, P.; WALLET, M.; LONG, B.; BALDWIN-Jr, A. S.; TISCH, R. Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity. **Blood**, v. 104, p. 1100-1109, 2004.
- BIREBENT, B.; LORHO, R.; LECHARTIER, H.; DE GUIBERT, S.; ALIZADEH, M.; VU, N.; BEAUPLET, A.; ROBILLARD, N.; SEMANA, G. Suppressive properties of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 3485-3496, 2004.
- BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUS, W. A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, p. 1644-1655, 1992a.
- BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, v. 112, p. 235-243, 1997.
- BONE, R. C.; IBBALD, W. J.; SPRUNG, C. L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest**, v. 101, p. 1481-1483, 1992b.
- BRUN-BUISSON, C.; MESHAKA, P.; PINTON, P.; VALLET, B.; EPISEPSIS STUDY GROUP. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. **Intensive Care Med.**, v. 30, p. 580-588, 2004.

- BRUSKO, T. M.; WASSERFALL, C. H.; AGARWAL, A.; KAPTURCZAK, M. H.; ATKINSON, M. A. An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **J. Immunology**, v. 174, p. 5181-5186, 2005.
- BURCHILL, M. A.; YANG, J.; VOGTENHUBER, C.; BLAZAR, B. R.; FARRAR, M. A. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 178, p. 280-290, 2007.
- CAVAILLON, J. M.; ADIB-CONQUY, M.; FITTING, C.; ADRIE, C.; PAYEN, D. Cytokine cascade in sepsis. **Scand J. Infect. Dis.**, v. 35, p. 535-544, 2003.
- CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K. J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S. M. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naïve T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 1875-1886, 2003.
- CHEN, X.; BAUMEL, M.; MANNEL, D. N.; HOWARD, O. M.; OPPENHEIM, J. J. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. **J. Immunol.**, v. 179, p.154–161, 2007.
- COHEN. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, p. 885-891, 2002.

- COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J.; KUO, T. T.; BOYD, K.; WANG, Y.; VIGNALI, K. M.; CROSS, R.; SEHY, D.; BLUMBERG, R. S.; VIGNALI, D. A. A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. **Nature**, v. 450, p. 566-571, 2007.
- DIECKMANN, D.; BRUETT, C. H.; PLOETTNER, H.; LUTZ, M. B.; SCHULER, G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 247-253, 2002.
- DIECKMANN, D.; PLOTTNER, H.; BERCHTOLD, S.; BERGER, T.; SCHULER, G. Ex vivo isolation and characterization of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties from human blood. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 1303-1310, 2001
- EINLOFT, P.R.; GARCIA, P. C.; PIVA, J. P.; BRUNO, F.; KIPPER, D. J.; FIORI, R. M. A sixteen-year epidemiological prolife of a pediatric intensive care unit, Brazil. **Rev. Saude Publica**, v. 36, p. 728-733, 2002.
- FANTINI, M. C.; BECKER, C.; MONTELEONE, G.; PALLONE, P.; GALLE, P. R.; NEURATH, M. F. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. **J. Immunol.**, v. 172, p. 5149-5153, 2004.
- FEHERVARI, Z.; SAKAGUCHI, S. CD4(+) Tregs and immune control. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 1209-1217, 2004.

- FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 330-336, 2003.
- FONTENOT, J. D.; RUDENSKY, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 331-327, 2005.
- FLOHE, S. B.; AGRAWAL, H.; SCHMITZ, D.; GERTZ, M.; FLOHE, S.; SCHADE, F. U. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. **J. Leukoc. Biol.**, v. 79, p. 473-481, 2006.
- GAMBINERI, E.; TORGERSON, T. R.; OCHS, H. D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 15, p. 430-435, 2003.
- GERSON, R. K.; KONDO, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. **Immunol.**, v. 18, p. 723-737, 1970.
- GONDEK, D. C.; LU, L. F.; QUEZADA, S. A.; SAKAGUCHI, S.; NOELLE, R. J. Cutting dge: contact-mediated suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. **J. Immunol.**, v. 15, p. 1783-1786, 2005.
- GRAY, D. H.; SEACH, N.; BOYD, R. L. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. **Blood**, v. 108, p. 3777-3785, 2006.

- HEUER, J. G.; ZHANG, T.; ZHAO, J.; DING, C.; CRAMER, M.; JUSTEN, K. L.; VONDERFECHT, S. L.; NA, S. Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis. **J. Immunol.**, v. 174, p. 7141–7146, 2005.
- HORAK, I.; LOHLER, J.; MA, A.; SMITH, K. A. Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self-tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 148, p. 35-44, 1995.
- HORI, S.; CARVALHO, T. L.; DEMENGEOT, J. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells suppress CD4<sup>+</sup> T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, p. 1282-1291, 2002.
- HORI, S.; TAKAHASHI, T.; SAKAGUCHI, S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. **Adv. Immunol.**, v. 81, p. 331-371, 2003.
- HOTCHKISS, R. S.; TINSLEY, K. W.; SWANSON, P. E. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 96, p. 14541-14546, 1999.
- HOTCHKISS, R. S.; COOPERSMITH, C. M.; KARL, I. E. Prevention of lymphocyte apoptosis – a potential treatment of sepsis? **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, p. S465-469, 2005.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 138-150, 2003.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; STASSEN, M.; TUETTENBERG, A.; KNOP, J.; ENK, A. H. Identification and functional characterization of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 1285–1294, 2001.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; KAKIRMAN, H.; STASSEN, M.; KNOP, J.; ENK, A. H. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. **J. Exp. Med.**, v. 15, p. 255-260, 2002.

JONULEIT, H.; SHMITT, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. **J. Immunol.**, p. 6323-6327, 2003.

KARIM, M., BUSHELL, A.; WOOD, K. J. Regulatory T cells in transplantation. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 584-591, 2001.

KIM, J. H.; KIM, Y. H.; KIM, B. K.; KIM, S.; CHUNG, D. H. Engagement of glucocorticoid-induced TNF receptor costimulates NKT cell activation in vitro and vivo. **J. Immunol.**, v. 176, p. 3507-3515, 2006.

KOHM, A. P.; MCMAHON, J. S.; PODOJIL, J. R.; BEGOLKA, W. S.; DEGUTES, M.; KASPROWICZ, D. J.; ZIEGLER, S. F.; MILLER, S. D. Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. **J. Immunol.**, v. 176, p. 3301–3305, 2006.

LATIN AMERICAN SEPSIS INSTITUTE–

<http://www.sepsisnet.org/site/conteudo/sscuh.pdf> - acesso: 14-02-2008 - 14:20.

LE TULZO, Y.; PANGAULT, C.; GACOUIN, A.; GUILLOUX, V.; TRIBUT, O.; AMIOT, L.; TATTEVIN, P.; THOMAS, R.; FAUCHET, R.; DRENOU, B. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. **Shock**, v. 18, p. 487-94, 2002.

LEVINGS, M. K.; SANGREGORIO, R.; RONCAROLO, M. G. Human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells suppress naive and memory T-cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of suppressor function. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 1295-1302, 2001.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade update. *Nat. rev. Immunol.*, v. 7, p. 678-689, 2007.

LINDE-ZWIRBLE, W. T.; ANGUS, D. C. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. **Crit Care**, v. 8, p. 222-226, 2004.

MACCONMARA, M. P.; MAUNG, A. A.; FUJIMI, S.; MCKENNA, A. M.; DELISLE, A.; LAPCHAK, P. H.; ROGERS, S.; LEDERER, J. A.; MANNICK, J. A. Increased CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. **Ann. Surg.**, v. 244, p. 514–523, 2006.

- MADAKAMUTIL, L. T.; MARICIC, L.; SERCARZ, E.; KUMAR, V. Regulatory T cells control autoimmunity in vivo by inducing apoptotic depletion of activated pathogenesis lymphocytes. **J. Immunology**, v. 170, p. 2985-2992, 2003.
- MAGGI, E.; COSMI, L.; LIOTTA, F.; ROMAGNANI, P.; ROMAGNANI, S.; ANNUNZIATO, F. Thymic regulatory T cells. **Autoimmunity Rev.**, v. 4, p. 579-586, 2005.
- MANZOTTI, C. N.; TIPPING, H.; PERRY, L. C.; MEAD, K. I.; BLAIR, P. J.; ZHENG, Y.; SANSOM, D. M. Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, p. 2888, 2896, 2002.
- MARTIGNONI, A.; TSCHOP, J.; GOETZMAN, H.; CHOI, L. C.; REID, M. D.; JOHANNIGMAN, J. A.; LENTSCH, A. B.; CALDWELL, C. C. CD4-Expressing cells are early mediators of the innate immune system during sepsis. **SHOCK**, 2007.
- MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 1546-1554, 2003.
- MAY-JR, K. F.; CHANG, X.; ZHANG, H.; LUTR, K. D.; ZHOU, P.; KOCAK, E.; ZHENG, P.; LIU, Y. B7-deficient autoreactive T cells are highly susceptible to suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **J. Immunol.**, v.1, p. 1542-1552, 2007.

- MILLS, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 841-855, 2004.
- MONNERET, G.; DEBARD, A. L.; VENET, F.; BOHE, J.; HEQUET, O.; BIENVENU, J.; LEPAPE, A. Marked elevation of human circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. **Crit. Care Med.**, v. 31, p. 2068–2071, 2003.
- MOSS, M.; MARTIN, G. S. A global perspective on the epidemiology of sepsis. **Intensive Care Med.**, v. 30, p. 527-529, 2004.
- MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; MELLOR, A. L. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4<sup>+</sup> T cells triggers inoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 4100-4110, 2004.
- NAKAMURA, K.; KITANI, A.; STROBER, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 629-644, 2001.
- NATHAN, C. F.; MURRAY, H. W.; WIEBE, M. E.; RUBIN, B. Y. Identification of interferon gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, v. 158, p. 670-689, 1983.

- NG, W. F.; DUGGAN, P. J.; PONCHEL, F.; MATARESE, G.; LOMBARDI, G.; EDWARDS, A. D.; ISAACS, J. D.; LECHLER, R. I. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. **Blood**, v. 98, p. 2736–2744, 2001.
- OSUCHOWSKI, M. F.; WELCH, K.; SIDDIQUI, J.; REMICK, D. G. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. **J. Immunol.**, v. 177, p. 1967-1974, 2006.
- OFFNER, H.; SUBRAMANIAN, S.; PARKER, S. M.; WANG, C.; AFENTOULIS, M. E.; LEWIS, A.; VANDENBARK, A. A.; HURN, P. D. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. **J. Immunol.**, v. 176, p. 6523–6531, 2006.
- PAE, H. O.; OH, G. S.; CHOI, B. M.; CHAE, S. C.; KIM, Y. M.; CHUNG, K. R.; CHUNG, H. T. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. **J. Immunol.**, v. 172, p. 4744, 2004.
- PAES, N. A. Mortality due to infectious and parasitic diseases in the elderly in Brazil. **Rev. Panam salud Publica**, v. 15, p. 233-241, 2004.
- PARIJS, L. V.; ABBAS, A. K. Homeostasis and self tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. **Science**, v. 280, p. 243-248, 1998.
- PERL, T. M.; DVORAK, L.; HWANG, T.; WENZEL, R. P. Long-term survival and function after suspected Gram-negative sepsis. **JAMA**, v. 274, p. 338–345, 1995.

- POWRIE, F.; READ, S.; MOTTET, C.; MALOY, K. Control of immune pathology by regulatory T cells. **Novartis Found. Symp.**, v. 252, p. 92-98, 2003.
- PICCIRILLO, C. A.; THORNTON, A. M. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **Trends Immunol.**, v.25, p. 374-380, 2004.
- RIEDEMANN, N. C.; GUO, R. F.; WARD, P. A. The enigma of sepsis. **J. Clin. Invest.**, v. 112, p. 460-467, 2003.
- ROMANI L., KAUFMANN S. H. Immunity to fungi: editorial overview. **Res. Immunol.**, v. 149, p. 277-281, 1998.
- RONCHETTI, S.; ZOLLO, O.; BRUSCOLI, S.; AGOSTINI, M.; BIANCHINI, R.; NOCENTINI, G.; AYROLDI, E.; RICCARDI, C. GITR, a member of the receptor superfamily, is coestimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 613-622, 2004.
- SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, v. 155, p. 1151-1164, 1995.
- SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N. Role of genetic factors in organ-specific autoimmune diseases induced by manipulating the thymus or T cells, and not self-antigens. **Rev. Immunogenet.**, v. 1, p. 147-153, 2000.

SCUMPIA, P. O.; DELANO, M. J.; KELLY, K. M.; O'MALLEY, K. A.; EFRON, P. A.; MCAULIFFE, P. F.; BRUSKO, T.; UNGARO, R.; BARKER, T.; WYNN, J. L.; ATKINSON, M. A.; REEVES, W. H.; SALZLER, M. J.; MOLDAWER, L. L. Increased natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. **J. Immunol.**, v. 177, n. 11, p. 7943–7949, 2006.

SCUMPIA, P. O.; DELANO, M. J.; KELLY-SCUMPIA, K. M.; WEINSTEIN, J. S.; WYNN, J. L.; WINFIELD, R. D.; XIA, C.; CHUNG, C. S.; AYALA, A.; ATKINSON, M. A.; REEVES, W. H.; CLARE-SALZLER, M. J.; MOLDAWER, L. L. Treatment with GITR agonistic antibody corrects adaptive immune dysfunction in sepsis. **Blood.**, v. 110, p. 3673-3681, 2007.

SHEVACH, E. M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 389-400, 2002.

SHEVACH, E. M.; STEPHENS, G. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity?. **Nat. Rev.**, v. 6, p.613-618, 2006.

SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; TAKAHASHI, T.; ISHIDA, Y.; SAKAGUCHI, S. Stimulation of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 135-142, 2002.

- SILVA, E.; PEDRO MDE A.; SOGAYAR, A. C.; MOHOVIC T.; SILVA, C. L.; JANISEWSKI, M.; CAL R. G.; DE SOUZA E. F; ABE, T. P; DE ANDRADE J.; DE MATOS, J.D.; REZENDE, E; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, P. C; DE MATS, G F.; BENTO, A. M.; COREA, A. D.; VIEIRA, P. C.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit. Care**, v. 8, p. R251-260, 2004.
- STEINHAUSER, M. L.; HOGABOAM, C. M.; KUNKEL, S. L.; LUKACS, N. W.; STRIETER, R. M.; STANDIFORD, T. J. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in nlung antibacterial host defense. *J. Immunol.*, v. 162, p. 392-399, 1999.
- STEPHENS, L. A.; MOTTET, C.; MASON, D.; POWRIE, F. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 1247–1254, 2001.
- TAKAHASHI, T.; KUNIYASU, Y.; TODA, M.; SAKAGUCHI, N.; ITOH, M.; IWATA, M.; SHIMIZU, J.; SAKAGUCHI, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. **Int. Immunol.**, v. 10, p. 1969-1980, 1998.
- THORNTON, A. M.; SHEVACH, E. M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 287–296, 1998.

- THORNTON, A. M.; SHEVACH, E. M. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. **J. Immunol.**, v. 164, p. 183, 2000.
- TKATCH, L. S.; KUSNE, S.; IRISH, W. D.; KRYSIOFIK, S.; WING, E. Epidemiology of *Legionella* pneumonia and factors associated with *Legionella*-related mortality at a tertiary care center. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, p. 1479, 1998.
- TONE, M.; TONE, Y.; ADAMS, E.; YATES, S. F.; FREWIN, M. R.; COBBOLD, S. P.; WALDMANN, H. Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 15059-15064, 2003.
- VENET, F.; PACHOT, A.; DEBARD, A. L.; BOHE, J.; BIENVENU, J.; LEPAPE, A.; MONNERET, G. Increased percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> lymphocytes. **Crit. Care Med.**, v. 32, p. 2329–2331, 2004.
- VENET, F.; BOHE, J.; DEBARD, A. L.; BIENVENU, J.; LEPAPE, A.; MONNERET, G. Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. **Crit Care Med.**, v. 33, p. 2836-2840, 2005.
- VENET, F.; CHUNG, C. S.; MONNERET, G.; HUANG, X.; HORMER, B.; GARBER, M.; AYALA, A. Regulatory T cells populations in sepsis and Trauma. **J. Leukoc. Biol.**, v. 83, p. 1-13, 2007.

- VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J. Immunol. Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. **Atheneu**, 1996.
- VIANNA, R. C.; GOMES, R. N.; BOZZA, F. A.; AMANCIO, R. T.; BOZZA, P. T.; DAVID, C. M.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C. Antibiotic treatment in a murine model of sepsis: impact on cytokines and endotoxin release. **Shock**, v. 21, p. 115-120, 2004.
- VINCENT, J-L.; ABRAHAM, E. The last 100 years of sepsis. **Aim. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 173, p. 256-263, 2006.
- VYAS, D.; JAVADI, P.; DIPASCO, P. J.; BUCHMAN, T. G.; HOTCHKISS, R. S.; COOPERSMITH, C. M. Early antibiotic administration but not antibody therapy directed against IL-6 improves survival in septic mice predicted to die on basis of high IL-6 levels. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 289, p. R1048-R1053, 2005.
- WAN, S.; XIA, C.; MOREL, L. IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell regulatory functions. **J. Immunol.**, v. 178, p. 271-279, 2007.

- WILLERFORD, D. M.; CHEN, J.; FERRY, J. A.; DAVIDSON, L.; MA, A.; ALT, F. W. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. **Immunity**, v. 3, p. 521-530, 1995.
- WILLIAMS, L. M.; RUDENSKY, A. Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 277-284, 2007.
- WYSOCKI, C. A.; JIANGX, Q.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; TAYLOR, P. A.; MCKINNON, K. P.; SU, L.; BLAZAR, B. R.; SERODY, J. S. Critical role for CCR5 in function of donor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. **Blood**, v. 106, p. 3300-3307, 2005.
- WISNOSKI, N.; CHUNG, C. S.; CHEN, Y.; HUANG, X.; AYALA, A. The contribution of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. **Shock**, v. 27, p. 251-257, 2007.
- ZAMBONI, D. S.; KOBAYASHI, K. S.; KOHLSDORF, T.; OGURA, Y.; LONG, E. M.; VANCE, R. E.; KUIDA, K.; MARIATHASAN, S.; DIXIT, V. M.; FLAVELL, R. A.; DIETRICH, W. F.; ROY, C. R. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. **Nat. Immunol.**, v. 7, p. 318-325, 2006.

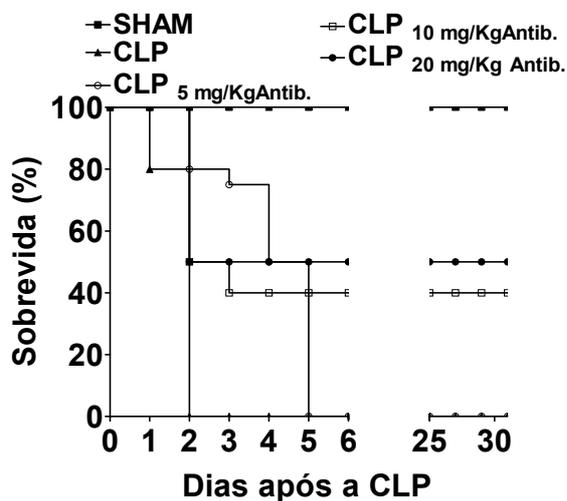
## Apêndice

✎ O Papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental

---

## 8. APÊNDICE

### 8.1. Padronização da dose de antibiótico Ertapenem Sódico



**Figura Apêndice 1: Padronização da dose do antibiótico Ertapenem Sódico administrada após indução da sepse polimicrobiana grave.** Os camundongos C57BL/6 submetidos à CLP receberam duas perfurações com agulha 18G. O grupo SHAM não teve perfurações no ceco. Após 6 h da cirurgia um dos grupos submetidos à CLP foi tratado com diferentes concentrações do antibiótico ertapenem sódico (5, 10 e 20mg/ Kg), mantendo o tratamento em intervalos de 12h até completar 3 dias. A sobrevivência foi determinada diariamente por um período de 30 dias. Os resultados são representativos de três experimentos. Os dados correspondem às porcentagens de sobrevivência de oito a dez animais por grupo. A taxa de sobrevivência dos animais sépticos tratados com a dose de 10 e 20 mg/ Kg do antibiótico foi significativamente diferente dos animais sépticos sem tratamento com antibiótico ( $P < 0,05$ , Mantel-Cox logrank).

## Anexos

✂ O Papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave experimental

---

## 9. ANEXOS

### 9.1. Certificado do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

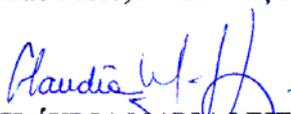


## *CERTIFICADO*

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 023/2007, sobre o projeto intitulado “*O papel das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepse grave*”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. João Santana da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **26 de março de 2007**.

(We certify that the protocol nº 023/2007, about “*The role of regulatory T cells in the development of the immunosuppression during sepsis*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 03/26/2007 meeting).

Ribeirão Preto, 30 de março de 2007.

  
**Prof. Dra. CLÁUDIA MARIA LEITE MAFFEI**  
Vice-Presidente da Comissão de Ética  
em Experimentação Animal

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)