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

**Papel dos receptores de TNF no
desenvolvimento da imunossupressão pós-
sepse**

Paulo Henrique de Melo

Ribeirão Preto-SP

2013

Paulo Henrique de Melo

**Papel dos receptores de TNF no desenvolvimento da
imunossupressão pós-sepse**

Dissertação apresentada ao Programa de
pós-graduação em Imunologia Básica e
Aplicada da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. José Carlos Farias Alves-Filho

Ribeirão Preto-SP

2013

2013

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Melo, Paulo Henrique

Papel dos receptores de TNF no desenvolvimento da imunossupressão
pós-sepse. Ribeirão Preto, 2013. 128 p; il.:30cm

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

Orientador: Alves-Filho, José Carlos Farias.

1. Sepsis. 2. Imunossupressão. 3. Tregs. 4. TNFR1. 5. TNFR2

Paulo Henrique de Melo

**Papel dos receptores de TNF no desenvolvimento da
imunossupressão pós-sepse**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em 17 de Abril de 2013

Banca examinadora

Prof. Dr. José Carlos Alves-Filho
FMRP-USP

Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato Martins
FMRP-USP

Prof. Dr. Reinaldo Salomão
UNIFESP

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

Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará.
Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.
Porque ele te livrará do laço do passarinho, e da peste perniciosa.
Ele te cobrirá com as suas penas, e debaixo das suas asas te confiarás; a sua verdade será o teu escudo e broquel.
Não terás medo do terror de noite nem da seta que voa de dia,
Nem da peste que anda na escuridão, nem da mortandade que assola ao meio-dia.
Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita, mas não chegará a ti.
Somente com os teus olhos contemplarás, e verás a recompensa dos ímpios. Porque tu, ó Senhor, és o meu refúgio. No Altíssimo fizeste a tua habitação.
Nenhum mal te sucederá, nem praga alguma chegará à tua tenda.
Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em todos os teus caminhos.
Eles te sustentarão nas suas mãos, para que não tropeces com o teu pé em pedra.
Pisarás o leão e a cobra; calcarás aos pés o filho do leão e a serpente.
Porquanto tão encarecidamente me amou, também eu o livrarei; pô-lo-ei em retiro alto, porque conheceu o meu nome.
Ele me invocará, e eu lhe responderei; estarei com ele na angústia; dela o retirarei, e o glorificarei.
Fartá-lo-ei com longura de dias, e lhe mostrarei a minha salvação.

Salmo 91

DEDICATÓRIA

À minha amada família:

Meus pais, Isbela e Cinézio

Meus irmãos, Luiz e João

Aos meus avós: Benedita, Alcides, Zezé e Joaquim

Que apesar de não conhecerem de perto minha caminhada,

estão sempre presentes com

enorme compreensão, paciência e amor.

Obrigado por mostrarem minha essência e minhas raízes.

Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela Fé, pela Coragem e pela Paz que levo dentro do meu coração!

Ao meu orientador, **Prof. José Carlos**, pela exemplar orientação e pelos ensinamentos que possibilitaram meu crescimento pessoal, profissional e intelectual nestes dois anos de caminhada.

Ao **Prof. Fernando Cunha**, pela oportunidade de integrar seu laboratório e pelo exemplo de dedicação à pesquisa e competência.

Aos demais professores do LID, **Sandra Fukada, Thiago Cunha e Sérgio Ferreira**, pela convivência nestes dois anos.

Aos professores, **Vânia Bonato e Reinaldo Salomão**, pela atenção e disponibilidade em participar da minha banca examinadora.

Aos meus queridos colaboradores, **Daniele Nascimento e Raphael Ferreira**, pela incondicional ajuda e apoio nos nossos longos experimentos, pelas discussões científicas e principalmente pela força e amizade.

Aos queridos amigos e colegas: **Alexandre Kanashiro, Andressa Duarte, Gabriela Tretin, Maurício Mota, Vanessa Borges, Walter Turato, Raphael (Panda) e Paula Barbim**, pela ajuda em alguns experimentos realizados e principalmente pela amizade.

Aos demais amigos e colegas do LID: **Paula, Larissa, Rafael Poloni, Cristina, André, Danilo, Jhimmy, Dênis, João, Miriam, Alexandre, Guilherme, Adriana, Giovane, Maria Cláudia, Fabricio, Jaqueline, Rangel, Sílvia, Flávia, Daniel, Andreza, David, Kalil, Flávio, Morena, Andressa Freitas, Fabi e Fernanda (dupla)**, pelos maravilhosos momentos de discussão científica e descontração.

Aos técnicos do Laboratório de Inflamação e Dor: **Kátia, Giuliana, Diva, Sérgio, Ieda, Marco, Bruno e Talita**, pelo apoio técnico e amizade.

Aos funcionários dos biotérios: **Júlio, Rubinho, Dener, Edir, Eliana e Orlando**, pela criação, distribuição e cuidado com os animais utilizados neste estudo.

À **Ana Cristina**, 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.

Aos queridos amigos, aos professores e técnicos do Programa de Imunologia, pelos bons momentos de aprendizado e diversão.

Sem amigos a vida não tem o mesmo sabor, por isso agradeço também aos **meus grandes amigos** de toda uma vida, amo muito todos vocês!

A toda minha grande família querida, **meus pais** (Cinézio e Isbela), **meus irmãos** (kal e JP), **meus avós** (Dita, Alcides, Zezé e Joaquim), **minha tias** (em especial à Angélica, Cristina e Léa), aos **meus primos** (especialmente a Letícia) e a querida Beth!

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

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional e para a realização deste trabalho.

“Não basta saber ler que Eva viu a uva.

*É preciso compreender qual a posição que Eva ocupa no seu contexto social,
quem trabalha para produzir a uva e quem lucra com esse trabalho.”*

Paulo Freire

*“A matéria prima do educador
não é o conhecimento,
é a pessoa humana que conhece,
aprende e ensina”*

Madalena Freire

RESUMO

MELO, P.H. **Papel dos receptores de TNF no desenvolvimento da imunossupressão pós-sepse.** 2013. 149 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A sepse é uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica decorrente de um processo infeccioso, a qual acarreta alta taxa de mortalidade. Relatos da literatura tem demonstrado que pacientes e animais de experimentação que sobrevivem à sepse desenvolvem quadro de imunossupressão tardia, o qual contribui com a maior suscetibilidade destes a infecções secundárias. Nosso grupo demonstrou que as células T reguladoras (Tregs) participam ativamente do desenvolvimento desta imunossupressão. O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma citocina pleotrópica responsável por diversas funções durante a resposta inflamatória, apresentando dois receptores responsáveis pelas suas atividades: o TNFR1 e o TNFR2. Foi demonstrando que o TNF exerce um importante papel na atividade de Tregs, induzindo a proliferação, estabilização do fenótipo e aumentando sua atividade imunossupressora, sugerindo que tais atividades sejam atribuídas ao TNFR2. Desta forma, nosso objetivo foi avaliar a participação dos receptores de TNF no desenvolvimento da imunossupressão pós-sepse. Para isso animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepse grave, induzida por CLP e tratados com um suporte básico (reposição hídrica e antibioticoterapia). Inicialmente avaliamos a participação dos receptores de TNF na fase aguda da sepse. Demonstramos que nesta fase os receptores de TNF, principalmente TNFR1, apresentam um papel prejudicial na migração de neutrófilos, no controle do processo infeccioso e nas lesões de órgãos decorrentes da sepse. Posteriormente, os animais sobreviventes foram infectados com um dose subletal de *L. pneumophila* i.n 15 dias após a CLP. Avaliamos a participação dos receptores TNF na suscetibilidade à infecção secundária induzida por *L. pneumophila* em animais sobreviventes à sepse. Observamos que animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse são mais suscetíveis, ao passo que animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse são resistentes à infecção secundária em relação aos animais WT sobreviventes à sepse. Avaliamos então, a expansão de Tregs no baço destes animais sobreviventes à sepse e, observamos que animais TNFR1^{-/-} apresentam aumento da expansão de Tregs, ao passo que os animais TNFR1/2^{-/-} não apresentaram expansão de Tregs comparados ao WT. Observamos também que as Tregs apresentam maior densidade de receptores de TNF do que as células T convencionais e, que durante a sepse ocorre aumento da densidade destes receptores nas Tregs. Sugerimos então que possivelmente o TNFR1 seja um regulador negativo, enquanto o TNFR2 possa assumir um papel na regulação positiva na expansão de Tregs após a sepse, durante o desenvolvimento da imunossupressão.

Palavras-chave: Sepse, imunossupressão, Tregs, TNFR1 e TNFR2.

ABSTRACT

Melo, P.H. **The role of TNF receptors in the development of sepsis-induced immunosuppression.** 2013. 149 f. Dissertation (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Sepsis is a systemic inflammatory response syndrome resulting from infectious process, resulting in high mortality rate. It has been shown that septic mice and patients that survived from sepsis develop a late immunosuppression, which contributes to greater susceptibility to these secondary infections. Our group has shown that regulatory T cells (Tregs) actively participate in the development of this immunosuppression. The Tumor Necrosis Factor (TNF) is pleiotropic cytokine responsible for several processes in the inflammatory response. Two receptors are responsible for the various activities of TNF: TNFR1 and TNFR2. It has been shown that TNF plays an important role in the activity of Tregs, inducing proliferation, stabilization of phenotype and increasing their immunosuppressive activity. The authors also suggested that these activities are TNFR2-mediated. Thus, our objective was to evaluate the role of TNF receptors in the acute phase of sepsis and also in the development of immunosuppression post-sepsis. For that, TNFR1^{-/-}, TNFR1/2^{-/-} and WT mice were subjected to severe sepsis induced by CLP and treatment with basic support (hydration and antibiotics). Initially we evaluated the participation of TNF receptors in the acute phase of sepsis. We suggest that at this stage the TNF receptor, TNFR1 mainly exerts a deleterious role in the migration of neutrophils in control of the infectious process and the tissue damage resulting from sepsis. In addition, the survivors from the septic event were intranasally infected with *L. pneumophila* in the 15th day after sepsis induction. We evaluated the participation of these receptors in susceptibility to secondary infection induced by *L. pneumophila* in survivors from sepsis. Comparing the animals that survived from sepsis, we observed that TNFR1/2^{-/-}, like WT mice, are not susceptible to the secondary infection, while TNFR1^{-/-} survivors are more susceptible to it. We also observed that TNFR1^{-/-} animals show increased expansion of Tregs in the spleen, different of TNFR1/2^{-/-} mice, that did not show expansion of Tregs compared to WT. We also observed Tregs have a higher density of receptors for TNF than conventional T cells, whereas during sepsis occurs increased expression of this receptor in Tregs. Altogether, the results suggest that TNFR1 is a negative regulator, whereas TNFR2 may play a role in the upregulation during expansion of Tregs, in development of sepsis-induced immunosuppression.

Keywords: Sepsis, immunosuppression, Tregs, TNFR1 and TNFR2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil cinético da produção sistêmica de TNF durante a sepse experimental..	39
Figura 2. Animais deficientes de receptores de TNF apresentam maior resistência após CLP.....	41
Figura 3. Animais deficientes de receptores de TNF apresentam maior controle do processo infeccioso durante a sepse.....	44
Figura 4. Os receptores de TNF são importantes para inflamação sistêmica durante a sepse grave.....	47
Figura 5. Os receptores de TNF são importantes para lesões de órgãos e tecidos durante a sepse grave.....	50
Figura 6. Animais TNFR1 ^{-/-} e TNFR1/2 ^{-/-} apresentam maior suscetibilidade a infecção subletal por <i>Legionella pneumophila</i>	52
Figura 7. Animais TNFR1/2 ^{-/-} sobreviventes à sepse são mais resistentes à infecção secundária por <i>L. pneumophila</i> , ao passo que os TNFR1 ^{-/-} apresentam maior susceptibilidade.....	55
Figura 8. Animais TNFR1/2 ^{-/-} sobreviventes à sepse apresentam maior controle da infecção secundária, ao passo que, os TNFR1 ^{-/-} apresentaram redução desta capacidade.....	58
Figura 9. Aumento relativo de Tregs na fase aguda da sepse independe da ativação dos receptores de TNF.....	60
Figura 10. Os receptores de TNF podem modular a expansão de Tregs após a sepse grave.....	62
Figura 11. Concentrações de TGF-β e IL-10 não aumentam no tecido pulmonar de animais TNFR1/2 ^{-/-} sobreviventes à sepse.....	64
Figura 12. Animais TNFR1/2 ^{-/-} sobreviventes à sepse não apresentam redução da capacidade proliferativa de células T CD4 ⁺ em relação ao grupo <i>naive</i>	67

Figura 13. As Tregs apresentam maior densidade de receptores de TNF do que as Tconv.....	69
Figura 14. Densidade de receptores de TNF aumenta nas Tregs na fase aguda da sepse.....	72
Figura 15. Aumento da densidade dos receptores de TNF nas Tregs induzido pela sepse permanece após a resolução da infecção.....	73
Figura 16. Tregs TNFR1 ^{-/-} não apresentam maior densidade de TNFR2.....	75
Figura 17. Frequência relativa de Tregs TNFR1 ⁺ na fase aguda da sepse.....	77
Figura 18. Frequência relativa de Tregs TNFR1 ⁺ na fase tardia após a sepse.....	78
Figura 19. Aumento da frequência relativa de Tregs TNFR2 ⁺ na fase aguda da sepse..	81
Figura 20. Aumento da frequência relativa de Tregs TNFR2 ⁺ após a sepse.....	82
Figura 21. TNF leva ao aumento de células CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ <i>in vitro</i>	85
Figura 22. Células CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ proliferam após estímulo com TNF.....	86

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Complexos de sinalização ativados por TNFR1.....	09
Esquema 2. Complexos de sinalização ativados por TNFR2.....	09
Esquema 3: Conclusão.....	108

LISTA DA ABREVIATURAS

7-AAD - 7-Aminoactinomycin D

ACCP -American College of Chest Physicians

AP-1 - *activator fator-1*

APC – *antigen presenting cells*

AST - Aspartatoaminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

B7 – CD80/CD86

Brdu - *Bromodeoxyuridine*

BUN - *Blood urea nitrogen*

CD – *Clusters of differentiation*

Ck-MB – isoforma da enzima *phosphocreatin kinase*.

CLP – *Cecal ligation and puncture*

CTLA-4 – *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

DAMP - Padrões moleculares associados ao dano tecidual

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade ótica

EDTA - Etilenodiaminotetracético

ELISA - Enzyme-linked immunoassay

ESICM - European Society of Intensive Care Medicine

ESM-1- Endothelial cell-specific molecule 1

FACS – Citometria de fluxo

FITC – Isoticianato de fluoresceína

FoxP3 – Fator de transcrição *Forkhead Box P3*

GITR -Gene relacionado à família do receptor TNF induzido por glucocorticóide

i.n. – Intranasal

i.p. – Intraperitoneal

IL – Interleucina

kg – Quilograma

Log - Logaritmo da função matemática

LPS - Lipopolissacarídeo bacteriano

MAPK – *Mitogen-activated protein kinases*

mg - miligrama (s)

MHC – *Major histocompatibility complex*

ml - mililitro (s)

MODS - síndrome da falência múltipla de órgãos

MPO - Mieloperoxidase

Naive – animal hígido

NFκB - Fator de transcrição kappa B

NO - óxido nítrico

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PBS – Tampão salina fosfato

PE – Ficoeritrina

Percp - Clorofilia-peridina

pg - picograma (s)

PRRs - Receptores de Reconhecimento Padrão

RPMI- Meio de cultura para células 1640

s.c. – Subcutâneo

SIRS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TGF-β – Fator de crescimento transformante β

TLR – *Toll-like receptor*

TNF - Fator de necrose tumoral

TNFR1 – Receptor de TNF tipo 1

TNFR1^{-/-} - Camundongos deficientes para TNFR1

TNFR1/2^{-/-} - Camundongos deficientes para TNFR1 e TNFR2

TNFR2- Receptor de TNF tipo 2

Tregs – Células T reguladoras

UFC - Unidade formadora de colônia

UTIs – Unidades de terapia intensiva

WT - animal selvagem

μl – microlitro (s)

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Seps.....	02
1.1.1 Considerações Gerais.....	02
1.1.2 Imunossupressão pós-seps.....	03
1.2 O Fator de Necrose Tumoral e seus receptores.....	06
1.2.1 Considerações Gerais.....	06
1.2.2 Envolvimento do TNF na seps.....	09
1.3 As Células T reguladoras.....	10
1.3.1 Considerações Gerais.....	11
1.3.2 Envolvimento do TNF na função e expansão de Tregs.....	12
2.OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais.....	19
3.2 Protocolos experimentais.....	20
3.2.1 Participação dos receptores de TNF na fase aguda da seps.....	20
3.2.2 Participação dos receptores de TNF na expansão de Tregs durante e após a seps.....	20
3.2.3 Participação dos receptores de TNF na resposta à infecção secundária após a seps.....	21
3.3 Modelo experimental de seps polimicrobiana.....	21
3.4.Preparação e inoculação da bactéria <i>Legionella pneumophila</i>	22

3.4.1. Bactéria.....	22
3.4.2. Infecção <i>in vivo</i>	23
3.5. Análise da sobrevida.....	23
3.6. Avaliação do escore clínico.....	23
3.7. Migração de neutrófilos para cavidade peritoneal.....	24
3.8. Quantificação de bactérias.....	25
3.8.1. Quantificação de bactérias durante a sepse.....	25
3.8.2 Quantificação de <i>L. pneumophilla</i>	25
3.9 Quantificação de citocinas por ELISA.....	26
3.10 Ensaio de mieloperoxidase.....	27
3.11 Marcadores de lesões e função tecidual.....	28
3.11.1 Determinação das concentrações séricas de aminotransferase (AST).....	28
3.11.2 Determinação das concentrações de uréia (BUN).....	29
3.11.3 Determinação da atividade de CK-MB.....	29
3.11.4 Determinação da concentração de Endocan.....	29
3.12 Preparação da suspensão celular.....	30
3.13 Citometria de fluxo.....	30
3.13.1 Análise da expressão de marcadores clássicos de Tregs.....	30
3.13.2 Análise da expressão dos receptores de TNF nas Tregs.....	31
3.14 Ensaio de proliferação de células T CD4 ⁺ <i>in vivo</i>	32
3.15 Separação de células T CD4 ⁺	32
3.16 Cultura de diferenciação e proliferação de Tregs.....	33

3.17. Preparo das soluções e reagentes.....	33
3.17.1. Solução de Ketamina e Xilazina.....	34
3.17.2. Solução de Tampão Salina-fosfato (PBS) 10X.....	34
3.17.3. PBS 1X.....	34
3.17.4. PBS/EDTA (1mM).....	35
3.17.5. Corante Panótico Rápido (LaborClin).....	35
3.17.6. Meio Ágar Muller Hinton (M.M.H.):.....	35
3.17.7. Meio RPMI incompleto.....	35
3.17.8 Meio RPMI completo.....	35
3.17.9. Tampão de citometria de fluxo (Tampão de FACS).....	35
3.17.10. Tampão de lise.....	36
3.17.11. Tampões utilizados para o ensaio de ELISA.....	36
3.18. Análises estatísticas.....	36
4.RESULTADOS.....	37
4.1 Perfil cinético da produção sistêmica de TNF durante a sepse experimental.....	38
4.2 A deficiência dos receptores de TNF confere maior resistência à sepse induzida pela sepse.....	40
4.3 A deficiência dos receptores de TNF confere maior controle do processo infeccioso durante a sepse.....	42
4.4 Os receptores de TNF são importantes para o desenvolvimento da inflamação sistêmica durante a sepse induzida por CLP.....	45
4.5 Os receptores de TNF são importantes para lesão de órgãos e tecidos durante a sepse induzida por CLP.....	48

4.6 TNFR1 é importante para resistência contra infecção subletal induzida por <i>Legionella pneumophila</i>	51
4.7 Dicotomia da relação resistência/suscetibilidade à infecção secundária entre animais deficientes para os receptores de TNF sobreviventes à sepse.....	53
4.8 Animais TNFR1 ^{-/-} E TNFR1/2 ^{-/-} sobreviventes à sepse apresentam distinta capacidade de controlar a infecção secundária.....	56
4.9 Expansão de Tregs na fase aguda da sepse independe dos receptores de TNF.....	59
4.10 Os receptores de TNF podem regular a expansão de Tregs na fase tardia após a sepse.....	61
4.11 Citocinas relacionadas ao perfil regulador não estão aumentadas em animais TNFR1/2 ^{-/-} sobreviventes à sepse.....	63
4.12 A sepse não induz redução da capacidade proliferativa das células T CD4 ⁺ nos animais TNFR1/2 ^{-/-}	65
4.13 As Tregs apresentam maior densidade de receptores de TNF quando comparadas as células T convencionais.....	68
4.14 Durante a sepse ocorre aumento dos receptores de TNF na membrana das Tregs.....	70
4.15 A densidade de TNFR2 não é maior nas Tregs TNFR1 ^{-/-}	74
4.16 Durante a sepse não ocorre aumento da frequência de Tregs TNFR1 ⁺	76
4.17 Durante a sepse ocorre aumento da frequência de Tregs TNFR2 ⁺	79
4.18 TNF induz expansão de Tregs <i>in vitro</i>	83
5.DISSCUSSÃO.....	87
6.CONCLUSÃO.....	109
7.REFERÊNCIAS.....	111
ANEXO.....	127

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1.SEPSE

1.1.1. Considerações gerais

Definida como uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) em decorrência de um processo infeccioso, a sepse representa um grande problema de saúde pública, pois é a principal causa, não coronarianas, de internações em unidades de terapia intensiva (UTI's) e décima causa de morte nos EUA. A sepse está frequentemente associada a pneumonia, queimaduras de grande extensão, trauma, cirurgias e a doenças malignas (Bone et al., 1997; David, 2007).

Dados americanos mostram que a incidência de sepse triplicou nos últimos anos, atingindo cerca de 25% de mortalidade. Na década passada, os EUA apresentaram cerca de 240 casos para cada 100.000 habitantes e os custos ultrapassavam \$17 bilhões anuais (Angus and Wax, 2001; Martin et al., 2003; Kumar, et al., 2011). Já no Brasil, o BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) mostrou a incidência de 57 para cada 1000 pacientes admitidos nas UTI's, sendo a taxa de mortalidade de aproximadamente 34%. Os custos no Brasil variam em torno de R\$ 17 bilhões anuais (Silva et al., 2004; Friedland, 2009).

Os complexos eventos decorrentes da sepse, como a liberação sistêmica de mediadores proinflamatórios e de padrões moleculares associados aos micro-organismos, podem acarretar importantes mudanças em diversos compartimentos celulares, resultando nas diferentes respostas de células, como leucócitos, frente aos diversos estímulos liberados durante a sepse, evento este referido por alguns autores

como reprogramação celular (Salomão et al., 2012). Os estímulos decorrentes da sepse podem resultar na dessensibilização de receptores quimiotáticos nos neutrófilos e na clivagem de moléculas endoteliais de adesão celular (Nakae et al., 1996; Rios-Santos, et al., 2007; Alves-Filho, 2008; Trevelin et al., 2012). Estes eventos contribuem para redução da migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Os neutrófilos são fagócitos indispensáveis para controle inicial do processo infeccioso, sendo a falha de sua migração associada com perda do controle da infecção local, culminando na disseminação bacteriana e consequentemente na potencialização da resposta inflamatória sistêmica (Alves-Filho et al., 2010).

As principais implicações da sepse grave são o **choque séptico**, caracterizado pela hipotensão e hipoperfusão tecidual, refratários às intervenções clínicas e a **disfunção múltipla de órgãos** representada por lesões teciduais graves em órgãos como pulmões, coração, rins e fígado (Bone et al., 1997; Dixon, 2004; Freitas et al., 2010; Seeley et al., 2012).

1.1.2. Imunossupressão pós-sepse

Apesar do aumento da incidência de sepse, medidas tomadas pela *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), *International Sepsis Forum* (ISF) e *Society of Critical Care Medicine*, conhecidas como campanha de sobrevivência à sepse (*Survival Sepsis Campaign*), tem colaborado para a redução das taxas de mortalidade de pacientes com esta doença (Dellinger and Vincent, 2005). De fato, a taxa de mortalidade foi reduzida de 40% para cerca de 27% entre os anos de 2000 e 2007 (Kumar et al. 2011).

Estudos clínicos demonstram que após a recuperação da sepse grave, os pacientes desenvolvem quadro de imunossupressão, o qual tem como principal manifestação clínica o aumento da suscetibilidade à infecções oportunistas (Riedemann et al., 2003; Benjamim et al., 2005; Barichello et al., 2007; Wang et al., 2008). Dados recentes sobre a mortalidade na sepse mostram que existem picos de mortalidade em fases distintas da doença: Na fase I, também chamada de precoce, a mortalidade ocorre entre o 1º e o 5º dia, sendo intimamente relacionada com a bacteremia causada pelo mesmo agente etiológico da sepse. Porém, nas demais fases, fase II (6 a 15 dias) ou na fase III (16 a 150 dias), nas quais a bacteremia primária foi abolida, a mortalidade decorre após uma infecção secundária por micro-organismos oportunistas (Otto et al., 2011). Além disso, também foi relatado que pacientes sobreviventes à sepse grave tem maior risco de adquirir uma infecção secundária em até cinco anos após a alta hospitalar (Cuthberts et al., 2010).

Associado ao fato de que a sobrevida à sepse grave vêm aumentando e que os pacientes que sobrevivem a sepse tornam-se mais suscetíveis a infecções oportunistas, faz-se necessária a compreensão dos eventos que decorrem da sepse e que possam contribuir para o desenvolvimento de uma imunossupressão tardia. Neste sentido, Boomer e colaboradores (2011) demonstraram que células do baço de pacientes que morreram de sepse apresentam uma irresponsividade a diversos estímulos policlonais. Foi observada uma redução expressiva das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ e de moléculas responsáveis pela apresentação do antígeno e ativação de linfócitos, como HLA-DR e CD80, além do aumento da expressão de moléculas como PD-1 (*programmed cell death 1*) e seu ligante PD-L1. Desta forma, pacientes que morreram de sepse apresentaram disfunções nas células imunes não encontradas nos pacientes que morreram de causas não relacionadas (Boomer et al., 2011). Assim também, Brunialti e colaboradores (2006)

demonstraram que células do sangue periférico de pacientes com sepse grave ou choque séptico apresentaram redução da produção de citocinas pró-inflamatórias após estimulação com LPS.

Além disso, experimentalmente, foi demonstrado que animais que sobrevivem à sepse grave são suscetíveis às infecções secundárias causadas por diversos patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* (Steinhauser et al., 1999; Muenzer et al., 2010), *Aspergillus fumigatus* (Benjamim et al., 2003) e *Legionella pneumophila* (Nascimento et al., 2010). Além disso, camundongos sobreviventes à sepse grave apresentam redução na capacidade de montar uma resposta de hipersensibilidade tardia e comprometimento na resposta imune contra tumores (Venet et al., 2008; Cavassani et al., 2010; Nascimento et al., 2010). Muitos dos estudos experimentais iniciais que demonstraram a suscetibilidade destes animais à infecções secundárias, apontaram um comprometimento na função de monócitos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos, além do aumento de citocinas imunorreguladoras, como a IL-10, no desenvolvimento deste comprometimento imune (Steinhauser et al., 1999; Flohe et al., 2006; Osuchowski et al., 2006).

Apesar de estabelecida a participação da IL-10 no processo de imunossupressão pós-sepse, este não é o único componente envolvido neste quadro complexo. Com base em conhecimentos prévios sobre as células T reguladoras (Tregs), Nascimento e colaboradores (2010) investigaram a participação destas células no desenvolvimento da imunossupressão após sepse grave. Foi demonstrado que na fase aguda da sepse ocorre o aumento de Tregs apenas no local da infecção, ao passo que em uma fase tardia, 15 dias após a indução de sepse, estas células aumentam consideravelmente em órgãos linfóides periféricos (Nascimento et al., 2010). A principal implicação fisiopatológica do aumento de Tregs após a sepse foi demonstrada pela redução da capacidade

proliferativa das células T CD4⁺ convencionais. Nosso grupo demonstrou que animais sobreviventes à sepse apresentavam déficit da proliferação das células T CD4⁺, tanto *in vivo* quanto *in vitro* e, que este comprometido era abolido com o uso de anticorpos depletors de Tregs, os quais contribuíram para melhora significativa da sobrevivência após a infecção secundária (Nascimento et al. 2010, Nascimento, 2012).

Além da participação ativa das Treg no desenvolvimento da imunossupressão pós-sepse (Cavassani et al., 2010; Nascimento et al., 2010), outras células e moléculas também estão intimamente relacionadas com a imunossupressão após a resolução da infecção primária. Pastille e colaboradores (2011) observaram que após a sepse polimicrobiana grave induzida por CLP, ocorrem disfunções nos precursores de células dendríticas (CD) da medula óssea, os quais irão repovoar tecidos linfóides e não linfóides. Estas CD disfuncionais são grandes produtoras de IL-10. Este é um defeito crônico que afeta a indução de uma resposta Th1 e suprime mecanismos efetores inatos e adaptativos (Pastille et al., 2011).

Ainda, dados recentes do nosso grupo demonstram a participação da ativação alternativa de macrófagos na imunossupressão pós-sepse. Estes macrófagos, também referidos como M2, aumentam consideravelmente após a sepse e este fenômeno é dependente de citocinas como IL-33, IL-4 e IL-13. Estes macrófagos são eficientes em induzir a polarização de Tregs, assim como as Tregs são capazes de induzir a ativação alternativa destes macrófagos. Este pode ser um elo importante entre mudanças do sistema imune inato e adaptativo que ocorrem na sepse e favorecem o desenvolvimento da imunossupressão (Nascimento, 2012).

1.2. O FATOR DE NECROSE TUMORAL E SEUS RECEPTORES

1.2.1. Considerações gerais

O fator de necrose tumoral (TNF) foi identificado pelo pesquisador Lloyd Old, como um fator liberado por macrófagos e com capacidade de induzir citotoxicidade em linhagens celulares tumorais (Carswell et al., 1975). O TNF (também conhecido com caquexina ou TNF- α) é um dos principais mediadores inflamatórios, responsável por respostas inflamatórias agudas. A síntese de TNF ocorre em diversas células (mastócitos, natural killers, linfócitos ativos e fagócitos mononucleares) por meio de estímulos, como padrões moleculares associados ao patógeno ou ao dano tecidual, bem como pela indução por outras citocinas proinflamatórias (Dinarello et al., 1997; Abbas, 2010). O TNF é sintetizado como uma proteína transmembrana do tipo II (mTNF), constituída por 233 aminoácidos (26kDa), a qual forma um homotrímero estável na membrana celular. A liberação do TNF solúvel (sTNF) ocorre através da atividade proteolítica da enzima conversora de TNF (TACE ou ADAM17), a qual cliva o ectodomínio de mTNF, permitindo desta forma a liberação de um forma solúvel de 17 kDa, a qual forma um trímero estável de 51 kDa (Kriegler et al., 1988; Fischer et al., 2010). Tanto a forma solúvel quanto a forma transmembrana são biologicamente ativas e podem atuar sob dois receptores: o TNFR1 e o TNFR2 (Hierro and Lazo, 2012).

O TNFR1 (TNFRSF1A, CD120 α ou p55) é expresso em quase todas as células do organismo e está relacionado com a ativação de diferentes complexos de sinalização. O complexo I é importante para a ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e o AP-1, responsáveis pela transcrição de genes que culminam na produção de diversos mediadores inflamatórios (Gaur and Aggarwal, 2003; Rauert et al., 2009; Hierro and

Lazo, 2012). A ativação do TNFR1 também pode resultar na ativação do complexo II, responsável pelo recrutamento de proteínas adaptadoras associadas a domínios de morte, como TRADD (domínio de morte associado ao receptor de TNF) ou FADD (domínio de morte associado à Fas), os quais levam a ativação de caspases iniciadoras e efetoras resultando em apoptose celular (Gaur and Aggarwal, 2003; Schliemann et al., 2011), ou então, a ativação de proteínas como RIP-3 que resulta em necroptose (Duprez et al., 2012; Hierro and Lazo, 2012).

A expressão de TNFR2 (p75) é restrita a subpopulações celulares do sistema imune e a pouquíssimas células de outros sistemas, como células endoteliais e neurônios. Este receptor apresenta um domínio intracelular ligado a proteínas adaptadoras tipo TRAF (fator associado a receptor de TNF), os quais têm como principal mecanismo de transdução, a ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1, associados com respostas proliferativas, de sobrevivência e pró-inflamatórias (Faustman e Davis, 2010; Hierro and Lazo, 2012).

Os receptores de TNF também podem ser ativados pela linfotóxina alfa (LT- α , também conhecida como TNF- β), a qual possui alto grau de homologia com TNF (Smith et al., 1994; Sriskandan et al., 1996). Os receptores de TNF podem ser clivados pela TACE, gerando formas solúveis dos receptores (sTNFR1 e sTNFR2), os quais tem a função de neutralizar o TNF na circulação (Van Zee et al., 1992; Kiesko et al., 2007).

Esquema 1: Complexos de sinalização ativados por TNFR1 (Hierro and Lazo, 2012)

Esquema 2: Complexos de sinalização ativados por TNFR2 (Hierro and Lazo, 2012)

1.2.2. Envolvimento do TNF na sepse

Além da sua função como uma importante citocina inflamatória, auxiliando no recrutamento de neutrófilos e demais fagócitos, bem como na potencialização dos seus mecanismos microbicidas para controle do processo infeccioso, o TNF também apresenta um outro lado. Quando liberado exacerbadamente, exerce funções endócrinas prejudiciais ao organismo.

A alta concentração de TNF liberada durante a sepse leva a produção de prostaglandinas pelas células hipotalâmicas, causando febre; a indução da síntese de outras citocinas, como IL-6, que induz o aumento da síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e o intenso catabolismo muscular, hepático e adiposo, acarretando na caquexia. Além disso, tais concentrações desta citocina inibem a contratilidade do miocárdio e o tônus da musculatura lisa dos vasos, levando a queda acentuada e progressiva da pressão arterial, assim como a alteração de fatores de coagulação, culminando em coagulação intravascular disseminada (CIVD) (Balkwill et al., 1987; Tracey, 1992; Abbas et al., 2010).

Alguns polimorfismos genéticos estão associados à gravidade da sepse e do choque séptico, dos quais muitos estão localizados no gene de TNF. Relatos da literatura mostram que pacientes que possuem altas concentrações de TNF durante a sepse apresentam polimorfismos em algumas regiões do gene de TNF, evento este relacionado com a taxa de mortalidade destes pacientes (Kothari et al., 2013). No entanto, clinicamente, é conhecida a ineficiência da terapia de bloqueio de TNF em pacientes sépticos (Fisher Jr et al., 1996), desta forma o estudo da participação

individual dos seus receptores é fundamental para o entendimento da fisiopatologia da sepse.

Secher e colaboradores (2009) demonstraram que animais $TNF^{-/-}$, $TNFR1^{-/-}$ e $TNFR1/2^{-/-}$ apresentam aumento da sobrevivência durante a sepse induzida pela injeção de bactérias do conteúdo fecal. A maior sobrevivência foi acompanhada pelo maior controle do processo infeccioso, bem como pela redução de citocinas sistêmicas e lesões teciduais. Este trabalho demonstrou que animais $TNFR1/2^{-/-}$ sépticos apresentaram redução da dessensibilização de receptores quimiotáticos nos neutrófilos e consequentemente aumento do clearance bacteriano (Secher et al., 2009). Embora estabelecida a participação do TNF na fase aguda da sepse, nenhum trabalho relatou a importância deste mediador e dos seus receptores no desenvolvimento da imunossupressão pós-sepse.

1.3. CÉLULAS T REGULADORAS

1.3.1. Considerações gerais

As células T reguladoras (Tregs) são células $CD4^{+} CD25^{+}$ com expressão única do fator de transcrição FoxP3 (*forkhead box protein 3*). São células fundamentais para o processo de tolerância periférica e podem ser classificadas de acordo com sua ontogenia. As Tregs originadas no timo a partir do processo de tolerância central são chamadas de Tregs naturais, deixando o timo como Tregs fenotipicamente completas, enquanto que as células T $CD4^{+}$ *naive* que tem seu TCR ativado na presença de TGF- β em órgãos linfóides periféricos podem começar a expressar FoxP3, tornando-se Tregs induzidas. (Mills, 2004; Thornton et al., 2010; Liu et al., 2011). Para que uma célula

Treg possa exercer seu mecanismo supressor é necessária a ativação via TCR, porém uma vez ativa, estas células exercem seu mecanismo supressor independente do antígeno (Thornton e Shevachi, 2000).

Os mecanismo de ação das Tregs podem ser diretos, causando supressão direta das células T convencionais, ou indiretos, levando a supressão da apresentação do antígeno. Os mecanismos responsáveis pela supressão direta da célula alvo são: a liberação de IL-10, IL-35 e TGF- β que inibem diretamente as células T e as demais células mielóides; o consumo de IL-2 do microambiente, levando as demais células T à apoptose; a liberação de granzimas que causa apoptose da célula alvo; a liberação de monóxido de carbono (CO), o qual leva ao bloqueio da produção de IL-2 na células alvo (Thornton e Shevachi, 2000; Tone et al., 2003; Brusko et al., 2005, Shevach, 2009). Dentre os mecanismo reguladores indiretos, podemos citar alguns, como: a interação entre CTLA-4 das Tregs com B7 em células dendríticas, levando ao aumento de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) nestas células e, conseqüentemente, a degradação do triptofano e a produção de metabólitos proapoptóticos; LAG-3 (CD223), a qual possui grande afinidade pelo MHC de classe II, desta forma LAG-3 pode se ligar ao MHC-II durante a apresentação de antígenos e impedir a maturação das células dendríticas; outro mecanismo de ação das Tregs ocorre via CD39, devido a sua capacidade de induzir a inativação catalítica do ATP (mediador inflamatório importante para a maturação de células dendríticas); as Tregs também expressam Neuropilina-1 (Nrp-1), a qual promove uma longa interação com células dendríticas imaturas, restringido desta forma o acesso a células T convencionais (Thornton e Shevachi, 2000; Tone et al., 2003; Brusko et al., 2005; Shevach, 2009).

A expansão de Tregs representa um evento central para o desenvolvimento da imunossupressão pós-sepse (Nascimento et al., 2010). No entanto os mecanismos envolvidos com a expansão destas células após a sepse, permanecem desconhecidos.

1.3.2. Envolvimento do TNF na expansão e função das Tregs

O TNF foi considerado protótipo de citocina pró-inflamatória. Porém, atualmente tem-se demonstrado novas funções para esta citocina, principalmente quanto ao seu papel imunorregulador. Muitos fatores estão envolvidos com as novas funções atribuídas ao TNF, como o tempo de exposição ao estímulo, o estado da doença e o contexto no qual a doença ocorre (Chen e Oppenheim, 2010).

Chen e colaboradores (2007) demonstraram que células T $CD4^+CD25^+$ possuem uma maior densidade de TNFR2 do que células T $CD4^+CD25^-$ e que esta relação não ocorre com o TNFR1. Ainda neste trabalho, foi demonstrado *in vitro* que o TNF é capaz de aumentar a expressão de Foxp3 e de CD25 nas células T $CD4^+CD25^+$ e que isso não ocorre quando estas células são estimuladas com outras citocinas inflamatórias, como IL-1 e IL-6. Do mesmo modo, as Tregs expandidas com TNF apresentaram efeito supressor potencializado sob a proliferação de células $CD4^+CD25^-$. Assim TNF promoveu a expansão e o aumento da função de Tregs *in vitro* (Chen et al., 2007).

As Tregs oriundas de animais TNFR2^{-/-} apresentam uma capacidade supressora reduzida em relação às provenientes de animais WT, demonstrando que possivelmente o TNFR2 seja o principal receptor envolvido com a atividade de TNF sob as Tregs (Chen et al., 2008; Chen et al., 2010). Do mesmo modo, as Tregs isoladas de um infiltrado tumoral apresentaram atividade supressora aumentada quando

expressavam TNFR2, contribuindo desta forma com a evasão imune do tumor (Chen et al, 2008). O TNFR2 também assume um papel importante na estabilização do fenótipo de células $CD4^{+}FoxP3^{+}$ no ambiente inflamatório, já que estas células apresentam plasticidade frente a outros estímulos (Chen et al., 2013). Além do TNFR2, outros membros da super família de TNF (TNFRSF) também estão envolvidos com a atividade de Tregs. Hamano e colaboradores (2010) demonstraram que TNF aumenta a expressão de TNFR2, OX40 e 4-1BB nas Tregs, resultando na atenuação de uma resposta inflamatória exacerbada (Chen et al., 2008; Hamano et al., 2010).

No entanto, o TNFR2 também é um coestimulador de células T convencionais, importante para a ativação e proliferação destas células (Kim et al., 2004). Chen e colaboradores (2010) demonstraram que a expressão de TNFR2 nas células T convencionais permite a resistência destas células aos mecanismos reguladores das Tregs. O efeito dual do TNF sob as células Tregs e as células T convencionais pode ser exemplificado pelos efeitos benéficos ou prejudiciais que o tratamento com anti-TNF apresenta em diferentes doenças autoimunes. De fato é necessário um equilíbrio entre a atividade de ambas as células para o restabelecimento da homeostase, o qual ainda permanece sob investigação (Chen et al., 2008).

Embora demonstrado o papel do TNFR2 na expansão e aumento da função supressora das Tregs, poucos trabalhos relatam um possível envolvimento do TNFR1 na regulação de Tregs. Assim, Chee e colaboradores (2011) demonstraram que a deficiência do TNFR1 está relacionado à resistência durante o desenvolvimento de diabetes autoimunes em camundongos NOD (*Nonobese Diabetic*), evento este associado ao aumento de Tregs, evidenciando uma possível participação do TNFR1 na regulação negativa da expansão destas células.

Sendo assim, eventos decorrentes da sepse ainda não totalmente esclarecidos são capazes de induzir a expansão de Tregs, as quais participam ativamente do desenvolvimento da imunossupressão tardia nos indivíduos sobreviventes a fase aguda da doença. Sabe-se que, durante a fase aguda da sepse, ocorre um aumento da liberação sistêmica de TNF. Uma vez demonstrada a participação do TNF via TNFR2 na expansão e função de Tregs, seria esta uma via envolvida na expansão de Tregs, importante para o desenvolvimento da imunossupressão pós-sepse? De acordo com esta breve revisão da literatura, nossa hipótese foi que o TNF liberado sistemicamente durante a sepse poderia atuar sobre seus receptores TNFR1 e TNFR2 nas Tregs, regulando assim sua expansão e, conseqüentemente, o desenvolvimento da imunossupressão pós-sepse.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL:

Avaliar a participação do TNF e de seus receptores no desenvolvimento da imunossupressão induzida pela sepse.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a participação dos receptores de TNF no desenvolvimento da inflamação sistêmica e da lesão de órgãos durante a fase aguda da sepse induzida pelo modelo de CLP
- Investigar a participação dos receptores de TNF na suscetibilidade à infecção secundária nos animais sobreviventes à sepse (fase tardia após a sepse).
- Investigar a participação da ativação dos receptores de TNF na expansão de Tregs durante e após a sepse.
- Avaliar a frequência e a densidade dos receptores de TNF nas células Tregs e T convencionais durante e após a sepse.
- Investigar a participação do TNF na proliferação e/ou diferenciação de Tregs.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para realização deste trabalho, foram utilizados camundongos isogênicos de linhagem C57/BL6 (wide type, WT) e camundongos deficientes para TNFR1 (Rothe et al., 1993) e para TNFR1 e TNFR2 (Erickson et al., 1994), machos e fêmeas com idade de 6 a 10 semanas. Os camundongos TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram obtidos da *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Estados Unidos) e gentilmente cedidos pelos professores João Santana (FMRP-USP) e Bernhard Ryffel (*University of Orléans*), respectivamente. Os animais deficientes foram criados no Centro de criação de camundongos especiais do Departamento de Genética da FMRP-USP e, os camundongos WT foram criados no Serviço de biotério (Biotério Central – Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto-USP). Todos os animais para experimentação foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP sob condições de temperatura de 23-25°C, ciclo de claro/escuro de 12h, com acesso livre a água e ração.

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 152/2011 de 31 de outubro de 2011) (Anexo).

3.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.2.1. Participação dos receptores de TNF na fase aguda da sepse (Protocolo 1)

3.2.2. Participação dos receptores de TNF na expansão de Tregs durante e após a sepse (Protocolo 2)

3.2.3. Participação dos receptores para TNF na resposta a infecção secundária após a sepse (Protocolo 3)

3.3. MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE POLIMICROBIANA

O modelo experimental de sepse adotado no presente trabalho foi descrito por Baker (Baker et al., 1983), e consiste na ligadura e perfuração do ceco (CLP), o qual mimetiza um quadro séptico grave. Este método sofreu algumas modificações como descritas abaixo.

Os camundongos foram anestesiados com cetamina 6%/xilazina 2,5% via intraperitoneal (i.p.) na dose de 10 µl/g. Em seguida, os mesmos foram submetidos a laparotomia, com incisão de 1 cm na linha média do abdome. O ceco foi exposto e ligado com um fio de algodão abaixo da válvula íleo-cecal com subsequente perfuração transversal com agulha estéril de 18G (1X18G) para induzir sepse grave (CLP) com 100% de mortalidade. Após a perfuração, o ceco foi pressionado gentilmente para garantir a saída de fezes pela perfuração e recolocado no abdome, sendo a incisão

suturada. Imediatamente após a cirurgia, todos os animais receberam 1 ml de salina subcutânea para evitar desidratação, e foram colocados na presença da luz. Após a recuperação da anestesia, cerca de 40 minutos após a cirurgia, os animais foram levados ao biotério sob condições adequadas.

Para diminuir a mortalidade de 100% observada no modelo experimental de sepse grave, segundo Benjamim e colaboradores (2003) e modificado por Nascimento (2010), os animais foram tratados via i.p. com antibiótico Ertapenem sódico (*Laboratories Merck Sharp e Dohme – Chibret Mirabet Plant Riom*) na dose de 30 mg/Kg. A administração foi realizada a partir da 6^o h após a cirurgia e posteriormente em intervalos de 12 h até o quarto dia após CLP. O conjunto de intervenções como a reposição hídrica e a antibioticoterapia, nos referimos como o suporte básico.

3.4. PREPARAÇÃO E INOCULAÇÃO DA BACTÉRIA *Legionella pneumophila*

3.4.1. Bactéria

L. pneumophila sorogrupo 1 foi utilizada neste estudo como ferramenta para avaliar a imunossupressão causada pela sepse. A cepa utilizada, (CR)1326 (selvagem), cresceu a 37°C por 48 horas 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)₃; 1.5 % de ágar bacteriológico e 0.2 % de carvão ativado) (Zamboni et al., 2006). A leitura da D.O. a 600 nm das bactérias diluídas em PBS estéril foi utilizada para estimar a concentração da suspensão bacteriana.

3.4.2. Infecção *in vivo*

Os animais foram anestesiados com injeção i.p. de ketamina e xilazina, e infectados via intranasal (i.n.) com 40µl da suspensão contendo 1×10^7 *L. pneumophila* (Nascimento et al., 2010).

3.5. ANÁLISE DA SOBREVIDA

Os camundongos foram monitorados, a cada 12 h, durante 7 dias após a CLP e tratamento com suporte básico para avaliação da sobrevida durante a fase aguda da sepse. Os animais sobreviventes desta fase foram os objetos de estudo na fase tardia (Protocolo 2 e 3). A sobrevida dos animais infectados com *L. pneumophilla* foi avaliada a cada 12 horas por 7 dias. Ao final deste prazo, os animais foram eutanasiados de acordo com as normas sobre uso de animais de experimentação em laboratórios. Os resultados foram expressos em taxa (%) de sobrevida.

3.6. AVALIAÇÃO DO ESCORE CLÍNICO

O escore clínico para os animais submetidos a CLP foi baseado em quatro parâmetros, os quais recebiam pontuações de 0 a 3 de acordo com os critérios avaliados:

- A- Aparência: pêlos normais (0), piloereção (1), piloereção e pêlos umedecidos (2), muco nos olhos (3).
- B- Frequência respiratória: normal (0), rápida (1), lenta (2), fraca e intermitente (3).
- C- Alterações de peso: perdas até 5% (0), 15% (2), 20% (2) e maiores que 20% (3)

D- Comportamento: normal, ágil e curioso (0), movimentos lentos (1), movimentos cambaleantes (2), deitados de lado (3).

Avaliamos o escore clínico antes e a cada 12 horas após a CLP até o final da antibioticoterapia. A pontuação foi atribuída de acordo com os critérios para cada animal e a média aritmética foi atribuída para cada grupo ao final de cada tempo. Portanto, os resultados demonstram a média de cada grupo no tempo determinado.

3.7. MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA CAVIDADE PERITONEAL

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi determinada seis horas após a CLP, antes do início da antibioticoterapia. Os animais foram eutanasiados, a pele do abdômen aberta com uma incisão mediana sem lesar a musculatura. A cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de tampão PBS contendo EDTA (1mM). A partir do lavado peritoneal foram feitas contagens total e diferencial das células.

3.7.1. Contagem total de leucócitos

A contagem total foi realizada em contador automático de células (COULTER® AC T; Coulter Corporation, Miami, Florida, USA) e os valores expressos com número de células x 10^6 /mL.

3.7.2. Contagem diferencial de leucócitos

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação (citospin; Shandon Lipshaw Inc, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) de uma alíquota do lavado peritoneal (40µl) e coradas com o corante panótico rápido (LaborClin; Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brasil). As células foram examinadas em

microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 x), sendo contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se dois tipos celulares: neutrófilos e macrófagos. A quantificação de cada tipo celular presente no lavado foi calculada pela porcentagem dessas células contadas nos esfregaços e pela quantidade de células totais obtidas na contagem total. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos ou macrófagos $\times 10^6$ presentes no lavado peritoneal.

3.8. QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

3.8.1. Quantificação de bactérias durante a sepse

A quantificação de bactérias no sangue (bacteremia) e no lavado peritoneal (foco da infecção) nos camundongos submetidos à sepse, foi realizada 6, 24 e 48 horas após a CLP e tratamento com suporte básico. Os animais foram anestesiados, o sangue foi coletado por punção cardíaca e o lavado peritoneal por lavagem da cavidade peritoneal com PBS/EDTA. Todo o procedimento foi realizado sob condições estéreis. 10 μ l do sangue com anticoagulante (sem diluições) ou 10 μ l do lavado peritoneal (diluído 10^{-2}) foram semeados em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Mich). Após a semeadura, as placas foram incubadas por 24 h a 37°C e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi quantificado. Os resultados foram expressos em Log de UFC/ ml de amostra.

3.8.2 Quantificação de *L. pneumophila*

Para quantificação de bactérias presentes no baço e pulmão, os animais foram eutanasiados, o baço foi coletado, colocado em 500 µl de água deionizada estéril. No tecido pulmonar, a determinação do número de bactérias presentes, foi realizada sem perfusão dos animais com PBS, o pulmão foi retirado e armazenado em 10 ml de água deionizada estéril. Esses órgãos serão homogeneizados com auxílio do Pollytron®. Foram, então, semeados 10 µl das amostras em placas de Petri contendo meio de crescimento para *Legionella* (Zamboni et al., 2006). As placas são incubadas por 4 dias a 37°C e o número de colônias contado. Os resultados foram expressos como Log de UFC/ tecido.

3.9. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

As quantificações de IL-1 β , IL-6 e TNF no soro e de IL-10 e TGF- β homogenato pulmonar foram realizadas com material coletado em diferentes tempos após a indução da sepse. A determinação dos níveis destas citocinas foi feita por método imunoenzimático (ELISA). Resumidamente, as placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 µl/ poço do anticorpo específico anti-IL-1 β (RD), , anti-IL-6 (BD), anti-IL-10 (eBioscience), anti-TGF- β (eBioscience), anti-TNF (RD) na concentração descrita pelo fabricante. Estes anticorpos foram diluídos em solução de ligação (coating buffer) e incubados por 18-24 horas a 4°C. As placas foram lavadas por quatro vezes com PBS/Tween-20 (0.05 % Sigma). As ligações não-específicas foram bloqueadas com 200 µl de PBS contendo BSA 1 % (para kits da RD) ou 200 µl de PBS contendo soro bovino fetal inativado 10% (para kits BD e eBioscience) durante 1 hora à 37 °C. As amostras e o padrão (curva-padrão) contendo as concentrações de IL-1 β (5000 pg/ ml), IL-6 (4000 pg/ ml), IL-10 (5000 pg/ ml), TGF- β (8000 pg/ ml), TNF

(10000 pg/ml), foram colocados nas placas (50 µl) e incubados overnight a 4 °C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50 µl dos anticorpos biotinilados específicos para cada citocina foram adicionados nas concentrações descritas pelo fabricante. 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 45 min. Posteriormente, elas foram lavadas com PBS/Tween e TMB foi adicionado. A densidade óptica (DO) foi medida a 630 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). A concentração de citocinas contidas nas amostras foi calculada a partir de uma curva padrão com 10 pontos obtidos por diluição seriada. Os resultados foram expressos em pg/ml. Os limites de detecção para estas citocinas foram: TNF: 1,333 a 0,001pg/ml, TGF-β: 1,485 a 0,009 pg/ml, IL-10: 1,789 a 0,021 pg/ml, IL-6: 1,375 a 0,011 pg/ml e IL-1β: 1,259 a 0,008 pg/ml.

3.10. ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE

A quantificação do infiltrado de neutrófilos no pulmão dos animais submetidos a CLP e tratados com suporte básico foi determinado pelo ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), no homogeneizado do pulmão obtido em diferentes tempos na fase aguda da sepse. Para isso, após a perfusão com salina, o pulmão de cada animal foi coletado e colocado em 200uL de tampão gelado (pH 4,7; NaCl 0,1M, NaPO⁴ 0,02M e NaEDTA 0,012M) e posteriormente, homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). O material homogeneizado foi em seguida centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Foi realizado então um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 600uL de NaCl 0,2%, seguido de 600uL de solução de NaCl 1,6% e glicose 5%. Depois uma nova centrifugação foi realizada a 3000rpm por 15 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso em tampão NaPO₄ (pH 5.4) contendo 5% de brometo de

hexadeciltrimetilamonio(HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir o homogeneizado centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, 3uL do sobrenadante foram colocados em placas de 96 poços para ensaio. Em cada poço foram adicionados 25uL de TMB (3,3',3,3-tetrametilbenzidina 1,6mM) e a placa foi incubada por 5 minutos a 37°C. Logo após, 100uL de H₂O₂ (0,5mM) foram adicionados nos poços e a placa foi incubada por mais 5 minutos a 37°C. A seguir a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M. A quantificação de neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (obtidos da cavidade peritoneal 6 horas após os camundongos serem injetados com carragenina), a qual foi diluída seriadamente em NaPO₄ 0,08M (1 x 10⁵ neutrófilos/poço/50uL). Foi determinada a absorbância em leitor de ELISA (Spectra Max 250) no comprimento de onda de 450nm. Resultados foram expressos como número de neutrófilos por 100mg de tecido.

3.11 MARCADORES DE FUNÇÃO E LESÃO DE ÓRGÃOS

3.11.1. Determinação da atividade sérica de aminotransferase (AST)

Para avaliação da função hepática, foram realizadas dosagens de AST dos soros de animais *naive* e animais sépticos 6, 24, 48 e 72 horas após a indução da sepse. Para tanto foi utilizado o ensaio colorimétrico enzimático através do Kit transaminase AST / LABTEST Diagnóstica e a leitura da absorbância determinado em leitor de ELISA (Spectra Max 250) no comprimento de onda de 505nm.. O soro de animais foi obtido através de centrifugação a 1000 x g por 10 minutos e processado conforme indicações do fabricante. Os valores foram expressos em U/ml.

3.11.2. Determinação das concentrações de uréia sérica (BUN)

Para avaliação da produção de uréia, foram realizadas dosagens no soro de animais sépticos (6,24,48 e 72 horas após CLP) e *naive*. Para tanto foi utilizado o ensaio colorimétrico enzimático por meio do Kit Uréia/ LABTEST Diagnóstica leitura da absorbância determinado em leitor de ELISA (Spectra Max 250) no comprimento de onda de 600nm.. As amostras foram processadas conforme indicações do fabricante. Os valores foram expressos em mg/dL.

3.11.3. Determinação da atividade sérica de CK-MB

Para avaliação da lesão cardíaca, foram realizadas dosagens de CK-MB dos soros de animais *naive* e animais sépticos 6, 24, 48 e 72 horas após a CLP associada ao suporte básico. Para tanto foi utilizado o ensaio colorimétrico enzimático por meio do Kit CK-MB / LABTEST Diagnóstica e a leitura da absorbância determinado em leitor de ELISA (Spectra Max 250) no comprimento de onda de 340nm. O soro de animais foi obtido através de centrifugação a 1000 x g por 10 minutos e processado conforme indicações do fabricante. Os valores foram expressos em U/ L.

3.11.4. Determinação da concentração sérica de Endocan

As concentrações de Endocan foram dosadas no soro por ELISA (ver item 3.9). Mouse Endocan DuoSet (RD system) foi utilizado para quantificação de Endocan no soro dos animais *naive* e sépticos 6, 24, 48, 72 horas após CLP. Os valores foram expressos em pg/mL.

3.12.. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR

Após os camundongos serem eutanasiados, o baço foi retirado, e colocado em tubo de propietileno de 15 ml (Falcon®) contendo 1 ml de meio RPMI 1640 incompleto. A seguir, os órgãos foram divulssionados em peneira de propietileno (Falcon® - separador de células – 100 µm) com auxílio do êmbolo da seringa de 5 ml (Plastipak®), formando uma única suspensão celular. As hemácias foram lisadas por choque hiposmótico utilizando um tampão de lise e uma nova centrifugação foi realizada. Subseqüentemente, as células do baço foram ressuspensas em 3 ml, 1 ml e 2 ml de PBS cotendo 2% de soro bovino fetal inativado, respectivamente. As células foram contadas no contador automático (COULTER® AC T; Coulter Corporation, Miami, Florida, USA).

3.13. CITOMETRIA DE FLUXO

3.13.1. Análise da expressão de marcadores de Tregs

As análises da expressão de alguns marcadores, no intuito de avaliar a presença da população de Tregs, foram realizados em células recuperadas do baço, de camundongos sépticos (CLP_{1d}) ou sobreviventes à sepse (CLP_{15d}) ou hígidos. Sendo caracterizada a expressão dos seguintes marcadores: CD4⁺ e CD25⁺ e Foxp3⁺.

Resumidamente, foi preparada uma suspensão de células de cada tecido individualmente como descrito no **item 3.12**. As células (1x10⁶ células/tubo) foram incubadas com 40 µl de Fc block (soro de coelho), bloqueador da porção Fc de

imunoglobulinas (anticorpo proveniente de sobrenadante de 14 hibridoma de anti-CD16/ CD32), para evitar ligações inespecíficas, por 20 minutos a 4 °C. Em seguida, foram adicionados com 1,0 µl (1,0 µg) de anticorpos CD4 Percp ou FITC e CD25 FITC ou PE por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, adiciona-se 300 µl de CITOFIX (puro) (kit Cytofix/Cytoperm – Pharmingen) (utilizado para fixar as células), por 20 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente as amostras serão lavadas 2 vezes com 1 ml de Perm Wash (diluído 1:10 em PBS) (kit Cytofix/Cytoperm – Pharmingen), sendo centrifugadas a 400 g por 10 minutos. Após a lavagem, foram adicionados 1 µl (1 µg) de anticorpo monoclonal intracelular anti-Foxp3 conjugado a PE ou APC ou isotipo (obtidos da eBioscience) por 45 minutos a 4°C. Posteriormente as amostras foram lavadas 2 vezes com 2 ml de PBS contendo 2% de soro bovino fetal, centrifugadas a 400 g por 10 minutos e ressuspensas em 100 µl de solução de formaldeído a 1 % em PBS. Após estes procedimentos, as amostras foram adquiridas em FACScanto (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ), utilizando os canais de fluorescência 1 (FL1) para moléculas conjugadas a FITC; 2 (FL2) para moléculas conjugadas a PE e 4 (FL4) para moléculas conjugadas a APC ou Alexa Fluor 647. As análises foram feitas usando o programa FCS Express V3 (DE NOVO SOFTWARE), o qual permitirá analisar todas as células adquiridas (30000 eventos/gate de células T CD4⁺/amostra), individualizadas por janelas (Gates) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL). Os resultados foram expressos como porcentagem da expressão de marcadores de Tregs (% de células CD25⁺FoxP3⁺ dentro de uma população de linfócitos T CD4⁺).

3.13.2. Análise da expressão dos receptores de TNF nas Tregs

O procedimento segue os mesmos moldes do **item 3.13.1**. Porém, neste caso além dos marcadores clássicos, utilizamos marcadores para receptores de TNF. Ao mesmo tempo em que anti-CD4 e anti-CD25 foram adicionados a suspensão celular, também adicionamos 1,0 µl (1,0 µg) de anticorpos anti-CD120a (TNFR1) APC ou anti-CD120b (TNFR2) PE. Os demais procedimentos seguem assim como no item anterior, para marcação com anti-FoxP3 e a finalização do procedimento.

3.14. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T CD4⁺ *in vivo*

Para avaliação da proliferação *in vivo*, os animais sobreviventes a sepse (CLP_{15d}) ou *naive* (controles) foram infectados i.n. com *L. pneumophila* (1 x 10⁷/40 µl). No 1º e 2º dia após a infecção, os animais foram tratados i.p. com 150mg/dose de BrdU (volume final de 200µl). No 3º dia após a infecção, foi preparada uma suspensão de células do baço (1,0x10⁶ células/tubo) com no **item 3.12**. O protocolo de marcação para anti-BrdU APC, 7-AAD PE e anti-CD4 FITC, utilizando o Kit BrdU APC (BD®), foram realizado conforme as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos como porcentagem de células T CD4⁺ 7AAD⁺ BrdU⁺.

3.15. SEPARAÇÃO DE CÉLULAS T CD4⁺

A subpopulação de células T CD4⁺CD25⁻ do baço de camundongos C57/B6 hípidos foram separadas utilizando um kit comercial proveniente da Miltenyi Biotec (Auburn, CA). Resumidamente, as células foram primeiramente marcadas com um coquetel de anticorpos monoclonais biotinilados específicos para camundongos: CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγδ e, subseqüentemente a suspensão celular foi incubada com micro-beads cobertas com biotina. Após 15 minutos de

incubação, as células foram lavadas, 400 g por 10 minutos a 4-8 °C e, a população CD4⁺ (maior que 90 % pureza) foi separada magneticamente por MACS®-sorting através da seleção negativa em colunas adequadas ao número de células.

3.16. CULTURA DE DIFERENCIAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE Tregs

As células (WT e TNFR1/2^{-/-}) separadas conforme item 3.15 foram utilizadas para a cultura de diferenciação de Tregs. A cultura foi procedida em placa de 96 poços de fundo chato. Inicialmente foi realizado um coating com anticorpos anti-CD3 (1µg/ul) e posteriormente 100 mil células colocadas em cada poço. Quatro poços foram feitos para cada grupo de estímulos. Realizamos um grupo controle, o qual continha apenas meio de cultura; outro grupo foi estimulado com IL-2 (10ng/ml) e o grupo controle positivo estimulado com IL-2 (10ng/ml) e TGF-β (30ng/mL). Os testes foram realizados com dois estímulos diferentes: um com IL-2(10ng/mL) mais TNF (10ng/ml) e outro com IL-2(10ng/ml), TNF (10ng/ml) mais TGF-β (30ng/ml). Em todos os poços foram adicionados anticorpos anti-CD28 (1µg/ul).

As células T CD4⁺ (WT) também foram submetidas a cultura para avaliação da proliferação das células CD4⁺Foxp3⁺. Para isso foi utilizado : meio (controle) e estímulo com IL-2 (10ng/ml) ou IL-2 (10ng/ml) e TNF (10ng/ml). Todos os grupos foram acrescidos de anti-CD3 e anti-CD28. Em todos os poços utilizamos BrdU (10mM) para avaliação da proliferação celular. Após 96 horas de cultura, estas células foram marcadas com anti-CD4, anti-Foxp3 (como no item 3.13.1) e com anti-BrdU.

3.17. PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

3.17.1. Solução de cetamina e xilazina

Cetamina 10% (Agener União) .....1,25 mg/ml
Xylazina 2% (Agener União) 0,5mg/ml
Salina 0.9 % q.s.p .....100 ml
A solução foi estocada à 4°C.

3.17.2. Solução de Tampão Salina-fosfato (PBS) 10X (Solução Mãe)

Cloreto de Sódio (NaCl, Merck) 80g
Cloreto de Potássio (KCl, Merck) .....2 g
Fosfato de Sódio dibásico (Na₂HPO₄, Merck) .....11,5 g
Fosfato de Potássio monobásico (KH₂PO₄, Merck) .....20 g
Água deionizada Milli-Q q.s.p. ....1000 ml
A solução foi estocada à 4°C.

3.17.3. PBS 1X:

PBS10X .....100 ml
Água Milli-Q q.s.p. ....900 ml
O pH foi ajustado para pH 7.2, a solução foi filtrada e estocada à 4°C.

3.17.4. PBS/EDTA (1mM):

PBS 1X q.s.p. 100ml
Etilenodiaminotetracético (EDTA, Merck) .....37,2 mg
O pH foi ajustado para pH 7.2, a solução foi filtrada e estocada à 4°C.

3.17.5. Corante Panótico Rápido (LaborClin)

Panótico rápido n°1: compõe-se por uma solução de triarilmetano a 0.1% - 1 minuto.
Panótico rápido n°2: compõe-se por uma solução de xantenos a 0.1% - 1minuto.
Panótio rápido n°3: compõe-se por uma solução de tiazinas a 0.1% - 1 minuto.

3.17.6. Meio Ágar Muller Hinton (M.M.H.):

M.M.H. (Difco)	38 g
Água Milli-Q q.s.p.	1 l

O meio foi autoclavado, plaqueado aproximadamente 22 ml por placa e estocado à 4°C.

3.17.7. Meio RPMI incompleto

Hepes (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S, Sigma)	2,38 g
RPMI 1640 (Sigma) – 1 frasco	10,4 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ , Vetec)	2,20 g
Água de Milli-Q q.s.p.	1 g

O pH foi ajustado para pH 7.2, a solução foi filtrada e estocada à 4°C.

3.17.8 Meio RPMI completo

Soro Bovino Fetal inativado (SBF-I, Difco)	10 ml
Estreptomicina (10mg/mL)/penicilina (10 unidades) (antibiótico, Sigma)	1 ml
Fungizona (antifúngico, Sigma)	120 µl
L-Glutamina (200mM, Sigma)	1,3 ml
RPMI incompleto q.s.p.	100 ml

O pH foi ajustado para pH 7.2, a solução foi filtrada e estocada à 4°C.

3.17.9. Tampão de citometria de fluxo (Tampão de FACS)

Soro Bovino Fetal inativado (SBF-I, Difco) 2%	2 ml
PBS 1X q.s.p.	100 ml

A solução foi preparada no dia do uso e utilizada gelada.

3.17.10. Tampão de lise

Cloreto de amônio (NH ₄ Cl, Merck)	4,01 g
EDTA (Labsynth)	0,18 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ , Vetec)	0,42 g
Água de Milli-Q q.s.p.	500 ml

O pH foi ajustado para pH 7.2, a solução foi filtrada e estocada à 4°C.

3.17.11. Tampões utilizados para o ensaio de ELISA

(A) Solução de ligação (coating buffer) pH 8.4

Bicarbonato de sódio (NaHCO₃, Merk) .....4.2 g
Água de Milli-Q q.s.p. ....500 ml

(B.1) Tampão de bloqueio (para ELISA da companhia BD)

Soro Bovino Fetal inativado (SBF-I, Difco) 10% .....5 ml
PBS 1X q.s.p. ....50 ml

(B.2) Tampão de bloqueio (para ELISA da companhia eBioscience e RD)

Albumina derivada de soro bovino(BSA, Sigma) 0,1 % .....0,1 g
PBS 1X q.s.p. ....100 ml

3.18. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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 $p < 0,05$. A contagem de bactérias foi expressa como mediana do Log de UFC e analisada estatisticamente pelo teste Mann-Whitney U . 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, para comparações múltiplas) ou teste t de Student (comparações entre duas amostras) para amostras não pareadas. O número (n) de animais por grupo experimental está descrito nas figuras. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de média (EPM) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 . RESULTADOS

4.1. PERFIL CINÉTICO DA LIBERAÇÃO SISTÊMICA DE TNF DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL

Dados da literatura demonstram que durante a sepse ocorre aumento das concentrações séricas de TNF nas primeiras horas após início do processo infeccioso (Tracey et al., 1987; Creasey et al, 1991). Assim, o primeiro passo do trabalho foi determinar a cinética de produção sistêmica de TNF durante a sepse experimental. Para isso, animais selvagens (WT), TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com um suporte básico (reposição hídrica e antibioticoterapia). Na 6^a, 24^a, 48^a, 72^a h e no 15^o dia após CLP, o sangue foi coletado para a dosagem de TNF no soro destes animais. Como a antibioticoterapia é iniciada 6 h após a CLP, o primeiro grupo eutanasiado não recebeu tal tratamento. Os resultados foram comparados aos dos grupos não submetidos à sepse (*naive*).

Como pode ser observado na figura 1A, ocorreu aumento da concentração sérica de TNF nos animais WT na 6^a h, sendo que o pico foi observado na 24^a h após a indução da sepse. Na 48^a h após a CLP, as concentrações séricas de TNF retornaram aos níveis basais. O mesmo perfil cinético da produção sistêmica de TNF foi observado nos animais deficientes para os receptores de TNF. No entanto, os animais TNFR1/2^{-/-} apresentaram concentrações séricas de TNF maiores que os animais WT e TNFR1^{-/-} nos tempos avaliados (Figura 1B).

Figura 1. Perfil cinético da liberação sistêmica de TNF durante a sepse experimental. Os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} (n=5) foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com um suporte básico (reposição hídrica e antibioticoterapia). Nos tempos determinados durante a fase aguda da sepse (6, 24, 48 e 72 h) e 15 dias após CLP, os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para obtenção do soro. O TNF foi dosado por ELISA e os resultados expressos em pg/ml correspondem a três experimentos independentes. (A) Concentrações de TNF nos animais WT sépticos e *naive*. (B) Concentrações de TNF em animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} submetidos à sepse e *naive*. *p<0,05 foi utilizado para demonstrar diferença entre os grupos *naive* e sépticos.

4.2. A DEFICIÊNCIA DOS RECEPTORES DE TNF CONFERE MAIOR RESISTÊNCIA À SEPSE INDUZIDA POR CLP

O TNF participa da fisiopatologia da sepse e pode agir diretamente sob dois receptores, TNFR1 e TNFR2, os quais apresentam diferentes funções durante o processo inflamatório (Tracey e Cerami, 1994; Faustman e Davis, 2010). Nosso próximo passo foi avaliar a participação dos receptores de TNF na fase aguda da sepse grave induzida por CLP associada a um tratamento de suporte básico. Inicialmente avaliamos dois parâmetros: a sobrevida, avaliada a cada 12 h por sete dias; e o escore clínico (frequência respiratória, mobilidade, aspecto/aparência e alteração do peso) avaliado a cada 12 h até o final da antibioticoterapia. Os animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} apresentaram uma taxa de sobrevida maior, aproximadamente 25%, em relação aos WT sépticos, porém não houve diferença entre os animais deficientes. Com relação ao escore clínico, os animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} apresentaram melhora dos parâmetros avaliados em relação ao WT séptico.

Assim como observado na avaliação da sobrevida, não encontramos diferenças significativas no escore clínico entre os animais deficientes (Figura 2A). Desta forma, os dados sugerem que o TNF exerce um papel prejudicial durante a sepse, sendo possivelmente o TNFR1 o principal receptor envolvido com este processo.

Figura 2: Animais deficientes para os receptores de TNF apresentam maior resistência após CLP. Animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico (n=10 por grupo). (A) A sobrevivência foi avaliada por 7 dias e os resultados foram expressos em % de sobrevivência. As taxas de sobrevivência dos animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} submetidos à sepse grave foram significativamente diferentes das dos animais WT. (B) O escore clínico (alterações de frequência respiratória, comportamento/aparência, mobilidade e alterações de peso) foi avaliado nos mesmos grupos de animais durante o período de antibioticoterapia (até 4º dia). Os escores clínicos dos animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} submetidos à sepse foram significativamente diferentes dos animais WT. Os resultados correspondem a três experimentos independentes.

4.3. A DEFICIÊNCIA DOS RECEPTORES DE TNF CONFERE MAIOR CONTROLE DO PROCESSO INFECCIOSO DURANTE A SEPSE GRAVE

Posteriormente, avaliamos a migração de neutrófilos para o local da infecção, evento este fundamental para o controle do processo infeccioso e, conseqüentemente, para a sobrevivência dos animais sépticos (Alves-Filho et al., 2008). Os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram induzidos à CLP e, 6 h após, o lavado peritoneal foi coletado para contagem global e diferencial, estimando assim, o número de neutrófilos que migraram para o local da infecção. Os animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} sépticos apresentaram maior número de neutrófilos no local da infecção quando comparado ao WT séptico. A quantidade de neutrófilos encontrada no peritônio dos animais TNFR1^{-/-} sépticos foi intermediária aos demais grupos, já os animais TNFR1/2^{-/-} sépticos apresentaram maior migração de neutrófilos quando comparada a migração encontrada nos animais WT e TNFR1^{-/-} sépticos (Figura 3A). Com isso, os dados sugerem que os receptores de TNF exercem um papel prejudicial no início da migração de neutrófilos para o foco infeccioso.

Uma vez que os animais deficientes para os receptores de TNF apresentaram maior migração de neutrófilos para o local da infecção, possivelmente o processo infeccioso também estaria melhor controlado nestes animais. Desta forma, avaliamos a carga bacteriana local e sistêmica 6, 24 e 48 h após CLP em animais tratados com suporte básico. Para isso, nestes tempos, os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} sépticos foram eutanasiados para coleta do lavado peritoneal e sangue, sob condições estéreis. Estas amostras foram semeadas para avaliação do crescimento das UFC (unidades formadoras de colônia). Um maior controle do crescimento bacteriano foi observado nos animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} no foco da infecção já na 6^a h após a

CLP, antes do início da antibioticoterapia, sendo que neste mesmo tempo não encontramos diferença na bacteremia entre os animais WT e deficientes. Na 24^a h após a CLP, os animais $TNFR1^{-/-}$ e $TNFR1/2^{-/-}$ continuaram apresentando maior controle da infecção local, apresentando também um maior controle da bacteremia com relação ao grupo WT. Na 48^a h após a CLP, observamos que a carga bacteriana local encontrava-se estável nos três grupos de animais, ao passo que a bacteremia foi controlada apenas nos animais $TNFR1^{-/-}$ e $TNFR1/2^{-/-}$ sépticos (figura 3A e 3B). Em nenhum tempo avaliado encontramos diferenças na carga bacteriana local e sistêmica entre os grupos de animais deficientes para os receptores de TNF. Deste modo, os dados sugerem que a ativação dos receptores de TNF durante a sepse grave pode prejudicar o controle da infecção local e sistêmica.

Figura 3: Animais deficientes para os receptores de TNF apresentam maior controle do processo infeccioso durante a sepse grave. (A) Migração de Neutrófilos para cavidade peritoneal antes do início da antibioticoterapia (6 h após CLP) nos animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} submetidos à sepse grave. (B) e (C) Quantificação bacteriana local (cavidade peritoneal) e sistêmica (sangue), respectivamente, nos animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} 6, 24 e 48 h após a CLP. O número total de bactérias foi estimado pelo cultivo em placas contendo Agar Müller-Hinton durante 24 horas. Os resultados são expressos como Log de UFC/ml de amostra e foram analisados por teste de Kruskal-Wallis seguido por Dunns. *p<0,05 comparado entre animais WT e deficientes.

4.4. OS RECEPTORES DE TNF SÃO IMPORTANTES PARA O DESENVOLVIMENTO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA DURANTE A SEPSE INDUZIDA POR CLP

É estabelecido que durante a sepse ocorre uma resposta inflamatória sistêmica, a qual é responsável pela lesão de diversos tecidos e órgãos distantes do foco infeccioso. Um dos principais mediadores liberados em grande quantidade durante a sepse é o TNF, envolvido com a potencialização da resposta inflamatória (Laster, et al., 1988).

Para avaliarmos a produção de mediadores inflamatórios durante a fase aguda da sepse (24h), nos animais deficientes para os receptores de TNF, dosamos IL-1 β e IL-6 sistêmicas. Foi observado, que os animais WT apresentam aumento da concentração de IL-1 β sistemicamente (figura 4A), ao passo que os animais deficientes para os receptores de TNF não apresentam este aumento 24 h após a indução da sepse. Os controles hígidos não apresentaram concentrações detectáveis de IL-6 no soro, ao passo que os animais WT sépticos apresentaram uma liberação exacerbada de IL-6 após CLP (figura 4B). Diferentemente, os animais deficientes para os receptores de TNF, não apresentaram aumento da concentração de IL-6 durante a sepse. Não foi observado diferença entre os animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} sépticos quanto a dosagem sistêmica de IL-6 e IL-1 β .

O infiltrado neutrofilico em órgãos distantes do foco infeccioso é um evento comum durante a sepse (Baumann and Gauldie., 1994), sendo assim, um importante indicador da gravidade da inflamação sistêmica. Desta forma, quantificamos indiretamente o infiltrado neutrofilico pulmonar durante a sepse, por meio do ensaio de mieloperoxidase (MPO). O tecido pulmonar dos animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foi coletado 6, 24 e 48 h após CLP. Os resultados demonstraram um aumento do infiltrado de neutrófilos no pulmão na 6ª h em todos os grupos avaliados. No entanto, os

animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} apresentam um infiltrado neutrofílico menor em relação aos WT sépticos. Na 24^a h após a CLP, o infiltrado de neutrófilos estava reduzido a níveis basais nos animais deficientes, porém o infiltrado permaneceu aumentado nos animais WT sépticos. Não foi observado aumento do infiltrado neutrofílico pulmonar em nenhum dos grupos avaliados na 48^a h após a CLP (figura 4C). Sugerimos assim que os receptores de TNF, principalmente TNFR1, estejam envolvidos com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica durante a sepse.

Figura 4: Os receptores de TNF s3o importantes para inflama33o sist3mica durante a sepse grave. Os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos 3 sepse grave induzido por CLP e tratatdos com suporte b3sico. Ap3s 24 horas, os mesmos foram eutanasiados e o sangue coletado para obten33o do soro. As citocinas foram dosadas por ELISA e os resultados expressos em pg/ml. (A) Concentra333es de IL-1 β no soro. (B) Concentra333es de IL-6 no soro. (C) Ap3s 6, 24 e 48h da CLP, o tecido pulmonar foi coletado para o ensaio de mieloperoxidase (MPO), utilizado como m3todo indireto para avaliar o infiltrado neutrofilico. Os resultados s3o expressos como n3mero de neutr3filos infiltrados no pulm3o x 10³/mg tecido. *p<0,05 comparado entre animais WT e deficientes para os receptores de TNF.

4.5. OS RECEPTORES DE TNF SÃO IMPORTANTES PARA LESÃO DE ÓRGÃOS E TECIDOS DURANTE A SEPSE INDUZIDA POR CLP

Durante a sepse, a reposta inflamatória sistêmica gerada pode lesar muitos órgãos e tecidos distantes do foco infeccioso, sendo os principais órgãos acometidos: pulmão, rim, coração e fígado (Bone et al., 1997). Para avaliar a participação dos receptores de TNF na lesão tecidual e na disfunção orgânica durante a sepse grave, animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepse induzida por CLP e tratados com um suporte básico. Ao final dos tempos determinados (6, 24, 48 e 72 h), os animais foram eutanasiados para coleta do sangue e obtenção do soro. Marcadores clássicos foram utilizados para avaliar diretamente ou indiretamente o grau de lesão nos órgãos, frequentemente acometidos durante a sepse grave. A atividade da enzima creatinoquinase (Ck-MB) foi avaliada no soro para estimar o grau de lesão cardíaca. Não observamos em nenhum dos tempos avaliados o aumento da atividade desta enzima em ambos os grupos de animais deficientes, porém nos animais WT sépticos a atividade da Ck-MB aumentou consideravelmente na 6^a h após a indução da sepse, restabelecendo valores basais nos demais tempos avaliados (figura 5A). O grau de lesão hepática foi avaliada através da atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST) no soro nos mesmos tempos referidos acima. Os animais WT sépticos apresentaram aumento progressivo a partir da 6^a h, com pico na 24^a h e queda na 48^a h, restabelecendo níveis basais na 72^a h após a CLP. Os animais deficientes para os receptores de TNF apresentaram um discreto aumento na 6^a e 24^o h, reduzindo a níveis basais na 48^o h após a CLP. Os animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} sépticos não apresentaram diferença entre si, apresentando respostas muito similares quanto ao grau de lesão hepática (figura 5B).,mk

Para avaliar indiretamente a lesão renal, realizamos a dosagem sérica de uréia (*BUN, Blood urea nitrogen*), um metabólito nitrogenado o qual é depurado pelos rins. Em uma lesão renal ocorrem falhas na depuração e, conseqüentemente, acúmulo deste metabólito na circulação, indicando a perda de função renal. Avaliamos as concentrações no soro de animais *naive* e sépticos (6, 24, 48 e 72 h). Observamos que na 6^a h após CLP ocorreu um aumento similar das concentrações de uréia em todos os grupos avaliados. Já na 24^a h após a CLP, os animais WT sépticos apresentaram concentração exacerbada de uréia, enquanto os grupos de animais deficientes apresentaram níveis normais deste metabólito sérico. Nos demais tempos avaliados as concentrações de uréia retomaram a normalidade em todos os grupos avaliados (figura 5C). Para avaliar o grau de lesão endotelial renal e pulmonar, realizamos a dosagem de endocan no soro, por ELISA. O endocan ou ESM-1 (*endothelial cell specific molecule-1*) é um proteoglicano sulfatado secretado por células endoteliais do rim e do alvéolo pulmonar e tem sua expressão aumentada pelo TNF durante a sepse grave, sendo sua dosagem utilizada para indicar lesões renais e pulmonares durante esta doença (Scherpereel et al, 2006). Na 6^o h após CLP não encontramos diferenças dos níveis de endocan no soro dos animais sépticos e *naive*. Já na 24^o h, as concentrações séricas estavam elevadas nos animais WT sépticos, ao passo que nos grupos de animais deficientes para os receptores de TNF os níveis permaneceram reduzidos. Neste parâmetro, todos os grupos experimentais apresentaram níveis basais na 48^a h após a CLP (figura 5D). Desta forma, sugerimos que a ativação dos receptores de TNF participa de modo direto ou indireto no desenvolvimento de lesões de órgãos durante a sepse, sendo que possivelmente o TNFR1 seja o principal receptor envolvido neste processo agudo, já que não encontramos diferença no grau de lesão nos diferentes órgãos avaliados entre animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} sépticos.

Figura 5. Os receptores de TNF são importantes para a lesão de órgãos e tecidos durante a sepse grave. Os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico. Durante a fase aguda da sepse, em tempos determinados (6, 24, 48 e 72 h) os animais foram eutanasiados e a coleta do soro foi realizada para respectivas análises. (A) Como marcador de lesão cardíaca foi utilizado o ensaio de atividade enzimática da Ck-MB, realizado pelo método Cinético de Imunoinibição-IFCC e os resultados expressos em U/l. (B) A atividade da asparto aminotransferase (AST) foi avaliada para verificar o grau de lesão hepática, pelo método Reitman e Frankel, os resultados foram expressos em U/l. (C) Dosagem de Uréia no soro foi utilizada para demonstrar a perda de função renal durante a sepse. Foi realizada por método Colorimétrico Urease-Labtest, os resultado são expresso em mg/dl. (D) A dosagem de Endocan, realizado por ELISA, foi utilizada para estimar o grau de lesão do endotélio alveolar/renal e os resultados são expressos em pg/ml. *p<0,05 comparado entre animais WT e deficientes para os receptores de TNF.

4.6. TNFR1 É IMPORTANTE PARA RESISTÊNCIA À INFECÇÃO SUBLETAL INDUZIDA POR *Legionella pneumophila*

O TNF é uma das primeiras citocinas inflamatórias liberadas para o controle de um processo infeccioso. Como o resultado anterior sugeriu, a ativação do TNFR1 é importante para o processo de lesão de tecidos durante uma resposta inflamatória sistêmica induzida por uma infecção polimicrobiana grave. Por outro lado, é conhecido que este receptor também é importante para uma atividade proinflamatória protetora (Pfeffer et al., 1993). Afim de comprovar a participação dos receptores de TNF em nosso modelo, investigamos a importância destes receptores durante a infecção causada por um única bactéria intracelular, *Legionella pneumophila*, a qual utilizamos posteriormente como modelo de infecção secundária. Para isso foi inoculado uma suspensão subletal desta bactéria (1×10^7) por via intranasal em animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} híbridos e avaliamos a sobrevivência por sete dias.

Como esperado, os animais WT não sucumbiram à infecção, porém os animais deficientes para os receptores de TNF apresentaram uma mortalidade de 50%, tanto aqueles TNFR1^{-/-} quanto os TNFR1/2^{-/-}. Sugerimos que provavelmente TNFR1 seja o receptor de TNF mais importante na proteção à infecção por *Legionella pneumophila*.

Figura 6. Animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} apresentam maior suscetibilidade a infecção subletal por *Legionella pneumophila*. A. Os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à infecção subletal com *L. pneumophila* (1×10^7 via intranasal). A sobrevivência foi avaliada por 7 dias. A sobrevivência foi significativamente diferente entre animais WT e deficientes, embora não houve diferença entre os animais TNFR1/2^{-/-} e TNFR1^{-/-}.

4.7. DICOTOMIA DA RELAÇÃO RESISTÊNCIA/SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO SECUNDÁRIA ENTRE ANIMAIS DEFICIENTES PARA OS RECEPTORES DE TNF SOBREVIVENTES À SEPSE

Como os dados da literatura e os resultados anteriores sugerem, o TNF é importante para o controle de infecções, porém quando o processo infeccioso torna-se sistêmico causando a sepse grave, esta citocina passa então a exercer um papel prejudicial no controle da infecção e no surgimento de lesões teciduais. Estes dados também sugerem que o TNFR1 seja o principal receptor de TNF envolvido com estes eventos. Desta forma, nosso próximo passo foi avaliar a importância dos receptores de TNF para imunossupressão desenvolvida nos animais sobreviventes à sepse. Para isso, os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico até o 4º dia. No 15º dia após da CLP, os animais sobreviventes e os hígidos (*naive*) foram submetidos à pneumonia subletal com através da inoculação com *L. pneumophila* (1 x 10⁷ via i.n). A sobrevida foi avaliada até o 7º dia e os resultados expressos em taxa (%) de sobrevida.

Como já demonstrado pelo nosso grupo, os animais WT *naive* infectados com *L. pneumophila* controlam a infecção e apresentam sobrevida de 100%, ao passo que os animais WT sobreviventes à sepse sucumbem à infecção e apresentam 100% de mortalidade até o 7º dia, evidenciando o estado de imunossupressão destes animais sobreviventes à sepse. Como também demonstrado na figura anterior, os animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} *naive* apresentaram uma suscetibilidade intrínseca à infecção com a *L. pneumophila* (50% sobrevida). Os animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse sucumbiram rapidamente à infecção secundária apresentando 100% de mortalidade até o 5º dia (figura 7A). Diferentemente, os animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse apresentaram maior resistência à infecção secundária (40% de sobrevida), em relação

aos WT sobrevivente à sepse (figura 7B). A taxa de sobrevivência frente à infecção secundária dos animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse foi similar ao seu respectivo grupo *naive*, sugerindo que possivelmente este grupo não desenvolva um estado de imunossupressão pós-sepse, ao contrário dos animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse. Os dados sugerem que diferentemente da fase aguda, os receptores de TNF tenham ações distintas na fase tardia após sepse e, que possivelmente a ativação de TNFR2 tenha um efeito prejudicial nesta fase.

Figura 7. Animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse são mais resistentes à infecção secundária por *L. pneumophila*, ao passo que os TNFR1^{-/-} apresentam maior susceptibilidade. Os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse grave e *naive* foram infectados com uma dose subletal de *L. pneumophila* (1×10^7 via i.n.) 15 dias após CLP (n=6). A sobrevivência foi avaliada de 12 h em 12 h por 7 dias e os resultados expressos em % sobrevivência. (A) Sobrevivência referente aos animais TNFR1^{-/-}. (B) Sobrevivência referente aos animais TNFR1/2^{-/-}. A taxa de sobrevivência foi significativamente diferente entre os grupos de animais sobreviventes à sepse avaliados. Os resultados correspondem a três experimentos independentes.

4.8. ANIMAIS TNFR1^{-/-} E TNFR1/2^{-/-} SOBREVIVENTES À SEPSE APRESENTAM DISTINTA CAPACIDADE DE CONTROLAR A INFECÇÃO SECUNDÁRIA

Os animais deficientes para os receptores de TNF apresentam similar capacidade de controlar a infecção local e sistêmica durante a fase aguda da sepse (figura 3). Anteriormente foi observado que animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse são mais suscetíveis à infecção secundária, ao passo que os animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse apresentaram resistência frente a tal infecção com relação ao WT (Figura 7). Com base nestes dados, fomos avaliar a capacidade dos animais deficientes para os receptores de TNF em controlar a infecção secundária causada por *L. pneumophila*. Para isso, os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} *naive* e sobreviventes à sepse (15 dias após CLP) foram infectados com dose subletal de *L. pneumophila* (1×10^7 via i.n.). Na 24^a h (figura 8A) ou 72^a h (figura 8B) após infecção com *L. pneumophila*, os grupos foram eutanasiados, o pulmão e o baço coletados para avaliação da carga bacteriana local e sistêmica, respectivamente.

Os órgãos foram macerados e semeados em ágar enriquecido para crescimento *L. pneumophilla* (Zamboni et al., 2006). Após 4 dias em estufa 37°C, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e os resultados expressos em Log de UFC/órgão. Os animais WT sobreviventes à sepse apresentaram comprometimento no controle local e sistêmico da infecção secundária, em relação ao grupo WT *naive* em ambos os tempos avaliados (figura 8). Os animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} *naive* possuem um comprometimento da capacidade de controlar a infecção por *L. pneumophila* quando comparados ao grupo WT *naive*, corroborando os resultados anteriores (figura 6).

Ainda, corroborando os dados encontrados na avaliação da sobrevida, a carga bacteriana local e sistêmica após a infecção secundária foi maior nos animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse quando comparada àquela encontrada nos animais WT sobreviventes à sepse, em ambos os tempos avaliados. Diferentemente, os animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse, apresentaram carga bacteriana local e sistêmica menor que os animais WT sobreviventes à sepse infectados. A carga bacteriana observada nos animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse foi comparável àquela encontrada no seu respectivo *naive* infectado. Estes resultados foram observados em ambos os tempos avaliados. A avaliação realizada na 24^a h após a infecção secundária (figura 8B) apresentou perfil similar aos resultados encontrados na 72^a h após a infecção secundária.

Corroborando os dados de sobrevida (figura 7), sugerimos que os receptores de TNF possam apresentar papéis antagônicos no controle da infecção secundária nos animais sobreviventes à sepse. Possivelmente, a ativação de TNFR2 seja prejudicial nesta fase tardia, ao passo que a ativação dos receptores TNFR1 possa auxiliar, de certa forma, o controle desta infecção secundária.

A 24 horas após infecção por *L. pneumophila*

B 72 horas após infecção por *L. pneumophila*

Figura 8. Animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse apresentam maior controle da infecção secundária, ao passo que os TNFR1^{-/-} apresentaram redução desta capacidade. No 15^a dia após CLP e tratamento com suporte básico, os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse e *naive* foram infectados com dose subletal com *L. pneumophila* (1 x 10⁷ via i.n.) e a carga bacteriana (Log UFC de *L. pneumophila*) foi avaliada no local (pulmão) e sistêmica (baço) 24 h (A) e 72 h (B) após inoculação. Os resultados são expressos como log de UFC/órgão (*p<0.05). Os resultados correspondem a somatória de dois a quatro experimentos independentes.

4.9. EXPANSÃO DE Tregs NA FASE AGUDA DA SEPSE INDEPENDE DOS RECEPTORES DE TNF

As células T reguladoras (Tregs) são fundamentais para homeostase do sistema imunológico, sendo capazes de suprimir a resposta de células T efetoras com potencial autorreativo ou não (Shevach et al., 2007). Durante a sepse ocorre intensa apoptose de linfócitos T porém, as Tregs são células mais resistentes à morte celular na fase aguda da sepse (Venet et al., 2004). Desta forma, os dados demonstram o aumento da frequência (número relativo) de Tregs durante a fase aguda da sepse experimental (Nascimento, et al. 2010). Assim, o próximo passo foi avaliar a participação dos receptores de TNF no aumento relativo de Tregs durante a fase aguda da sepse grave.

Para isso os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico até a 24^a h, neste mesmo tempo os animais foram eutanasiados para coleta das células do baço. A citometria de fluxo foi procedida para marcação de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, caracterizando Tregs. Os resultados demonstram que o aumento relativo da frequência de Tregs, encontrado na fase aguda da sepse, independe da ativação dos receptores de TNF pois, os três grupos de animais sépticos apresentaram aumento em relação aos seus respectivos controles *naive* (figura 9). Além disso, não observamos diferenças entre os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} sépticos.

Figura 9. Aumento relativo de Tregs na fase aguda da sepse independente da ativação dos receptores de TNF. Os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico por 24 horas (CLP_{1d}). Na 24^a h os animais foram eutanasiados para coleta e processamento das células do baço. A citometria de fluxo foi realizada e a porcentagem de células do baço que expressam os marcadores de Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) apresentadas em *Dot plot*. A frequência e o número absoluto de Tregs foram apresentados em colunas. Os resultados correspondem às médias ± EPM de 5 animais por grupo e são representativos de três experimentos independentes. *p < 0.05

4.10. OS RECEPTORES DE TNF PODEM REGULAR A EXPANSÃO DE Tregs NA FASE TARDIA APÓS A SEPSE

Nascimento e colaboradores (2010) demonstraram que animais sobreviventes à sepse grave apresentam aumento da frequência de Tregs, podendo este evento ser central no desenvolvimento da imunossupressão induzida pela sepse. Chen e colaboradores (2007) demonstram que, o TNF pode participar da expansão e do aumento da função supressora de Tregs via TNFR2. Desta forma, avaliamos a participação dos receptores de TNF na expansão de Tregs nos animais sobreviventes à sepse grave. Para isso, camundongos WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico até o 4º dia. Após 15 dias da indução da sepse grave, os animais sobreviventes foram eutanasiados e as células do baço coletadas para análise por citometria de fluxo. Descrevemos como Tregs as células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

Os animais WT sobreviventes à sepse apresentaram aumento de Tregs no baço 15 dias após CLP ($\pm 10\%$) em relação ao seu grupo *naive* ($\pm 5\%$). Os animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse apresentaram aumento da frequência de Tregs em relação ao seu *naive* ($\pm 14\%$ vs. 5% , respectivamente), porém este aumento ($\pm 14\%$) foi mais expressivo que o encontrado no grupo WT ($\pm 10\%$). Já aqueles animais TNFR1/2^{-/-} sobrevivente à sepse não apresentaram aumento de Tregs, assim como os demais grupos de animais sobreviventes, sendo sua frequência ($\pm 6\%$) similar ao seu respectivo grupo *naive* ($\pm 5\%$) (figura 10). Desta forma, os dados sugerem que os receptores de TNF possuem a capacidade de regular a expansão de Tregs na fase tardia após a sepse, sendo este efeito possivelmente dependente da ativação de TNFR2.

Figura 10. Os receptores de TNF podem modular a expansão de Tregs após a sepse grave. Os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico por 4 dias. Após 15 dias da CLP (CLP_{15d}), os animais foram eutanasiados para coleta do baço. A frequência e o número absoluto de células do baço que expressam os marcadores de Tregs (CD4⁺-CD25⁺Foxp3⁺) foram apresentadas em colunas e a porcentagem de Tregs em *Dot plots*. Os resultados correspondem às médias ± EPM de 5 animais por grupo e são representativos de três experimentos independentes. *p < 0.05 representa diferença entre animais *naive* e sobreviventes à sepse.

4.11. CITOCINAS IMUNORREGULADORAS NÃO ESTÃO AUMENTADAS EM ANIMAIS TNFR1/2^{-/-} SOBREVIVENTES À SEPSE

A IL-10 e o TGF- β são mediadores com potencial imunorregulador, sendo estas as principais citocinas produzidas pelas Tregs (Sheviac et al., 2009). Nosso grupo demonstrou que animais WT sobreviventes à sepsse apresentam aumento da citocinas imunorreguladoras no pulmão após a sepsse (Nascimento et al., 2010). Os resultados anteriores sugerem que os animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepsse são resistentes à infecção secundária, ao passo que os animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepsse são mais suscetíveis a tal infecção. Este fenômeno pode estar relacionado com a capacidade dos receptores de TNF de modular a expansão de Tregs após a sepsse.

Assim, avaliamos o perfil de IL-10 e TGF- β no pulmão dos animais deficientes para os receptores de TNF após a sepsse grave. Para isso os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepsse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico até o 4º dia. No 15º dia após a indução da sepsse, os animais foram eutanasiados e o tecido pulmonar coletado. Posteriormente, o tecido pulmonar foi macerado e o sobrenadante utilizado para realização de ELISA para IL-10 e TGF- β . Como esperado, houve aumento significativo destas citocinas no pulmão dos animais WT sobreviventes à sepsse (Figura 11). Nos animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepsse, encontramos aumento de TGF- β , mas não de IL-10 no tecido pulmonar, em relação ao seu respectivo grupo *naive*. Já os animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepsse não apresentaram aumento de nenhuma das citocinas analisadas, corroborando nossos dados anteriores.

Figura 11. As Concentrações de TGF-β e IL-10 não aumentam no tecido pulmonar de animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse. No 15º dia após a CLP e tratamento com suporte básico, os animais WT, TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} foram eutanasiados e o tecido pulmonar coletado para dosagem de citocinas relacionadas ao perfil regulador por ELISA. (A) Concentrações de IL-10 (pg/100mg de pulmão) 15 dias após CLP. (B) Concentrações de TGF-β (pg/100mg de pulmão) 15 dias após CLP. Os resultados correspondem às médias ± EPM de 5 animais por grupo e são representativos de dois experimentos independentes. *p < 0.05 representa diferença entre animais WT e deficientes para os receptores de TNF.

4.12. A SEPSE NÃO INDUZ REDUÇÃO DA CAPACIDADE PROLIFERATIVA DAS CÉLULAS T CD4⁺ NOS ANIMAIS TNFR1/2^{-/-}

Animais sobreviventes à sepse possuem comprometimento da proliferação das células T CD4⁺, dado este que vem ao encontro dos resultados que demonstram o aumento da frequência de Tregs nesta mesma fase (Nascimento et al., 2010). Como os resultados anteriores demonstraram, os animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse não apresentam aumento da frequência de Tregs na fase tardia. Desta forma, avaliamos a capacidade proliferativa das células T CD4⁺ nos animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse. Para isso utilizamos incorporação de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) como método para avaliar a capacidade proliferativa *in vivo* destas células frente ao desafio com *L. pneumophila*. Neste experimento os animais WT e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico até 4º dia. No 15º dia após a CLP os animais sobreviventes à sepse e *naive* foram submetidos a uma infecção pulmonar subletal com *L. pneumophila* (1 x 10⁷ i.n.). No 16º e 17º dia os animais receberam uma injeção diária via i.p. de BrdU (150mg/camundongo/injeção). No 18º dia após CLP os animais foram eutanasiados, as células do baço coletadas e marcação para realização do FACS.

As células T CD4⁺ que proliferaram em resposta à infecção por *L. pneumophila* apresentam marcação para 7-AAD e BrdU, ou seja, as células que proliferaram no baço são CD4⁺7-AAD⁺BrdU⁺, segundo tal protocolo. Uma média de 35% das células T CD4⁺ do baço dos animais WT proliferaram, três dias após a infecção com *L. pneumophila*, já os animais WT sobreviventes à sepse apresentam redução das células T CD4⁺ que proliferaram em resposta a mesma bactéria ($\pm 18\%$), confirmando os dados que demonstram o comprometimento da proliferação destas células após a sepse. Os animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse não apresentaram redução da capacidade

proliferativa das células T CD4⁺ ($\pm 17\%$) quando comparados ao seu grupo *naive* ($\pm 19\%$) (figura 12). Porém, os animais TNFR1/2^{-/-} *naive* apresentam um comprometimento intrínseco da proliferação destas células frente ao mesmo estímulo bacteriano. Estes resultados demonstram que a sepse não reduz a capacidade proliferativa de células T CD4⁺ nos animais TNFR1/2^{-/-}.

Figura 12. Animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse não apresentam redução da capacidade proliferativa de células T CD4⁺ em relação ao grupo *naive*. Os camundongos WT e TNFR1/2^{-/-} foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico. No 15º dia após a CLP, os animais WT e TNFR1/2^{-/-} foram infectados via i.n. com 1x10⁷ UFCs de *L. pneumophila*. Os camundongos receberam, no 16º e 17º dia, uma injeção diária via i.p. de BrdU (150mg/camundongo e por injeção). No 18º dia após a CLP, as células totais do baço foram marcadas como CD4⁺ 7-AAD⁺ e BrdU⁺ e avaliadas a expressão de 7-AAD⁺ e BrdU⁺ na população de células T CD4⁺ por citometria de fluxo. Os dados foram apresentados em *dot plot* e em coluna. Os resultados correspondem às médias de 5 animais por grupo. *p < 0.05 representa a diferença entre animais sépticos e *naive*.

4.13. AS Tregs APRESENTAM MAIOR DENSIDADE DE RECEPTORES DE TNF QUANDO COMPARADAS AS CÉLULAS T CONVENCIONAIS

Os receptores de TNF são distribuídos de forma diferente nos mais diversos órgãos e tecidos. O TNFR1 é expresso em todos os tipos celulares, ao passo que o TNFR2 é expresso principalmente em células hematopoéticas (Faustman e Davis, 2010). Assim, nosso objetivo foi avaliar a distribuição dos receptores de TNF na superfície das Tregs ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) em relação as demais células T $CD4^+$ ($CD4^+Foxp3^-$), as quais nos referimos com células T convencionais (Tconv). As células do baço de animais WT *naive* foram utilizadas para a marcação de TNFR1 e TNFR2 nas Tregs e Tconv, analisadas posteriormente por citometria de fluxo.

Foi observado que as Tregs apresentam maior densidade de TNFR1 (valor de MIF), cerca de quatro vez maior, em relação as células T convencionais (figura 13A). Com relação ao TNFR2, também foi observada uma maior expressão nas Tregs do que em células T convencionais (cerca de nove vezes maior) (figura 13 B). Estes dados demonstram que, as Tregs apresentam maior densidade de receptores de TNF do que as células T convencionais, sendo que esta diferença é intensificada com relação ao TNFR2, o qual apresentou uma relação de expressão Tregs/Tconv maior que o valor observado para o TNFR1.

Figura 13. As Tregs apresentam maior densidade de receptores de TNF do que Tconv. (A) Citometria de fluxo para análise da expressão de TNFR2 (MIF – Mediana da Intensidade de Fluorescência) em células T CD4⁺ WT. (B) Citometria de fluxo para análise da expressão de TNFR1 (MIF – Mediana da Intensidade de Fluorescência) em células T CD4⁺ WT. Os dados estão expressos em histograma e em coluna. Os resultados correspondem às médias de 5 animais por grupo e são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0.05$.

4.14. DURANTE A SEPSE OCORRE AUMENTO DOS RECEPTORES DE TNF NA MEMBRANA DAS Tregs

Os resultados anteriores sugerem que as Tregs possuem uma densidade maior de receptores de TNF do que células Tconv (figura 13). Chen et al. (2007) demonstraram o aumento da expressão de TNFR2 nas células T $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^-$, quando estimuladas com estímulos policlonais, sendo que o mesmo não foi observado com relação a expressão de TNFR1. Sendo assim, o próximo passo foi avaliar a expressão dos receptores de TNF, TNFR1 e TNFR2, na superfície de células Tregs e Tconv durante a fase aguda da sepse, fase na qual ocorre um aumento da concentrações séricas de TNF (figura 1A). Para isso, os animais WT foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico até a 24^o h. Neste tempo os animais foram eutanasiados, as células do baço coletadas e a marcação para o TNFR1 ou TNFR2 realizada nas células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ou $CD4^+Foxp3^-$ para análise por citometria de fluxo.

Durante a fase aguda da sepse observamos um discreto aumento, porém significativo, do MIF para TNFR1 apenas nas Tregs e não nas Tconv (figura 14A). Observamos também um aumento significativo da expressão de TNFR2 na membrana de Tregs 24 h após a sepse, sugerindo que as modificações nestas células já ocorram na fase aguda da sepse. Também de acordo com os valores de MIF, não encontramos diferença na expressão de TNFR2 na membrana de Tconv 24 h após a sepse, sugerindo que as alterações da expressão destes receptores ocorram principalmente nas Tregs (figura 14B).

Sugerimos que os receptores de TNF estejam envolvidos com a regulação da expansão de células Tregs após a sepse (figura 10) e, que na fase inicial da sepse ocorram modificações nestas células, quanto ao padrão de expressão destes receptores (figura 14). Com base nestes dados, fomos avaliar a expressão dos receptores de TNF após a sepse. Para isso, os animais WT foram submetidos à sepse induzida por CLP e tratados com suporte básico até 4º dia. No 15º dia após a CLP, os animais foram eutanasiados e as células do baço coletados para realização da citometria de fluxo. Para isso realizamos a marcação para TNFR1 ou TNFR2 em células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ou $CD4^+Foxp3^-$ (figura 15). Assim, como na fase aguda, os resultados mostraram aumento da densidade de TNFR1 apenas nas Tregs dos animais sobreviventes à sepse (figura 15A). Do mesmo modo, encontramos aumento da densidade de TNFR2 nas Tregs, mas não em Tconv 15 dias após a sepse (figura 15 B). Estes dados sugerem que o aumento da expressão dos receptores de TNF na membrana de Tregs possa ocorrer na fase aguda e permanecer até uma fase tardia, correlacionando este evento a uma possível regulação da expansão destas células na fase tardia após a sepse.

Figura 14. Densidade de receptores de TNF aumenta nas Tregs na fase aguda da sepse. Células do baço de animais WT submetidos à sepse foram coletadas 24 horas após CLP e suporte básico. Citometria de fluxo foi procedida para analisar o MIF de TNFR1 (A) ou de TNFR2 (B) nas Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) e Tconv (CD4⁺Foxp3⁻). Os dados representando os valores de MIF foram apresentados em histograma e em coluna. Os resultados correspondem às médias de 5 animais por grupo e são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ representa diferença entre os grupos séptico e *naive*.

Figura 15. Aumento da densidade dos receptores de TNF nas Tregs induzido pela sepse permanece após a resolução da infecção. Células do baço de animais WT sobreviventes a fase aguda da sepse foram coletadas 15 dias após CLP e tratamento com suporte básico. Citometria de fluxo foi procedida para a análise do MIF de TNFR1 (A) ou de TNFR2 (B) em Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) e Tconv (CD4⁺Foxp3⁻). Os dados foram expressos em histograma e em coluna representando os valores de MIF. Os resultados correspondem às médias de 5 animais por grupo e são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, representa a diferença entre os grupos de animais sobreviventes à sepse e *naive*.

4.15. A DENSIDADE DE TNFR2 NÃO É MAIOR NAS Tregs TNFR1^{-/-}

Como demonstrado anteriormente, as células Tregs possuem densidade maior de TNFR2 do que as células T convencionais e, possivelmente, tal receptor está envolvido com a regulação positiva da expansão destas células. Demonstramos também que, os animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse apresentam uma maior frequência de Tregs no baço que a encontrada nos animais WT. Uma das hipóteses seria que, esses animais poderiam apresentar maior expressão de TNFR2 na membrana, como defeito intrínseco devido a deficiência do TNFR1. Neste caso, com maior densidade de TNFR2, estas células apresentariam maior capacidade proliferativa.

Para testar nossa hipótese, realizamos citometria de fluxo para marcação de TNFR2 nas Tregs dos animais WT e TNFR1^{-/-} e observamos que as Tregs dos animais TNFR1^{-/-} não apresentaram maior densidade destes receptores, apresentando valores de MIF similares aos encontrados nas células oriundas de animais WT (figura 16). Desta forma, sugerimos que o aumento da frequência de Tregs nos animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse não ocorre por um possível aumento da expressão de TNFR2 nas Tregs destes animais.

Figura 16. Tregs TNFR1^{-/-} não apresentam maior densidade de TNFR2. As Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) oriundas do baço de animais WT e TNFR1^{-/-} foram analisadas quanto a expressão de TNFR2. A citometria de fluxo foi realizada para análise da MIF de TNFR2 nas Tregs. Os dados estão expressos em histograma e em coluna. Os resultados correspondem às médias $\pm$ EPM de 5 animais por grupo e são representativos de três experimentos independentes.

4.16. DURANTE A SEPSE NÃO OCORRE AUMENTO DA FREQUÊNCIA DE Tregs TNFR1⁺

Os resultados anteriores demonstram que as Tregs possuem maior densidade de TNFR1 do que as demais células T CD4⁺ e, que durante a sepse ocorre o aumento permanente de TNFR1 na membrana de Tregs. Deste modo, investigamos se durante a sepse também ocorre o aumento da frequência de Tregs TNFR1⁺. Os animais WT foram submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico por 24 horas. Ao final da 24^a h, os animais foram eutanasiados e as células do baço coletadas para avaliar a frequência de células CD4⁺CD25⁺TNFR1⁺Foxp3⁺ por citometria de fluxo. O mesmo procedimento foi realizado 15 dias após a sepse, com os animais sobreviventes à sepse. Para isso inicialmente selecionamos uma população de células CD4⁺Foxp3⁺ e a partir desta, analisamos a frequência de células CD25⁺TNFR1⁺.

Não encontramos diferenças significativas entre o grupo de animais *naïve* e sépticos (figura 17), o mesmo foi observado, 15 dias após a sepse, durante a fase tardia após a sepse (figura 18). Demonstramos que durante e após a sepse não ocorre aumento relativo da frequência de Tregs TNFR1⁺.

Figura 17. Frequência relativa de Tregs TNFR1⁺ na fase aguda da sepse. Na 24^a h após CLP e tratamento com suporte básico, os animais WT foram eutanasiados e o baço coletado. As células do baço foram analisadas por citometria de fluxo. Inicialmente uma *gate* (CD4⁺Foxp3⁺) foi selecionada e analisada quanto à frequência de células CD25⁺TNFR1⁺. Os resultados foram expressos em *Dot plots* e colunas com a % de células CD4⁺ CD25⁺TNFR1⁺Foxp3⁺. Os resultados correspondem às médias $\pm$ EPM de 5 animais por grupo e são representativos de três experimentos independentes.

Figura 18. Frequência relativa de Tregs TNFR1⁺ na fase tardia após a sepse. No 15º dia após CLP e tratamento com suporte básico os animais WT foram eutanasiados e o baço coletado. As células do baço foram analisadas por citometria de fluxo. Inicialmente uma *gate* (CD4⁺Foxp3⁺) foi selecionada e analisada quanto à frequência de células CD25⁺TNFR1⁺. Os resultados foram expressos em *Dot plots* e colunas com a % de células CD4⁺ CD25⁺TNFR1⁺Foxp3⁺. Os resultados correspondem às médias $\pm$ EPM de 5 animais por grupo e são representativos de três experimentos independentes.

4.17. DURANTE A SEPSE OCORRE AUMENTO DA FREQUÊNCIA DE Tregs TNFR2⁺

Na fase aguda da sepse ocorre um aumento relativo da frequência de Tregs de modo independente de TNF (figura 9). A expansão de Tregs após a sepse parece ser dependente de TNFR2 (figura 10). No entanto, já na fase aguda da sepse ocorre o aumento da expressão deste receptor nas Tregs, fenômeno este que permanece tardiamente (figura 14B e 15A).

Avaliamos então, a frequência de Tregs que expressam TNFR2 na membrana durante a fase aguda da sepse. Para isso os animais WT e TNFR1^{-/-} foram submetidos à sepse grave e tratados com suporte básico. Após 24 h da CLP, os animais foram eutanasiados e as células do baço coletadas para citometria de fluxo. Inicialmente construímos uma *gate* para demarcação de células CD4⁺Foxp3⁺ e, posteriormente, dentro desta população celular analisamos a frequência de células CD25⁺TNFR2⁺, sendo que os resultados mostram a frequência de células CD4⁺CD25⁺TNFR2⁺Foxp3⁺. Observamos que ocorre um aumento da frequência relativa de Tregs TNFR2⁺ na fase aguda da sepse, tanto nos animais WT séptico quanto nos animais TNFR1^{-/-} sépticos (aumento aproximado de 10%) em relação aos seus respectivos controles *naive*. Porém, os animais TNFR1^{-/-} *naive* apresentaram uma maior frequência de Tregs TNFR2⁺ em relação aos animais WT *naive* (figura 19).

Também avaliamos a frequência destas mesmas células após a sepse. Para isso os animais WT e TNFR1^{-/-} foram submetidos à sepse grave. No 15º dia após CLP e tratamento com suporte básico, os animais sobreviventes foram eutanasiados e as células do baço coletadas para citometria de fluxo. O procedimento foi o mesmo utilizado no experimento anterior. Assim, como observamos anteriormente, os animais

TNFR1^{-/-} *naive* apresentaram maior frequência de Tregs TNFR2⁺ em relação ao WT, embora ambos os animais apresentassem aumento da frequência de Tregs TNFR2⁺ após a sepse (figura 20).

Deste modo, demonstramos que além do aumento da densidade de TNFR2 nas Tregs, também ocorre o aumento da frequência de Tregs que expressam TNFR2, tanto na fase aguda da sepse quanto na fase tardia após a sepse.

Figura 19. Aumento da frequência relativa de Tregs TNFR2⁺ na fase aguda da sepse. Após 24 horas da CLP e tratamento com suporte básico, as células do baço dos animais WT e TNFR1^{-/-} foram analisadas quanto à frequência de Tregs TNFR2⁺. Citometria de fluxo foi realizada, sendo uma *gate* CD4⁺Foxp3⁺ selecionada previamente e analisada quanto à frequência de células CD25⁺TNFR2⁺. Os resultados foram expressos em *Dot plots* e colunas com a % de células CD4⁺CD25⁺TNFR2⁺Foxp3⁺. Os resultados correspondem às médias $\pm$ EPM de 5 animais por grupo e são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ representa diferença entre os grupos *naive* e sépticos.

Figura 20. Aumento da frequência relativa de Tregs TNFR2⁺ após a sepse. Após 15 dias da CLP e tratamento com suporte básico, as células do baço dos animais WT e TNFR1^{-/-} foram analisadas quanto à frequência de Tregs TNFR2⁺. Citometria de fluxo foi realizada, sendo que uma *gate* CD4⁺Foxp3⁺ foi selecionada previamente e analisada quanto à frequência de células CD25⁺TNFR2⁺. Os resultados foram apresentados em *Dot plots* e colunas com a % de células CD4⁺CD25⁺TNFR2⁺Foxp3⁺. Os resultados correspondem às médias $\pm$ EPM de 5 animais por grupo e são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ representa a diferença entre grupos *naive* e sobreviventes à sepse.

4.18. TNF INDUZ EXPANSÃO DE Tregs *in vitro*

Os experimentos anteriores demonstraram *in vivo*, em animais sobreviventes à sepse, que a expansão de Tregs envolve a participação dos receptores de TNF. Os resultados sugerem que a ativação de TNFR2 está envolvida na expansão tardia de Tregs nestes animais.

Com base nestes resultados, realizamos este experimento *in vitro* para comprovar a capacidade deste mediador proinflamatório clássico em expandir Tregs. Para isso, as células T CD4⁺ totais foram isolados do baço de animais WT e TNFR1/2^{-/-}. Todas as células foram cultivadas em placas de 96 poços (100 mil células/poço) com estímulos policlonais (anti-CD3 e anti-CD28) por 4 dias a 37°C a 5% CO₂. Os seguintes estímulos foram realizados: apenas meio de cultura como controle; IL-2 (10ng/mL), como agente proliferativo; IL-2(10ng/mL) e TGF-β(30ng/mL), como controle positivo para diferenciação de Tregs; IL-2(10ng/mL) e TNF (10ng/mL), ou IL-2 (10ng/mL), TNF (10ng/mL) e TGF-β(20ng/mL), estes dois últimos como estímulos testes. Posteriormente realizamos a citometria de fluxo para marcação de células CD4⁺Foxp3⁺.

Estes resultados demonstram que, as células T CD4⁺ WT ou TNFR1/2^{-/-} (figura 21) apresentaram capacidade de diferenciação em células Tregs, pois o estímulo com IL-2 e TGF-β induziu o aumento de células FoxP3⁺. Quando as células T CD4⁺ WT foram estimuladas com IL-2 e TNF apresentaram aumento de frequência de células FoxP3⁺ (22%), no entanto as células CD4⁺TNFR1/2^{-/-} estimuladas com IL-2 e TNF não apresentaram o mesmo efeito (8,8%), sugerindo que o TNF é importante para o aumento de células T CD4⁺FoxP3⁺. As células CD4⁺ (WT e TNFR1/2^{-/-}) também foram estimuladas com IL-2, TGF-β e TNF, porém nenhum efeito sinérgico foi observado.

Assim, o próximo passo foi investigar se o TNF está envolvido com a proliferação de Tregs. Para isso as células T $CD4^+$ foram cultivadas com meio (RPMI), ou IL-2, ou IL-2 e TNF. Todos os poços foram acrescido de BrdU (1mM), anti-CD3 e anti-CD28. Foi observado que cerca de 14% das células $CD4^+$ que proliferaram são $Foxp3^+$, ao passo que quando acrescido de TNF este valor aumentou para 21%.

Corroborando os dados da literatura, podemos também sugerir que, o TNF é um importante estímulo para a proliferação de Tregs, induzindo o aumento de células T $CD4^+FoxP3^+$. Embora ainda não saibamos se o TNF é capaz de induzir também a diferenciação destas células.

Figura 21. O TNF leva ao aumento de células CD4⁺Foxp3⁺ *in vitro*. Células do baço de animais WT e TNFR1/2^{-/-} foram utilizadas para a separação de células CD4⁺ por MACS. As células CD4⁺ foram cultivadas em placas de 96 poços (fundo chato) com estímulos policlonais de anti-CD3(4μg/ml, BD) e anti-CD28 (1μg/ml, BD) por 4 dias a 37°C a 5% CO₂. RPMI completo (meio), IL-2 (10ng/mL), IL-2 (10ng/ml) e TGF-β (30ng/mL), IL-2 (10ng/ml) e TNF (10ng/mL), IL-2 (10ng/ml), TGF-β (10ng/ml) e TNF (10ng/ml). Resultados representativo de dois experimentos independentes.

Figura 22. Células $CD4^+Foxp3^+$ proliferam após estímulo com TNF. Células do baço de animais foram utilizadas para a separação de células $CD4^+$ por MACS. As células $CD4^+$ foram cultivadas com BrdU (1mM) em placas de 96 poços (fundo chato) com estímulos policlonais de anti-CD3(4 μ g/ml, BD) e anti-CD28 (1 μ g/ml, BD) por 4 dias a 37°C a 5% CO₂. RPMI completo (meio), IL-2 (10ng/mL), IL-2 (10ng/ml) e TNF (10ng/mL).

5. DISCUSSÃO

O TNF foi identificado originalmente devido a sua capacidade de causar necrose em células tumorais e caquexia durante infecções (Craswell et al., 1975; Tracey et al., 1988). Hoje, o TNF é considerado a citocina protótipo para os demais mediadores proinflamatórios, pois apresenta diversas funções bem caracterizadas durante a resposta inflamatória, mesmo em baixas concentrações, como a indução de moléculas de adesão, quimiocinas e outras citocinas, importantes para o recrutamento de fagócitos para o foco da inflamação. Além de induzir a liberação de outros mediadores, o TNF também é capaz de ativar fagócitos, potencializando seus mecanismos microbicidas, essenciais para a morte do patógeno e, conseqüentemente, para a resolução da infecção (Tracey and Cerami, 1993; Kaufman, 1994; Abbas et al., 2010).

Com o objetivo elucidar a participação dos receptores de TNF durante a fase aguda da sepse, utilizamos o modelo de CLP letal associada a um suporte básico, constituído de reposição hídrica e antibioticoterapia, o qual garante uma maior sobrevivência para os animais WT. Todos os animais submetidos à sepse grave induzida por CLP e tratados com um suporte básico apresentaram aumento significativo das concentrações de TNF no soro, nas primeiras 24 h após a CLP. No entanto, os animais TNFR1/2^{-/-} sépticos apresentaram concentrações exacerbadas de TNF, sugerindo que estes animais possam apresentar alguma falha na regulação das concentrações desta citocina, possivelmente pela ausência dos receptores solúveis, importantes para neutralização do TNF (Kieszko et al., 2007). Assim como observado, Peschon e colaboradores (1998) demonstraram que a deficiência de ambos os receptores de TNF era responsável pela exacerbação das concentrações sistêmicas de TNF após a indução da endotoxemia.

Altas concentrações sistêmicas de TNF, levam a uma participação endócrina desta citocina, a qual é prejudicial para diversos órgãos. Este evento é bem relatado em doenças nas quais ocorre a síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), como a sepse (Tracey et al., 1987; McMasters et al., 1994). Nos quadros de SIRS que decorrem da ausência de infecções, como politraumatismo, pancreatite, queimaduras de grande extensão, fica evidente que o TNF desempenha um papel prejudicial, pois este mediador é capaz de potencializar a inflamação e, conseqüentemente, promover a lesão de diversos órgãos e tecidos, levando a um quadro conhecido como a síndrome da falência múltipla de órgãos (MODS) (Tracey and Cerami, 1994). Porém, durante a sepse, que por definição é uma SIRS decorrente de uma infecção, as funções do TNF são duais e contraditórias, pois se por um lado o TNF está envolvido na lesão de órgãos, o mesmo é importante para o desenvolvimento de uma resposta imune para o controle do processo infeccioso (Tracey and Cerami, 1994). Desta forma, qual seria o papel do TNF no resultado geral no desenvolvimento e progressão da sepse? Prejudicial ou protetor?

Tendo em vista o papel prejudicial do TNF no desenvolvimento da SIRS e MODS, diversos estudos clínicos foram realizados durante a década de 90, utilizando anticorpos neutralizantes ou receptores solúveis para bloqueio desta citocina. Infelizmente, alguns estudos clínicos demonstraram baixa ou nenhuma eficiência (Abraham et al., 1997), ao passo que outros demonstraram aumento da mortalidade após bloqueio de TNF (Fisher et al., 1996). Algumas explicações foram dadas para o insucesso da terapia com anti-TNF, apontando principalmente a falta de critério para a seleção dos pacientes nestes estudos, como a seleção pela idade, características genéticas, tempo de doença e pelo tipo de infecção (Reinhart and Karzai, 2001). Uma outra possível explicação para o insucesso clínico da terapia anti-TNF na sepse seria o fato que esta citocina é principalmente liberada na fase aguda da sepse, exercendo suas

funções rapidamente e retornando aos níveis basais posteriormente (Van Zee et al., 1992). De fato, diferentemente do ocorrido com os estudos clínicos, o tratamento de babuínos com anticorpos anti-TNF foi eficiente em reduzir as disfunções orgânicas e aumentar a sobrevivência dos animais quando administrado 30 minutos após o início da indução de sepse experimental por injeção intravenosa de *E. coli* (Hinshaw et al., 1990). Além disso, Secher e colaboradores (2009) demonstraram que animais TNFR1/2^{-/-} apresentam um aumento da sobrevivência após a sepse induzida pela inoculação bacteriana. Ainda, surpreendentemente, os animais deficientes para os receptores de TNF apresentaram aumento considerável do controle do crescimento bacteriano e da migração de neutrófilos para o foco infeccioso, funções estas classicamente executadas pelo mesmo mediador. Então, qual seria a explicação para este evento paradoxal? Na sepse ocorre um rápido e momentâneo aumento de TNF na circulação levando a dessensibilização de receptores quimiotáticos, como CXCR2, o qual está associado à redução da migração de fagócitos circulantes para o foco infeccioso, mesmo frente a estímulos quimiotáticos, fenômeno este revertido nos animais deficientes para os receptores de TNF (Secher et al., 2009). Assim, segundo Tracey e Cerami (1992), os efeitos sistêmicos prejudiciais do TNF sobrepõem suas ações inflamatórias protetoras locais durante a sepse, sendo a ausência da atividade deste mediador protegeu os animais infectados da disseminação bacteriana e, conseqüentemente, da inflamação sistêmica (Tracey and Cerami, 1992; Secher et al., 2009).

Embora a participação dos receptores de TNF na sepse induzida pela inoculação bacteriana tenha sido investigada, ainda não está claro a participação individual de cada receptor de TNF durante a fase aguda da sepse. Secher e colaboradores (2009) observaram que animais TNF^{-/-} ou TNFR1^{-/-} apresentaram sobrevivência de 70% a 80% após uma inoculação bacteriana letal (100% de mortalidade dos animais WT), ao passo

que os animais TNFR1/2^{-/-} apresentaram sobrevida de 100%. Os autores sugeriram que exista uma cooperação entre ambos os receptores de TNF na fisiopatologia da sepse aguda, sem esclarecer como este evento poderia ocorrer e qual a razão para as diferentes respostas entre os animais TNF^{-/-} e os TNFR1/2^{-/-}. Peschon e colaboradores (1998) demonstraram que os receptores de TNF possuem funções distintas durante uma resposta inflamatória. Antes deste estudo, era sugerido que a ativação de TNFR1 era a principal responsável pelos efeitos proinflamatórios de TNF e que a atividade de TNFR2 era apenas complementar (Ostade et al., 1993; Tartaglia et al., 1993; Barbara et al., 1994). A atividade de TNFR2 era restrita somente à proliferação de timócitos e à ativação linfocitária (Erickson et al., 1994). No entanto, posteriormente, Peschon e colaboradores (1998) demonstraram que animais TNFR1^{-/-} são suscetíveis à infecção por *Listeria monocytogenes*, ao passo que animais TNFR2^{-/-} são igualmente resistentes como os animais WT. Diferentemente, os animais TNFR1^{-/-} apresentam menor sensibilidade a endotoxemia, já os animais TNFR2^{-/-} apresentam maior sensibilidade a endotoxina. Desta forma, foi sugerido que o TNFR1 é importante para proteção contra bactérias intracelulares, ao passo que TNFR2 poderia modular negativamente uma resposta inflamatória sistêmica (Peschon et al., 1998).

A avaliação da sobrevida dos animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} submetidos a sepse grave induzida por CLP e tratados com suporte básico, mostrou que ambos os grupos de animais deficientes apresentaram uma sobrevida cerca de 25% maior em relação ao WT. Porém, não houve diferença na sobrevida entre os animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-}, os quais apresentaram sobrevida de aproximadamente 70%. Para complementar os dados de sobrevida, o escore clínico foi avaliado, baseado nas alterações dos parâmetros clínicos apresentadas durante o quadro séptico. Novamente, os animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} apresentaram melhor resposta em relação ao WT, embora não tenha sido

observada nenhuma diferença entre os animais deficientes. Posteriormente, demonstramos que os animais deficientes para os receptores de TNF apresentam maior capacidade de controlar o processo infeccioso local e sistêmico durante a fase aguda da sepse. No início da infecção (6 h), os animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} igualmente apresentaram maior controle da infecção local, o que refletiu no maior controle da infecção sistêmica nos tempos avaliados posteriormente. Como bem descrito pelo nosso grupo, a rápida migração de neutrófilos para o foco infeccioso é um processo chave para o controle da infecção e, conseqüentemente, para o prognóstico da sepse (Rios-Santos et al., 2007; Alves-Filho et al, 2008). De modo geral, os animais deficientes para os receptores de TNF apresentaram maior recrutamento de neutrófilos para o local da infecção em relação ao WT, embora os animais TNFR1/2^{-/-} sépticos tenham apresentado maior recrutamento de neutrófilos quando comparados aos animais TNFR1^{-/-} sépticos. Apesar dos animais deficientes para os receptores de TNF apresentarem diferentes perfis de migração de neutrófilos para o foco infeccioso no início da sepse, esta diferença não alterou os resultados encontrados na carga bacteriana, sugerindo que possivelmente a migração de neutrófilos observada nos animais TNFR1^{-/-} foi suficiente para eficiência do controle da infecção durante a sepse. Assim, sugerimos que embora o TNFR2 juntamente com TNFR1 possa participar da regulação da migração de neutrófilos, os efeitos desencadados pelo TNFR1 parecem ser mais relevantes para o deficit do controle da infecção.

Os receptores de TNF são importantes para a produção de citocinas próinflamatórias sistêmicas e para lesão orgânica decorrente da sepse grave (Tracey and Cerami, 1994). Inicialmente observamos que animais deficientes para os receptores de TNF não apresentaram aumento das concentrações de IL-6 e IL-1 β na 24^o h após CLP. Os resultados dos marcadores de lesão e função orgânica sugeriram que os animais

TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} apresentam proteção cardíaca, hepática, pulmonar e renal durante a fase aguda da sepse em relação aos animais WT. Os animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} sépticos não apresentaram diferenças entre si quanto a produção sistêmica de citocinas inflamatórias e de marcadores de lesão e função orgânica, sugerindo assim, que a ativação do TNFR1 seja importante para a produção sistêmica de citocinas proinflamatórias e para a lesão tecidual. De modo geral, os nossos resultados sugerem que o TNFR1 possivelmente seja o principal responsável pelas ações prejudiciais do TNF durante a fase aguda da sepse. Corroborando os nossos dados, Welborn e colaboradores (1996) demonstraram através da inoculação de proteínas mutantes ligantes de TNFR1 ou de TNFR2, que eventos desencadeados pelo TNF, como o choque, a inflamação e a necrose também eram desencadeados pela inoculação de proteínas ligantes de TNFR1, ao passo que a inoculação de proteínas ligantes de TNFR2 não foi capaz de promover tais eventos. Além disso, outros trabalhos sugerem que o principal receptor de TNF responsável pelas respostas agudas do processo inflamatório seja o TNFR1 (Pfeffer et al., 1993; Welborn et al., 1996; Peschon et al., 1998).

Os receptores de TNF são diferentemente distribuídos no organismo, sendo que o TNFR1 apresenta distribuição ubiquitária, ao passo que o TNFR2 é expresso principalmente em leucócitos. Também é estabelecido que ambos os receptores de TNF ativam vias proinflamatórias, no entanto, cada um deles ativam outras vias de sinalização particulares, sendo o TNFR1 envolvido com vias de morte celular e o TNFR2 ligado a vias de proliferação e sobrevivência (Faustam and Davis, 2010). Nossos resultados confirmam e complementam a literatura sobre a participação dos receptores de TNF na fase aguda da sepse, assim com Secher e colaboradores (2009), demonstramos o papel destes receptores na fase aguda da sepse e nos surpreendemos com baixa relevância da participação do TNFR2 desenvolvimento da inflamação

sistêmica, já que este receptor é majoritariamente expresso em leucócitos, os quais são fundamentais para o controle da infecção e para gênese da inflamação. Assim, inferimos que o TNFR1 por apresentar uma distribuição ampla e a ligação com vias de morte celular, poderia ser o principal receptor de TNF responsável pela inflamação sistêmica e lesões orgânicas decorrente da sepse.

Posteriormente avaliamos a participação dos receptores de TNF na infecção subletal (100% sobrevida no animal WT) monobacteriana, induzida pela bactéria intracelular *Legionella pneumophila*. Observamos que tanto os animais TNFR1^{-/-} quanto os TNFR1/2^{-/-} infectados com *L. pneumophila* apresentaram sobrevida de cerca de 50%, demonstrando possível suscetibilidade intrínseca destes animais à infecção por esta bactéria intracelular. Conhecida a importância de TNF na proteção contra diversos micro-organismos intra ou extracelulares (Rhotte et al., 1993; Fujita et al. 2008), a maior suscetibilidade dos animais deficientes para os receptores de TNF infectados com *L. pneumophila* não é surpreendente. Porém, não encontramos diferença na sobrevida e na carga bacteriana entre ambos os animais deficientes, sugerindo que TNFR1 seja o principal receptor de TNF envolvido com o processo inflamatório protetor contra *L. pneumophila*.

Desta forma, o TNFR1 representa o principal receptor de TNF envolvido com as respostas inflamatórias agudas, mediando a proteção em infecções locais, bem como lesões nas infecções sistêmicas. Por outro lado, assim como demonstrado por outros trabalhos, o TNFR2 parece não estar diretamente envolvido com estes eventos (Pfeffer et al., 1993; Burres et al., 1996; Peschon et al., 1998; Kim et al., 2006). Muitos dados da literatura demonstram a participação dos receptores de TNF na fase aguda da sepse, corroborando os nossos resultados anteriores. No entanto, não existem relatos que demonstrem a participação destes receptores no desenvolvimento da imunossupressão

induzida pela sepse. Desta forma, investigamos a participação destes receptores em uma fase tardia após a sepse. Nesta fase, os animais sobreviventes à sepse não apresentam mais resquícios da infecção primária, porém são mais suscetíveis à uma infecção oportunista ou ao desenvolvimento tumores (Venet et al., 2008; Cavassani et al., 2010; Nascimento et al., 2010). O estado de imunossupressão dos animais na fase tardia após a sepse foi avaliado por meio de um modelo de infecção secundária, que consiste em uma pneumonia subletal, a qual não causa mortalidade em animais WT hígidos, porém é capaz induzir mortalidade de 100% em animais WT sobreviventes à sepse (Nascimento et al., 2010). A gravidade da fase aguda da sepse está direta e proporcionalmente relacionada ao desenvolvimento da imunossupressão, uma vez que um estímulo infeccioso subletal não é capaz de desencadear uma imunossupressão tardia (Nascimento et al. 2010).

Os animais TNFR1^{-/-} e TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse foram infectados com uma baixa dose de *L. pneumophila*. Observamos que os animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse apresentaram 100% de mortalidade no 5º dia após a infecção secundária, sucumbindo antes que animais WT (mortalidade 100% no 7º dia), embora ambos os grupos mantivessem uma relação inversa durante a fase aguda da sepse. Corroborando a sobrevida, a avaliação da carga bacteriana mostrou que os animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse apresentaram maiores quantidades de UFC de *L. pneumophila* tanto local quanto sistêmica, em relação àquelas observadas nos grupos TNFR1^{-/-} *naive* e WT sobreviventes à sepse infectados, demonstrando que estes animais apresentaram maior suscetibilidade à infecção secundária.

Embora os animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse apresentassem maior suscetibilidade à infecção secundária, o mesmo não ocorreu com os animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse. Os animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse quando infectados

com *L. pneumophila* apresentaram uma sobrevida de cerca de 40% até o 7º dia após a infecção, sobrevida esta similar à encontrada nos animais TNFR1/2^{-/-} *naive* infectados *L. pneumophila*. Do mesmo modo, animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse não apresentaram aumento da carga bacteriana quando comparados ao seu respectivo grupo *naive* infectado. Desta forma, os animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse não desenvolvam um estado de imunossupressão pós-sepse. Assim, procuramos investigar quais mecanismos poderiam contribuir com esta relação dicotômica de resistência/suceptibilidade à infecção secundária entre os animais deficientes para os receptores de TNF.

Nosso grupo demonstrou que a expansão de Tregs é um evento central no desenvolvimento da imunossupressão pós-sepse e, conseqüentemente, para a suscetibilidade à infecções secundárias (Nascimento et al., 2010). A expansão de Tregs ocorre nos dias subsequentes a recuperação da sepse, com aumento detectável no 15º dia após a sepse. Uma vez que estas células são depletadas, os animais sobreviventes à sepse são capazes de recuperar a homeostasia do sistema imune e controlar a infecção secundária. Nos últimos anos, o grupo do Prof. Oppenheim vêm demonstrando a capacidade do TNF, juntamente com a IL-2, de ativar Tregs resultando em proliferação, aumento da expressão de FoxP3, aumento da atividade supressora e estabilização do fenótipo de Tregs em um ambiente inflamatório. Estes trabalhos demonstram que o principal receptor de TNF expresso nas Tregs humanas e murinas é o TNFR2, o qual é encontrado em cerca de 40% das Tregs e esta associado com uma maior atividade supressora destas células (Chen et al., 2007; Chen e Oppenheim, 2010; Chen et al., 2013).

Também foi demonstrado que os efeitos imunorreguladores de TNF dependem do estímulo prolongado desta citocina sob as Tregs TNFR2⁺ (Chen et al, 2007). Durante

a sepse, ocorre intensa liberação sistêmica de TNF nas primeiras 24 horas. Deste modo investigamos a participação dos receptores de TNF na expansão de Tregs durante e após a sepse. Nascimento e colaboradores (2010) demonstraram que 24 horas após a sepse ocorre um aumento relativo da população de Tregs no baço, como reflexo da intensa apoptose dos demais linfócitos T CD4⁺. Inicialmente, avaliamos a importância dos receptores de TNF sobre as Tregs durante a fase aguda da sepse, fase na qual as concentrações de TNF são altas. Não foi observada diferenças quanto ao aumento relativo do número de Tregs entre os animais deficientes para os receptores de TNF e WT 24 h após a sepse. Deste modo sugerimos que os receptores de TNF não participam deste fenômeno durante a fase aguda da sepse.

Por outro lado, como bem estabelecido, 15 dias após a sepse ocorre a expansão relativa e absoluta de Tregs no baço dos animais WT sobreviventes. Interessantemente, observamos um aumento da expansão de Tregs no baço dos animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse, com valores maiores que os encontrados nos animais WT. Ao passo que, nos animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse, a expansão de Tregs foi completamente abolida, sendo similar aos níveis de Tregs encontrados nos grupos *naive*. Assim, os receptores de TNF parecem assumir diferentes funções na expansão de Tregs durante o desenvolvimento do quadro de imunossupressão pós-sepse. A ausência de TNFR1 confere uma maior expansão de Tregs após a sepse, sendo que tal receptor poderia, desta forma, assumir um papel na regulação negativa da expansão destas células. No entanto, a ausência de TNFR1 e TNFR2 impede expansão de Tregs após a sepse, sendo que, de acordo com os resultados anteriores e os dados da literatura (Chen e Oppenheim, 2010), sugerimos que TNFR2 poderia assumir um papel na regulação positiva da expansão de Tregs. Assim, levando em consideração os dados da literatura que demonstram a importância das Tregs na imunossupressão pós-sepse (Venet

et al., 2008; Nascimento et al., 2010), inferimos que os animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse apresentaram maior suscetibilidade à infecção secundária por apresentarem maior quantidade de Tregs. Diferentemente dos animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse, que possivelmente não desenvolvem imunossupressão por não apresentarem expansão de Tregs após a sepse.

A atividade reguladora positiva do TNF sob as Tregs via TNFR2 foi demonstrada por experimentos tanto “*in vivo*” em doenças autoimunes e no choque endotóxico, quanto “*in vitro*”, nos quais TNF é capaz de induzir expansão e aumento da função supressoras nestas células (Chen et al., 2007, Chen et al., 2008, Chen et al., 2010 e Chen et al., 2013). Corroborando estes dados, demonstramos que esta citocina é capaz de expandir células TCD4⁺FoxP3⁺ *in vitro*, uma vez que TNF associado a IL-2 induziu um aumento desta população celular, sendo este efeito abolido nas células TNFR1/2^{-/-}. Desta forma TNF apresentou maior capacidade que o controle positivo em expandir Tregs, também demonstramos que diferenciação de Tregs pelo TGF- β independe dos receptores de TNF. Mas ainda nos perguntamos se o TNF é capaz induzir foi apenas proliferação ou diferenciação destas células. Posteriormente observamos, que após estimulação com TNF parte das células Foxp3⁺ proliferaram, embora ainda não podemos excluir a participação do TNF na diferenciação destas células. Independentemente da capacidade do TNF de expandir e/ou diferenciar Tregs, sugerimos que este estímulo proinflamatório clássico seja capaz de induzir o aumento de células FoxP3⁺. Partindo da idéia que a principal função das Tregs é a manutenção da homeostasia, impedindo assim a exacerbação de um processo inflamatório (Venet et al., 2008; Shevach et al., 2009), o TNF poderia desta forma induzir um *feedback negativo* da inflamação, por meio da expansão de Tregs.

Por outro lado, a atividade reguladora negativa do TNF sob as Tregs também tem sido relatada, principalmente com o advento das terapias anti-TNF nas doenças autoimunes (Ehrenstein et al., 2004). Recentemente, Nie e colaboradores (2013) demonstraram que a fosforilação de FoxP3 é um evento essencial para função supressora das Tregs, sendo a fosforilação de FoxP3 reduzida em Tregs de pacientes com artrite reumatóide. Estes pesquisadores observaram que o TNF induz o aumento da expressão e da atividade enzimática da proteína fosfatase 1 (PP1) nas Tregs, a qual desfosforila a região do FoxP3 responsável pela ligação ao DNA, implicando o TNF como regulador negativo das Tregs. Assim, o uso de anti-TNF reduziu a expressão de PP1, restaurando os níveis de FoxP3 fosforilado e, consequentemente, na função supressora das Tregs (Nie et al., 2013). Este estudo contrasta com os dados reportados pelo grupo do Prof. Oppenheim e com os nossos presentes resultados. Neste sentido, é importante destacar que a participação dos receptores de TNF não foi investigada nos estudo de Nie e colaboradores (2013), fato que poderia explicar a aparente contradição do papel do TNF na regulação das Tregs.

De fato, Chee e colaboradores (2011) demonstraram que animais NOD (*nonobese diabetic*) $TNFR1^{-/-}$ não desenvolvem diabetes devido ao aumento do número de Tregs encontrado em órgãos linfóides secundários, o qual contribui para a manutenção da tolerância imunológica. Ainda neste trabalho, sugere-se que o TNF regule negativamente as Tregs via $TNFR1$, levando à quebra da homeostasia, a destruição das ilhotas pancreáticas e, consequentemente, ao desenvolvimento do diabetes tipo I. (Chee et al., 2011; Thomas et al., 2012). Além disso, Eugster e colaboradores (1999), utilizando o modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE), demonstraram que animais $TNFR1^{-/-}$ apresentam redução da inflamação e da desmielinização, ao passo que animais $TNFR2^{-/-}$ apresentam intensa inflamação

desmielinizante e maior gravidade da doença. Apesar de não terem demonstrado os mecanismos envolvidos neste fenômeno, acreditamos que a participação dos receptores de TNF na regulação da expansão de Tregs possam estar envolvidos nas diferentes resposta destes animais durante a EAE. Desta forma, sugerimos que ocorra um balanço entre a ativação de TNFR1 e TNFR2 nas Tregs, para que um equilíbrio homeostático do número destas células no organismo seja alcançado. Possivelmente, quando uma ou outra via estiver favorecida ocorrerá o predomínio da atividade reguladora positiva de TNFR2 ou reguladora negativa de TNFR1. No entanto, os conhecimentos que cercam a regulação da atividade e da quantidade dos receptores de TNF nas Tregs permanecem desconhecidos.

Uma questão interessante é que os animais deficientes para TNFR1 apresentaram maior expansão de Tregs na fase tardia após a sepse. Nossos resultados sugerem que o TNFR2 parece ser um receptor importante para a proliferação de Tregs. Desta forma, levantamos uma questão: seria possível que os animais TNFR1^{-/-} apresentassem uma maior expansão de Tregs devido a um mecanismo de regulação genética, pelo qual estes animais expressariam uma maior densidade de TNFR2 nas Tregs? Para isso analisamos os valores de MIF para TNFR2 nas Tregs WT e nas Tregs TNFR1^{-/-}. Não encontramos diferença na expressão TNFR2 nas Tregs TNFR1^{-/-}, sugerindo que não seja este o mecanismo responsável por este fenômeno.

Um dado intrigante foi observado nos animais WT e TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse que apresentavam expansão de Tregs, os quais também apresentaram concentrações aumentadas de IL-10 e/ou TGF- β no pulmão após a sepse. Mas o que mais nos intriga é que o aumento de Tregs foi detectado no baço, qual seria então a razão para o aumento destas citocinas no pulmão em um período no qual não há mais lesão tecidual? Nosso grupo demonstrou que após a sepse ocorre ativação alternativa de

macrófagos, com expressivo aumento da frequência de macrófagos M2 em diferentes tecidos linfóides ou não linfóides, como possível reflexo do reparo tecidual das lesões decorrentes da sepse. Este evento foi dependente de citocinas como a IL-4, IL-13 e IL-33, contribuindo desta forma para o aumento de IL-10 e TGF- β no pulmão dos animais sobreviventes à sepse (Nascimento, 2012). Relatos da literatura mostram que Tregs podem ser induzidas na presença de outras células, como os macrófagos M2 (Weber et al., 2007), bem como estes macrófagos podem ser induzido por Tregs (Biswas e Mantovani, 2010). Assim, a cooperação entre estes tipos celulares contribuem para amplificação da produção de citocinas imunorreguladoras, como IL-10 e TGF- β , uma vez que ausência da expansão de Tregs poderia contribuir para falha na liberação destas citocinas no pulmão dos animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse.

Relatos da literatura demonstram que a disfunção imune induzida pela sepse também está associada com a disfunção das células T CD4⁺ tanto fase aguda (Scumpia et al., 2007) quanto tardia após a sepse (Nascimento et al., 2010). As células T CD4⁺, provenientes de animais ou pacientes sépticos, apresentam deficit da capacidade proliferativa após estimulação *in vivo* e *in vitro* (Heidecke et al., 1999; Scumpia et al., 2007). Diversas explicações foram sugeridas para este fenômeno, sendo que a primeira apontava a intensa apoptose de linfócitos que ocorre durante a fase aguda da sepse (Hotchkiss et al., 2005). Porém, nosso grupo demonstrou que no 15º dia após a sepse não ocorre a intensa apoptose observada na fase aguda (Nascimento et al., 2010). Explicações epigenéticas também foram sugeridas com relação ao comprometimento imune, já que foram observadas metilações em histonas nos linfócitos T CD4⁺ que poderiam levar a repressão da função destas células no 14º dia após a sepse (Carson et al., 2010; Carson et al., 2011). Outra explicação para este comprometimento linfocitário é que durante a sepse ocorre a liberação de diversas citocinas proinflamatórias, radicais

livres e metabólitos que poderiam levar a redução da expressão da cadeia do CD3 ζ em células T (Otsuji et al., 1996; Isomaki et al., 2001; Scumpia et al., 2007), acarretando em uma provável disfunção do receptor de células T (TCR).

No entanto, acreditamos que a expansão de Tregs seja a principal responsável pelo comprometimento das células T CD4⁺ nesta fase tardia. As Tregs são potentes supressoras da proliferação e função das células T (Shevach, 2009; Shevach, 2011) e apresentam uma capacidade aumentada de supressão destas células na fase inicial e tardia da sepse (Scumpia et al., 2006; Cavassani et al., 2010). Além disso, a depleção de Tregs *in vivo* durante a sepse, pelo tratamento com anti-GITR, reverteu o comprometimento da proliferação das células TCD4⁺ e aumentou a resistência à infecção secundária (Nascimento et al., 2010). Os animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes à sepse não apresentaram redução da capacidade proliferativa das células T CD4⁺ *in vivo* após a infecção com *L. pneumophila* quando comparados ao seu grupo *naive*. Porém os animais TNFR1/2^{-/-} *naive* quando infectados com *L. pneumophila* apresentaram reduzida capacidade proliferativa destes linfócitos. Uma das explicações para este fenômeno é que TNFR2 apresenta funções de coestimulação, aumentando a resposta de células T convencionais aos sinais mediados por TCR (Kim et al., 2001; Kim et al., 2004; Kim et al., 2006). Segundo Kim e colaboradores (2006) as células T TNFR2^{-/-} apresentam defeitos na ativação, na proliferação e na diferenciação, quando submetidas à diversos estímulos específicos ou policlonais. Demonstramos assim, que a sepse não altera a capacidade proliferativa das células T CD4⁺ nos animais TNFR1/2^{-/-} sobreviventes, embora a resposta proliferativa destes animais em condições basais já esteja comprometida.

Uma vez estabelecida a participação dos receptores de TNF na expansão de Tregs decorrentes da sepse e suas implicações com a imunossupressão, investigamos a

expressão destes receptores nestas células. Observamos que as Tregs ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) apresentaram maior expressão de ambos os receptores de TNF quando comparadas as células T convencionais ($CD4^+FoxP3^-$). Os valores de MIF para TNFR2 nas Tregs foi maior que o encontrado para TNFR1. Corroborando os nossos resultados, Chen e colaboradores (2007) demonstraram que células $CD4^+CD25^+$ apresentam maior densidade de TNFR2 do que células $CD4^+CD25^-$. Os autores também observaram que a densidade de TNFR2 era maior do que a de TNFR1 nas células $CD4^+CD25^+$. Assim, sugerimos que a população clássica de Tregs, ou seja $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, apresentam maiores densidades dos receptores de TNF, sendo o TNFR2 mais expresso que o TNFR1 nestas células.

Relatos da literatura demonstram que quando as células T $CD4^+CD25^+$ são estimuladas com TNF e/ou estímulos policlonais ocorre o aumento da expressão dos genes de alguns membros da superfamília de TNF, como TNFR2, OX-40 e 4-1BB, bem como o aumento da densidade dos mesmos na membrana destas células (Chen et al., 2007; Hamano et al., 2010). Um evento altamente complexo como a sepse proporciona grandes mudanças na expressão de vários genes e, consequentemente, na produção de diversas proteínas, como mediadores inflamatórios, enzimas, moléculas de adesão e receptores (Bosmann and Ward, 2012). Apartir desta etapa do trabalho, avaliamos as possíveis mudanças quantitativas na expressão dos receptores de TNF que podem ocorrer durante e após a sepse nas células T $CD4^+$, reguladoras ou não.

Observamos que na fase aguda da sepse ocorre o aumento da densidade de TNFR2 nas Tregs, sendo que este aumento também foi observado nas Tregs 15 dias após a sepse. Diferentemente do que foi observado nas Tregs, não encontramos aumento da densidade de TNFR2 nas células T convencionais durante e após a sepse. Sugerimos desta forma, que as mudanças decorrentes da sepse possam alterar a expressão de

TNFR2 nas Tregs, as quais possivelmente contribuem para a expansão destas células em uma fase tardia. Com relação ao TNFR1, não observamos aumento da densidade deste receptor nas células T convencionais, tanto na fase aguda quanto na fase tardia da sepse. Já nas Tregs, o aumento da densidade de TNFR1 foi observado tanto na fase aguda, quanto na fase tardia após a sepse. Embora não observada a participação dos receptores de TNF com o aumento da frequência de Tregs na fase aguda da sepse, é possível que o fenômeno de regulação da expansão tardia das Tregs tenha origem ainda na fase aguda da sepse. Os complexos estímulos decorrentes da sepse foram capazes de induzir alterações quantitativas de ambos os receptores de TNF nas Tregs. Ainda não sabemos quais as implicações fisiopatológicas deste fenômeno. Porém, de acordo com os dados anteriores, sugerimos que este aumento da densidade dos receptores de TNF esteja relacionado com a maior necessidade de regulação da expansão destas células após a sepse. Para isso, melhores investigações precisam ser realizadas.

Nosso próximo passo foi avaliar as alterações causadas pela sepse na frequência de Tregs que expressam receptores de TNF. A frequência de Tregs TNFR1⁺ não aumentou na fase aguda e na fase tardia após a sepse. De fato, Chen e colaboradores (2007) demonstraram que as Tregs expandidas após um estímulo policlonal são preferencialmente as Tregs que expressam TNFR2. Em condições homeostáticas, cerca de 30% a 40% das Tregs dos órgãos linfóides periféricos murinos apresentam alta densidade de TNFR2, enquanto menos que 10% das células T convencionais apresentam alta densidade TNFR2 (Chen et al., 2008; Hamano et al., 2010). Deste modo, avaliamos as mudanças quantitativas provocadas pela sepse na população de Tregs TNFR2⁺ nos animais WT e TNFR1^{-/-}. Observamos que os animais WT e TNFR1^{-/-} apresentaram um aumento da frequência de Tregs TNFR2⁺, tanto na fase aguda quanto na fase tardia após a sepse. Interessantemente, os animais TNFR1^{-/-}

apresentaram maior frequência destas células quando comparados aos animais WT em todas as condições experimentais. Uma vez que o receptor TNFR2 é importante para atividade proliferativa das Tregs. A maior frequência de Tregs TNFR2⁺ poderia ser uma das explicações para a maior expansão de Tregs encontradas nos animais TNFR1^{-/-} sobreviventes à sepse. Porém para que esta conclusão seja tomada é necessária uma melhor investigação.

Ao longo deste trabalho sugerimos que os receptores de TNF possam regular antagônicamente a expansão de Tregs decorrente da sepse. Chen e colaboradores (2012) demonstraram que animais TNFR2^{-/-} apresentam fisiologicamente redução da população de células CD4⁺FoxP3⁺ tanto no timo quanto em órgãos linfóides periféricos. Foi demonstrado também que quando as células CD4⁺FoxP3⁺TNFR2^{-/-} eram transferidas para um ambiente inflamatório, a capacidade de recuperação destas células, posteriormente, era menor em relação à células CD4⁺FoxP3⁺TNFR2^{+/+}. Para tal fenômeno, o autor ressaltou a importância de TNFR2 para estabilização do fenótipo de Tregs (Chen et al., 2012). De acordo com nossos resultados, sugerimos que TNFR1 seja um regulador negativo da expansão de Tregs, sendo que seus efeitos possam ser contrabalanceados pelo TNFR2. A deficiência de TNFR2 impediria a regulação positiva da expansão de Tregs, permitindo desta forma a não expansão desta população celular. Do mesmo modo sugerimos que animais deficientes de TNFR1 apresentam maior expansão de Tregs após a sepse em virtude da falta da regulação negativa. Para que uma conclusão mais refinada sobre a participação dos receptores de TNF na imunossupressão pós-sepse seja tomada, um importante objeto de estudo seria o animal TNFR2^{-/-}, porém não possuímos estes animais nos biotérios disponíveis.

Embora nossos resultados tenham avançado no entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da imunossupressão pós-sepse, colocando o papel dos

receptores de TNF, em particular o TNFR2, na expansão de Tregs, muitas questões ainda permanecem sem respostas. Uma vez que a expansão de Tregs, regulada pelos receptores de TNF, ocorre em uma fase tardia após a sepse, na qual não mais detectamos TNF na circulação, quem seria o possível ligante responsável pela ativação dos receptores de TNF? Os principais ligantes dos receptores de TNF são TNF solúvel (sTNF), o TNF transmembranico (mTNF) e as linfotoxinas, LT- α e LT- β . Todos estes ligantes são capazes de ativar os receptores de TNF de diferentes modos. O TNFR1 apresenta maior atividade frente ao sTNF e mTNF, sendo que é frequentemente ativado pelo sTNF, já o TNFR2 apresenta ligação preferencial ao mTNF (Remouchamps et al., 2011; Cabal-Hierro and Lazo, 2012). Grell e colaboradores (1995) demonstraram que a ligação do mTNF ocorre preferencialmente ao TNFR2. Nosso grupo demonstrou que após a sepse ocorre o aumento da ativação alternativa de macrófagos e, consequentemente, um aumento da frequência macrófagos M2 em diversos órgãos linfóides ou não (Nascimento, 2012). Ogawa e colaboradores (2012) demonstraram que macrófagos ativados alternativamente por IL-4 e IL-33 apresentam aumento da densidade de mTNF, sendo incapazes de liberar o sTNF. Desta forma, o mTNF também é um importante candidato à ligante responsável pelas atividades reguladoras dos receptores de TNF sob as Tregs. Ainda, as linfotoxinas apresentam afinidades semelhantes frente aos dois receptores (Remouchamps et al., 2011). As linfotoxinas são importantes ligantes do TNFR2 (Chan et al., 2000). Chen e colaboradores (2012) demonstraram que animais TNFR2^{-/-} apresentam redução de Tregs, sendo que o mesmo fenômeno não foi observado em animais TNF^{-/-} ou LT α / β ^{-/-}. Porém animais TNF/LT α /LT β ^{-/-} apresentaram redução das Tregs no timo e nos órgãos linfóides periféricos, assim como os animais TNFR2^{-/-}. Demonstrando desta forma, a importância das linfotoxinas na ativação e função deste receptor nas Tregs. Sriskandan e

colaboradores (1996) demonstraram aumento da LT- α durante a fase aguda da sepse, porém nenhum trabalho relata a presença destes mediadores em uma fase mais tardia. O fato é que não podemos excluir as linfotoxinas como mediador da regulação tardia da expansão de Tregs. Para isso futuras investigações precisam ser realizadas.

Em conjunto, os nossos resultados obtidos permitem-nos concluir que os receptores de TNF são fundamentais para a resolução de um processo infeccioso subletal, ao passo que durante a resposta inflamatória sistêmica eles passam a exercer um papel deletério, comprometendo a migração de neutrófilos, permitindo a disseminação bacteriana e levando a lesões teciduais. Nossos dados sugerem que o principal receptor envolvido com estes processos seja o TNFR1. Por outro lado, nossos resultados indicam que os receptores de TNF possuem papéis antagônicos durante a expansão de Tregs observada na fase tardia após a sepse, sendo que, possivelmente, o TNFR2 apresente um papel na regulação positiva destas células, ao passo que o TNFR1 possa exercer um papel como regulador negativo. Por fim, demonstramos que a sepse induz alterações na expressão dos receptores de TNF nas Tregs, sugerindo que estes efeitos podem acarretar consequências tardias na regulação da expansão destas células, influenciando diretamente no desenvolvimento da imunossupressão pós-sepse, embora ainda não tenhamos identificado o ligante responsável por tal fenômeno.

Esquema 3: **Resumo dos fenômenos observados.** Durante a sepse ocorre uma liberação exacerbada de vários mediadores inflamatórios, inclusive TNF, que podem modular positivamente a expressão dos receptores de TNF nas Tregs. Essas alterações agudas podem ser reflexo de uma necessidade de regulação da expansão destas células. Sugerimos então, que o TNFR1 apresente uma capacidade reguladora negativa sob a expansão destas células, ao passo que o TNFR2 poderia exercer uma papel na regulação positiva deste processo. Essas ações antagônicas dos receptores de TNF na regulação da expansão de Tregs após a sepse podem determinar o grau de expansão de Tregs na fase tardia, e consequentemente, o grau de suscetibilidade à infecções secundárias (imunossupressão pós-sepse).

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Concluimos que, a atividade dos receptores de TNF possa regular a expansão de Tregs durante o desenvolvimento da imunossupressão induzida pela sepse. Os receptores de TNF apresentam papéis antagônicos neste processo, uma vez que, o TNFR1 possa agir como regulador negativo e o TNFR2 como regulador positivo, durante a expansão de Tregs após a sepse.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Abbas, A.K.,A.H. Litchman, S. Pillai. Cellular and Molecular Immunology. [Philadelphia]:Elsevier, 2012. 554 p.

Abraham E, Glauser MP, Butler T, et al: p55Tumor necrosis factor receptor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. JAMA 1997; 277:1531–1538

Alves-Filho, JC., et al. Neutrophil Function in Severe Sepsis. Current Drug Targets – Immune, Endocrine e Metabolic Disorders 2006; 6: 7-16.

Alves-Filho, JC; DE Freitas, A; Russo, M; Cunha, FQ. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. Crit Care Med 2006; 34: 461-70.

Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. Crit Care Med. 2001 Jul;29(7 Suppl):S109-16.

Baker C.C., Chaudry I.H., Gaines H.O., Baue A.E. (1983) Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. Surgery 94:331-5. DOI: 0039-6060(83)90109-5 [pii].

Barbara JA, Smith WB, Gamble JR, Van Ostade X, Vandenabeele P, Tavernier J, Fiers W, Vadas MA, Lopez AF. Dissociation of TNF-alpha cytotoxic and proinflammatory activities by p55 receptor- and p75 receptor-selective TNF-alpha mutants. EMBO J. 1994 Feb 15;13(4):843-50.

Barichello T, et al. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. Braz J Med Biol Res. 2007 Jun;40(6):831-7.

Baumann, H., and J. Gauldie. 1994. The acute phase response. *Immunol. Today*

Benjamim C.F., Hogaboam C.M., Kunkel S.L. (2004) The chronic consequences of severe sepsis. J Leukoc Biol 75:408-12. DOI: 10.1189/jlb.0503214

Benjamim C.F., Hogaboam C.M., Lukacs N.W., Kunkel S.L. (2003) Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol* 163:2605-17. DOI: S0002-9440(10)63615-2 [pii].

Benjamim C.F., Lundy S.K., Lukacs N.W., Hogaboam C.M., Kunkel S.L. (2005) Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood* 105:3588-95. DOI: 2004-08-3251 [pii]

Beutler, B, Rietschel, ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:169-176.

Biswas S.K., Mantovani A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11:889-96.

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells". *Nature* 385 (6618): 729–33.

Bone, R.C., Grodzin, C.J; Balk, R.A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*, v. 112: 235-243, 1997.

Bone, RC; Sibbald, WJ; Sprung, CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992; 101: 1481-3.

Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD 2nd, Kreisel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011 Dec 21;306(23):2594-605. doi: 10.1001/jama.2011.1829.

Bosmann M, Ward PA. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol*. 2013 Mar;34(3):129-36. doi: 10.1016/j.it.2012.09.004. Epub 2012 Oct 2.

Brusko, T.M. et al. An integral role for Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4 CD25 Regulatory T Cells. *J Immunology* V. 174, 2005.

Brusko, T.M.; Putnam, A.L.; Bluestone, J.A. Human regulatory T Cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunological Reviews* 2008, V. 223, 371-390.

Brunialti MK, Martins PS, Barbosa de Carvalho H, Machado FR, Barbosa LM, Salomao R. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock*. 2006 Apr;25(4):351-7.

Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal*. 2012 Jun;24(6):1297-305. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.02.006. Epub 2012 Feb 20.

Carson W.F., Cavassani K.A., Dou Y., Kunkel S.L. (2011) Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics* 6:273-83. DOI: 14017 [pii]

Carson W.F.t., Cavassani K.A., Ito T., Schaller M., Ishii M., Dou Y., Kunkel S.L. (2010) Impaired CD4+ T-cell proliferation and effector function correlates with repressive histone methylation events in a mouse model of severe sepsis. *Eur J Immunol* 40:998-1010. DOI: 10.1002/eji.200939739.

Carswell E A, Old L J, Kassel R L. Green S, Fiore N, Williamson B 1975 An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 72: 3666-3670.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Sep;72(9):3666-70.

Cavassani K.A., Carson W.F.t., Moreira A.P., Wen H., Schaller M.A., Ishii M., Lindell D.M., Dou Y., Lukacs N.W., Keshamouni V.G., Hogaboam C.M., Kunkel S.L. (2010)

The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood* 115:4403-11. DOI: blood-2009-09-241083 [pii]

Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. 2000 Jun 30;288(5475):2351-4.

Chee J, Angstedt E, Mariana L, Graham KL, Carrington EM, Bluethmann H, Santamaria P, Allison J, Kay TW, Krishnamurthy B, Thomas HE. TNF receptor 1 deficiency increases regulatory T cell function in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2011 Aug 15;187(4):1702-12. doi: 10.4049/jimmunol.1100511. Epub 2011 Jul 6.

Chen X, Bäuml M, Männel DN, Howard OM, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J Immunol*. 2007 Jul 1;179(1):154-61.

Chen X, Hamano R, Subleski JJ, Hurwitz AA, Howard OM, Oppenheim JJ. Expression of costimulatory TNFR2 induces resistance of CD4⁺FoxP3⁻ conventional T cells to suppression by CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 2010 Jul 1;185(1):174-82. doi: 10.4049/jimmunol.0903548. Epub 2010 Jun 4.

Chen X, Oppenheim JJ. 11. TNF- α : an activator of CD4⁺FoxP3⁺TNFR2⁺ regulatory T cells. *Curr Dir Autoimmun*. 2010;11:119-34. doi: 10.1159/000289201. Epub 2010 Feb 18. Review.

Chen X, Oppenheim JJ. Contrasting effects of TNF and anti-TNF on the activation of effector T cells and regulatory T cells in autoimmunity. *FEBS Lett*. 2011 Dec 1;585(23):3611-8. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.025. Epub 2011 Apr 15. Review.

Chen X, Oppenheim JJ. Resolving the identity myth: key markers of functional CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Int Immunopharmacol*. 2011 Oct;11(10):1489-96. doi: 10.1016/j.intimp.2011.05.018. Epub 2011 May 31. Review.

Chen X, Subleski JJ, Kopf H, Howard OM, Männel DN, Oppenheim JJ. Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse

CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol.* 2008 May 15;180(10):6467-71.

Chen X, Wu X, Zhou Q, Howard OM, Netea MG, Oppenheim JJ. 1.TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol.* 2013 Feb 1;190(3):1076-84. doi: 10.4049/jimmunol.1202659. Epub 2012 Dec 31

Chen, X. et al. Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4+CD25+ T Regulatory Cells. *J Immunol* 2007, 179; 179-154-161.

Creasey AA, Stevens P, Kenney J, Allison AC, Warren K, Catlett R, Hinshaw L, Taylor FB Jr (1991) Endotoxin and cytokine profile in plasma of baboons challenged with lethal and sublethal *Escherichia coli*. *Circ Shock* 33:84-91.

Cuthbertson BH, Roughton S, Jenkinson D, Maclellan G, Vale L. Quality of life in the five years after intensive care: a cohort study. *Crit Care.* 2010;14(1):R6. doi: 10.1186/cc8848. Epub 2010 Jan 20.

David, C.M; Faria, H.C. Sepsis da bancada ao leito. *Revinter*, v.1: 3-11, 2007.

Dellinger, R. P. and J. L. Vincent (2005). The Surviving Sepsis Campaign sepsis change bundles and clinical practice. *Crit Care* 9(6): 653-654.

Dinarello C.A. (1997) Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112:321S-329S.

Dinarello CA. The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor. *Immunol Lett.* 1987 Dec;16(3-4):227-31.

Duprez L, Takahashi N, Van Hauwermeiren F, Vandendriessche B, Goossens V, Vanden Berghe T, Declercq W, Libert C, Cauwels A, Vandenabeele P. RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity.* 2011 Dec 23;35(6):908-18. doi: 10.1016/j.immuni.2011.09.020.

Ehrenstein, M.R. et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J. Exp. Med.* 200, 277–285 (2004).

Erickson SL, de Sauvage FJ, Kikly K, Carver-Moore K, Pitts-Meek S, Gillett N, Sheehan KC, Schreiber RD, Goeddel DV, Moore MW. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature*. 1994 Dec 8;372(6506):560-3.

Eugster HP, Frei K, Bachmann R, Bluethmann H, Lassmann H, Fontana A. Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1. *Eur J Immunol.* 1999 Feb;29(2):626-32.

Faustman, D.; Davis, M. TNF receptor 2 pathways: drugs target for autoimmune diseases. *Nature reviews.* jun 2010. V.9

Fisher CJ Jr, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, Benjamin E. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med.* 1996 Jun 27;334(26):1697-702.

Flohé S, Lendemans S, Schmitz D, Waydhas C. [Intensive care medicine -- update 2005]. *Zentralbl Chir.* 2006 Jun;131(3):175-87. Review. German. a

Freitas A, Alves-Filho JC, Trevelin SC, Spiller F, Suavinha MM, Nascimento DC, Pestana CR, Dal-Secco D, Sônego F, Czaikoski PG, Curti C, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ. Divergent role of heme oxygenase inhibition in the pathogenesis of sepsis. *Shock.* 2011 Jun;35(6):550-9. doi: 10.1097/SHK.0b013e31820e1ef0.

Fujita M, Ikegame S, Harada E, Ouchi H, Inoshima I, Watanabe K, Yoshida S, Nakanishi Y. TNF receptor 1 and 2 contribute in different ways to resistance to *Legionella pneumophila*-induced mortality in mice. *Cytokine.* 2008 Nov;44(2):298-303. doi: 10.1016/j.cyto.2008.08.015. Epub 2008 Oct 5.

Gaur U, Aggarwal BB (2003). "Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily". *Biochem. Pharmacol.* 66 (8): 1403–8. doi:10.1016/S0006-2952(03)00490-8. PMID 14555214.

Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Löhden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83:793.

Hamano R, Huang J, Yoshimura T, Oppenheim JJ, Chen X. TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40. *Eur J Immunol.* 2011 Jul;41(7):2010-20. doi: 10.1002/eji.201041205.

Heidecke C.D., Hensler T., Weighardt H., Zantl N., Wagner H., Siewert J.R., Holzmann B. (1999) Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. *Am J Surg* 178:288-92.

Hinshaw LB, Tekamp-Olson P, Chang AC, Lee PA, Taylor FB Jr, Murray CK, Peer GT, Emerson TE Jr, Passey RB, Kuo GC. Survival of primates in LD100 septic shock following therapy with antibody to tumor necrosis factor (TNF alpha). *Circ Shock.* 1990 Mar;30(3):279-92.

Hiraki S., Ono S., Tsujimoto H., Kinoshita M., Takahata R., Miyazaki H., Saitoh D., Hase K. (2012) Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor-beta decreases the percentages of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival. *Surgery* 151:313-22. DOI: S0039-6060(11)00370-9 [pii]

Hoetzonecker W, Echtenacher B, Guenova E, Hoetzonecker K, Woelbing F, Brück J, Teske A, Valtcheva N, Fuchs K, Kneilling M, Park JH, Kim KH, Kim KW, Hoffmann P, Krenn C, Hai T, Ghoreschi K, Biedermann T, Röcken M. ROS-induced ATF3 causes susceptibility to secondary infections during sepsis-associated immunosuppression. *Nat Med.* 2011 Dec 18;18(1):128-34. doi: 10.1038/nm.2557.

Hotchkiss R.S., Coopersmith C.M., Karl I.E. (2005) Prevention of lymphocyte apoptosis--a potential treatment of sepsis? *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7:S465-9. DOI: CID36076 [pii]

Hotchkiss R.S., Nicholson D.W. (2006) Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 6:813-22. DOI: nri1943 [pii]10.1038/nri1943.

Housley WJ, Adams CO, Nichols FC, Puddington L, Lingenheld EG, Zhu L, Rajan TV, Clark RB. Natural but not inducible regulatory T cells require TNF-alpha signaling for in vivo function. *J Immunol.* 2011 Jun 15;186(12):6779-87. doi: 10.4049/jimmunol.1003868. Epub 2011 May 13.

Isomaki P., Panesar M., Annenkov A., Clark J.M., Foxwell B.M., Chernajovsky Y., Cope A.P. (2001) Prolonged exposure of T cells to TNF down-regulates TCR zeta and expression of the TCR/CD3 complex at the cell surface. *J Immunol* 166:5495-507.

Janeway, CA. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 2001; 3: 1167-71.

Kaufman DR, Choi Y. Signaling by tumor necrosis factor receptors: pathways, paradigms and targets for therapeutic modulation. *Int Rev Immunol.* 1999;18(4):405-27. Review.

Kieszko R, Krawczyk P, Chocholska S, Bojarska-Junak A, Jankowska O, Król A, Roliński J, Milanowski J. Tumor necrosis factor receptors (TNFRs) on T lymphocytes and soluble TNFRs in different clinical courses of sarcoidosis. *Respir Med.* 2007 Mar;101(3):645-54. Epub 2006 Aug 4.

Kim EY, Priatel JJ, Teh SJ, Teh HS. 1. TNF receptor type 2 (p75) functions as a costimulator for antigen-driven T cell responses in vivo. *J Immunol.* 2006 Jan 15;176(2):1026-35.

Kim EY, Teh HS. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J Immunol.* 2001 Dec 15;167(12):6812-20.

Kim EY, Teh HS. Critical role of TNF receptor type-2 (p75) as a costimulator for IL-2 induction and T cell survival: a functional link to CD28. *J Immunol.* 2004 Oct 1;173(7):4500-9.

Konrad Reinhart, MD; Waheedullah Karzai, MD Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: Update on clinical trials and lessons learned Crit Care Med 2001 Vol. 29, No. 7 (Suppl.)

Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD (1988). "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF". Cell 53 (1): 45–53. doi:10.1016/0092-8674(88)90486-2. PMID 3349526.

Kumar, G., N. Kumar, A. Taneja, T. Kaleekal, S. Tarima, E. McGinley, E. Jimenez, A. Mohan, R. A. Khan, J. Whittle, E. Jacobs, R. Nanchal and I. Milwaukee initiative in critical care outcomes research group of (2011). Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). Chest 140(5): 1223-1231.1 Amgen Institute BibcodeCell, Vol. 73, 457-467, May 7, 1993.

Liu, G. et al. Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4⁺CD25⁺ T Cells in mice. Immunology and Cell Biology 2011, 89, 130-142.

Mantovani, A. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. TRENDS in Immunology. V. 23, N.11, 2002.

Martin C. Weapons of pressure resuscitation for septic shock. Intensive Care Med. 2003 Oct;29(10):1621-2. Epub 2003 Aug 27

Martin RA, Silva AT, Cohen J. Effect of anti-TNF-alpha treatment in an antibiotic treated murine model of shock due to Streptococcus pyogenes. FEMS Microbiol Lett. 1993 Jun 15;110(2):175-8.

McMasters KM, Peyton JC, Hadjiminias DJ, Cheadle WG. Endotoxin and tumour necrosis factor do not cause mortality from caecal ligation and puncture. Cytokine. 1994 Sep;6(5):530-6.

Mills, K.H. Regulatory T Cells: friends or foe in immunity to infection? Nat. Rev. Immunol, v. 4, p.841-855, 2004.

Muenzer JT, Davis CG, Chang K, Schmidt RE, Dunne WM, Coopersmith CM, Hotchkiss RS. Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect Immun*. 2010 Apr;78(4):1582-92. doi: 10.1128/IAI.01213-09. Epub 2010 Jan 25.

Nagar M, Jacob-Hirsch J, Vernitsky H, Berkun Y, Ben-Horin S, Amariglio N, Bank I, Kloog Y, Rechavi G, Goldstein I. 10.TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA- regulatory T cells that modulates their suppressive function. *J Immunol*. 2010 Apr 1;184(7):3570-81. doi: 10.4049/jimmunol.0902070. Epub 2010 Feb 24.

Nascimento DC, Alves-Filho JC, Sônego F, Fukada SY, Pereira MS, Benjamim C, Zamboni DS, Silva JS, Cunha FQ.. Role of Regulatory T Cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. *Crit Care Med* 2010, V.38, N.8, 1718-1725.

Nascimento, Daniele Carvalho Bernardo Participação da interleucina-33 e citocinas do tipo 2 na ativação alternativa de macrófagos e estabelecimento da imunossupressão induzida pela sepse Ribeirão Preto, 2012. 240 p; il.:30cm Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Nie H, Zheng Y, Li R, Guo TB, He D, Fang L, Liu X, Xiao L, Chen X, Wan B, Chin YE, Zhang JZ. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. *Nat Med*. 2013 Feb 10;19(3):322-8. doi: 10.1038/nm.3085. Epub 2013 Feb 10.

Ogawa H, Mukai K, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. Th2-inducing cytokines IL-4 and IL-33 synergistically elicit the expression of transmembrane TNF- α on macrophages through the autocrine action of IL-6. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Mar 30;420(1):114-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.124.

Otsuji M., Kimura Y., Aoe T., Okamoto Y., Saito T. (1996) Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13119-24.

Otto G.P., Sossdorf M., Claus R.A., Rodel J., Menge K., Reinhart K., Bauer M., Riedemann N.C. (2011) The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. Crit Care 15:R183. DOI: cc10332 [pii]

Pastille, E. et al. Modulation of Dendritic Cell Differentiation in the Bone Marrow Mediates Sustained Immunosuppression after Polymicrobial Sepsis. J Immunol 2011, 186; 977-986.

Perl TM, Dvorak L, Hwang T, Wenzel RP. 20. Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. JAMA. 1995 Jul 26;274(4):338-45

Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, Mohler KM. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. J Immunol. 1998 Jan 15;160(2):943-52.

Pfeffer K, Matsuyama T, Kündig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Krönke M, Mak TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. Cell. 1993 May 7;73(3):457-67.

Rauert H, Wicovsky A, Müller N, Siegmund D, Spindler V, Waschke J, Kneitz C, Wajant H. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). J Biol Chem. 2010 Mar 5;285(10):7394-404. doi: 10.1074/jbc.M109.037341. Epub 2009 Dec 28.

Remouchamps C, Boutaffala L, Ganef C, Dejardin E. Biology and signal transduction pathways of the Lymphotoxin- $\alpha\beta$ /LT β R system. Cytokine Growth Factor Rev. 2011 Oct-Dec;22(5-6):301-10. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.11.007. Review.

Riedemann, NC; Guo, RF; Ward, PA. The enigma of sepsis. J Clin Invest 2003; 112: 460-67.

Rios-Santos, F., J. Alves-Filho, F. Souto, F. Spiller, A. Freitas, C. Lotufo, M. Soares, R. dos Santos, M. Teixeira AND F. D. Cunha (2007). Down-regulation of CXCR2 on

neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. American journal of respiratory and critical care medicine 175(5): 490-497.

Rothe J, Lesslauer W, Lötscher H, Lang Y, Koebel P, Köntgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, Bluethmann H. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. Nature. 1993 Aug 26;364(6440):798-802.

Salomao R, Brunialti MK, Rapozo MM, Baggio-Zappia GL, Galanos C, Freudenberg M. Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. Shock. 2012 Aug;38(3):227-42. doi: 10.1097/SHK.0b013e318262c4b0. Review

Sales, J.R et al. Sepsis Brasil: Estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileira. Ver Bras Ter Intensiva, v.18: 9-17, 2006.

Scherpereel A, Depontieu F, Grigoriu B, Cavestri B, Tsicopoulos A, Gentina T, Jourdain M, Pugin J, Tonnel AB, Lassalle P. Endocan, a new endothelial marker in human sepsis. Crit Care Med. 2006 Feb;34(2):532-7.

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

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. (2007) Treatment with GITR agonistic antibody corrects adaptive immune dysfunction in sepsis. Blood 110:3673-81.

Secher T, Vasseur V, Poisson DM, Mitchell JA, Cunha FQ, Alves-Filho JC, Ryffel B.. Crucial Role of TNF Receptors 1 and 2 in the Control of Polymicrobial Sepsis. J Immunol 2009, 182; 7855-7864.

Shevach E.M. (2009) Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. Immunity 30:636-45. DOI: S1074-7613(09)00197-6 [pii]

Shevach E.M. (2011) Biological functions of regulatory T cells. *Adv Immunol* 112:137-76. DOI: B978-0-12-387827-4.00004-8 [pii]

Sriskandan S, Moyes D, Lemm G, Cohen J. Lymphotoxin-alpha (TNF-beta) during sepsis. *Cytokine*. 1996 Dec;8(12):933-7.

Steinhauser M.L., Hogaboam C.M., Kunkel S.L., Lukacs N.W., Strieter R.M., Standiford T.J. (1999) IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* 162:392-9.

Tang P, Hung M-C, Klostergaard J (1996). "Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer". *Biochemistry* 35 (25): 8216–25. doi:10.1021/bi952182t. PMID 8679576.

Tartaglia LA, Goeddel DV, Reynolds C, Figari IS, Weber RF, Fendly BM, Palladino MA Jr. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol*. 1993 Nov 1;151(9):4637-41.

Thomas HE, Graham KL, Chee J, Thomas R, Kay TW, Krishnamurthy B. Proinflammatory cytokines contribute to development and function of regulatory T cells in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Nov 21. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06797.

Thornton, A.M. et al. Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced FoxP3 + T Regulatory Cells. *J Immunol*, Feb 2010, p.3433-3441.

Thornton, A.M.; Shevach, E.M. Suppressor Effector Function Of CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Is Antigen Nonspecific. *J. Immunol*, V. 164, P183, 2000.

Tone, M. et al. Mouse Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Ligand Is Costimulatory For T Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, V. 100, 2003.

Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol*. 1993;9:317-43. Review

Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med*. 1994;45:491-503. Review.

Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987 Dec 17-23;330(6149):662-4.

Tracey KJ, Lowry SF, Cerami A. Physiological responses to cachectin. *Ciba Found Symp*. 1987;131:88-108. Review.

Van Ostade X, Vandenabeele P, Everaerd B, Loetscher H, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W, Tavernier J, Brouckaert P, Fiers W. Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. *Nature*. 1993 Jan 21;361(6409):266-9.

Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jun 1;89(11):4845-9.

Venet F., Chung C.S., Kherouf H., Geeraert A., Malcus C., Poitevin F., Bohe J., Lepape A., Ayala A., Monneret G. (2009) Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 35:678-86. Wang R., Wan Q., Kozhaya L., Fujii H., Unutmaz D. (2008) Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS One* 3:e2705. DOI: 10.1371/journal.pone.0002705.

Venet F., Chung C.S., Monneret G., Huang X., Horner B., Garber M., Ayala A. (2008) Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol* 83:523-35.

Venet F., Pachot A., Debarb A.L., Bohe J., Bienvenu J., Lepape A., Monneret G. (2004) Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 32:2329-31. DOI: 00003246-200411000-00023 [pii].

Weber M.S., Prod'homme T., Youssef S., Dunn S.E., Rundle C.D., Lee L., Patarroyo J.C., Stuve O., Sobel R.A., Steinman L., Zamvil S.S. (2007) Type II monocytes

modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. Nat Med 13:935-43.

Welborn MB, Van Zee K, Edwards PD, Pruitt JH, Kaibara A, Vauthey JN, Rogy M, Castleman WL, Lowry SF, Kenney JS, Stüber D, Ettlin U, Wipf B, Loetscher H, Copeland EM, Lesslauer W, Moldawer LL. A human tumor necrosis factor p75 receptor agonist stimulates in vitro T cell proliferation but does not produce inflammation or shock in the baboon. J Exp Med. 1996 Jul 1;184(1):165-71.

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. (2006) The Bir1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. Nat Immunol 7:318

ANEXO

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 152/2011, sobre o projeto intitulado "*Participação de TNF- α e seus receptores TNFR1 e TNFR2 na fisiopatologia da imunossupressão pós-sepse*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor José Carlos Farias Alves Filho** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 31 de outubro de 2011.

(We certify that the protocol nº 152/2011, about "*Involvement of TNF-A and its receptors TNFR1 and TNFR2 immunosuppression in the physiopatology of post-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 10/31/2011.

Ribeirão Preto, 31 de outubro de 2011.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal