Mariana Macedo Costa de Andrade

O efeito da tolerância à endotoxina nos linfócitos T regulatórios e Th17

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo

2016

Mariana Macedo Costa de Andrade

O efeito da tolerância à endotoxina nos linfócitos T regulatórios e Th17

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Andrade, Mariana Macedo Costa de

O efeito da tolerância à endotoxina nos linfócitos T regulatórios e Th17 / Mariana
Macedo Costa de Andrade. — São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos.

Orientador: Francisco Garcia Soriano.

Descritores: 1.Sepsis 2.Inflamação 3.Tolerância imunológica 4.Linfócitos T
reguladores 5.Células Th17

AGRADECIMENTOS

A Deus que trilha o meu caminho e que me faz seu instrumento para auxiliar o maior número de pessoas possíveis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano, por ter aceitado me orientar e compartilhar seu conhecimento.

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco, por permitir minha pesquisa no LIM 51.

À minha amiga Denise Barbeiro por sempre me orientar e ajudar em todo o percurso do projeto e nesta etapa da minha vida. Obrigada!

À minha amiga Vanessa Victorino que esteve ao meu lado em todos os momentos me dando apoio, me orientando, me dando abrigo e por tantas vezes sendo meu ombro amigo. Você estará eternamente em meu coração!

Aos colegas Wermerson, Isabela, Anne, Vivian, Joleen, Ricardo, Rosângela, Ester pelo companheirismo e ajuda nos experimentos.

À Kelly, Suely, Hermes, Fátima e Geraldo. Obrigada por toda a ajuda!

À CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização desse projeto.

DEDICATORIA

Esta vitória é dedicada a,

Principalmente à minha mãe Anelise Macedo Costa e minha avó Sally M. F. Costa por estarem sempre presentes na minha vida dado suporte, apoio, acolhimento nos momentos mais difíceis, por serem meu porto seguro, por me impulsionarem à correr atrás dos meus maiores sonhos e não voltar atrás nos momentos de fraqueza.

Ao meu filho Pedro Henrique que veio como um raio de sol em minha vida e que faz valer a pena levantar todos os dias e seguir em frente.

Ao meu marido Oseias Macedo Silva, que me apoiou e esteve ao meu lado em momentos difíceis.

"... não é fácil ser bom, pois em todas as coisas é difícil encontrar o meio-termo. Por exemplo, qualquer um pode encolerizar-se, dar ou gastar dinheiro - isso é fácil; mas fazê-lo a pessoa que convém, na medida, na ocasião, pelo motivo e da maneira que convém, eis o que não é para qualquer um e tampouco fácil. Por isso a bondade tanto é rara como nobre e louvável."

Autor: Aristóteles
Livro: Ética à Nicômaco

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

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

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

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

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Objetivos	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3. Revisão de Literatura	17
Tolerância central	18
Falhas na tolerância central das células T	23
Tolerância periférica	23
Falhas na tolerância periférica de linfócito T	24
Mecanismos de tolerância periférica	27
Células T regulatórias	27
Fator de transcrição FOXP3	30
Mecanismos de ação das Treg	33
Doenças auto-imunes	36
Doenças alérgicas	36
Doenças infecciosas	37
Câncer	38
Imunodeficiências primárias	38
Linfócitos T efetores e auto-imunidades	39
Características da resposta T dependente	43
Sepse	43
Tolerância ao LPS	47
4. Material e Métodos	49
5. Resultado	52
6. Discussão	64
Referencias Bibliográficas	70

RESUMO

Andrade, MMC. *O efeito da tolerância à endotoxina nos linfócitos T regulatórios e Th17* [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

O controle de respostas imunes patológicas (autoimunidade, alergia, rejeição de transplantes) tem sido um dos principais objetivos dos imunologistas. Apesar dos avanços recentes, a maioria dos tratamentos atuais ainda procura diminuir a imunidade e inflamação em vez de restabelecer o estado saudável da tolerância imunológica. Sepsé é uma doença desencadeada pela presença de bactérias e/ou produtos bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS), componente principal da membrana externa de bactérias gram-negativas, ativando a resposta imune do hospedeiro. A caracterização do perfil de linfócitos na resposta à tolerância ao LPS são de extrema importância para a contribuição do estudo da imunodepressão na sepsé. O objetivo deste estudo foi investigar se a comprovada redução de mortalidade previamente vista em modelo de sepsé animal através tolerância ao LPS, pode ser associada com o aumento da população de linfócitos T CD4⁺ regulatórios e Th17. Camundongos machos C57/6, receberam por via subcutânea (s.c.) injeções de LPS (1mg/kg) durante 5 dias , seguido por perfuração e ligadura cecal (CLP) . Citocinas e linfócitos marcados foram medidos durante, após a tolerância e o desafio CLP. Ambos os subtipos de células T analisados Treg e Th17 , mostrou aumento destas células no baço durante e após a tolerância. Este estudo demonstrou que a mortalidade reduzida depois de tolerância previamente constatada pode ser associada com o aumento da população de células T regulatórias e Th17 devido a imunorregulação do hiperinflamação e recrutamento de neutrófilos.

Descritores: sepsé, inflamação, tolerância, linfócitos T reguladores, células Th17.

ABSTRACT

Andrade, MMC. *The effect of endotoxin tolerance in lymphocytes regulatory and Th17*. [Thesis]. Sao Paulo: "Faculty of Medicine, University of São Paulo"; 2016.

The control of pathological immune responses (autoimmunity, allergy, transplant rejection) has been a major goal of immunologists. Despite recent advances, most current treatments still seeks to reduce immunity and inflammation rather than restore the healthy state of immune tolerance. Sepsis is a disease triggered by the presence of bacteria and / or bacterial products like lipopolysaccharide (LPS), the main component of the outer membrane of gram-negative bacteria, activating the immune response of the host. The characterization of lymphocyte profile in response to LPS tolerance is extremely important for the study of immunosuppression in sepsis contribution. The aim of this study was to investigate whether the proven reduction in mortality seen previously in animal sepsis model by tolerance to LPS, can be associated with the increase in population of CD4 + regulatory and Th17. Mice C57 / 6 mice received subcutaneous (s.c.) injection of LPS (1mg / kg) for 5 days, followed by cecal ligation and puncture (CLP). Cytokines and marked lymphocytes were measured during after tolerance and CLP challenge. Both subtypes of T cells Treg and Th17 analyzed showed an increase of these cells in the spleen during and after tolerance. This study demonstrated that reduced mortality after previously seen tolerance may be associated with increasing the population of regulatory T cells and Th17 because immunoregulation of the hiperinflamação and neutrophil recruitment.

Descriptors: sepsis, inflammation, tolerance, Regulatory T-Lymphocytes, Th17 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática dos mecanismos de seleção positiva e negativa para células T no timo	23
Figura 2 - Estrutura da proteína FOXP3, com o domínio repressor	33
Figura 3 - Regulação da ativação das células T mediada por FOXP3	34
Figura 4 - Modelos de mecanismos de ação das Tregs. (a) Contato célula-célula	35
Figura 5 - Representação esquemática das diferentes vias de diferenciação das células TH0	41
Figura 6 - O efeito da tolerância ao LPS em linfócitos T CD4	54
Figura 7 - O efeito da tolerância ao LPS em linfócitos T REG	55
Figura 8 - O efeito da tolerância ao LPS em linfócitos Th17	55
Figura 9 - O efeito da tolerância ao LPS em citocinas pró-inflamatórias	56
Figura 10 - O efeito da tolerância ao LPS em citocinas anti-inflamatórias	56
Figura 11 - O efeito da tolerância ao LPS nas citocinas da família TH17	57
Figura 12 - O efeito da tolerância ao LPS nas citocinas da família TH17	57
Figura 13 - O efeito da tolerância após a CLP nos linfócitos T CD4	58
Figura 14 - O efeito da tolerância após a CLP nos linfócitos T REG	58
Figura 15 - O efeito da tolerância após a CLP nos linfócitos Th17	59
Figura 16 - O efeito da tolerância ao LPS antes da CLP nas citocinas pró-inflamatórias	60
Figura 17 - O efeito da tolerância ao LPS antes da CLP nas citocinas anti-inflamatórias	60
Figura 18 - O efeito da tolerância ao LPS antes da CLP nas citocinas da família TH17	61
Figura 19 - . O efeito da tolerância ao LPS antes da CLP nas citocinas da família TH17	61

Figura 20 - Efeito do LPS durante 5 dias nas citocinas pró-inflamatórias	
Esplênicas	62
Figura 21 - Efeito do LPS durante 5 dias nas citocinas anti-inflamatórias	62
Esplênicas	
Figura 22 - Efeito do LPS durante 5 dias nas citocinas pró-inflamatórias	
Hepáticas	63
Figura 23 - Efeito do LPS durante 5 dias nas citocinas anti-inflamatórias	
Hepáticas	63
Figura 24 - Perfil das citocinas da família do linfócito TH17 esplênico	
durante a indução à tolerância	64
Figura 25 - Perfil das citocinas da família do linfócito TH17 esplênico	
durante a indução à tolerância	65

1. Introdução

Cada dia mais conforme explicita Lippolis (2008) se acastelam comprovações de que o sistema imunitário é constituído por uma rede complexa e articulado por diversos componentes integrados, sendo possível citar as células com seus distintos receptores, mediadores secretados, moléculas expressas, vias bioquímicas acionadas, entre outros componentes que, em conjunto e em dessemelhantes sítios anatômicos, concedem ao organismo a capacidade de interagir com os distintos estímulos antigênicos.

Todo e qualquer ser vivo está em continuada exposição a agressões vindas do seu ambiente, em sua maioria, o mecanismo de resposta a infecções e danos celulares fica a cargo da imunidade inata, que faz uso de receptores codificados no genoma que reconhecem padrões moleculares comuns a diferentes patogênicos. (Takeda et al., 2003).

Os vertebrados superiores, conforme destacam Mosmann & Coffman (1989) e Reiner (2007) para além da imunidade inata, possuem ainda imunidade adquirida, cujas células fundamentais são os linfócitos. Os linfócitos B segregam anticorpos, os linfócitos T CD8⁺ ligam-se diretamente às células alvos, matando-as através de granzimas e perforina, enquanto os linfócitos T CD4⁺ orquestram e mobilizam outras células para os seus alvos por meio da produção de citocinas.

Segundo esclarece Janeway (2001) de modo geral, as respostas tem início mediante a interação dos antígenos exógenos com células apresentadoras de antígenos, posicionadas de forma estratégica e responsáveis por captação, transporte e processamento antigênico. Uma vez processados, os peptídeos são, então, apresentados

para os componentes da resposta imune específica ou contraída, que, em sendo ativados, desencadeiam resposta efetora contra o estímulo antigênico. Inúmeras vezes, a estratégia de defesa adquirida se torna permanente (memória imunológica), garantindo maior conforto e eficácia ao organismo nas exposições posteriores com a tendência, na expressiva maioria das vezes, a busca pelo equilíbrio homeostático.

Embasados em ensaios funcionais e estudos de expressão protéica, as células T CD4⁺ a princípio foram divididas em dois grupos, Th1 e Th2, exercendo funções distintas na defesa do organismo e segregando díspares grupos de citocinas, para além das Th0 – células *naves* precursoras não diferenciadas. As células Th1 se caracterizam por expressarem o fator de transcrição T-bet, produzindo gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), com desempenho de um papel fundamental na estimulação da fagocitose e na defesa contra micro-organismos intracelulares. As células Th2 expressam o fator de transcrição Gata-3 produzindo interleucina 4 (IL-4), IL-5 e IL-13 e têm um papel importante na defesa contra parasitas extracelulares. (Mosmann & Coffman 1989; Reiner, 2007)

Recentemente, com a descoberta de células T CD4⁺ que produzem IL-17, conforme destacam Reiner (2007); Harrington et. al., (2005); Park et. al., 2005) foi percebida a necessidade de dilatar o grupo das células T auxiliares, assinalando estas últimas como Th17, células que se caracterizam também por propagar um fator de transcrição específico – o ROR γ t – sendo importantes na defesa contra bactérias extracelulares.

Contudo, conforme ainda Reiner (2007) os linfócitos, não obstante da sua ação na defesa do organismo, podem ser também ocasionadores de enfermidades, como a alergia e a auto-imunidades. Enquanto as células Th1 e Th17 podem mediar doenças auto-imunes e inflamatórias, as células Th2 estão associadas a alergia e asma.

O controle das repostas imunitárias patológicas tem se constituído como um dos fundamentais objetivos dos imunologistas. Nos últimos anos, um outro subtipo de células T CD4+ designadas células T reguladoras (Treg) se tornou um dos capitais alvos de investigação, visto que, se mostrou eficaz na prevenção de doenças de base imunológica e na manutenção do estado de tolerância imune, ou seja, o estado em que o sistema imunitário não responde a antigênicos. (Sakaguchi, 2005)

No transcorrer dos anos, o ambiente apresenta uma infinidade de fontes antigênicas potenciais e apenas um sistema imunitário altamente flexível e adaptável, com capacidade de distinguir e responder as variadas sequencias antigênicas encontradas. O alicerce de reconhecimento deste sistema é o produto das recombinações aleatórias de segmentos gênicos que geram linfócitos com enorme diversidade de receptores. Diretamente vinculada a resposta aos diferentes antígenos se encontra a aptidão de regulação, mecanismo responsável por garantir que as respostas não alcancem amplitudes patológicas, e por impedir que o sistema seja ativado indevidamente contra antígenos próprios, originando desordens auto-imunes. Para desempenhar função protetora adequada, segundo Kappler et al., (1987) os múltiplos clones de células T com vasta diversidade de reconhecimento antigênico passam por rígido processo de seleção e maturação tímica que ocorre mediante o reconhecimento de peptídeos próprios ligados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC).

A capacidade de distinção entre antígenos próprios e não próprios é determinada como tolerância imunológica sendo fundamental para evitar o auto-reconhecimento de modo intenso, que ocasionaria respostas auto-imunes patológicas. Deste modo, timocitos auto-reativos que reconhecem antígenos próprios com elevada afinidade são eliminados por deleção clonal no timo. (Reiner, 2007)

De acordo com Burns et al., (1983) ainda que sendo este um mecanismo eficaz, é conhecido que algumas células auto-reativas conseguem evitar esta barreira, saindo do timo e podendo ser acionadas na periferia com potencialidade de gerar auto-imunidades. O fato de que células auto-reativas possam ser detectadas na periferia evidencia, nitidamente, que o mecanismo de seleção tímica, responsável pela eliminação dos clones de células T autorreativas, não é completo.

A sepse, uma das maiores causas de mortalidades em UTIs em todo mundo, é causada por bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e vírus (Vincent, 2000). Desde 1992, a sepse foi definida um subgrupo da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que é caracterizada pela: temperatura acima de 38°C ou abaixo de 36°C ; frequência cardíaca abaixo de 90 bpm; frequência respiratória acima de 20 rpm; nível de PaCO_2 acima de 32 torr e contagem de leucócitos acima 12000/ mm^3 ou abaixo de 4000/ mm^3 (Abraham et al., 2000).

Quando o choque séptico se instala ocorre hipotensão arterial sistêmica e este estado pode progredir para falência de múltiplos órgãos e sistemas (Salvo et al., 1995; Angus et al., 2001; Cipolle et al., 2003).

A alta taxa de mortalidade não tem se modificado nas últimas duas décadas apesar do desenvolvimento de novos antibióticos e aprimoramento de medidas de tratamento intensivo (Martin et al, 2003).

Desta forma, o tratamento permanece de suporte e direcionado para o controle da infecção e correção de distúrbios hemodinâmicos (Angus et al., 2001; Cipolle et al, 2003).

2. Objetivos

2.1 Geral

Revisão analítica no concernente ao efeito inerente á endotoxina nos linfócitos T regulatórios e Th17, com avaliativa se as Tregs são componentes da tolerância imunológica, e ainda, moduladores essenciais na resposta imune à patógenos, alérgenos, células cancerígenas e antígenos próprios.

2.2 Específicos

- Analisar se as células T regulatórias (Tregs) são componentes verdadeiramente importantes da tolerância imunológica;
- Analisar se as células Th17 são componentes verdadeiramente importantes da tolerância imunológica;

3. Revisão de Literatura

Tolerância imunológica é definida como a falta de resposta a antígenos do próprio organismo. A tolerância é um processo ativo que ocorre principalmente nos órgãos linfóides centrais, como o timo (linfócito T) e medula óssea (linfócitos B), com o intuito de impedir que o sistema imune reaja contra antígenos do próprio organismo, mantendo a homeostasia do hospedeiro. Após a indução da tolerância central, tanto os linfócitos T como os B migram para a periferia, onde passam pelo processo de tolerância periférica.

Os antígenos para os quais é induzida a tolerância são denominados de tolerogênicos ou tolerógenos, termo utilizado para distingui-los dos antígenos ou imunógenos, os quais induzem resposta imune efetora. Falhas no processo de autotolerância podem resultar na indução de doenças auto-imunes.

As células T regulatórias (Tregs) conforme descrevem Abbas & Lichtman (2005) são componentes importantes da tolerância imunológica. A tolerância imunológica é definida como a não-resposta a um determinado antígeno (Ag), induzida pela exposição prévia a este, e pode ser central ou periférica.

- **Tolerância central**

É induzida nos órgãos linfóides primários, em consequência ao reconhecimento dos antígenos próprios pelos linfócitos T imaturos. Os precursores dos linfócitos T são gerados na medula óssea e migram para o timo, onde recebem o nome de timócito. Os timócitos imaturos apresentam-se como células que não expressam o receptor de células T (TCR - *T cell receptor*) e nem as moléculas CD4 e CD8 (duplo negativos). Essas células passam pelos processos de proliferação, maturação e seleção positiva e negativa.

Vários aspectos são relevantes ao considerarmos a quebra dos mecanismos de tolerância com consequente desencadeamento e manutenção de anormalidades auto-imunes. Um deles é a natureza multifatorial e poligênica dos quadros auto-imunes, existindo tanto genes vinculados à susceptibilidade ao desenvolvimento das doenças, quanto outros estritamente relacionados à gravidade das mesmas. Uma vez que os mecanismos de recombinação dos múltiplos segmentos gênicos responsáveis por codificar as imunoglobulinas dos linfócitos B (LB) e o TCR dos linfócitos T (LT) sejam

aleatórios, receptores com capacidade para reconhecimento de estruturas próprias são certamente produzidos.

No processo de seleção positiva, o qual acontece no córtex tímico, os timócitos imaturos adquirem a expressão do TCR, além das moléculas CD4 e CD8, tornando-se células duplo positivas ($CD4^+CD8^+$). As células T $CD4^+CD8^+$ interagem com as moléculas do MHC (*Major HistocompatibilityComplex*) das células dendríticas ou células epiteliais do córtex tímico.

As células que não apresentam uma interação adequada MHC-TCR são delidas, ao passo que aquelas que apresentam interação adequada são selecionadas positivamente. Se o reconhecimento do antígeno envolver a ligação do TCR ao complexo peptídeo-MHC de classe II com auxílio da molécula CD4, esta célula se transformará em células T $CD4^+CD8^-$. Entretanto, se a apresentação for mediada pelo MHC de classe I, com auxílio da molécula CD8, será induzida a diferenciação de células T $CD4^-CD8^+$. Após a seleção positiva, os linfócitos T CD4 e as TCD8 migram para a medula tímica, onde passarão pelo processo de seleção negativa.

Na medula tímica, os linfócitos TCD4 e os TCD8 entram em contato com uma grande diversidade de antígenos próprios, apresentados pelas células dendríticas ou pelas células epiteliais da medula tímica. Nessa fase, ocorre expressão do gene AIRE (*autoimmuneregulator*), expresso principalmente nas células epiteliais da medula tímica, promovendo a expressão de vários antígenos teciduais periféricos (expressão gênica promíscua), com o objetivo de ensinar ao linfócito o que ele deve reconhecer como próprio ou não próprio na periferia. Se os linfócitos interagirem com alta afinidade aos

antígenos próprios, esses morrem por apoptose ou podem ser diferenciados em células T reguladoras naturais (nTregs). Aparentemente, a presença de TGF- β induz a diferenciação para nTreg e impede a deleção clonal. Se o reconhecimento for de baixa afinidade, os linfócitos migram para a periferia, onde desempenharão sua função efetora após o encontro com um antígeno estranho.

Os precursores das células T, originados na medula óssea, migram para o timo, onde sofrem modificações sequenciais intensas caracterizando os diferentes estágios de diferenciação dos LT. Na etapa inicial da maturação há proliferação celular dos timócitos na região mais externa do córtex, rearranjo dos genes do TCR e expressão das moléculas de CD3, TCR, CD4 e CD8 na superfície celular.

À medida que os timócitos maturam, migram do córtex para a medula tímica. O estroma tímico consiste de células epiteliais, macrófagos e células dendríticas derivadas da medula óssea além de fibroblastos e moléculas da matriz extracelular. A interação dos timócitos com as células do microambiente tímico é fundamental para a proliferação, a diferenciação celular, a expressão de moléculas de superfície, como o CD4 e CD8, e a criação do repertório de receptores de LT. (Abbas & Lichtman, 2003).

Os timócitos bem-sucedidos na expressão da molécula completa de TCR (cadeias $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$) são submetidos a dois processos diferentes, seleção positiva e, posteriormente, negativa. O processo de seleção positiva baseia-se em critérios de utilidade, com base na avidez de ligação do TCR com o complexo de MHC (restrição pelo MHC). A seleção positiva ocorre no córtex tímico, sendo que os timócitos que apresentam TCR capazes de se ligar ao complexo peptídeo-MHC próprio são estimulados a sobreviver e prosseguem

na maturação. Os timócitos cujos receptores não reconhecem as moléculas de MHC próprias morrem por apoptose, assegurando que os LT sejam restritos ao próprio MHC.

A seleção positiva também associa a restrição das moléculas de classe I e II do MHC aos subtipos de LT, garantindo que as células T CD8⁺ sejam específicas para peptídeos expostos nas moléculas de MHC de classe I e, as CD4⁺, específicas para peptídeos expostos por moléculas de MHC de classe II. A seleção negativa é o processo pelo qual timócitos cujos TCRs se ligam fortemente ao complexo peptídeo-MHC próprio são eliminados, evitando assim a maturação de LT autorreativos. Em tese, o próprio (*self*) imunológico compreende todos os epítomos (determinantes antigênicos) codificados pelo DNA do indivíduo, de modo que todos os demais epítomos sejam reconhecidos como não próprios. (Andersen et al., 1996)

Durante todo o processo de desenvolvimento dos timócitos a maior parte morre por apoptose (em torno de 95%). Isso se deve principalmente aos arranjos mal-sucedidos das cadeias de TCR e aos processos de seleção positiva e negativa, restando apenas uma pequena parcela (3% a 5 %) que se tornam LT maduros (Figura 1).

Figura 1 - A. Ilustração esquemática dos mecanismos de seleção positiva e negativa para células T no timo. Os timócitos duplo-positivos entram em contato com peptídeos próprios ligados às moléculas de MHC sobre células epiteliais no córtex tímico e sobre macrófagos e células dendríticas na medula tímica. Os timócitos, cujo TCR é incapaz de reconhecer o MHC e peptídeo próprios, morrem por apoptose (seleção positiva). Os timócitos, cujos TCRs reconhecem MHC próprio e peptídeo com elevada afinidade, são removidos por apoptose (seleção negativa). **B.** Representação esquemática dos mecanismos de tolerância central e periférica de linfócitos B. Linfócitos imaturos que reconhecem os antígenos próprios com alta afinidade na medula óssea são eliminados por apoptose (1) ou mudam a sua especificidade antigênica (2). Linfócitos não específicos para antígenos próprios e que sofreram o mecanismo de recombinação (3) migram para periferia. As células que encontram autoantígenos na periferia e são ativadas são eliminadas por apoptose ou se tornam anérgicas. Por outro lado, as que não possuem especificidade para antígenos próprios ao encontrarem antígenos exógenos são capazes de gerar uma resposta imune.

- **Falhas na tolerância central das células T**

Podem vir a ocorrer falhas na tolerância central em diversas situações, incluindo defeitos de expressão de moléculas do MHC, como na síndrome do linfócito nu (falta de MHC de classe II, com redução de células T CD4), deficiência de MHC de classe I (redução do número de células T CD8), sinalização defeituosa de linfócitos (síndrome de Wiskott-Aldrich). Mutações nos genes *RAG* e *IL-7R α* causam a síndrome de Omenn, caracterizada pela ausência de rearranjo dos genes do TCR, reduzindo o número de células T. Devido à grande importância do gene AIRE na seleção negativa, pacientes com deficiência desse gene apresentam hipoparatiroidismo, insuficiência adrenal e, às vezes, diabetes mellitus do tipo 1, associados à candidíase (APECED—*autoimmunepolyendocrinopathy-candidiasis-ectodermaldystrophy*).

- **Tolerância periférica**

As células T maduras reconhecem especificamente os Ag próprios presentes nos tecidos periféricos, tornando-se assim incapazes de responder a estes¹. A tolerância periférica tem importância fundamental na resposta a Ag estranhos e no desenvolvimento de doenças auto-imunes. (Kamradt & Mitchison, 2001)

Na periferia, os linfócitos T maduros interagem com antígenos próprios e não reagem contra os mesmos por diversos mecanismos, incluindo alta concentração do antígeno, antígenos crípticos (como cristalino e espermatozóide) ou falta de moléculas

coestimuladoras. No processo de tolerância periférica, os linfócitos T autorreativos podem morrer por apoptose ou se diferenciar em células T reguladoras induzidas (iTregs).

As nTregs podem exercer suas funções reguladoras a partir do momento em que entram na circulação periférica, enquanto as iTregs precisam ser induzidas na periferia, processo que ocorre somente após o reconhecimento de antígenos com baixa afinidade ou pela sinalização alterada do TCR. Na periferia, as células nTregs e as iTregs são importantes para o controle da resposta imune efetora, sendo esse controle mediado por:

- i. produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β),
- ii. contato com a célula T efetora,
- iii. captura de IL-2, citocina importante para a proliferação das células T efectoras, dentre outros mecanismos.

- **Falhas na tolerância periférica de linfócitos T**

Em certas ocasiões, podem existir falhas na indução do processo de tolerância periférica das células T, tornando-as responsivas aos antígenos próprios, o que pode gerar auto-imunidade por diversos mecanismos:

Mimetismo molecular - está bem conhecido que infecções microbianas podem levar a doenças auto-imunes por diferentes processos. Assim, microrganismos podem mimetizar antígenos próprios, os quais podem ser reconhecidos por reação cruzada, visto que esses antígenos têm constituição similar a antígenos próprios. Por exemplo, determinados indivíduos, quando infectados por *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo A, podem produzir anticorpos contra antígenos estreptocócicos que reagem cruzadamente com

antígenos do músculo cardíaco, ocasionando miocardite, como acontece na febre reumática.

Disseminação do epítipo - por ocasião da destruição de células infectadas por microrganismos ou outros processos de lise celular, ocorre liberação de antígenos próprios, os quais são apresentados por APCs (*AntigenPresentingCells*), desencadeando resposta imune contra esses antígenos, e também, contra outros antígenos da mesma proteína ou de antígenos estruturalmente relacionados. Um exemplo bem definido ocorre na encefalopatia experimental auto-imune, a contrapartida da esclerose múltipla humana.

Essa doença caracteriza-se pela desestruturação e destruição da bainha de mielina que reveste os axônios neuronais, havendo produção de diversos epítomos dessa proteína, que são capturados e apresentados por APCs presentes no sistema nervoso central, culminando com a ativação de diversos clones de células T. As células T podem atuar contra a própria mielina ou contra as células oligodendrogliais, responsáveis pela produção da mielina, amplificando o processo da auto-imunidade.

A ativação de células próximas (*bystanderactivation*): esse processo é reflexo da destruição de células infectadas do hospedeiro, com posterior liberação de antígenos próprios, que são apresentados por APCs diferentes daquelas que induziram a resposta efetora contra o patógeno.

Antígenos crípticos - a resposta efetora aos microrganismos ou a exposição a componentes químicos pode expor antígenos crípticos, que são apresentados por APCs, promovendo resposta imune contra estes antígenos. Assim, alguns pacientes que utilizam α -metil-dopa para tratamento de hipertensão arterial podem desenvolver anemia

hemolítica auto-imune, pois a droga pode expor antígenos crípticos da membrana eritrocitária, desencadeando o surgimento de anticorpos anti-hemácias. Ainda, a aterosclerose pode ser induzida pela oxidação de lipídeos (LDL-) da parede arterial, desestabilizando-a e expondo antígenos crípticos. Estes antígenos crípticos podem ser apresentados por APCs, ativando células T efectoras, ou ainda podem induzir a ativação de macrófagos e de proteína C-reativa.

Mecanismos complexos ou associação deles - A artrite reumatóide também é causada pela quebra da tolerância dos linfócitos T. O mecanismo indutor da doença ainda não está bem esclarecido. De alguma forma, ocorre desestruturação de componentes das articulações, com posterior indução de intenso infiltrado inflamatório para esta região. Está bem estabelecido que as células Th17 são responsáveis pelo aumento da produção das quimiocinas IL-8 e CXCL-1 nas articulações, capazes de promover intenso recrutamento de neutrófilos, os quais medeiam a destruição dos componentes das articulações, como a sinóvia, a cartilagem e os ossos.

Deficiência da função ou do número de células T reguladoras - não são capazes de controlar respostas imunes contra a microbiota intestinal, causando doença de Crohn e colite ulcerativa.

No Lupus, os anticorpos patogênicos são dependentes de células TCD4+ de alta afinidade, específicas para componentes nucleares. Ainda não está bem estabelecido o mecanismo pelo qual é desencadeado defeito patogênico primário, pode ser uma falha na tolerância central ou periférica nos linfócitos B, nos linfócitos TCD4+ ou em ambos. Outro efeito ainda pouco conhecido, é a produção excessiva de interferons (IFNs) do tipo

1 por linfócitos do sangue periférico de pacientes com lúpus. É sabido que ocorre falha no mecanismo que impede a ação dos linfócitos T autorreativos no Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE - *systemic lupus erythematosus*), pois quando a doença é ativa ocorre diminuição da capacidade de supressão das células T reguladoras (Tregs). Pesquisas demonstraram que o aumento da atividade do lúpus é associada com a diminuição de células TCD4⁺ CD25^{high}, e com o aumento de células TCD4⁺ Foxp3⁺.

- **Mecanismos de tolerância periférica**

Foram descritos nas células T CD4⁺ e ocorrem através de anergia, deleção clonal e supressão das células T. A anergia pode ser induzida durante o processo de reconhecimento do Ag pelas células T quando:

- a) as células apresentadoras de antígenos (APCs) não expressam as moléculas co-estimulatórias, tornando assim as células T incapazes de responder aos Ag; ou
- b) quando as células T expressam receptores inibidores.

Na deleção clonal ocorre a estimulação repetida das células T por Ag, resultando na morte celular por apoptose. O mecanismo de supressão é exercido pelas Tregs. (Abbas & Lichtman, 2005)

- **Células T regulatórias**

As Tregs representam uma sub população de linfócitos T caracterizados pela expressão da molécula/ CD25⁺ e do fator nuclear FOXP3. Induzem a supressão das células T efectoras, bloqueando a ativação e a função destes linfócitos, sendo assim

importantes no controle da resposta imunológica a Ag próprios e não-próprios. (Campbell & Ziegler, 2007- Sojka et al., 2008)

Atualmente são descritas pelo menos dois tipos de Tregs: naturais e adaptativas. (Bacchetta et al., 2007). As chamadas Tregs naturais expressam constitutivamente o receptor de cadeia α da IL-2 (CD25), sendo assim denominadas CD4⁺CD25⁺. (Yagi et al., 2004)

São produzidas naturalmente nos corpúsculos de Hassal no timo como uma subpopulação de células T funcionalmente distintas e maduras, e representam 5 a 10% das células T CD4⁺ periférica. (Sakaguchi, 2005).

A sinalização para o desenvolvimento das Tregs naturais que ocorre durante a timopoiese normal ainda é desconhecida, porém, acredita-se que estas células possam ser geradas mediante reconhecimento de Ag próprios no timo, através de receptores (TCR) de alta afinidade. (Abbas & Lichtman, 2005 -Piccirillo, 2008).

A interleucina 2 (IL-2) parece ter papel importante no desenvolvimento das Tregs. Experimentos com murinos demonstraram que a deficiência tanto da citocina quanto do receptor, resultou em defeitos graves de Tregs. O que também foi observado em pacientes com deficiência congênita da molécula CD25. (Abbas & Lichtman, 2005 -Piccirillo, 2008).

Além do marcador CD25 as Tregs naturais também expressam outros marcadores de superfície que não são específicos, mas auxiliam na identificação destas células, entre os quais estão: CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), GITR (*Glucocorticoid-*

induced tumor necrosis factor receptor), TNFR-2 (*tumor necrosis factor receptor-2*) e HLA-DR (*human leucocyte antigen*). Dentre estes marcadores o CTLA-4, que é expresso constitutivamente nos linfócitos T CD4+CD25+, é um dos mais estudados e acredita-se que o bloqueio desta molécula possa afetar a função das Tregs. (Read et al., 2006; Gupta et al., 2008).

Outros receptores de superfície descritos nas Tregs são CD27, Fas, CD62L; e os receptores de quimiocina CCR6, CCR7, CCR8 e CD103, o que permite a migração das Tregs até o local de inflamação. (Bacchetta et al., 2007; Gupta et al., 2008).

Entretanto, como nenhum destes marcadores é exclusivo desta subpopulação celular, uma vez que refletem também o estado de ativação do linfócito T, (Gupta, 2008) a descoberta do fator de transcrição FOXP3, crucial no desenvolvimento e função das Tregs, permitiu caracterizar melhor estas células. (Yagi et al., 2004).

Sendo FOXP3 um marcador nuclear, o receptor de IL-7 (CD127), que é regulado negativamente pelo FOXP3, tem sido descrito como um marcador de superfície fidedigno para selecionar as Tregs dentre a subpopulação de linfócitos T, além de caracterizar aquelas com maior função supressora. (Liu et al., 2006; Ndhlovu et al., 2008).

As Tregs denominadas adaptativas, por sua vez são geradas na periferia após uma variedade de estímulos antigênicos ou em condições ditas tolerogênicas. (Bacchetta et al., 2007; Taams et al., 2006).

Estas células exercem sua função através da liberação de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β (Jonuleit & Schmitt, 2003; Sakaguchi, 2006).

Vários tipos de Tregs adaptativas têm sido descritos, incluindo TR1, que produzem IL--10 e cuja função supressiva está bem documentada nas doenças alérgicas, auto-imunes e transplante alogênico (Bacchetta et al., 2007).

Outras Tregs adaptativas citadas são: TR3 (produtoras de TGF- β), células T CD4-CD8-, natural killer, CD8+ supressora e gama-delta (Tang & Bluestone, 2008).

- **Fator de transcrição FOXP3**

A importância de FOXP3 nas Tregs foi bem estabelecida a partir do trabalho de Brunkow *et al.*, ao identificar a mutação do tipo *frameship* no gene FOXP3. (Torgerson & Ochs, 2007).

Esta mutação é responsável pelo fenótipo de camundongos *scurfy*, uma linhagem mutante recessiva, ligada ao X que apresenta distúrbios auto-imunes graves com depleção completa de Tregs e óbito precoce (Torgerson & Ochs, 2007).

Em humanos a deleção funcional do FOXP3 tem sido observada nos pacientes com a síndrome IPEX (*Immunodeficiency, Poliendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome*), caracterizada clinicamente por múltiplas doenças autoimunes, incluindo diarreia, eczema, diabetes com destruição das glândulas endócrinas, insulinite e tireoidite, acometendo meninos e culminando com óbito precoce, ao redor de 2 anos de idade (Campbell & Ziegler, 2007; Torgerson & Ochs, 2007; Gambineri et al., 2003).

O gene FOXP3 humano está localizado no braço curto do cromossomo X, consiste de 11 exons e codifica uma proteína de 431 aminoácidos, também denominada FOXP3.

É expresso predominantemente nas células do timo, baço e linfonodos e particularmente nas células T CD4+CD25+(Yagi et al., 2004).

A proteína FOXP3 é um fator de transcrição, cuja função é exercida sobre regiões reguladoras específicas dentro do DNA, aumentando ou suprimindo a transcrição de genes específicos (Torgerson & Ochs, 2007).

Acredita-se que o fator FOXP3 exerça funções efetora e facilitadora sobre os genes de proteínas chaves na ativação celular, incluindo a IL-2 e o GM-CSF (Torgerson & Ochs, 2007).

As proteínas FOX (*forkhead box*) são componentes de uma família de fatores de transcrição. Estas proteínas têm um domínio ligante de DNA altamente preservado denominado *forkhead/winged-helix*, o qual recebeu este nome devido à forma de dupla-asa, semelhante a uma borboleta (Coffer & Burgering, 2004).

O fator FOXP3 é membro da subfamília P das proteínas FOX e assim como os demais fatores de transcrição, é composto por três domínios (repressor, central e ligante de DNA ou *forkhead*. (Figura 2). No domínio *forkhead* foram identificadas a maioria das mutações que afetam o gene FOXP3, denominadas missenses (as que levam a substituição de um aminoácido por outro); muito embora outros tipos de mutações (deleções ou substituições) possam ocorrer e afetar os outros domínios (Torgerson & Ochs, 2007).

Figura 2 - Estrutura da proteína FOXP3, com o domínio repressor, central composto por dedos de zinco (ZnF) e zíper de leucina (Zip), e o domínio *forkhead*. A régua representa o número de aminoácidos (AA) de 1 a 431. (Adaptado de Torgerson & Ochs, 2007).

O domínio repressor suprime a transcrição gênica mediada pelo fator nuclear de células T ativadas (NFAT- *Nuclear factor of activated T-cells*). O domínio central, que contém um dedo de zinco (ZnF) e um zíper de leucina está envolvido na interação proteína-proteína e o domínio *forkhead* se liga ao DNA (Torgerson & Ochs, 2007).

A sinalização nuclear através da FOXP3 nas Tregs não está ainda bem definida. De acordo com estudos experimentais, após a ligação do Ag com o TCR, há uma atenuação na sinalização celular em decorrência da interação física dos fatores nucleares NF- κ B e NFAT com o fator FOXP3, reprimindo os genes de transcrição das citocinas IL-2, IL-4 e IFN- γ . (Figura 3). Uma outra consequência da ligação de NFAT e FOXP3 é o aumento da expressão de CD25 e CTLA-4. E, finalmente uma terceira hipótese de atuação do FOXP3 seria a ativação de um co-fator com a função de liberar sinais inibitórios após a ligação do TCR com o Ag (Campbell & Ziegler, 2007).

Figura 3 - Regulação da ativação das células T mediada por FOXP3. A) Sinalização nas células T CD4+ efetora. A ligação do receptor de células T (TCR) e da molécula coestimulatória CD28 leva à ativação das vias de sinalização, resultando na translocação de NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) e API (*activator protein 1*), com subsequente transcrição do gene da IL- 2 (interleucina 2); B) Modelo de regulação direta de TCR mediada pela sinalização do FOXP3. Neste modelo, o fator FOXP3 bloqueia a sinalização de TCR através da inibição da ativação mediada pelo NFAT, NF-κB e API; C) Modelo de regulação indireta de sinalização do TCR: o fator FOXP3 modula a sinalização de TCR através da expressão de um fator que pode inibir sinais induzidos pelo TCR. (Adaptado de Campbell & Ziegler, 2007)

- **Mecanismos de ação das Tregs**

Os mecanismos utilizados pelas Tregs para exercer a função supressora ainda não foram esclarecidos. Postula-se que existam pelo menos três mecanismos de atuação destas células (Figura 4) (Sojka et al., 2008; Tang & Bluestone, 2008).

Figura 4 – Modelos de mecanismos de ação das Tregs. (a) Contato célula-célula - Supressão da célula-alvo com liberação de fatores de supressão incluindo o monofosfato de adenosina cíclica (AMPc), citocinas supressivas como o TGF- β , citólise direta ou sinalização negativa através da molécula CTLA-4; (b) Fatores de supressão solúveis como citocinas IL-10, TGF- β e IL-35 ou secreção de fatores supressivos pelas APC como adenosina; (c) Competição – Competição por citocinas que sinalizam através de receptores da cadeia γ comum (IL-2, IL-4 e IL-7). APC: célula apresentadora de antígeno (Adaptado de Sojka *et al.*, 2008).

a - Contato célula – célula

Este tipo de mecanismo depende do contato da Tregs com a célula T CD4⁺ efetora, requer a participação de moléculas de superfície, tais como TGF- β e CTLA-4; além de moléculas citolíticas (Fas e granzima B). A molécula CTLA-4 libera sinais inibitórios após a ligação com o receptor de membrana B7-1 (CD80) expresso em células dendríticas e células T ativadas (Sojka *et al.*, 2008).

Um outro mediador importante é o monofosfato de adenosina cíclica (AMPc), que é liberado pelas Tregs após o contato com as células efectoras através das junções

comunicantes ou *gap junctions*. O AMPc em níveis elevados inibe a proliferação e a diferenciação celular, e em linfócitos leva a uma inibição seletiva da expressão de citocinas, incluindo IL-2 e IFN- γ . Esta inibição pode ocorrer por bloqueio da proteína cinase A (PKA), do fator nuclear NF- κ B, ou através da ativação de um repressor de transcrição chamado ICER (*inducible cAMP early repressor*)(Sojka et al., 2008).

b - Liberação de citocinas inibitórias

Em modelos experimentais *in vivo* o papel das citocinas inibitórias IL-10 e TGF- β 1 na regulação da resposta imunológica é complexo e depende do tempo e contexto desta resposta. O TGF- β além da função supressora sobre as células alvo, exerce a função de modular a expressão de FOXP3 pelas Tregs, sendo capaz de transformar células T periféricas CD4+CD25- em CD4+CD25+, tornando-se alvo importante de estudos relacionados a reação enxerto – hospedeiro. Enquanto a IL-10, inibe a ativação das APCs e é antagonista do IFN- γ , sendo relacionada às reações de controle da inflamação nos tecidos alvo (Sojka et al., 2008).

c - Competição por fatores de crescimento

Uma outra forma de atuação das Tregs seria a competição por fatores de crescimento, em especial a IL-2, com as células-alvo. O que levaria à apoptose células por privação de citocinas. Esta forma de ação seria combinada com outros mecanismos de ação.

- **Tregs nas doenças humanas**

O estudo das Tregs nas doenças humanas tem aumentado nas últimas 3 décadas. São inúmeros trabalhos sobre a possibilidade destas células se tornarem uma opção terapêutica nas doenças alérgicas, auto-imunes, neoplásicas e infecciosas, nestas últimas se destacando a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e também nos pacientes transplantados (Bacchetta et al., 2007; Torgerson & Ochs, 2007)

- **Doenças Auto-imunes**

Diversos estudos relatam alterações em número e função das Tregs em distúrbios auto-imunes. Na esclerose múltipla as Tregs de sangue periférico exibem uma redução na produção de $\text{INF-}\gamma$ e na capacidade de inibir proliferação de células T, disfunção esta, também observada em diabetes tipo I, na psoríase e na *miastenia gravis* (Bacchetta et al., 2007).

Interessante, que nos pacientes com artrite reumatóide o número e a função das Tregs podem ser normais, porém com defeito na inibição de citocinas ($\text{INF-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$) derivadas de células T e monócitos. Assim, o objetivo do tratamento com Tregs nestas doenças visa utilizar mediadores que aumentem a função supressiva da população existente ao invés de simplesmente aumentar o número destas células (Taams et al., 2006).

- **Doenças Alérgicas**

Os estudos relacionados às Tregs e atopia têm mostrado resultados controversos. Os resultados de estudos *in vitro* descrevem que a depleção das Tregs de indivíduos

normais pode aumentar a resposta do tipo Th2 a vários alérgenos incluindo leite, níquel e gramíneas (Taams et al., 2006).

Por outro lado, em amostras de sangue de pacientes alérgicos a pólen, a depleção de Tregs não afetou a liberação de citocinas pelas células T efectoras de pacientes alérgicos a pólen em comparação aos controles (Skrindo et al., 2008).

Nos pacientes com asma grave há relato de alteração na sinalização de quimiocinas relacionadas às Tregs, além de secreção diminuída de IL-10 (Bacchetta et al., 2007).

Provoost *et al.*, (2009) observaram que as Tregs de pacientes com asma intermitente a moderada tinham uma diminuição na expressão da proteína FOXP3. Neste estudo os pacientes em uso de corticóide inalado apresentavam uma tendência à maior expressão de FOXP3, em comparação aos outros.

Um aumento no número de Tregs tem sido descrito nos pacientes com dermatite atópica recebendo baixas doses de ciclosporina e nos pacientes alérgicos a leite de vaca e que adquiriram tolerância naturalmente, com o a progressão da idade. Apesar de não haver um consenso sobre os mecanismos de ação das Tregs, acredita-se que estas células possam ser úteis na compreensão das principais doenças alérgicas, e também ser utilizada para terapêutica nos pacientes atópicos (Provoost *et al.*, 2009).

- **Doenças infecciosas**

Para o controle das respostas imunológicas a infecção, diversos mecanismos são acionados e as Tregs participam ativamente no controle destas respostas. Em estudos

sobre indivíduos infectados pelo *Helicobacter pylori* tem sido demonstrado o aumento na frequência destas células em estômago e duodeno; e em pacientes com hepatite pelo vírus B (HBV) e C (HCV) há um aumento de Tregs em sangue periférico (Taams et al., 2006).

Nos pacientes infectados pelo HIV a progressão da doença está diretamente relacionada a um estado de hiperativação imune, e nestes casos há uma redução no número e na função das Tregs (Eggna et al., 2005).

- **Câncer**

Os trabalhos sobre Tregs nas neoplasias malignas sugerem que o aumento na atividade destas células associa-se a uma resposta prejudicada na imunidade anti-tumoral. Há co-estimulação deficiente das células T CD4⁺ sobre as células T CD8⁺, bem como alteração na citotoxicidade mediada por células NK contra os antígenos tumorais. Uma das formas de inibição das Tregs sobre as células efetoras da imunidade tumoral é a liberação das citocinas IL-10 e TGF- β . Assim, como estratégia terapêutica para o tratamento do câncer, a inibição da função das Tregs pode ter resultados positivos (Taams et al., 2006).

- **Imunodeficiências Primárias**

A síndrome IPEX é o protótipo de associação entre IDP e desregulação imune. Descrita pela primeira vez em 1982 (Powell), nesta síndrome há desregulação grave do sistema imunológico, levando a tireoidite, anemia hemolítica auto-imune, infecções de repetição e nefropatia. O diagnóstico definitivo é baseado na análise de DNA, mostrando a presença da mutação no gene FOXP3. Aproximadamente 20 mutações foram descritas,

e o quadro clínico pode ser mais ou menos grave dependendo do tipo de mutação. O transplante de medula óssea é o único tratamento curativo para IPEX.

Atualmente acredita-se que alguns fenótipos de IPEX ou IPEX-like possam se manifestar mais tardiamente, até mesmo na idade adulta. Outras imunodeficiências que podem apresentar distúrbios numéricos e funcionais das Tregs são: ICV, deficiência de CD25, APECED (*Autoimmune polyendocrinopathy- candidiasis-ectodermal dystrophy*) e síndrome de Wiskottt-Aldrich (Melo et al., 2009).

- **Linfócitos T efetores e auto-imunidades**

Há cerca de 20 anos, os LT efetores CD4+ começaram a ser categorizados em dois subtipos distintos, T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2), tomando por base o padrão de citocinas produzido. Alguns autores valorizavam ainda a existência de uma terceira população celular, as células Th0, representadas por linfócitos indiferenciados capazes de produzir citocinas do perfil Th1 e Th2. Atualmente está claro que, após a estimulação antigênica, conforme o ambiente local de citocinas, os LT CD4+ *naive* se proliferam e se diferenciam em diferentes subtipos efetores com características próprias (Th1, Th2, Th3, TREG, Th17), determinadas pelo perfil de citocinas produzidas e pelas propriedades funcionais.

Conforme esquematizado na Figura 4, as células Th1 se caracterizam sobretudo pela produção de grandes quantidades de INF- γ , enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13. As respostas Th1 desencadeiam os mecanismos de hipersensibilidade tardia, ativam macrófagos e são muito eficientes na eliminação de patógenos intracelulares.

As células Th2 são mais eficientes em auxiliar a resposta imune humoral, desencadeando produção de imunoglobulinas e inflamação eosinofílica, respostas estas mais importantes no combate aos patógenos extracelulares. Os linfócitos Th0 evoluem para diferenciação Th1 ou Th2 ainda em um estágio inicial da ativação celular. Caracteristicamente, as citocinas do perfil Th1 ou Th2 direcionam para o desenvolvimento de sua respectiva via, inibindo a expressão do padrão oposto. Deste modo, uma vez polarizada a resposta imune para o padrão Th1, a via Th2 será inibida, e vice-versa. Isso ocorre devido à regulação do nível de receptores de membrana, da expressão diferencial de fatores de transcrição e de mudanças epigenéticas (Abbas & Lichtman, 2003).

Figura 5 - Representação esquemática das diferentes vias de diferenciação das células TH0 com destaque para as citocinas indutoras da diferenciação Th1, Th2, Th17 e TREG e as principais citocinas secretadas.

As respostas imunes efetoras desreguladas, ou exacerbadas, podem levar ao desenvolvimento de doenças alérgicas e auto-imunes. As células Th1 são potencialmente pró-inflamatórias e têm sido associadas à indução e progressão de doenças auto-imunes. Entretanto, estudos em camundongos transgênicos, deficientes de INF- γ ou de seu receptor, demonstraram que a perda da sinalização associada ao INF- γ não confere resistência ao desenvolvimento de auto-imunidades.

Ao contrário, esses animais se apresentam até mais susceptíveis. Uma vez que o INF- γ é uma das principais citocinas das células Th1, essas observações levaram ao questionamento do papel exclusivo das células Th1 na fisiopatologia de doenças auto-imunes, abrindo perspectivas para a busca de outro subtipo de LT, distinto da subpopulação Th1, capaz de induzir inflamação tecidual e auto-imunidades.

A necessidade de compreensão dos mecanismos imunológicos responsáveis pelas lesões teciduais em diversas enfermidades inflamatórias crônicas e o desenvolvimento de estudos sobre populações de LT efetores levaram à caracterização de LT produtores de IL-17, denominados linfócitos Th17. Pesquisas recentes têm demonstrado que a subpopulação específica de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17, mais do que células Th1, possui um papel central na patogênese de modelos experimentais de doenças auto-imunes (O'Shea et al., 2008).

Estudos realizados em doenças auto-imunes como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, esclerose múltipla, esclerose sistêmica, doença inflamatória intestinal, espondilite anquilosante e artrite idiopática juvenil demonstraram

a presença de níveis elevados de produtos inflamatórios relacionados à via efetora Th17 ou mesmo a sua participação direta nos mecanismos fisiopatogênicos.

Os conceitos atuais em imunopatologia das doenças inflamatórias crônicas apontam para o papel central das células Th17, que seriam responsáveis por mediar a inflamação tecidual precoce, produzindo citocinas pro - inflamatórias e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de células Th1 aos sítios inflamatórios. Mesmo que células T reguladoras (TREGs) se acumulem também nesses locais, a presença de altos níveis de citocinas inflamatórias torna as células-alvo menos susceptíveis à imunorregulação e diminui o poder imunossupressor das TREGs.

Estudos realizados por Veldhoen et al., (2008) vêm demonstrando uma grande flexibilidade no programa de diferenciação dos LT CD4+, existindo uma estreita associação entre a via Th17 e as vias Th1 e TREG.

Dependendo das condições de estímulo e do meio no qual se encontram, as células Th17 podem se diferenciar tanto em células Th1 como em células T, o que altera significativamente o resultado final da resposta imune. (Veldhoen et al., (2008) Dentro deste contexto atual, uma nova subpopulação de LT efetores foi proposta, as células Th9. Os linfócitos Th9 foram recentemente descritos em murinos como células produtoras de grandes quantidades de IL-9, citocina importante nas respostas contra parasitas intestinais. Foi demonstrado também que elas são o resultado da polarização de linfócitos Th2 estimulados na presença de TGF- β e IL-4, e que não apresentam nenhum dos fatores de transcrição característicos das vias Th1, Th2, Th17 ou T. O papel da IL-9 tem sido muito bem documentado na fisiopatologia das condições alérgicas crônicas, no entanto,

muito pouco se sabe sobre o papel dessas células nas diversas doenças humanas (Dardalhon et al., 2008).

A compreensão destas vias de diferenciação e de seus desequilíbrios nas várias enfermidades auto-imunes poderá ajudar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visam a ampliar a ação das células reguladoras juntamente com o controle da resposta inflamatória efetora.

- **Características da resposta T dependente**

A resposta humoral frente a Ag protéicos requer o reconhecimento do antígeno pelos LT auxiliares e sua cooperação com os LB antígenos-específicos, estimulando a expansão clonal dos LB, a mudança de classe, a maturação de afinidade e a diferenciação em LB de memória (Abbas et al., 2007).

Os LT expressam na sua superfície moléculas CD40L, que interagem com seu ligante, CD40, presente na superfície de LB, e expressam também CD28 que se liga às moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), cuja expressão na membrana dos LB ativados é significativamente aumentada. Esses dois pares de moléculas, CD40/CD40-L e CD28/B7, permitem a transmissão dos sinais de estímulo e induzem a produção de enorme variedade de citocinas (Abbas et al., 2007).

- **Sepse**

A sepsé, uma das maiores causas de mortalidades em UTIs em todo mundo, é causada por bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e vírus (Vincent, 2000).

Desde 1992, a sepse foi definida um subgrupo da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que é caracterizada pela: temperatura acima de 38°C ou abaixo de 36°C; frequência cardíaca abaixo de 90 bpm; frequência respiratória acima de 20 rpm; nível de PaCO₂ acima de 32 torr e contagem de leucócitos acima 12000/ mm³ ou abaixo de 4000/mm³ (Abraham et al., 2000).

Quando o choque séptico se instala ocorre hipotensão arterial sistêmica e este estado pode progredir para falência de múltiplos órgãos e sistemas (Salvo et al., 1995; Angus et al., 2001; Cipolle et al., 2003).

A alta taxa de mortalidade não tem se modificado nas últimas duas décadas apesar do desenvolvimento de novos antibióticos e aprimoramento de medidas de tratamento intensivo (Martin et al., 2003). Desta forma, o tratamento permanece de suporte e direcionado para o controle da infecção e correção de distúrbios hemodinâmicos (Angus et al., 2001; Cipolle et al., 2003).

- **Fisiopatologia da Sepse**

Hotchkiss et al., (2003) destaca que quando a invasão microbiana ocorre, a primeira linha de defesa do hospedeiro é realizada pela imunidade inata através de uma rápida reação inflamatória mediada principalmente por monócitos, neutrófilos e células endoteliais (ECs).

Além de uma série de substâncias quimiotáticas para neutrófilos tais como fragmentos do complemento, IL-8, peptídeos quimiotáticos e leucotrienos que aumentam o número dessas células, no sítio da lesão. Os leucócitos são recrutados por componentes

bacterianos que estimulam diretamente o aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio (Vasselon & Detmers, 2002).

Adicionalmente a esta rápida resposta inespecífica, citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-1, estimulam a liberação de outros mediadores inflamatórios como espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS), óxido nítrico (NO), metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF), peptídeos vasoativos (bradicinina, angiotensina, peptídeo intestinal vasoativo), uma variedade de produtos derivados do complemento, e outras citocinas (por exemplo, IL-6) que amplificam a resposta à infecção (Nguyen et al., 2006).

- **Mecanismos moleculares de ação do LPS**

Muitas características fisiopatológicas da SEPSE vêm sendo atribuídas à regulação da resposta imune aos vários componentes da bactéria durante a sua infecção. O lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede de bactérias Gram-Negativas, possui um grande poder ativador da resposta imune via receptor de TOLL 4 (Foster et al., 2007).

Os componentes liberados durante a infecção a bacteriana induzem a produção de radicais livres tendo como consequência a deregulação da resposta imune e produção excessiva de espécies reativas derivadas de oxigênio e nitrogênio, os quais foram propostos em desempenhar tanto um papel um anti-microbiano, como um papel deletério ao organismo hospedeiro (Cuzzocrea et al., 2001).

A interação do LPS com os linfócitos, bem como as células natural killers (NK) e células B, além dos macrófagos levam a formação e liberação de mediadores inflamatórios que são críticos à defesa adaptativa à defesa anti-bactericida (Hotchkiss et al. 2001, 2005; Kusuda et al., 2005; Pinheiro-da-Silva et al., 2006).

Durante o processo inicial da infecção bacteriana, estes microorganismos são rapidamente eliminados pela resposta inflamatória agressiva (Hoffmann et al 1999).

No entanto, durante uma invasão bacteriana maciça ou persistente, os linfócitos são danificados e a depuração das bactérias é severamente comprometida tendo como consequência o desenvolvimento de uma supressão imune que contribui para a disfunção de múltiplos órgãos e morte na fase posterior da doença (Hotchkiss et al., 1999, 2001, 2002; Hotchkiss e Karl, 2003).

Apesar do entendimento dos mecanismos de resposta à SEPSE esteja em crescimento ainda não há um tratamento imunomodulatório definido para tal. Vem sendo descrito o fenômeno da tolerância ao LPS que é definido como fenômeno hiporresponsivo de transição da resposta imune da célula do hospedeiro a exposições repetidas ou crescentes de baixas doses de LPS (Fan & Cook, 2004).

As células respondem ao estresse através da ativação primitiva conservados geneticamente por programas que mantêm a homeostase assegurando a sobrevivência celular. Esse mecanismo vem sendo observado na natureza em geral, o qual envolve uma exposição primária de uma célula ou do organismo a um estímulo de estresse elucidando a uma subsequente resposta adaptativa (Cavaillon et al., 2003; Cavaillon e Adib-Conquy, 2006).

- **Tolerância ao LPS**

A resistência ao LPS pode ser determinada geneticamente ou adquirida. Animais de experimentação submetidos a exposição prévia a doses sub-letais de LPS pode induzir um estado de resistência adquirida e tornar estes animais resistentes a doses letais, pirogênicas e metabólicas de LPS. O fenômeno da interrupção da mortalidade associada com LPS, ou então chamado como tolerância a endotoxina, não é específico à ação de LPS e apresenta reação cruzada com outros estímulos, tais como, peptidoglicano, lipoproteína das bactérias, estresse hipertérmico, lipoaribinomannan, ácido lipoteicoico, micobacterium, muramil dipeptideo, 25-hidroxi-colesterol, estresse cirúrgico, isquemia, TNF e IL-10 (Christians et al., 2002; West & Heagy, 2002).

As fases inicial e tardia de tolerância com características diferentes seguem a injeção inicial do LPS. A fase inicial pode ser detectada dentro das primeiras 24 horas depois de exposição ao LPS e pode durar até 8 dias. A tolerância ao LPS relaciona-se à produção e liberação reduzida de citocinas pelos fagócitos em re-exposição ao LPS.

Além disso, foi demonstrado que a exposição prévia ao LPS resulta em alteração de padrão de expressão gênica das citocinas (Staudt, 2001). Parece que a tolerância a endotoxina resulta de alterações em rotas de transdução de sinal induzidas pelo LPS. Inicialmente foi proposto que a tolerância seria uma resposta imune benéfica, entretanto as evidências indiretas sugerem-na como um marcador ou participante de desregulação imune, complicando o manejo de pacientes em sepse severa.

- **A tolerância e o perfil de linfócitos**

A orientação da resposta imune para Th1, Th2, Th17 ou Treg desempenha um papel importante na defesa contra agentes patogênicos e tumores. Contudo, esta orientação não foi completamente caracterizada no modelos de indução à tolerância ao LPS. Dudek & Bednarek (2011) verificaram no sangue periférico de pombos tolerantes ao LPS um aumento na percentagem de células CD3+, CD4+ e CD8+ em resposta à injeção única de LPS. Porém, após as injeções consecutivas de LPS, verificaram um decréscimo na porcentagem de células CD4+ e aumento das células CD3+ e CD8+. Camundongos tolerantes demonstraram um aumento na porcentagem de células CD4+Th17+ (Zhang et al., 2010).

Caramalho et al. (2011) observaram acréscimo na população de linfócitos Treg em camundongos diabéticos. No entanto, é de grande importância que seja estabelecida a imunofenotipagem dos linfócitos dos camundongos após indução à endotoxemia.

4. Material e Métodos

4.1 Animais

Camundongos C57BL/6 machos com seis semanas de idade pesando entre 20 e 25 gramas foram randomizados em 2 grupos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina (248#/12). Todos os animais foram tratados de acordo com as regras institucionais para animais de laboratório.

4.2 Indução à tolerância

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: o grupo naïve controle recebeu por via subcutânea (sc), injeções intraperitoneais de 0,2 ml de solução salina, enquanto que o grupo de tolerante ao LPS recebeu injeções repetidas de LPS intraperitoneais (1mg/kg,sc) durante 5 dias (de *Escherichia coli* 026 : B6 Sigma) . Os camundongos foram eutanasiados no 8º dia .

4.3 Modelo de Ligação e punção cecal (CLP)

Para indução da sepse polimicrobiana, os camundongs foram submetidos a CLP como descrito anteriormente (Scumpia et al., 2005; Oberholzer et al., 2002). Em resumo , foi realizada uma laparotomia e o ceco foi isolado, ligado abaixo da válvula íleo-cecal, e 3 vezes puncionada com uma agulha de calibre 23. A operação dos animais SHAM foi realizada através do isolamento do ceco sem ligadura ou punção. Os animais foram devolvidos às suas gaiolas com livre acesso a comida e água.

4.4 Grupos dos animais

Os grupos foram separados como: BASAL - amostra do animal, sem qualquer procedimento de tolerância ou operação; 4 HS TOL - amostra de animais recolhidas 4 horas após submetidos injeção de LPS (1mg/kg); 7 D TOL - amostra de animais recolhidos após 5 dias de aplicação de LPS (1mg/kg) e mais 2 dias de descanso sem procedimento de operação ; SHAM - amostra de animais submetidos à operação simulada ; SHAM TOL - amostra de animais tolerantes submetido a procedimento simulado ; CLP ; CLP TOL - amostra de animais tolerantes submetidos à operação de CLP .

Ao realizar novos estudos posteriores, outros grupos foram formados para análise da concentração proteica. 1D - amostra de animais recolhidas 4 horas após submetidos injeção de LPS (1mg/kg); 2D - amostra de animais recolhidas 4 horas após submetidos à 2ª injeção de LPS dada 24 horas após a primeira; 3D - amostra de animais recolhidas 4 horas após submetidos à 3ª injeção de LPS dada 48 horas após a primeira; 4D - amostra de animais recolhidas 4 horas após submetidos à 4ª injeção de LPS dada 72 horas após a primeira; 5D - amostra de animais recolhidas 4 horas após submetidos à 5ª injeção de LPS dada 120 horas após a primeira.

4.5 Coleta das amostras

4.5.1 Células do sangue e do baço para análise em Citrometria de Fluxo

Os camundongos foram anestesiados com ketamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) i.p. As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca, centrifugou-se 400g X durante 10 minutos . O plasma foi removido e o sangue vermelho embalado Incubou-se com tampão de lise(0,16M e 0,17M TRIS NH₄CL) a porção vermelha do sangue restante. As células foram lavadas, contadas e 10⁶ células foram ressuspensas em

PBS . Para analisar as células esplênicas, órgãos inteiros foram recolhidos, macerados, e as células suspensas em 2 mL de PBS, posteriormente foram lavadas e incubadas em tampão de lise. Depois as células foram lavadas 3 vezes , contadas e ressuspensas 10^6 células em PBS.

4.5.2 Proteínas esplênicas e hepáticas para avaliação de citocinas

Baço e fígado foram colhidos e colocados em tampão (100mM Tris- HCl pH7,4; 100mM NaHPO₄; 100mM de fluoreto de sódio; 10mM de EDTA; 2 mM de PMSF, 0,2mg/ml de aprotinina, 10% de Triton - X100) e clarificados por centrifugação a 11.000 rpm, 4°C. A concentração total de proteína foi medida por Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontário, Canadá).

4.6 Citometria de Fluxo

As analyses de Citometria de Fluxo foram feitas utilizando Guava 8HT (Millipore, USA). Células do baço e do sangue de animais controle e tolerantes foram coletados e marcados com anticorpos de marcação de superfície anti-mouse (BioLegend): CD4-PE, CD25- APC/Cy7. Anteriormente a membrana celular foi permeabilizada com saponina, e os marcadores do interior celular foi marcados com os anticorpos anti-mouse: FOXP3-PE/Cy7, IL-17a- APC e IL-6-FITC (BioLegend).

4.7 Determinação da concentração de citocinas no baço e fígado

Um painel de 13 citocinas foi mensurado através da tecnologia Miliplex® (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), um método multiplex para análise de citocinas. Este painel incluiu: TNF α , INF γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17A, IL-17E, IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-23.

4.8. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DV) e analisados com análise de variancia (ANOVA; a mixed-model, factorial ANOVA). O Teste de Turkey foi used para avaliar as diferenças significativas entre os grupos. Foi utilizado o valor de p menor ou igual a 0.05 para considerar significancia estatística.

5. Resultado

A tolerância LPS afeta os linfócitos CD4, Treg e Th17.

Animais tolerantes apresentaram um aumento da população de linfócitos T CD4 no sangue (Fig.1a) e baço (Fig.1b). O mesmo foi observado em linfócitos T regulatórios (Fig.2) e linfócito TH17 (Fig.3). Para examinar se uma população de células específica do sangue e do baço foi estimulada pela tolerância por LPS, as populações isoladas de células T CD4, CD25, FOXP3, citocinas IL-17 e IL-6 foram analisadas por citometria de fluxo.

Foi observado um aumento significativo de expressão de CD4+CD25+FOXP3+ ($p < 0,05$). Os linfócitos TH17 que foram marcados por linfócitos TCD4+IL17+ e verificou-se expressão significativamente elevada desta população ($p < 0,05$).

Figura 6. O efeito da tolerância ao LPS em linfócitos T CD4. Quantificação por citometria de fluxo de CD4 no baço (a) e sangue (b) no grupo (BASAL); coletado 4 horas após a primeira dose de LPS (4H TOL) e coletado 2 dias após a última dose de LPS (7D TOL). (*) $p < 0,05$ comparado com grupo Basal; (#) $p < 0,05$ comparado ao grupo 4HS TOL ($n = 5$ para cada grupo).

Os linfócitos TCD4 do sangue (ver Fig. 6a) e do baço (Fig. 6b) de animais induzidos à tolerantes aplicando doses de LPS durante 7 dias apresentaram significativamente aumentados em comparação com as amostras de animais basais e ao comparando-se aos animais analisados 4 horas após a primeira dose de LPS (1mg/kg).

Este aumento do número de linfócitos também foi verificado em células T regulatórias (Treg). As Tregs apresentaram aumento significativo no sangue (Fig. 7a) e baço (Fig. 7b) em camundongos induzidos à tolerância por 7 dias.

Foi verificado aumento do número de células TH17 no sangue (figura 8a) e baço (Fig. 8b) nos animais induzidos à tolerância por 7 dias. A IL-6 produzida por Th17 também apresentou aumento significativo nestes animais 7 dias tolerantes em relação aos animais basais, no sangue (Fig. 8c) e em comparação com 4 horas tolerantes no baço (Fig. 8d).

Figura 7. O efeito da tolerância ao LPS em linfócitos T REG. Quantificação por citometria de fluxo de CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ no baço (a) e sangue (b) no grupo (BASAL); coletado 4 horas após a primeira dose de LPS (4H TOL) e coletado 2 dias após a última dose de LPS (7D TOL). (*) $p < 0,05$ comparado com grupo Basal; (#) $p < 0,05$ comparado ao grupo 4HS TOL (n=5 para cada grupo).

Figura 8. O efeito da tolerância ao LPS em linfócitos Th17. Quantificação por citometria de fluxo de CD4⁺IL17⁺ (a,b) e CD4⁺IL17⁺IL6⁺ (c,d) no baço (a,c) e sangue (b,d) no grupo (BASAL); coletado 4 horas após a primeira dose de LPS (4H TOL) e coletado 2 dias após a última dose de LPS (7D TOL). (*) $p < 0,05$ comparado com grupo Basal; (#) $p < 0,05$ comparado ao grupo 4HS TOL (n=5 para cada grupo).

O efeito da tolerância ao LPS em citocinas foi avaliada pela técnica de multiplex, quando um painel de citocinas foi analisada a partir de proteínas de baço extraído dos animais

grupos estudados. Bem como nos linfócitos, a tolerância ao LPS mostrou aumento de grande parte da citocina painel.

Figura 9. O efeito da tolerância ao LPS em citocinas pró-inflamatórias. Níveis das citocinas IL1β(a), TNFα (b) e INFγ (c) foram determinadas no grupo (BASAL); coletado 4 horas após a primeira dose de LPS (4H TOL) e coletado 2 dias após a última dose de LPS (7D TOL). (*) $p < 0,05$ comparado com grupo Basal (n=5 para cada grupo).

Houve um aumento significativo das citocinas pró-inflamatórias IL-1β (Fig. 9a) e TNFα (ver Fig. 9b) na proteína de baço de animais tolerantes 4 horas após a primeira dose de LPS, em relação ao basal.

A citocina de ativação e proliferação de linfócitos, IL-2 (Fig. 9a), mostrou um aumento significativo no baço dos animais 7 dias tolerantes em relação ao basal e 4 horas tolerantes. O mesmo foi verificado para as citocinas anti-inflamatórias de IL-4 (Fig. 9b) e IL-10 (Fig. 9c).

Figura 10. O efeito da tolerância ao LPS em citocinas anti-inflamatórias. Níveis das citocinas IL2(a), IL4 (b) e IL10(c) foram determinadas no grupo (BASAL); coletado 4 horas após a primeira dose de LPS (4H TOL) e coletado 2 dias após a última dose de LPS (7D TOL). (*) $p < 0,05$ comparado com grupo Basal; (#) $p < 0,05$ comparado ao grupo 4HS TOL (n=5 para cada grupo).

As citocinas IL-17A (Fig. 10A) e IL-17F (Fig. 10B), que são constituintes do complexo IL-17 e caracterizam o linfócito subtipo Th17 (Korn et al., 2009), foram significativamente aumentados em animais 7 dias tolerantes comparados para os animais basais e 4 horas tolerantes.

A citocina IL-6 (Fig. 10c) apresentou-se significativamente mais elevada no baço de animais tolerantes por 4 horas. O mesmo foi observado na citocina IL-22 (Figura 11b). No baço animais tolerantes 7 dias verificou-se um aumento significativo de IL-21 (Fig. 11a) e IL-23 (Fig. 11c).

Figura 11. O efeito da tolerância ao LPS nas citocinas da família TH17. Níveis das citocinas IL17a (a), IL17f (b) e IL6 (c) foram determinadas no grupo (BASAL); coletado 4 horas após a primeira dose de LPS (4H TOL) e coletado 2 dias após a última dose de LPS (7D TOL). (*) $p < 0,05$ comparado com grupo Basal ($n=5$ para cada grupo).

Figura 12. O efeito da tolerância ao LPS nas citocinas da família TH17. Níveis das citocinas IL21 (a), IL22 (b) e IL23(c) foram determinadas no grupo (BASAL); coletado 4 horas após a primeira dose de LPS (4H TOL) e coletado 2 dias após a última dose de LPS (7D TOL). (*) $p < 0,05$ comparado com grupo Basal ($n=5$ para cada grupo).

O efeito de tolerância LPS anteriormente à Punção e ligadura Cecal (CLP)

Quando os animais foram sujeitos a CLP após a tolerância LPS foi encontrado um aumento da população de células T CD4 (Fig.12), Treg (fig.13) e TH17 (Fig.14), este aumento foi observado na análise da tolerância LPS sem o desafio de CLP. Os animais tolerantes submetidos a CLP apresentou um aumento significativo de linfócitos T CD4

no sangue (Figura 12a) e baço (Figura 12b), de acordo com os achados de outros autores (Melo et al., 2010).

Tanto no sangue periférico (Fig. 13a) e baço (Fig. 13b) células T regulatórias tiveram um aumento significativo quando comparado ao grupo SHAM, SHAM tolerante e animais CLP. O mesmo foi observado quando os linfócitos TH17 foram analisados.

Figura 13. O efeito da tolerância após a CLP nos linfócitos T CD4. Quantificação por citometria de fluxo de células T CD4 em baço (a) e sangue (b) em animais do grupo SHAM, SHAM tolerantes, CLP e CLP tolerante. (*) $p < 0,05$ comparado com grupo SHAM; (#) $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM TOL; (§) $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP (n=5 para cada grupo).

Figura 14. O efeito da tolerância após a CLP nos linfócitos T Reg. Quantificação por citometria de fluxo de células T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ em baço (a) e sangue (b) em animais do grupo SHAM, SHAM tolerantes, CLP e CLP tolerante. (*) $p < 0,05$ comparado com grupo SHAM; (#) $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM TOL; (§) $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP (n=5 para cada grupo).

(Fig.10b) de animais CLP tolerantes em comparação aos animais SHAM tolerantes e CLP e SHAM, respectivamente.

Foi verificado o aumento significativo da Th17 produzindo IL- 6 no sangue de animais CLP tolerante (Fig. 15c). No baço (Fig. 15d), este aumento significativo foi observado nos animais SHAM Tolerante, CLP e CLP tolerantes quando comparados ao grupo controle SHAM, mas não houve diferença significativa entre estes grupos aumentados.

Figura 15. O efeito da tolerância após a CLP nos linfócitos Th17. Quantificação por citometria de fluxo de células T CD4⁺IL17⁺ (a,b) e CD4⁺IL17⁺IL6⁺ (c,d) em baço (a,c) e sangue (b,d) em animais do grupo SHAM, SHAM tolerantes, CLP e CLP tolerante. (*)p<0,05 comparado com grupo SHAM; (#) p<0,05 comparado ao grupo SHAM TOL; (§) p<0,05comparado ao grupo CLP (n=5 para cada grupo).

No baço, o citocinas pró-inflamatórias de IL-1 β (Fig. 16a) e TNFa (Fig. 16b), aumentaram significativamente em animais CLP tolerantes. Bem como as citocinas anti-inflamatórias IL-2 (Fig.17a), IL-4 (fig.17b) e IL-10 (Fig. 17c).

Figura 16. O efeito da tolerância ao LPS antes da CLP nas citocinas pró-inflamatórias. Níveis das citocinas IL1 β (a), TNF α (b) e INF γ (c) foram determinadas no grupo SHAM, SHAM tolerante, CLP e CLP tolerante. (*)p<0,05 comparado com grupo SHAM; (#) p<0,05 comparado ao grupo SHAM TOL; (n=5 para cada grupo).

Figura 17. O efeito da tolerância ao LPS antes da CLP nas citocinas anti-inflamatórias. Níveis das citocinas IL-2(a), IL-4(b) e IL-10(c) foram determinadas no grupo SHAM, SHAM tolerante, CLP e CLP tolerante. (*)p<0,05 comparado com grupo SHAM; (#) p<0,05 comparado ao grupo SHAM TOL; (n=5 para cada grupo).

A família de citocinas do linfócito Th17 no baço mostrou também um aumento significativo dos seus níveis em animais CLP tolerantes. A citocina IL-17a (Fig. 18a) aumentou significativamente em comparação à SHAM e CLP; IL-17F (Fig. 18b), IL-6 (Fig. 18c) e IL-22 (Fig. 19b) aumentaram significativamente em comparação com os animais SHAM, SHAM tolerante e CLP. A citocina IL-21 (Fig. 19a) apresentou um aumento significativo no baço de animais CLP tolerantes comparados com os animais SHAM e SHAM tolerantes. A IL-23 (Fig. 19c) foi a única citocina que apresentou diferença significativa em comparação com somente os animais SHAM.

Figura 18. O efeito da tolerância ao LPS antes da CLP nas citocinas da família TH17. Níveis das citocinas IL17a (a), IL17f (b) e IL6 (c) foram determinadas no grupo SHAM, SHAM tolerante, CLP e CLP tolerante. (*) $p < 0,05$ comparado com grupo SHAM; (#) $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM TOL; (n=5 para cada grupo).

Figura 19. O efeito da tolerância ao LPS antes da CLP nas citocinas da família TH17. Níveis das citocinas IL21 (a), IL-22(b) e IL-23(c) foram determinadas no grupo SHAM, SHAM tolerante, CLP e CLP tolerante. (*) $p < 0,05$ comparado com grupo SHAM; (#) $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM TOL; (n=5 para cada grupo).

Posteriormente às análises feitas das citocinas presentes no baço dos camundongos dos grupos avaliados, viu-se a necessidade em verificar as concentrações dos mesmos dia a dia durante a aplicação de LPS (1mg/kg) na indução à tolerância. Além do baço, o fígado também foi analisado.

- **Perfil das Citocinas Pró-Inflamatórias e anti-inflamatórias no Baço durante a indução à tolerância**

Ao efetuar analisar as citocinas pró-inflamatórias – $\text{INF}\gamma$, $\text{IL}1-\beta$ e IL-6 - presentes no baço, verificou-se que elas apresentaram um aumento significativo no início da indução à tolerância e posteriormente foram diminuindo suas taxas, algumas chegando à zero, exemplo a IL-6 (ver figuras 20a,20b e 20c).

Figura 20. Efeito do LPS durante 5 dias nas citocinas pró-inflamatórias esplênicas. Níveis de citocinas esplênicas INF γ (a), IL-1 β (b) e IL-6(c) dos grupos Basal, Dose 1, Dose 3, Dose 4, Dose 5, Dose 6 e Dose 7. (*) $p < 0.05$ comparado grupo BASAL; (#) $p < 0.05$ comparado Dose 1; (§) $p < 0.05$ comparado com dose 1 (n=5 para cada grupo).

As citocinas anti-inflamatórias analisadas apresentaram em sua maioria um perfil parecido de alta concentração basal e queda ao longo da indução à tolerância. A citocina IL-10 (ver Fig.21c) apresentou um aumento significativo na sua concentração na primeira dose de LPS em relação às doses subsequentes. E, apesar da citocina IL-4 (ver Fig.21b) apresentar uma tendência no aumento de sua concentração no 7º dia após o início da indução à tolerância, o aumento não foi significativo.

FIGURA 21. Efeito do LPS durante 5 dias nas citocinas anti-inflamatórias esplênicas, Níveis de citocinas esplênicas IL-2(a), IL-4(b) e IL-10(c) dos grupos Basal, Dose 1, Dose 3, Dose 4, Dose 5, Dose 6 e Dose 7. (*) $p < 0.05$ comparando ao grupo BASAL; (#) $p < 0.05$ comparado

- **Perfil das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no Fígado durante a indução à Tolerância**

Em consonância com o observado no baço dos animais induzidos à tolerância, no fígado, as citocinas pró-inflamatórias analisadas apresentaram em sua maioria um perfil parecido de aumento a partir da primeira dose de LPS, posterior queda e aumento ao final do período da dose e 7º dia após início da indução da tolerância (ver Fig. 22a e 22c). A

citocina IL-1 β (ver Fig.22b) apresentou uma diminuição significativa da sua concentração em relação à dose 1.

FIGURA 22. Efeito do LPS durante 5 dias nas citocinas pró-inflamatórias hepáticas. Níveis de citocinas esplênicas INF γ (a), IL-1 β (b) e IL-6(c) dos grupos Basal, Dose 1, Dose, Dose 3, Dose 4, Dose 5, Dose 6 e Dose 7. (*)p<0.05 comparado grupo BASAL; (#) p<0.05 comparado Dose 1; (§) p<0.05 comparado com dose 1 (n=5 para cada grupo).

As citocinas anti-inflamatórias basais hepáticas apresentaram-se baixas e picos de concentração na dose inicial, com valores significativamente maiores que os valores apresentados nas doses posteriores (ver Fig. 23a, 23b e 23c).

FIGURA 23. Efeito do LPS durante 5 dias nas citocinas anti-inflamatórias hepáticas. Níveis de citocinas esplênicas IL-2(a), IL-4(b) e IL-10(c) dos grupos Basal, Dose 1, Dose, Dose 3, Dose 4, Dose 5, Dose 6 e Dose 7. (*)p<0.05 comparado grupo BASAL; (#) p<0.05 comparado Dose 1; (§) p<0.05 comparado com dose 1 (n=5 para cada grupo).

- **Perfil das Citocinas da família do linfócito Th17 no baço e fígado durante a indução à Tolerância**

Todas as Citocinas relacionadas aos linfócitos Th17 apresentaram um aumento significativo no início da aplicação de LPS para indução da tolerância e posterior queda das taxas e até ausências destas Citocinas, é o caso da IL23 (Ver Fig.24d). A citocina IL-17f(ver Fig.24b), em especial, apresentou um aumento significativo no quarto dia da dose de LPS em relação às doses dos momentos, em exclusão da primeira dose.

FIGURA 24. Perfil das citocinas da família do linfócito TH17 esplênico durante a indução à tolerância. Níveis de citocinas esplênicas IL-17a (a), IL-17f(b) e IL-22 (c), IL-23(d) dos grupos Basal, Dose 1, Dose, Dose 3, Dose 4, Dose 5, Dose 6 e Dose 7. (*) $p < 0.05$ comparado grupo BASAL; (#) $p < 0.05$ comparado Dose 1; (§) $p < 0.05$ comparado com dose 1 (n=5 para cada grupo).

O mesmo foi observado no fígado, todas as citocinas da família do perfil linfocitário Th17 apresentaram um aumento significativo na primeira dose de LPS e depois queda da concentração e até mesmo ausência, como é caso da IL-17a (ver Fig. 25a), IL-17f (ver Fig. 25b) e da IL23 (ver Fig. 25d).

FIGURA 25. Perfil das citocinas da família do linfócito TH17 hepáticos durante a indução à tolerância. Níveis de citocinas esplênicas IL-17a(a), IL-17f(b), IL-22(c) e IL-23(d) dos grupos Basal, Dose 1, Dose, Dose 3, Dose 4, Dose 5, Dose 6 e Dose 7. (*) $p < 0.05$ comparado grupo BASAL; (#) $p < 0.05$ comparado Dose 1; (\$) $p < 0.05$ comparado com dose 1 (n=5 para cada grupo).

6. Discussão

Tolerância ao LPS, também conhecido como pré-condicionamento ou tolerância à endotoxina, é caracterizada por um período transiente de hipo-reatividade do sistema imune do hospedeiro após exposição repetida doses de baixa concentração de LPS (Fan e Cook et al., 2004, Foster et al, 2007) Estudos anteriores estabeleceram que a tolerância é caracterizada pela redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas reguladoras (Biswas e Lopez-Colazzo 2009).

O presente estudo mostra que a tolerância LPS é, em grande parte, responsável pela ativação e proliferação de linfócitos. Observou-se também que, durante a indução à tolerância, os níveis de concentração de citocinas anti e pró-inflamatórias apresentaram um pico inicial e gradual queda destas concentrações ao longo do tempo, chegando a níveis zero. Além disso, apenas os animais tolerantes apresentaram, no baço, um aumento significativo do ativador de citocinas, IL-2, bem como das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. Os aumentos destas citocinas nos animais tolerantes contribuem para a queda da taxa de mortalidade após endotoxemia ou sepse (Melo et al., 2010). Autores anteriores (del Fresno et al. 2009, Draisma et al., 2009) também observaram o aumento das citocinas IL-10 e IL-4 e animais induzidos à tolerância.

Além das citocinas anti-inflamatórias, no presente estudo foi verificado o aumento significativo dos subtipos de linfócitos T CD4: Treg e Th17, no sangue e no baço de animais tolerantes. As células T regulatórias têm como principal função a homeostase do sistema imunológico através de citocinas reguladoras da IL-10 e TGF-beta (Sakaguchi et al., 2008). Randow e colaboradores demonstraram que a IL-10 foi uma importante ferramenta na modulação da resposta inflamatória aumentada na tolerância (Randow et al., 1995).

Outra questão muito importante estudada foi o papel da população de linfócitos TH17 como imunomodulador atuante na tolerância à sepse. O Th17 é um subtipo de células T CD4 caracterizado por a expressão da família de IL-17. A sua expressão e proliferação são dependentes da expressão de IL-6, IL-21, IL-22 e IL-23 (Weaver et al., 2006, Stockinger et al., 2007, Yousef et al. 2013). Nos camundongos tolerantes analisados, foram encontrados no sangue e no baço um aumento Th17 e IL-6 produzida

por linfócitos T CD4+IL17+, bem como foi verificado o aumento do número de citocinas da família Th17. A IL-17A e IL-17F possuem propriedades pró-inflamatórias e agem sobre uma ampla gama de tipos de células para induzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias (Jovanovich et al., 1998, Kolls et al., 2004, Park et al. 2008). Células Th17 também secretam IL-21 para comunicar com as outras células do sistema imunológico, e a IL-23, é um fator de crescimento e estabilização celular (Korn et al., 2009).

Devido aos efeitos benéficos do bloqueio de citocinas em modelos animais de sepse (Tracey et al., 1987), durante as últimas décadas, o tipo clássico de imunomodulação terapêutica foi baseado na inibição de mediadores inflamatórios, tais como citocinas. No entanto, esta abordagem tradicional como tratamento adjuvante de sepses não tem provado ser bem sucedida em numerosos ensaios clínicos (Bommer et al. 2011). Uma razão importante para isso poderia ser que, a vasta maioria de pacientes sépticos não morre devido a complicações resultantes de uma resposta imunológica pró-inflamatória exacerbada, mas devido a infecções oportunistas secundárias resultante de uma resposta imune reprimida (Kumar et al. 2011).

O estudo da fisiopatologia da sepse é crucial para compreender os mecanismos da doença. Vários modelos animais foram desenvolvidos para sepse, a sepse polimicrobiana induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP) é o modelo mais utilizado por ser semelhante à sepse humana (Dejager, 2011). O efeito, da tolerância LPS anterior à indução da sepse por CLP, é de persistir na ativação e proliferação de linfócitos T CD4+ e de os seus subtipos: Treg e Th17. Os animais tolerantes induzidos à sepse apresentaram

um aumento significativo destas células e as suas citocinas responsáveis pela sua ativação (IL-2) e os desempenhos do sistema imune (IL-21, IL-23 e IL-6 para Th17).

A literatura relata que animais tolerantes submetidos à CLP apresentaram aumento de linfócitos T CD4 (Melo et al. 2010). A tolerância ao LPS agiu nas células T, que induzem a produção de citocinas-chave e de quimiocinas, que ativam e atraem macrófagos e neutrófilos para locais de infecção (Scumpia et al., 2007). A secreção de proliferação de células T e produção de citocinas com defeito se correlaciona com o aumento da mortalidade em sepse (Hotchkiss e Karl 2003). Há dois efeitos de tolerância ao LPS em células T CD4 de modo a aumentar e manter estas células na sepse. Primeiro existe uma elevação direta na produção de células T no baço e segundo, a tolerância ao LPS protege-na da apoptose, ambos os efeitos podem reduzir a mortalidade de animais de sepse (Melo et al. 2010).

Uma subpopulação de células T se tornou um dos principais focos de interesse: as células T regulatórias naturais (Tregs). Estas células vêm sendo apontadas como de importância central para a manutenção da homeostase imune e da auto-tolerância. A sua ablação leva às doenças auto-imunes catastrófica em camundongos e seres humanos (Xiao et al., 2006, Wollenberg et al. 2011). Durante a infecção, as Tregs pode prevenir patologias associadas com excesso de resposta imunológicas e aumentar a sobrevivência sob algumas condições (Hesse et al., 2004, Singh et al., 2005, Kuhlhorn et al. 2013). Em nosso estudo, o animal CLP tolerante apresentou elevada produção de células Treg no sangue e baço. Nascimento et al. (2010) verificaram em camundongos sépticos aumento do número de células Treg e autor confirmou a ação deletéria destas células. Animais sépticos sobreviventes foram tratados com bloqueio de Treg e submetido a um

subsequente a pneumonia, onde animais foram protegidos bloqueio Treg à morte. No entanto, Heuer et al. (2005) relataram melhora da sobrevida após a transferência adoptiva de um pequeno número de CD4⁺ CD25⁺ Tregs, obtidos ex vivo de animais saudáveis, para os animais sépticos. Seguindo o esgotamento Treg com anti CD25-mAbs, outros grupos observado nenhum efeito ou até mesmo melhorou a sobrevivência na sepse murino (Wisnoski et al., 2007, Chen et al 2007). Kulthorn et al. (2013) descobriram que células T regulatórias Foxp3⁺ são necessárias para a recuperação de sepse grave, uma vez que na fase inicial da infecção, estas células não foram eficazes na recuperação do induzido para animais CLP. No entanto, na infecção tardia, Treg eram cruciais para a sobrevivência de animais.

Células Th17, que emergiram como um terceiro independente subconjunto de células T que poderão desempenhar um papel essencial na proteção contra determinados agentes patogénicos extracelulares, têm sido extensivamente analisada por causa da sua forte associação com doenças inflamatórias e doenças autoimunes. Salomão et al. (2011) encontraram uma diminuição da proporção de células Th1 e duas vezes o número de células Th17 no plasma de doentes sépticos em comparação com saudáveis. Constatou-se também que o bloqueio do receptor da IL-17A teve um efeito protetor sobre a indução de sepse por CLP e este bloqueio foi correlacionado com o declínio nos níveis de bacteriémica e citocinas pró-inflamatórias (Flierl et al. 2008). Wu associou o aumento da sobrevida dos animais séptico com o aumento da quantidade de Treg e Th17 no sangue (Wu et al. 2013). Verificou-se um aumento do número de Th17 e IL-6 produzido por Th17 no sangue e os baços de animais CLP tolerantes induzidos a sepse, e um aumento de IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-21, IL-22, IL -23 no baço destes animais. Um dos papéis de

Th17, além de induzir uma atividade pró-inflamatória é o recrutamento de neutrófilos. As citocinas derivadas de Th17: tais como IL-17, INF γ , TNF α e GM-CSF são indutores do recrutamento, ativação e a sobrevivência prolongada de neutrófilos nos locais de inflamação (Pelletier et al. 2010).

Freitas et al. (2009) demonstraram em animais sépticos que a ausência dos receptores de IL-17 resultou numa redução na migração de neutrófilos para o local da infecção, aumento de inflamação e bacteremias. Ariga et al. (2014) relataram um aumento da infiltração de neutrófilos no local infeccioso em camundongos tolerantes sépticos correlacionando este evento como um dos responsáveis pela diminuição da mortalidade. As células Th17 podem ser um dos mecanismos responsáveis para este recrutamento de neutrófilo verificado e, podendo assim ser, mais um dos responsáveis pela ação protetora da tolerância.

A fim de reduzir a mortalidade, um número de fatores deve estar envolvido na resposta imune. A hiperinflamação ou sobre-regulação não é benéfica para o sucesso, no entanto, trabalhar juntos em Th1, Th2, Th17 e Treg podem ser o fator crucial associado com o declínio da mortalidade observado em estudos anteriores da tolerância e desafio de sepse.

Em conclusão, este estudo demonstrou que a redução na mortalidade após a tolerância previamente visto, pode ser associado com o aumento da população de células T regulatórias e citocinas reguladoras que podem ser responsáveis pela imunorregulação da hiperinflamação e os linfócitos Th17 podem ser uma das células responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, que tem sido associado com o sucesso de tolerância ao LPS.

Referencias Bibliográficas

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, 6a ed, Editora Saunders 2007.

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology, 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2005.

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed., Saunders, 2003.

Abraham, E, MA Matthay, C. A. Dinarello, J. L. Vincent, J. Cohen, S. M. Opal, M. Glauser, P. Parsons, C. J. Fisher, Jr., and J. E. Repine. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. Crit Care Med 28: 232-5, 2000.

Andersen G, Moore NC, Owen JJT, Jenkinson EJ. Cellular interactions in thymocyte development. Annual Review of Immunology 1996

Angus, D.C., et al., Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit. Care Med., v.29, n.7, p. 1303-10, 2001.

Ariga, SK, Abatepaulo, FB, Melo, ES, Velasco, IT, Silva, FP, Lima, TM, Soriano, FG. Endotoxin tolerance drives neutrophil to infectious site. Shock. 42,168, 2014

Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. J Allergy Clin Immunol 2007

Bommireddy R, Saxena V, Ormsby I, Yin M, Boivin GP, Babcock GF, Singh RR, Doetschman T. TGF-beta 1 regulates lymphocyte homeostasis by preventing activation and subsequent apoptosis of peripheral lymphocytes. J Immunol. 2003

Burns J, Rosenzweig A, Zweiman B, Lisak RP: Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. Cell Immunol 81(2):1983

Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2007

Caramalho, I.; Rodrigues-Duarte, L.; Perez, A.; Zelenay, S.; Penha-Gonçalves, C.; Demengeot. J. Regulatory T cells Contribute to Diabetes Protection in Lipopolysaccharide-Treated Non-Obese Diabetic Mice. *Scandinavian Journal of Immunology*. v.74, n. 6, p. 585–595, 2011

Christians, E. S.; Yan, L. J., Benjamin, I. J. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: Critical partners in protection against acute cell injury. *Crit. Care Med*. v.30, p.43-50, 2002.

Chen, X., Baumel, M., Mannel, D.N., Howard, O.M., Oppenheim, J.J., 2007. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 179, 154.

Cipolle, M.D., Pasquale, M.D.; Cerra, F.B. Secondary organ dysfunction. From clinical perspectives to molecular mediators. *Crit Care Clin*, v.9, n.2, p. 261-98, 2003

Coffier PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004

Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*. 53:135–59, 2001.

Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun* 2008

Dudek, K.; Bednarek, D. Cellular immune response of pigeons in the conditions of endotoxin fever and pyrogenic tolerance. *Pol J Vet Sci.*;v.14, n.1, p.127-33, 2011.

Fan, H.; Cook, J. A. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res*. v.10, p.71– 84, 2004.

Flierl, M.A., Rittirsch, D., Gao, H., Hoesel, L.M., Nadeau, B.A., Day, D.E., Zetoune, F.S., Sarma, J.V., Huber-Lang, M.S., Ferrara, J.L., Ward, P.A., 2008. Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. *FASEB J.* 22, 2198.

Freitas, A., Alves-Filho, J.C., Victoni, T., Secher, T., Lemos, H.P., Sônego, F., Cunha, F.Q., Ryffel, B. IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. *J Immunol.*, 182(12):7846-54, 2009.

Foster, S.L., Hargreaves, D.C., Medzhitov, R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, v.447, p.972, 2007

Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003

Gupta S, Shang W, Sun Z. Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005

Hesse, M., Piccirillo, C.A., Belkaid, Y., Prufer, J., Mentink-Kane, M., 2004. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol* 172, 3157.

Heuer, J.G., Zhang, T., Zhao, J., Ding, C., Cramer, M., Justen, K.L., Vonderfecht, S.L., Na, S. Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis. *J Immunol.* e174(11):7141-6, 2005

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz, R.A., Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* n.284, p.1313, 1999.

Hotchkiss, R.S., Karl, I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* v.348, n.138, 2003

Janeway CA Jr: How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3(11):2001

Janeway CA, Travers P, Walport Mark, Shlomchik M. *Imunobiologia – O sistema imune na saúde e na doença*, 5ª ed, Editora Artmed, 2002.

Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003

Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001

Kappler JW, Roehm N, Marrack P: T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49(2):1987

Kühlhorn, F., Rath, M., Schmoeckel, K., Cziupka, K., Nguyen, H.H., Hildebrandt, P., Hünig, T., Sparwasser, T., Huehn, J., Pötschke, C., Bröker, B. M. Foxp3+ regulatory T cells are required for recovery from severe sepsis. *PLoS One*, 28;8(5), 2013

Kusuda, T., Shigemasa, K., Arihiro, K., Fujii, T., Nagai, N., Ohama, K. Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Oncol. Rep.* v.13, p.1153, 2005.

Lippolis JD: Immunological signaling networks: integrating the body's immune response. *J Anim Sci* 86. 2008

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006

Martin, G.S., et al., The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, v.348, n.16, p. 1546-54, 2003.

Melo KM, Carvalho KI, Bruno FR, Ndhlovu LC, Ballan WM, Nixon DF, *et al.* A decreased frequency of regulatory T cells in patients with common variable immunodeficiency. PLoS One 2009

Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 1989

Nascimento, D.C., Alves-Filho, J.C., Sônego, F., Fukada, S.Y., Pereira, M.S., Benjamim, C., Zamboni, D.S., Silva, J.S., Cunha, F.Q. 2010. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. Crit Care Med, 38, 1718.

Ndhlovu LC, Loo CP, Spotts G, Nixon DF, Hecht FM. FOXP3 expressing CD127^{lo} CD4⁺ T cells inversely correlate with CD38⁺ CD8⁺ T cell activation levels in primary HIV-1 infection. J Leukoc Biol 2008

Nguyen, H.B., et al., Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. Ann Emerg Med, v.48,n.1, p. 28-54, 2006.

O'Shea JJ, Hunter CA, Germain RN. T cell heterogeneity: firmly fixed, predominantly plastic or merely malleable? Nat. Immunol 2008

Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat Immunol. 2005

Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi L, Lunardi C, Annunziato F, Romagnani S, Cassatella MA. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. Blood. 115(2):335-43, 2010.

Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease. Cytokine 2008

Pinheiro-da-Silva, F., Chiamolera, M., Charles, N., Kanamaru, Y., Velasco, I.T., Benhamou, M., Monteiro, R.C. B lymphocytes undergo apoptosis because of

FcγRIIb stress response to infection: a novel mechanism of cell death in sepsis. *Shock*, v.25, p.61, 2006.

Powell BR, Buist NR, Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr* 1982

Provoost S, Maes T, van Durme YM, Gevaert P, Bachert C, Schmidt-Weber CB *et al*. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy* 2009

Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L, Sharpe AH, Powrie F. Blockade of CTLA-4 on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol* 2006

Reiner SL. Development in motion: Helper T cells at work. *Cell*. 2007

Salomão, R., Brunialti, M., Silva, E., 2011. Th17 lymphocytes and alternatively activated monocytes are upregulated in clinical sepsis. *Crit. Care* 15, 21.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺regulatory T cells in immunological tolerance to self and nonself. *Nat Immunol* 2005

Scumpia, P. O., McAuliffe, P. F. Kerri, O'malley, A., Ungaro, R. Uchida, T., Matsumoto, T., Remick, D. R., Clare-Salzler, M. J., Moldawer, L., Efron, P. A., 2005. CD11c⁺ Dendritic Cells Are Required for Survival in Murine Polymicrobial Sepsis. *J Immunol*.175, 5, 3282.

Skrindo I, Farkas L, Kvale EO, Johansen FE, Jahnsen FL. Depletion of CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} regulatory T cells does not increase allergen-driven T cell activation. *Clin Exp Allergy* 2008

Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*, 2008

Staudt, L. M. Gene expression physiology and pathophysiology of the immune system. *Trends Immunol*, v.22, p.35-40, 2001.

Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, Robinson DS, Brown Z, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology* 2006

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003

Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008

Torgerson TR, Ochs HD. Regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007

Vasselon, T.; Detmers, P.A. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun* v.70, n. 3, p. 1033-41, 2002.

Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J *et al*. Transforming growth factor- β ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9–producing subset. *Nat.Immunol* 2008

Vincent, J. L. Update on sepsis: pathophysiology and treatment. *Acta Clin Belg* v.55, p.79-87, 2000.

West, M. A.; Heagy, W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit. Care Med*. v.30, p.64-73, 2002

Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, *et al*. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004

Xiao, H., Siddiqui, J., Remick, D.G., 2006. Mechanisms of mortality in early and late sepsis. *Infect Immun* 74, 5227.

Zhang, X.; M.; A., Munegowda, Yuan, J.; Wei, Y; Xiang, J. Optimal TLR9 signal converts tolerogenic CD4⁺CD8[−] DCs into immunogenic ones capable of stimulating antitumor immunity via activating CD4⁺ Th1/Th17 and NK cell responses. *Journal of Leukocyte Biology*, v.88, n. 2, p.393-403, 2010.

Wisnoski, N., Chung, C.S., Chen, Y., Huang, X., Ayala, A., 2007. The contribution of CD4⁺ CD25⁺ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. *Shock*. 27, 251.

Wollenberg, I., Agua-Doce, A., Hernández, A., Almeida, C., Oliveira, V.G., Faro, J., Graca, L., 2011. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3⁺ follicular regulatory T cells. *J Immunol*. 187,9, 4553.

Wu, H.P., Chung, K., Lin, C.Y, Jiang, B.Y, Chuang, D.Y., Liu, Y.C., 2013. Associations of T helper 1, 2, 17 and regulatory T lymphocytes with mortality in severe sepsis. *Inflamm. Res*. 62, 751.