

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Autotransplante de Baço e Reatividade  
Imunológica para o Controle da Infecção por  
*Staphylococcus aureus***



Francisco Martins Teixeira  
Belo Horizonte, julho de 2008

FRANCISCO MARTINS TEIXEIRA

**Autotransplante de Baço e Reatividade  
Imunológica para o Controle da Infecção por  
*Staphylococcus aureus***

Tese apresentada ao programa de pós-graduação  
em Bioquímica e Imunologia do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor em Imunologia

**ORIENTADOR: DR. HENRIQUE COUTO TEIXEIRA  
CO-ORIENTADOR: DR. SERGIO COSTA OLIVEIRA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**BELO HORIZONTE, JULHO DE 2008**

**O presente trabalho foi realizado com o apoio da CAPES (Projeto 070 – Imunologia das doenças infecto-parasitárias – PQI – CAPES);**

**As etapas realizadas em Juiz de Fora tiveram o apoio dos Projetos FAPEMIG CBS 255/03  
CNPq 471696/2004-8**

"A pessoa que se deu conta da responsabilidade em relação à obra que por ela espera ou perante o ente que a ama e espera, essa pessoa jamais conseguirá jogar fora sua vida. Ela sabe do *porquê* de sua existência - e por isso também conseguirá suportar quase todo *como*".

Viktor E. Frankl

"Quem tem por que viver aguenta quase todo como"

Nietzsche

"Assim, se uma célula interage com uma molécula X, incorporando-a a seus processos, o que acontece como consequência da interação não está determinado pelas propriedades dessa molécula, e sim pela maneira como ela é "vista" ou tomada pela célula, ao incorporá-la à sua dinâmica autopoietica".

Maturana & Varela

## Agradecimentos

- A Deus, Energia Cósmica Universal, que habita dentro de nós e de tudo o que existe nos universos infinitos, dando-lhes vida e força.
- Ao Dr. Henrique Couto Teixeira, que com censo crítico e capacidade de discernimento me auxiliou a entender que sempre existe a possibilidade de aprimorar um trabalho. Pela sua amizade e presença.
- Ao Dr. Sergio Costa Oliveira, que me auxiliou abrindo muitas portas e possibilitando o convívio com outros pesquisadores na UFMG.
- Aos meus pais, Antonio de Souza Teixeira e Altair Martins Teixeira, que me deram uma formação humanística e religiosa, não mais castradora, não mais temente a Deus, mas sim estruturada no amor.
- Aos meus irmãos, Marcelo e Barbara, que constituíram o primeiro laboratório vivo de atividades e convivência. Por me fornecerem a escola do compartilhar e trocar experiências.
- A Patrícia e Francisco, esposa e filho muito amados, que Deus possa direcionar nossas vidas para um amor que possa se estender a um número maior de pessoas, levando-nos a realizações na seara do bem.
- Às minhas queridas sobrinhas, Ana Luiza, Ana Beatriz e Ana Clara, que encheram de graça a vida de meus irmãos e da minha família.
- À Dra. Ana Paula Ferreira, pela amizade, atenção e carinho. Por compartilhar as primeiras publicações e por estar sempre disposta a auxiliar a todos, sem exceção.
- Aos amigos do laboratório de imunologia e todos os funcionários da UFJF.
- A todos os novos amigos que fiz na cidade de Belo Horizonte durante a realização deste trabalho, inclusive a você, Michele.

## Sumário

<b>SUMÁRIO</b> .....	II
<b>ABREVIATURAS</b> .....	IV
<b>FIGURAS</b> .....	VIII
<b>TABELAS</b> .....	IX
<b>RESUMO</b> .....	X
<b>ABSTRACT</b> .....	XII
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. O Baço – História.....	1
1.2. Tipos de Cirurgia.....	5
1.2.1. Esplenectomia total.....	5
1.2.2. Esplenectomia parcial.....	6
1.2.3. Autotransplante de baço.....	8
1.3. Baço e Resposta Imune.....	11
1.4. Resposta Imune a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
<b>2 – OBJETIVOS</b> .....	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos.....	25
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
3.1. Animais Experimentais.....	26
3.2. Procedimento Cirúrgico.....	26
3.3. Cepa Bacteriana.....	27
3.4. Meios e Condições de Cultivo.....	27
3.5. Preparo do Antígeno de <i>S. aureus</i> .....	27
3.6. Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford.....	29
3.7. Infecção e Análise da Resposta Imune.....	29
3.7.1. Número de unidades formadoras de colônia (UFC).....	29
3.7.2. Análise do influxo de neutrófilos e macrófagos para os pulmões	30
3.7.3. Análise histológica e morfométrica.....	31
3.7.4. Avaliação de marcadores celulares no baço e no pulmão.....	31
3.7.5. Determinação dos subtipos celulares e coleta do plasma.....	32
3.7.6. Perfil e cinética de produção de citocinas e óxido nítrico (NO)..	35
3.7.7. Detecção de anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a.....	35

3.8. Análise Estatística.....	36
<b>4 – RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1. Autotransplante de baço restaura a resistência de camundongos BALB/c esplenectomizados submetidos à infecção por <i>S. aureus</i> .....	37
4.2. Atividade de MPO e NAG em homogeneizados de pulmão de camundongos BALB/c é aumentada com infecção por <i>S. aureus</i> .....	38
4.3. Camundongos esplenectomizados apresentam maior acúmulo de macrófagos e neutrófilos nos pulmões e a realização de autotransplante de baço induz o aumento de células CD19 <sup>+</sup> após infecção por <i>S. aureus</i> .....	39
4.4. Camundongos esplenectomizados e infectados apresentam maior expressão de CTLA-4 no fígado e a realização de autotransplante de baço induz um influxo de neutrófilos similar ao observado no grupo controle.....	43
4.5. Infecção por <i>S. aureus</i> causa aumento semelhante de células B, células T, macrófagos e neutrófilos no tecido esplênico de camundongos autotransplantados e controle.....	46
4.6. Infecção de camundongos esplenectomizados por <i>S. aureus</i> induz um perfil de resposta imune que favorece a disseminação da infecção, com baixos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ e NO, e altos níveis de IL-10.....	49
4.7. Autotransplante de baço restaura parcialmente a resposta imune humoral após infecção por <i>S. aureus</i> em camundongos esplenectomizados.....	53
<b>5 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>
<b>8 – PUBLICAÇÕES.....</b>	<b>85</b>
8.1. Publicações referentes à tese.....	85
8.2. Publicações no período, não relacionadas à tese.....	85
<b>9 – ANEXOS.....</b>	<b>86</b>

## Abreviaturas

APCs – células apresentadoras de antígenos

AT – grupo autotransplantado

BSA – albumina bovina sérica

CD – marcador de diferenciação

CpG – fragmentos de DNA característicos de patógenos

CT – grupo controle sham

CTLA-4 – antígeno de linfócito T citotóxico 4, do inglês Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

ELISA – ensaio imunoenzimático, do inglês enzyme-linked immunosorbent assay

g – grama

HBSS – solução salina de Hanks

H&E – coloração por hematoxilina-eosina

HTAB – hexadecil-trimetil-amônio

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IFPE – infecção fulminante pós-esplenectomia

IgD – imunoglobulina D

IgG1 – imunoglobulina 1

IgG2a – imunoglobulina G 2 a

IgM – imunoglobulina M

IL-1 – interleucina 1

IL-10 – interleucina 10

IL-12 – interleucina 12

IL-4 – interleucina 4

IL-6 – interleucina 6

IRAK – quinase associada ao receptor de interleucina-1

Ln – logaritmo neperiano ou logaritmo natural

LPS – lipopolissacarídeo

M – molar

MARCO – receptor de macrófago com estrutura de colágeno

mg – miligrama

MHC – complexo maior de histocompatibilidade

min – minutos

ml – mililitros

ml/min – mililitros por minuto

mM – milimolar

MPO – mieloperoxidase

NAG – N-acetil- $\alpha$ -glicosaminidase

nm – nanômetros

NO – óxido nítrico

NRAMP – proteína de resistência natural associada a macrófagos

OD – densidade óptica

OPD – *o*-fenilenodiamina

PALS – bainha linfóide periarteriolar

PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos

PBS – salina tampão fosfato

pg/ml – picogramas por mililitro

pH – concentração de íons hidrogênio em solução

p/v – peso por volume (concentração)

rpm – rotações por minuto

SEA – enterotoxina A

SEB – enterotoxina B

SEM – erro padrão

sham – operação simulada

SIGLEC1 – do inglês “sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin 1”

SIGNR1 – do inglês “Specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing nonintegrin-related 1”

SP – grupo esplenectomizado

STAT-4 – ativador da transdução de sinal de transcrição do tipo 4

STAT-6 – ativador da transdução de sinal de transcrição do tipo 6

TCR – receptor de célula T

TD – resposta imune T dependente

TGF- $\beta$  – fator de crescimento tumoral beta

Th1 – célula T auxiliar do tipo 1

Th17 – célula T auxiliar do tipo 17

Th2 – célula T auxiliar do tipo 2

TI-1 – resposta imune T independente do tipo 1

TI-2 – resposta imune T independente do tipo 2

TLR – receptores do tipo toll

TMB – tetrametilbenzidina

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

Treg – célula T regulatória

TSST-1 – toxina 1 da síndrome do choque tóxico

UFC – unidades formadoras de colônia

v/v – volume por volume (concentração)

μl – microlitros

μm – micrometros

## Figuras

1. Cintilografia.....	10
2. Organização dos tecidos linfóides do baço.....	13
3. UFC.....	28
4. Gates utilizados.....	34
5. Autotransplante de baço restaura a resistência de camundongos BALB/c esplenectomizados submetidos à infecção por <i>S. aureus</i> .....	37
6. Atividade de MPO e NAG em homogeneizados de pulmão de camundongos BALB/c é aumentada com infecção por <i>S. aureus</i>	38
7. Maior área de infiltrado inflamatório nos pulmões de camundongos BALB/c esplenectomizados após infecção por <i>S. aureus</i> .....	40
8. Detecção de células positivas para os marcadores CD19, CD25 e CD40 em cortes de pulmão de camundongos BALB/c infectados por <i>S. aureus</i> .	41
9. Porcentagem de neutrófilos, macrófagos e células B nos pulmões de camundongos BALB/c infectados por <i>S. aureus</i> , por meio de citometria de fluxo.....	42
10. Formação de granulomas no fígado de camundongos infectados.....	44
11. Porcentagem de neutrófilos e células CTLA-4 <sup>+</sup> presentes no fígado de camundongos BALB/c.....	45
12. Coloração por imunohistoquímica de cortes do baço de camundongos BALB/c infectados por <i>S. aureus</i> .....	47
13. Níveis de IFN- $\gamma$ no plasma, fígado e pulmões de camundongos BALB/c infectados com <i>S. aureus</i> .....	50
14. Níveis de IL-1 $\alpha$ no plasma, pulmão e fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>S. aureus</i> .....	50
15. Níveis de NO produzidos em camundongos BALB/c em resposta à infecção por <i>S. aureus</i> .....	51
16. Níveis de IL-10 no plasma, pulmão e fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>S. aureus</i> .....	52
17. Níveis de TNF- $\alpha$ no plasma, pulmão e fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>S. aureus</i> .....	52
18. Efeito da esplenectomia nos níveis de anticorpos específicos anti- <i>S. aureus</i> produzidos no soro de camundongos BALB/c infectados.....	54

## Tabelas

1. Proporção de lâminas positivas para os marcadores de superfície presentes nos pulmões dos camundongos infectados por *S. aureus*..... 41
2. Número de granulomas no fígado de camundongos infectados por *S. aureus* 44
3. Diferenças na porcentagem dos subtipos celulares no baço dos camundongos infectados e não infectados por *S. aureus*..... 48

## Resumo

A esplenectomia resulta em maior risco de sepse. Todavia, seus efeitos na resposta imune e inflamatória contra bactérias permanecem obscuros. Neste estudo, a capacidade de animais submetidos a transplante autólogo de baço em responder à infecção por *Staphylococcus aureus* foi investigada. Camundongos BALB/c foram distribuídos em três grupos: grupo esplenectomizado e autotransplantado no retroperitônio (AT), grupo esplenectomizado (SP) e grupo controle operado e não esplenectomizado (CT). Trinta dias após a cirurgia, os camundongos foram infectados pela via endovenosa com  $5 \times 10^6$  UFC de *S. aureus* e após seis dias de infecção, amostras do plasma, soro, baço, fígado e pulmões foram coletadas. A contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) no fígado e nos pulmões mostrou que os camundongos do grupo SP apresentaram maior número de bactérias em ambos os órgãos quando comparado com os grupos CT e AT ( $P < 0,05$ ). Nossos resultados mostraram também uma maior área de infiltrado inflamatório nos pulmões dos camundongos dos grupos AT e SP, com menor área de infiltrado inflamatório nos pulmões dos camundongos do grupo CT ( $P < 0,05$ ). Foram detectadas diferenças na proporção de marcadores celulares entre os grupos AT e SP, havendo maior detecção de células  $CD25^+$  e de células  $CD40^+$  no grupo SP, e maior frequência de células  $CD19^+$  no grupo AT. Estas diferenças podem estar associadas com a maior resposta inflamatória nos pulmões dos camundongos do grupo SP e maior influxo de células B nos pulmões dos camundongos do grupo AT. A análise por citometria de fluxo e a avaliação da atividade de MPO e NAG corroboraram com esta hipótese, já que indicaram maior influxo de neutrófilos e macrófagos para os pulmões dos camundongos do grupo SP quando comparado com os grupos CT e AT, e maior porcentagem de células B nos pulmões dos camundongos do grupo AT quando comparado com os grupos CT e SP. As respostas no fígado e no baço foram similares nos grupos CT e AT, com maior número de granulomas e

maior porcentagem de neutrófilos no fígado dos camundongos destes grupos quando comparado aos camundongos do grupo SP. As porcentagens de células B, células T, macrófagos e neutrófilos não foram diferentes no baço de camundongos dos grupos CT e AT. Estes dados sugerem que o desenvolvimento da resposta imune no baço pode, em parte, influenciar na resposta frente à *S. aureus* no fígado, favorecendo o controle da infecção neste órgão. O perfil de produção de citocinas, óxido nítrico e anticorpos anti-*S. aureus* nos camundongos do grupo SP sugere ausência de resposta imune protetora, com baixa produção de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , NO e anticorpos das classes IgM e IgG1 e alta produção de IL-10 associada à baixa produção de TNF- $\alpha$ , nos pulmões. Tomados em conjunto, estes dados fornecem evidências de que esplenectomia reduz a capacidade de controle da infecção por *S. aureus*, alterando o perfil de moléculas imunorreguladoras e efetoras na corrente sanguínea, nos pulmões e no fígado. Estas alterações na resposta imune humoral e celular são, em parte, revertidas com a realização do transplante autógeno de baço.

## Abstract

Splenectomy results in greater risk of sepsis. However, its effects on the immune response and in the resistance to bacterial infections are still not well known. In this work, the capacity of mice subjected to splenectomy and autogenous transplant of the spleen for controlling *Staphylococcus aureus* infection was investigated. Parameters of cellular and humoral immune response connected with resistance to the infection, such as the influx of inflammatory cells to infection sites, the production of cytokines and of nitric oxide (NO), as well as the serum levels of specific antibodies were evaluated. BALB/c mice were divided into three groups: a splenectomized group (SP), a group splenectomized and autotransplanted in the retroperitoneum (AT), and a control group operated and not splenectomized (CT). Thirty days after the surgery, the mice were intravenously infected with  $5 \times 10^6$  colony forming units (CFU) of *S. aureus*. Six days after the infection, samples of the plasma, serum, spleen, liver and lungs were collected. Animals of the SP group presented a higher number of bacteria in the liver and in the lungs when compared with the CT and AT groups ( $p < 0.05$ ). Mice of the AT and SP groups presented a larger area of inflammation in the lungs in comparison to the CT group ( $p < 0.05$ ), having higher detection of CD25<sup>+</sup> cells and of CD40<sup>+</sup> cells in the SP group, and greater frequency of cells CD19<sup>+</sup> in the AT group. The analysis by flow cytometry and the evaluation of the activities of mieloperoxidase and N-acetilglicosaminidase confirmed the incident of greater influx of neutrophils and macrophages to the lungs of the mice in the SP group when compared with the CT and AT groups, and higher percentage of B cells in the lungs of mice from the AT group when compared with the CT and SP groups. The responses in the liver and in the spleen were similar in the CT and AT groups, with larger number of granulomas and higher percentage of neutrophils in the CT and AT mice in comparison to the SP group. The percentages of B cells (CD19<sup>+</sup>), T cells (CD3<sup>+</sup>), macrophages

(CD4<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> and CD3<sup>-</sup>) and neutrophils (CD11b<sup>+</sup> and CD69<sup>+</sup>) were similar in the spleens of mice from the CT and AT groups. These data suggest that the development of the immune response in the spleen can, in part, influence the response to *S. aureus* in the liver, favoring infection control in this organ. The profile of the production of cytokines, NO and anti-*S. aureus* antibodies in the mice of the SP group suggests an alteration of the immune response after the infection. The lungs of these animals showed low production of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and NO associated with high production of IL-10. The liver showed high production of TNF- $\alpha$  and low production of IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$  and NO. The plasma showed low levels of IFN- $\gamma$  and IL-1 $\alpha$  and high levels of TNF- $\alpha$  and IL-10 and the serum showed reduced levels of specific antibodies of the classes IgM and IgG1. Together, these data supply evidence that splenectomy reduces the capacity of control of the infection for *S. aureus*, altering the profile of immunoregulatory molecules and effector molecules in the blood stream, in the lungs and in the liver. These alterations in the humoral and cellular immune response are, in part, reversed with the performance of the autogenous spleen transplant.



# INTRODUÇÃO

## 1.1. O Baço - História

Diversos povos da Antigüidade designaram atribuições ao baço, as quais a ciência tem comprovado atualmente. O mais antigo documento relativo ao assunto é proveniente da China, onde o baço era considerado pela medicina tradicional como um dos quatro órgãos do corpo relacionados com a defesa do organismo, o fornecimento de energia para os outros órgãos e a digestão. A energia é representada pelas hemácias que o baço libera na circulação em situações que requeiram um esforço sistêmico. Com relação à digestão, o baço, além da digestão microscópica, que é exercida pelos macrófagos esplênicos, é precursor de grande parte das funções hepatocitárias, como a formação de bilirrubina indireta. Porém, a função que mais chama a atenção para esse órgão é a defesa do organismo (Petroianu *et al.*, 2003).

Na cultura hebraica, o *Midrash* – livro da tradição histórica – inclui o baço entre os 10 órgãos que contêm a alma. Isto se deve à assertiva proveniente do *Zohar*, famoso livro do misticismo hebraico, segundo a qual “o baço produz o riso e a alegria”. Outra função do baço é citada no *Talmud*, onde está escrito que teria o papel de moinho, responsável por triturar as impurezas do sangue (Rosner, 1972; McClusky *et al.*, 1999). A primeira indicação de esplenectomia também pertence à história hebraica. Após a morte do rei David, Adoniah tentou usurpar o trono de Salomão. Para isso, conforme está relatado no *Talmud*, retirou o baço de 50 soldados de sua tropa a fim de que corressem com maior velocidade (Rosner, 1972).

A alegria tão proclamada como um atributo do baço poderia ser intermediada pela saúde e bem-estar, que sobreviriam decorrentes da depuração do sangue de substâncias nocivas ao organismo. No contexto histórico daquela época, a malária e a esquistossomose mansônica eram doenças endêmicas em todo o Oriente Médio, assim, é pertinente presumir que a esplenomegalia, muito comum nessas moléstias, provocasse anemia por armazenamento aumentado do sangue. Se

esplenectomia tivesse sido realizada, ela poderia ter aumentado o desempenho dos guerreiros. Na era moderna, este efeito da esplenectomia no desempenho atlético foi comprovado cientificamente. Em 1922, ratos esplenectomizados apresentaram maior velocidade e resistência em corridas, quando comparados com ratos que possuíam baço intacto (McClusky *et al.*, 1999; Wilkins, 2002; Petroianu *et al.*, 2003).

Erasistratus (310-250 a.c.) e Aristóteles (384-322 a.c.) consideravam o baço um órgão equivalente ao fígado, quanto à simetria. Isto pode parecer surpreendente nos dias atuais, já que a distinção entre os dois órgãos com relação ao tamanho é evidente. Todavia, vale lembrar novamente da prevalência da malária no Oriente Médio no tempo de Erasistratus. Um tamanho considerado normal para o baço naquela época seria caracterizado como típico de esplenomegalia, na atualidade. Por fim, Erasistratus concluiu que o baço não possuía função crucial à vida, um ponto de vista que prevaleceu por muitos séculos (Gray, 1854; Wilkins, 2002).

A ausência de algum ducto excretor ou abertura externa conectada ao baço intrigava os primeiros anatomistas. Então, Galeno (129-201 d.C.) descreveu estruturas comunicantes entre o baço e o estômago. Além de realizar disseções em animais, ele teve a oportunidade de observar o baço humano em cirurgias realizadas em gladiadores romanos. Galeno acreditava que sua descoberta fornecia a prova de uma ligação do baço à digestão (Gray, 1854; Wilkins, 2002). A noção de que o baço integraria o sistema digestivo dominou o pensamento médico até o século XVI, quando Vesalius (1543) contestou-a definitivamente (Vesalius, 1543; McClusky *et al.*, 1999). Apesar da sua portentosa contribuição, o anatomista acabou mais repreendido do que elogiado. Apesar de bem sucedido ao desmontar a teoria de Galeno, foi incapaz de definir, convenientemente, o papel do baço no organismo (Christo, 2001).

No século XVII foram efetuadas notáveis descobertas no campo da anatomia e da fisiologia humana. Em 1654, Francis Glisson foi o primeiro a descrever a distribuição de nervos que supriam

o baço e o tecido conectivo trabecular que permeava o órgão. Marcello Malpighi, fundador da anatomia microscópica, interpretou corretamente a natureza do tecido conectivo dessa trabécula (Crosby, 1983; Gray, 1854; Wilkins, 2002).

Antony van Leeuwenhoek (1708), mais conhecido por sua contribuição à criação do microscópio, acrescentou dados importantes ao conhecimento morfológico do baço. Já no século XIX, a fagocitose de eritrócitos para a remoção de hemácias senescentes da circulação foi descrita pela primeira vez (Von Kölliker, 1854; Crosby, 1983). A ocorrência da destruição de hemácias no baço foi contestada por Rudolf Virchow, que acreditava no paradigma de que a morte celular era sempre um sinal de doença e não poderia, portanto, apresentar-se como um processo fisiológico (Virchow, 1852; Crosby, 1983). Em 1847, Tigli identificou a estrutura reticular da polpa vermelha do baço. Também nesta época, a estrutura anatômico-microscópica da polpa vermelha esplênica foi elucidada por Theodore Billroth, que descobriu os capilares sinusóides (Gray, 1854; Wilkins, 2002; Petroianu *et al.*, 2003).

Ludwig Aschoff e Landau (1913) contribuíram com outro grande momento da história esplênica ao descreverem o sistema reticuloendotelial, no qual o baço se destaca como um de seus principais órgãos constituintes. Mais tarde, este sistema, devido à sua capacidade de fagocitar diferentes partículas, por meio de múltiplas células mononucleadas, recebeu também os nomes de sistema macrofágico e de sistema mononuclear fagocitário (Petroianu *et al.*, 2003).

Os experimentos iniciais documentados de extirpação do baço datam do final do século dezessete nos trabalhos de Clarke (1676) e Zambecari (1680), porém, a primeira cirurgia de esplenectomia bem sucedida tem sido atribuída a Andriano Zacarello, de Palermo, no ano de 1549, e a ressecção seguida de sutura posicionada dentro do parênquima esplênico foi feita pela primeira vez por Rosetti, em 1590. Durante os 400 anos subseqüentes, não aconteceram mudanças significativas no tratamento cirúrgico do trauma esplênico (Morgenstern, 1975, Miko *et al.*, 2001).

Tornou-se senso comum, a partir do século XIX, que a esplenectomia é o método de escolha recomendável no caso de trauma esplênico, embora estudos atuais indiquem que esse procedimento não é isento de complicações (Avendano *et al.*, 1997).

Das crônicas desses mais de 20 séculos de folclore e estudos acadêmicos sobre o baço e sobre a sua cirurgia, em que mitos, tradições, eventos históricos e controvérsias científicas se misturam, só restou um consenso universalmente aceito – o baço poderia ser removido sem aparentes desvantagens para o organismo (Christo, 2001). Uma mudança na atitude começou com a descrição da “infecção fulminante pós-esplenectomia” (IFPE) por King e Shumacker Jr, em 1952. Trata-se de uma situação clínica grave, sendo 58 vezes mais freqüente nos pacientes esplenectomizados do que na população em geral, atingindo principalmente as crianças (Morris & Bullock, 1919; King & Shumacker Jr, 1952). Nesses casos a mortalidade é de 50 a 75%, nos dois primeiros anos após a cirurgia, apesar de poder ocorrer até 40 anos mais tarde (Miko, 2001). Por aproximadamente duas décadas, a IFPE esteve circunscrita a apenas crianças esplenectomizadas acometidas de desordens hematológicas (Horan & Colebatch, 1962). Em 1973, todavia, uma análise detalhada revelou que o risco era muito mais significativo do que se pensava. Foi observado que a septicemia fulminante era pertinente tanto a crianças quanto a adultos e que poderia ocorrer em qualquer tempo, após a esplenectomia (Singer, 1973).

Porém, nas décadas de 1980 e 1990, poucos trabalhos deram ênfase à ocorrência de infecções fatais em pacientes que sofreram esplenectomia, apesar de diversos casos de IFPE estarem sendo relatados, não apenas em pacientes com doenças hematológicas e malignas como também em indivíduos que sofreram esplenectomias após trauma (Norris *et al.*, 1996; Altamura *et al.*, 2001).

## 1.2. Tipos de Cirurgia

A ideia de que o baço poderia ser segmentado foi discutida primeiramente por Assolant, em 1802. Sua pesquisa foi realizada em cães, e demonstrou que a ligação das porções terminais da artéria esplênica afetava apenas aquelas regiões irrigadas pelo suprimento de sangue correspondente, enquanto o restante do baço permanecia viável (McClusky *et al.*, 1999). No ano de 1867, foram publicadas duas operações conservadoras do baço: uma na Índia, onde um baço lesado por faca foi tratado por B. N. Hyatt; a outra foi conduzida em Paris por Jules Emile Péan, para tratar um cisto de baço. Os tempos operatórios foram cuidadosamente descritos e estabeleceram os fundamentos técnicos para a operação conservadora do baço (Morgenstern, 1975). Mais tarde, William Mayo publicou três operações conservadoras do baço. Os pacientes evoluíram bem, permitindo a Mayo preconizar que o baço deveria ser preservado quando possível (Mayo, 1910). Finalmente, o marco definitivo da cirurgia conservadora do baço pertence ao professor Marcelo Barroca Campos Christo (1959). De acordo com esse cirurgião, seguindo a orientação da arquitetura vascular proveniente do pedículo esplênico, qualquer segmento do baço pode ser ressecado, preservando o restante do órgão (Christo, 1962; Petroianu *et al.*, 2003).

Recentemente, diversos grupos têm realizado diferentes procedimentos cirúrgicos de conservação do tecido esplênico visando melhores resultados no que diz respeito à manutenção das funções imunológicas do baço (Nunes *et al.*, 2005; Petroianu *et al.*, 2005; Miko *et al.*, 2007).

### 1.2.1. Esplenectomia total

Guilielmi Ballonii, em 1578, documentou uma cirurgia de esplenectomia total realizada com êxito nas mãos de um barbeiro, cujo nome permanece desconhecido. Diante da vida normal que o paciente teve após a cirurgia, Ballonii questionou: *Este igitu splenatum necessarius* (É,

portanto, o baço necessário?). Infelizmente, esta dúvida já levantada por muitos cirurgiões e pesquisadores ao longo da história, continua atual e é a principal responsável pelas esplenectomias indiscriminadamente realizadas (Mayo, 1928; Petroianu *et al.*, 2003). No século XVII, a fim de se compreender melhor os efeitos da retirada do baço, teve início o estudo da esplenectomia em animais. Estas pesquisas tiveram como principal consequência a descrença em eventuais perigos relacionados à esplenectomia e um aumento no número de indicações para a retirada do baço: traumatismos abdominais abertos (1711); púrpura trombocitopênica (1887); esferocitose (1895); síndrome de Banti (1910); doença de Gaucher (1910); síndrome de Augustus Felty (1924) e hipertensão porta (início do século passado) – (Beer, 1928; Petroianu *et al.*, 2003).

O aumento das indicações de esplenectomia resultou em maior incidência de septicemia e morte, sendo que os principais microrganismos responsáveis pelas infecções pós-esplenectomia são *Pneumococcus* (50%), *Meningococcus* (12%), *Escherichia coli* (11%), *Haemophilus influenza* (8%), *Staphylococcus* (8%) e *Streptococcus* (7%) (Singer, 1973). Embora a remoção indiscriminada do baço esteja associada ao risco de infecções subseqüentes, uma devoção radical à filosofia de “salvar o baço a qualquer custo” também pode representar um risco para o paciente. Exemplificando esta situação, estão as doenças onde qualquer baço acessório deve ser removido ou o tratamento falhará, tais como: púrpura trombocitopênica, esferocitose ou pancitopenia (Wallace *et al.*, 1982; Cooper & Williamson, 1984; Peitzman *et al.*, 2001).

### **1.2.2. Esplenectomia parcial**

Diversas técnicas operatórias visando à preservação do baço após trauma têm sido descritas. O fator limitante para o sucesso na preservação das funções do baço está associado à massa de tecido esplênico conservada (De Boer *et al.*, 1972; Peitzman *et al.*, 2001). Van Wyck e colaboradores investigaram a resposta de ratos ao desafio por injeção endovenosa com

*pneumococcus*. Os animais foram submetidos anteriormente a graus diversos de esplenectomia parcial, esplenectomia total ou operação simulada (sham). Os resultados mostraram que animais com resíduos de tecido esplênico maiores (300 mg) apresentaram proteção contra a infecção por *pneumococcus*, em níveis comparados àqueles observados nos animais, controle sham. Entretanto, animais que possuíam resíduos de massa esplênica menores (100 mg) não apresentaram proteção, enquanto animais que possuíam resíduos de massa e tamanho moderados (200 mg) apresentaram proteção em níveis intermediários (Van Wyck *et al.*, 1980). Bradshaw e Thomas, com o objetivo de definir a massa crítica de tecido esplênico necessária para preservar as funções do baço, estudaram a capacidade de ratos com 25%, 50% ou 75% de seu baço removido, para responder ao desafio por *pneumococcus*, utilizando como grupo controle animais esplenectomizados ou animais sujeitos ao trauma operatório (sham). Ocorreu uma correlação direta entre a massa de tecido esplênico conservada e a dose letal média de *pneumococcus*. Além disso, abaixo do patamar crítico de 25%, não ocorreu uma resposta imune satisfatória (Bradshaw & Thomas, 1982). Em outros dois estudos, procedimentos similares foram utilizados em ratos e no modelo murino e, embora não exista um consenso nos níveis de tecido esplênico necessários para a manutenção das funções imunológicas do baço, todos sugerem que no mínimo 25% a 50% do órgão deve ser conservado, para que a resposta imune seja satisfatória (Pouche *et al.*, 1987; Hebert, 1989).

Em estudos clínicos, a esplenectomia parcial apresentou vantagens em relação à esplenectomia total no que diz respeito à preservação das funções esplênicas. Um estudo realizado com 51 pacientes que sofreram trauma abdominal e dano no baço demonstrou que a esplenectomia parcial resultou em normalidade da função reticuloendotelial, porém, ainda não existem dados suficientes que possam estabelecer os níveis de tecido esplênico remanescentes necessários para conservar as funções esplênicas (Traub *et al.*, 1987). De acordo com a literatura, para se preservar o baço seria indispensável a integridade do pedículo vascular. Entretanto, Petroianu observou que

os vasos esplenogástricos não são ramos ou afluentes do pedículo vascular, mas constituem circulação independente, que conecta a circulação do fundo gástrico com os vasos do parênquima do pólo superior do baço. Esse conhecimento foi fundamental para que se propusesse um modelo de esplenectomia parcial, com preservação do pólo superior do baço suprido apenas pelos vasos esplenogástricos, após a ligadura das artéria e veia esplênicas. A partir de 1984, Petroianu passou a tratar hipertensão porta combinando a esplenectomia parcial também com a desconexão portarizes. As indicações da esplenectomia parcial foram estendidas, para demais estados patológicos, por Petroianu e colaboradores, e, com uma experiência superior a 230 operações, ainda não foram registradas complicações decorrentes da preservação do pólo superior do baço suprido apenas pelos vasos esplenogástricos (Petroianu *et al.*, 2003).

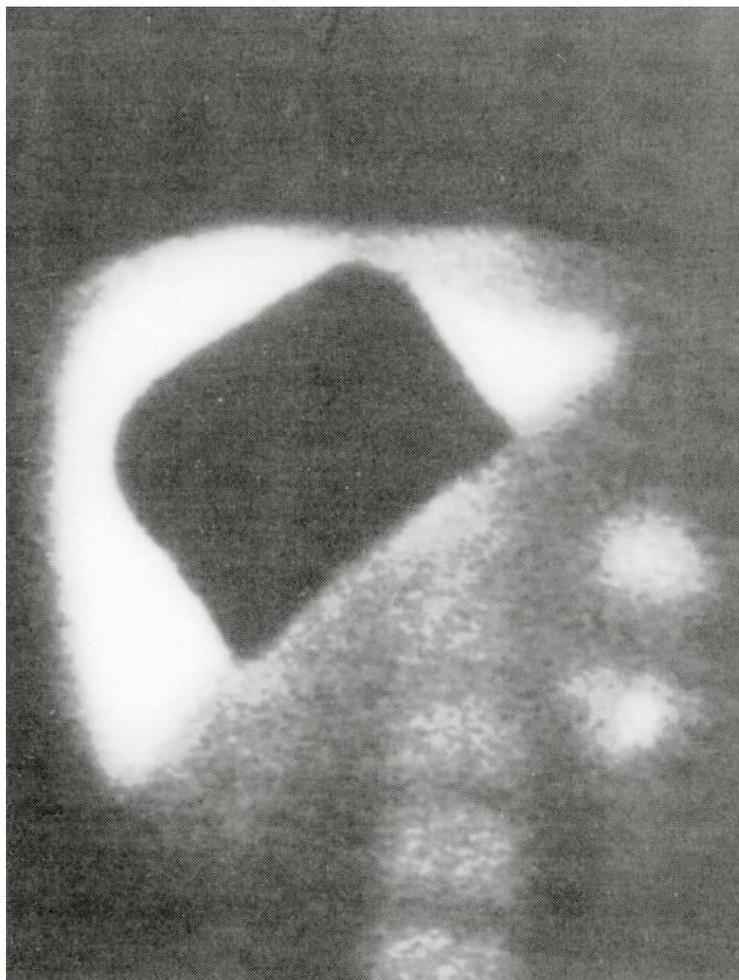
### **1.2.3. Autotransplante de baço**

A idéia de semear tecido esplênico em diferentes locais do abdome se baseia na esplenose, que consiste na implantação natural de segmentos de baço rompido após trauma. Grande parte das esplenoses ocorre dentro do abdome, porém, em vítimas de politraumatismos, não são raros os relatos de tais implantes no tórax e até em membros (Buchbinder & Lipkoff, 1935; Petroianu *et al.*, 2003).

A capacidade do implante autógeno de tecido esplênico, em proteger animais esplenectomizados e infectados do possível desenvolvimento de septicemia, depende do sítio de implante. Animais que tiveram a região subcutânea como sítio eletivo não apresentaram índices de mortalidade diferentes, quando comparados a ratos esplenectomizados em resposta ao desafio por *Streptococcus*. Todavia, quando o sítio de implante utilizado foi a região intraperitoneal, ocorreu uma redução significativa na mortalidade com relação aos animais esplenectomizados, alcançando uma proteção similar àquela observada nos animais controle sham (Livingston *et al.*, 1983).

O implante autógeno de tecido esplênico tem sido realizado em vários sítios incluindo a região subcutânea, o retroperitônio, o músculo retal e o grande omento, sendo este último o mais utilizado, embora apresente eventuais complicações, tais como casos de torção do implante, anemia e abscesso devido à necrose do tecido implantado (Liaunigg *et al.*, 1992; Ando *et al.*, 1997). Nosso grupo preconizou o retroperitônio como sítio eletivo e demonstrou que além dos padrões histológicos e aceitação do enxerto não diferirem neste sítio com relação ao grande omento, sua facilidade técnica e os menores riscos de complicações podem ser determinantes no procedimento cirúrgico (Nunes *et al.*, 2005). Com relação à viabilidade do implante esplênico, resultados de cintilografia evidenciam a neovascularização do tecido implantado (Figura 1) (Sharma *et al.*, 1996). O modelo murino, porém, apresenta como evidência de viabilidade as características morfológicas do tecido autógeno implantado (Nunes *et al.*, 2005; Miko *et al.*, 2007). Estudos experimentais que provam a eficácia da utilização do implante autógeno de tecido esplênico em proteger contra sepse existem na literatura desde a década de trinta. No Brasil, Ferraz e Pinto implantaram tecido esplênico autógeno em paciente esplenectomizado por eles, no ano de 1934, e são considerados os precursores da técnica no país (Perla & Marmorston-Gottesman, 1930; Petroianu *et al.*, 2003).

O implante autógeno de tecido esplênico é uma alternativa para os casos onde a esplenectomia total é inevitável. Esta técnica demonstrou ser menos efetiva em preservar a função reticuloendotelial, quando comparado à esplenectomia parcial, mas indubitavelmente apresenta grande valor em relação à esplenectomia total, conforme os diversos estudos que demonstraram a viabilidade do tecido autógeno implantado, sendo capaz de apresentar revascularização, padrões histológicos comparados aos do baço intacto e crescimento em indivíduos asplênicos (Leemans *et al.*, 1999; Nunes *et al.*, 2005; Petroianu & Petroianu, 2005; Miko *et al.*, 2007).



**Figura 1: Cintilografia.** Paciente foi submetido à esplenectomia e implante autógeno de tecido esplênico. Os dois fragmentos visualizados demonstram a viabilidade do enxerto. Eritrócitos foram rádiomarcados *in vitro* com tecnécio 99 (Tc99m) e injetados pela via endovenosa. Dois sítios de tecido esplênico funcionais foram localizados no abdômen, próximo ao fígado. Fonte: Sharma *et al.*, 1996.

### 1.3. Baço e Resposta Imune

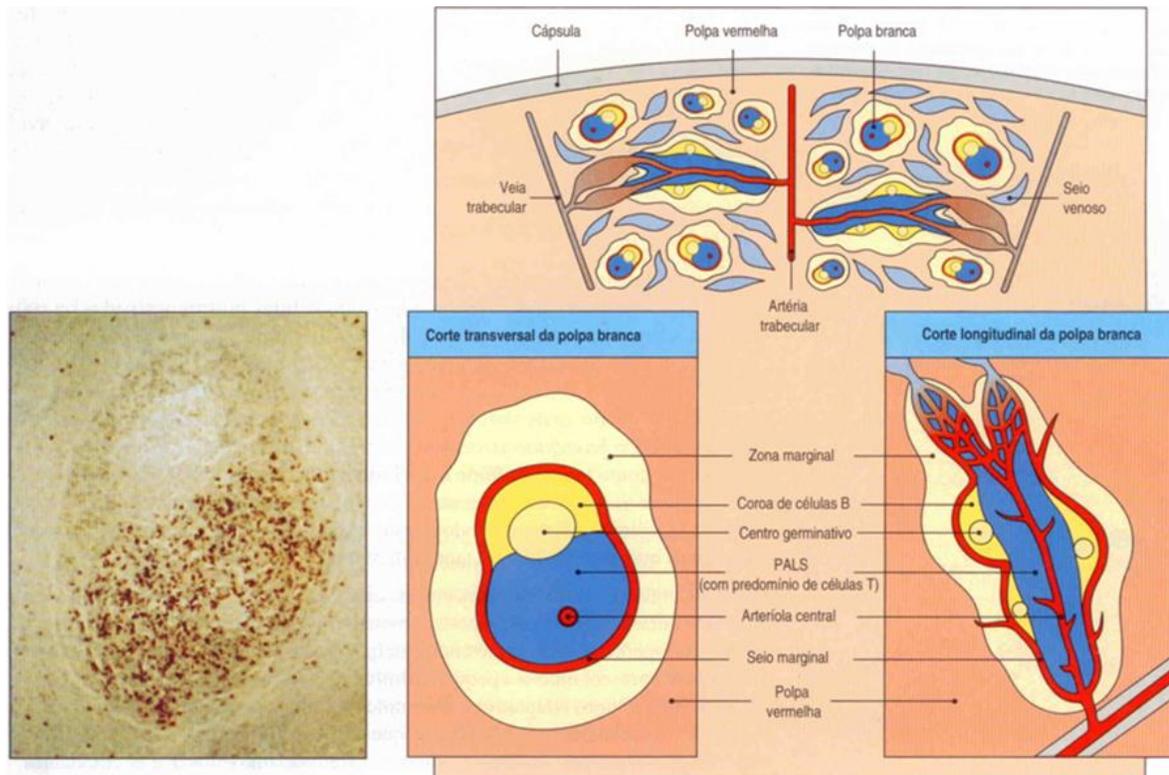
O baço apresenta um fluxo sanguíneo de aproximadamente 200-300 ml/min para cada 100 a 150 gramas do órgão no ser humano. O sangue passa através da polpa vermelha esplênica, uma espécie de filtro envolvido na remoção de partículas e eritrócitos senescentes ou danificados. Além disso, a fagocitose de eritrócitos exercida pelos macrófagos da polpa vermelha, assim como macrófagos do fígado, é importante para a reciclagem do ferro (Altamura *et. al.*, 2001; Knutson & Wessling-Resnick, 2003).

Macrófagos e monócitos expressam um transportador para metais de dupla valência, denominado proteína de resistência natural associada a macrófagos (natural-resistance-associated macrophage protein – NRAMP). O NRAMP está envolvido com a resistência contra certos patógenos intracelulares, o que está associado à habilidade desta molécula em transportar o ferro através da membrana do fagossomo. Este transporte interfere com o metabolismo do ferro de microrganismos patogênicos e conseqüentemente, limita o seu crescimento. Curiosamente, o mesmo transportador, que surgiu de um mecanismo baseado no transporte de ferro, acabou sendo adaptado para o combate contra patógenos em células específicas que já se encontravam comprometidas com o metabolismo do ferro por meio da fagocitose de eritrócitos. Assim, há a associação de duas importantes funções da polpa vermelha esplênica (Hackam *et. al.*, 1998; Gruenheid & Gros, 2000; Mebius & Kraal, 2005).

Diversos patógenos competem pelo ferro secretando moléculas que possuem alta afinidade para este metal, tais moléculas (siderofóros), são complexadas com lipocalina-2, cuja secreção ocorre em macrófagos estimulados via reconhecimento de patógenos por meio dos receptores do tipo toll (toll-like receptors – TLR). Dada a complexidade dos mecanismos de aquisição de ferro e a habilidade de diversos patógenos em escapar do reconhecimento pela lipocalina-2, há uma forte

evidência da importância desta molécula nas relações parasito-hospedeiro. Lipocalina-2 representa uma barreira contra a disseminação de bactérias, incluindo aquelas que fazem parte da flora bacteriana, além disso, pode atuar em diversos processos biológicos, tais como, neoplasias, desenvolvimento e reparo dos rins e involução do útero e das glândulas mamárias (Yang *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2005; Smith, 2007). Assim, a lipocalina-2, que é produzida sob estimulação em altos níveis nos macrófagos da polpa vermelha, limita o crescimento dos patógenos. Estes exemplos sugerem que a polpa vermelha não apenas funciona como filtro devido à sua localização, mas também age no combate a infecções e facilita o metabolismo do ferro (Ratledge & Dover, 2000; Flo *et al.*, 2004; Mebius & Kraal, 2005).

O sangue também atravessa a polpa branca que se divide em zonas de células T e B. Tanto as artérias centrais quanto as arteríolas possuem uma bainha concêntrica de linfócitos T, conhecida como bainha linfóide periarteriolar (periarterial lymphatic sheaths – PALS) (Timens, 1991; Liu, 1997; Loder *et al.*, 1999). Estas PALS são zonas de células T no baço que aparecem circundadas, como numa coroa, por folículos linfóides contendo linfócitos B (Figura 2). Outra importante área é a zona marginal, que se localiza mais externamente, circundando toda a estrutura. A zona marginal parece ser um sítio primário de entrada de células B e T para um eventual encontro com os antígenos trazidos por meio da circulação (Claassen *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1988; Timens, 1991). Na zona marginal, células B de memória podem ser encontradas após resposta imune primária (Altamura *et al.*, 2001). Estas células B se apresentam como um subtipo bastante peculiar, geralmente elas não circulam e têm fenótipo  $IgM^+/IgD^-$  que é oposto àquele apresentado pelas células B foliculares que são  $IgM^+/IgD^+$ . Uma região de macrófagos separa a zona marginal das bainhas linfóides periarteriolas e dos folículos (Cesta, 2006).



**Figura 2. Organização dos tecidos linfóides do baço.** O baço consiste de uma polpa vermelha (áreas róseas), que é o local de destruição de eritrócitos e reciclagem de ferro, entremeadas de polpa branca linfóide (áreas amarelas e azuis nos quadros inferiores). O quadro central exibe a ampliação de uma pequena seção do baço, mostrando o arranjo de discretas zonas de polpa branca ao redor de arteríolas centrais. A micrografia mostra uma seção transversal da polpa branca corada com hematoxilina e eosina. Fonte: *Imunobiologia – Charles A. Janeway et al.*, 5ª edição 2002.

Com relação aos macrófagos, dois subtipos podem ser encontrados na zona marginal. Os macrófagos do sino marginal formam um anel externo de macrófagos e se caracterizam por expressar uma lectina do tipo C (Specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing nonintegrin-related 1 – SIGNR1) e o receptor de macrófagos com estrutura de colágeno (macrophage receptor with collagenous structure – MARCO). O segundo subtipo, macrófagos metalofílicos da zona marginal, estão localizados mais próximos à polpa branca e formam um anel interno de macrófagos. Estas células são caracterizadas pela expressão de moléculas de adesão sialoadesina (sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin 1 – SIGLEC1). Entre estes dois subtipos de macrófagos, se localizam as células B da zona marginal e um subtipo de células dendríticas (Elomaa *et. al.*, 1995; Munday *et. al.*, 1999; Geijtenbeek *et. al.*, 2002; Mebius & Kraal, 2005).

No baço e nos linfonodos de camundongos, as células dendríticas são caracterizadas pela expressão de CD11c e MHC de classe II. Existem pelo menos três subtipos diferentes de células dendríticas no baço: As células dendríticas linfóides ( $CD11c^{high}CD8\alpha^{+}CD11b^{-}DEC205^{+}$ ), as células dendríticas mielóides ( $CD11c^{high}CD8\alpha^{-}CD11b^{+}DEC205^{-}$ ) e as células dendríticas plasmocitóides ( $CD11c^{intermediate}CD8\alpha^{+/-}CD11b^{-}B220^{+}Gr-1^{+}$ ) (Shortman & Naik, 2007). Embora a sensibilização de células dendríticas através de estímulos patogênicos seja crucial para a sua ativação, existe um número crescente de evidências sugerindo que as citocinas e quimiocinas, presentes no microambiente, podem modular as funções destas células e influenciar na resposta imune. Estudos *in vitro* sugerem que células dendríticas quando colocadas em cultura com IL-10 ou TGF- $\beta$  induzem respostas do tipo Th2 ou regulatórias, enquanto células dendríticas em cultura com IFN- $\gamma$  induzem respostas Th1. Além disso, células do estroma podem condicionar as células dendríticas a diferentes respostas, por exemplo, células dendríticas da placa de Peyer ou do trato respiratório apresentam respostas do tipo Th2, enquanto células dendríticas do baço apresentam respostas do tipo Th1/Th0, indicando que o microambiente influencia a função das células

dendríticas (Kalinski *et. al.*, 2000; Spörri & Reis e Sousa, 2005; Pulendran *et. al.*, 2008).

Embora a especialização funcional e a plasticidade das células dendríticas sejam conceitos amplamente aceitos, trabalhos recentes sugerem possíveis mecanismos de cooperação entre distintos subtipos de células dendríticas. Yoneyama e colaboradores sugeriram que infecção por vírus herpes simples (HSV) em linfonodos de camundongos causou o recrutamento de células dendríticas plasmocitóides que cooperaram com as células dendríticas locais na geração de respostas, através de linfócitos T citotóxicos específicos. Embora as células dendríticas plasmocitóides isoladas não consigam induzir os linfócitos T citotóxicos, a depleção *in vivo* deste subtipo celular trouxe prejuízos para a ação dos linfócitos T citotóxicos na erradicação do vírus. Conseqüentemente, o auxílio exercido pelas células dendríticas plasmocitóides para as células dendríticas dos linfonodos, na resposta imune primária, parece ser fundamental para uma indução adequada de linfócitos T citotóxicos anti-HSV (Yoneyama *et. al.*, 2005; Pulendran *et. al.*, 2008).

Outro exemplo de colaboração entre células dendríticas foi sugerido por Kuwajima e colaboradores, estes pesquisadores observaram que camundongos deficientes em IL-15 e tratados com motivos de DNA (unmethylated cytosine–phosphate-guanine oligodeoxynucleotide – CpG) apresentaram baixa produção de IL-12 e sucumbiram após desafio com *Listeria monocytogenes*. Células dendríticas convencionais estimuladas por CpG foram as principais produtoras de IL-15 e IL-12, porém a produção de IL-12 não ocorreu na ausência de células dendríticas plasmocitóides. A expressão de CD40 nas células dendríticas convencionais é induzida pela IL-15 produzida por estas mesmas células. A interação entre CD40 nas células dendríticas convencionais com CD40 ligante (CD40L) nas células dendríticas plasmocitóides leva à produção de IL-12 pelas células dendríticas convencionais. Assim, a cooperação dependente de IL-15 entre células dendríticas convencionais e células dendríticas plasmocitóides é essencial para a ativação da resposta imune induzida por motivos CpG (Kuwajima *et. al.*, 2006; Pulendran *et. al.*, 2008).

Células dendríticas do baço de camundongos estimulados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com antígenos provenientes de diversos microorganismos, produzem altos níveis da subunidade p40, que constitui parte da interleucina-12 (IL-12) (Reis e Sousa *et al.*, 2003). Porém, para passar a produzir a subunidade p35, e assim sintetizar a molécula de IL-12 ativa (p70), as células dendríticas que possuem o marcador CD40 estão condicionadas a um segundo sinal exercido pelo marcador CD40L, que está presente nas células T ativadas e nas células dendríticas plasmocitóides. O mais interessante é que injetando anticorpos anti-CD40 em camundongos que não estavam sofrendo processo infeccioso ou estímulo microbiano, houve baixa produção de IL-12, o que indica a necessidade de uma resposta imune inata precedente, que condicione as células dendríticas à produção desta citocina (Schulz *et al.*, 2000).

Esta resposta imune inata pode ser eficazmente montada no baço. MARCO e SIGNR1 são receptores específicos da zona marginal e, juntamente com receptores do tipo toll, reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs). O SIGNR1 reconhece antígenos de polissacarídeos, tais como lipoarabinomanana, que está presente na superfície de *Mycobacterium tuberculosis*, e tem demonstrado ser crucial para o reconhecimento e combate a *Streptococcus pneumoniae*, além de infecções virais. O MARCO pode reconhecer diversos patógenos, dentre os quais *Staphylococcus aureus*. Além disso, existe um padrão de reconhecimento complementar entre SIGNR1 e MARCO com relação a estes patógenos (Elomaa *et al.*, 1995; Oehen *et al.*, 2002; Koppel *et al.*, 2004; Lanoue *et al.*, 2004; Wluka & Olszewski, 2006).

Em respostas a antígenos dependentes da participação de células T (TD – proteínas), as células B proliferam e migram para os folículos linfóides dando surgimento aos centros germinativos ou diferenciam-se em plasmócitos dentro das coroas de células B. No caso de resposta independente da participação de células T do tipo um (TI-1 – LPS – lipopolissacarídeos),

embora aconteça intensa diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, tanto nas coroas quanto na polpa vermelha, a proliferação folicular é moderada. Em respostas independentes da participação de células T do tipo dois (TI-2 – polissacarídeos), a maior parte das células B se diferencia em plasmócitos. Já com relação às respostas secundárias do tipo TD, há extensiva proliferação e diferenciação de células B nas coroas. Todavia, a proliferação nos folículos linfóides é menos extensa quando comparado à resposta primária (Liu *et al.*, 1991; Liu & Arpin, 1997).

O acúmulo de linfócitos B antígeno-específicos dentro das coroas de células B nos primeiros dias da resposta imune é crítico para o eventual encontro com as células T antígeno-específicas (Cyster, 1997; Liu, 1997). O destino das células B, entretanto, depende não apenas da célula T auxiliar, mas também do tipo de imunógeno (proteínas, LPS ou polissacarídeos). Na ausência da célula T auxiliar, os linfócitos B sucumbem nas respostas do tipo TD, mas em uma resposta TI-2 se diferenciam em plasmócitos (Claassen *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1988; Matsuno *et al.*, 1989). Células B imaturas e células B de memória também respondem diferentemente ao estímulo das células T auxiliares. Embora as células B imaturas migrem para os folículos linfóides produzindo os centros germinativos, os linfócitos B de memória sofrem diferenciação em plasmócitos (Matsuno *et al.*, 1989).

A capacidade fagocítica dos macrófagos esplênicos é fundamental para a remoção de bactérias do sangue. Em ratos imunizados com polissacarídeos de pneumococo, a esplenectomia conduz ao acúmulo de polissacarídeos nos linfonodos e à retenção de complexos imunes, aumentada nos folículos destes órgãos (Van den Dobbelsteen *et al.*, 1993). O baço é importante sítio de produção de anticorpos e as células B da zona marginal parecem ser responsáveis pela resposta *in vivo* TI-2. Estes anticorpos auxiliam na opsonização de antígenos TI-2, tornando a remoção destes antígenos menos dependente da polpa vermelha esplênica, podendo ocorrer ao nível hepático (Van den Dobbelsteen *et al.*, 1993; Reid, 1994; Altamura, *et al.*, 2001).

Geralmente, linfócitos T CD4<sup>+</sup> são considerados como sendo células T auxiliares produtoras de citocinas, enquanto células T CD8<sup>+</sup> são consideradas células T citotóxicas. Ambas as populações, porém, podem produzir citocinas. A produção de diferentes citocinas pelas células T CD4<sup>+</sup> tem levado à sua classificação em pelo menos quatro subtipos diferentes. Assim, temos células T auxiliares do tipo1 (T-helper – Th1), células T auxiliares do tipo2 (Th2), células T auxiliares do tipo 17 (Th17) e células T regulatórias (Tregs) (Afzali *et al.*, 2007). A produção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), através do mecanismo da resposta imune conhecido como fase cognitiva, leva a fosforilação do ativador da transdução de sinal de transcrição quatro (signal transduction and activator of transcription - 4 – STAT4), característico de células Th1. Células Th2 produzem IL-4 e sinalizam por meio de STAT6. Uma vez diferenciada, cada linhagem é caracterizada por um perfil próprio de citocinas, com IFN- $\gamma$  sendo a principal citocina das células Th1, IL-4 a principal citocina das células Th2, TGF- $\beta$  a principal citocina de células Treg e TGF- $\beta$  associada a IL-6 como indutores de células Th17, além de seu próprio fator de transcrição, *T-bet* para Th1, *GATA-3* para Th2, *FoxP3* para Tregs e *ROR $\gamma$ t* para Th17 (Zheng & Flavell, 1997; Szabo *et al.*, 2002; Fontenot *et al.*, 2003; Ivanov *et al.*, 2006).

A qualidade da resposta primária de células T auxiliares em camundongos neonatos é fortemente dependente do sítio inicial de exposição antigênica: repostas iniciadas nos linfonodos são mescladas nos perfis Th1/Th2, enquanto respostas que ocorrem no baço são fortemente Th2, levando a resposta do tipo humoral (Adkins *et al.*, 2000; Altamura, *et al.*, 2001).

Macrófagos da zona marginal podem agir como APCs carregando polissacarídeos bacterianos, apresentando estes antígenos já processados às células B próximas. Este mecanismo ocorre por meio da indução de células produtoras de anticorpo do tipo IgM anti-polissacarídeo no baço. Permanece obscuro se os macrófagos da zona marginal agem de maneira direta ou por meio da secreção de interleucina-1 (IL-1), na indução da resposta TI-2 (Van den Dobbelsteen *et al.*,

1993; Altamura, *et al.*, 2001).

Em linfonodos murinos, o número de células imaturas é bastante superior quando comparado com o número de células de memória, enquanto no baço a quantidade de células de memória é maior. Esta diferença na composição celular pode representar diferentes funções desses compartimentos na resposta imune (Nolte, *et al.*, 2000; Langeveld *et al.*, 2006). A distribuição dos diferentes subtipos de linfócitos no baço é bastante diversa daquela verificada no sangue periférico e nos linfonodos. O baço contém mais células B que células T (Langeveld *et al.*, 2006). Em camundongos normais, apenas as células de memória podem circular com a linfa e o sangue, sendo capazes de adentrar nos folículos linfóides do baço e dos linfonodos. Esta capacidade é deveras importante para uma efetiva resposta imune. Apenas as células B que adentram nos folículos têm acesso aos antígenos carregados pelas células dendríticas foliculares, e são capazes de iniciar as reações nos centros germinativos, produzindo então anticorpos antígenos-específicos de alta afinidade (Loder, *et al.*, 1999).

O reconhecimento por meio dos receptores do tipo TLR, ativa o fator de transcrição NFκB e diversos genes dependentes deste fator de transcrição, tais como, os genes responsáveis pela produção de citocinas, quimiocinas e das moléculas co-estimulatórias CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) (Medzhitov & Janeway, 2000). Outros membros da família dos receptores TLR, incluindo TLR2, têm demonstrado reconhecer lipoproteínas bacterianas e o peptídeo glicano presente nas paredes das bactérias Gram-positivas. Uma mutação no gene *MyD88*, responsável pela transcrição da proteína adaptadora que conecta diversos membros da família “Toll” a quinases das vias de transdução de sinais, tais como: a quinase associada ao receptor de interleucina-1 (IL-1 receptor associated kinase - IRAK), provoca ausência de resposta tanto para LPS quanto para peptídeo glicano (Adachi *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 1999; Medzhitov & Janeway, 2000).

Ambos os tipos de resposta imune, inata e adaptativa, são requeridos para distinguir entre

antígenos próprios (“self”) e não próprios (“nonself”), e mais que isso, também são sustentados no tecido linfóide periférico pelo contato entre os diferentes tipos celulares. Assim, vale ressaltar a importância do ambiente onde se dará o evento conhecido como sinapse imunológica, que representa a apresentação antigênica em todos os seus detalhes, e a importância das moléculas e células presentes, induzindo uma eventual resposta ou tolerância a agentes infecciosos que acometem o organismo, dependendo de cada fator: perfil de citocinas, sinais co-estimulatórios, tipos celulares envolvidos e estágio de desenvolvimento destas células (Vaz *et al.*, 1997; Lanzavecchia & Sallusto, 2001).

#### **1.4. Resposta Imune a *Staphylococcus aureus***

O patógeno humano *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva responsável por uma ampla variedade de infecções hospitalares. *S. aureus* pode permanecer de forma inofensiva como bactéria comensal, habitando a pele e as mucosas, mas pode também sobreviver em diversos tecidos e na corrente sanguínea, causando importantes doenças, incluindo infecções na pele, choque tóxico ou outras enfermidades sistêmicas (Projan & Novick, 1997; Verhoef *et al.*, 2004; Rooijackers *et al.*, 2005).

Alguns grupos de pacientes apresentam maior probabilidade em se infectar com bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*. Indivíduos com ferimentos cirúrgicos ou traumáticos distantes da região abdominal têm maior probabilidade de desenvolver infecções nos ferimentos e choque séptico provocados por bactérias Gram-positivas (Sriskandan & Cohen, 1999).

Análises histológicas de tecidos obtidos de animais que apresentavam sepse demonstraram acúmulo de neutrófilos no foco de infecção. Este acúmulo geralmente é maior em infecções causadas por bactérias Gram-positivas quando comparado com infecções causadas por bactérias Gram-negativas (Schlievert *et al.*, 1996). Os neutrófilos são as principais células do organismo

responsáveis pela contenção do *S. aureus*, agindo por meio da fagocitose e da liberação de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico (NO), que são tóxicos para o patógeno (Rooijackers *et al.*, 2005). Porém, existem evidências que *S. aureus* também pode sobreviver dentro dos neutrófilos e desta maneira se disseminar pelo organismo (Gresham *et al.*, 2000). Estudos clínicos têm sugerido queda nos níveis plasmáticos de tuftsin em pacientes submetidos à esplenectomia, o que leva ao decréscimo da capacidade fagocítica de neutrófilos e à dificuldade na ativação da via alternativa do sistema do complemento (Oakes, 1981; De Ciutiis *et al.*, 1978). De fato, estudos *in vitro* indicam que a destruição de *S. aureus*, mediada por neutrófilos, não ocorre na ausência de anticorpos e outras opsoninas (Gresham *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1992).

Diversas toxinas estafilocócicas atuam como moléculas capazes de ativar o sistema imune, são proteínas capazes de se ligar ao receptor de antígeno de células T de uma maneira diferente dos antígenos convencionais, estimulando estas células a produzir citocinas e, sendo por isso, denominadas superantígenos. Estas toxinas são apresentadas por meio de moléculas MHC de classe II para as células T, ligando-se na porção  $V\beta$  do TCR. O *S. aureus* apresenta pelo menos três superantígenos importantes: a enterotoxina B (Staphylococcal enterotoxin B – SEB), a enterotoxina A (Staphylococcal enterotoxin A – SEA) e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (toxic shock syndrome toxin 1 – TSST-1) (Tokura *et al.*, 1994; Muraille *et al.*, 1997).

Os superantígenos bacterianos ligam-se principalmente à alça CDR2  $V\beta$  e, com menor intensidade, à alça CDR1  $V\beta$  e a uma alça adicional chamada de alça hipervariável 4 ou HV4. Cada superantígeno pode ligar um ou poucos produtos diferentes dos segmentos  $V\beta$ , dos quais existem 20 a 50 em camundongos e no homem; um superantígeno pode, assim, estimular 2 a 20% de todas as células T, um número substancial se comparado com o número de células T que se tornam ativadas pelos antígenos peptídicos convencionais, 1 em  $10^5$ - $10^6$  (Proft & Fraser, 2003).

Este estímulo não é específico para um dado agente patogênico e, assim, não leva a uma imunidade adaptativa. Em vez disso, ele causa produção maciça de citocinas pelas células T CD4<sup>+</sup>, a população responsiva predominante. A resposta imune inicial é seguida por supressão significativa de todas as respostas imunes e os detalhes desta supressão não são totalmente compreendidos, sabe-se, no entanto, que as células T estimuladas proliferam e então rapidamente sofrem apoptose, levando à imunossupressão generalizada, bem como à deleção de muitas células T na periferia (Fleischer, 1994; Muraille *et al.*, 1997; Janeway *et al.*, 2002).

A liberação massiva de citocinas pode levar ao choque tóxico, caracterizado por choque profundo e falência múltipla de órgãos. Os animais, em particular os camundongos, são relativamente resistentes aos superantígenos, tornando o estudo dos mecanismos que conduzem ao choque séptico de difícil execução. Além disso, a resposta aos superantígenos varia de acordo com a cepa de camundongo utilizada. Camundongos C57BL/6 apresentam como principais moléculas que se ligam aos superantígenos V $\beta$ 3 e V $\beta$ 11, enquanto camundongos BALB/c apresentam V $\beta$ 20 (Takimoto *et al.*, 1990; Bravo de Alba *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 2002). Assim, muitas cepas de camundongos não desenvolvem choque séptico mesmo após injeções de altas doses (4 mg/camundongo) ou infusão contínua (500  $\mu$ g/camundongo) de TSST-1 por exemplo, embora possam desenvolver massiva esplenomegalia (Sriskandan & Cohen, 1999; Dinges *et al.*, 2000). Todavia, a participação destas enterotoxinas na virulência de *S. aureus* é crítica quando consideramos a doença em humanos. Isso pode ser devido à maior afinidade dos superantígenos ao MHC de classe II humano em relação ao murino (Proft & Fraser, 2003).

Apesar da propriedade imunossupressora dos superantígenos, a enterotoxina de *S. aureus* condiciona o sistema imune inato à exacerbação da resposta quando estimulado por PAMPs. Quando pré-ativadas com enterotoxina, células dendríticas tiveram aumento na síntese de TNF- $\alpha$  e IL-12 em resposta a LPS, indicando que a enterotoxina é capaz de condicionar as células do

sistema imune inato ao reconhecimento por meio de TLR4 (Rossi *et al.*, 2004). Além disso, em respostas secundárias à enterotoxina B (SEB), células T foram capazes de produzir IFN- $\gamma$  e ativar a expressão de CD25 e CD69, sugerindo que a suposta imunossupressão não é absoluta (Hamel *et al.*, 1995).

A expansão clonal de células T em resposta a *S. aureus* pode estar associada à sinalização por meio de TLR, que induz o aumento na expressão de CD25, o surgimento de moléculas MHC de classe II na superfície das APCs e a indução da diferenciação de células T específicas em células T de memória. Após a imunização, células T antígeno-específicas desaparecem da circulação e migram para os tecidos linfóides onde poderão ter contato com os antígenos apresentados pelas células dendríticas e outras APCs. Este é um estágio onde as células T serão condicionadas a sobreviver ou morrer, dependendo do estado de ativação do sistema imune inato (Maxwell *et al.*, 2004).

Outro fator que pode ser importante na resposta imune ao *S. aureus* é o ambiente de apresentação antigênica. Células dendríticas provenientes da placa de Peyer apresentam antígenos às células T que secretam altos níveis de IL-10 e IL-4, enquanto células dendríticas provenientes do baço e de linfonodos ao apresentarem os antígenos às células T induzem a produção de IFN- $\gamma$  e IL-12 (Iwasaki & Kelsall, 2001; Faria & Weiner, 2005).

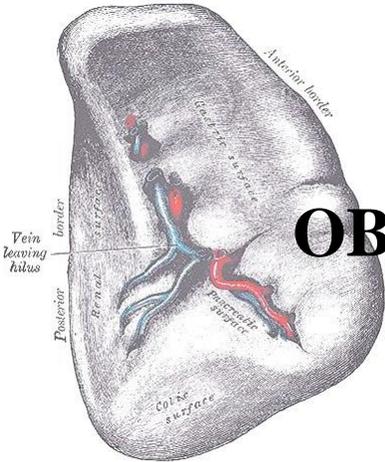
A importância do ambiente e das células dendríticas nas respostas imunes também é evidenciada no modelo de infecção com *Leishmania donovani*. A capacidade das células dendríticas em apresentar antígenos de *Leishmania* para células T específicas está condicionada à sua capacidade de expressar moléculas MHC de classe II, à produção de IL-12 induzindo a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T ativadas e ao controle da replicação do parasito no baço dos camundongos infectados (Basu *et al.*, 2000). Utilizando imunoterapia com transferência adotiva de células dendríticas previamente ativadas com LPS, ocorreu o aumento na resistência à

*Leishmania donovani*, sendo que interleucina-6 (IL-6) parece desempenhar um papel fundamental nesta função da célula dendrítica (Stäger *et al.*, 2006).

A IL-6, juntamente com IL-1 e TNF- $\alpha$  são responsáveis pela resposta de fase aguda. Uma reação que envolve alterações nos níveis de expressão de algumas proteínas secretadas no fígado, as quais ganham a corrente sanguínea. Estas proteínas são chamadas proteínas de fase aguda e apresentam alta especificidade para as PAMPs, podendo agir como opsoninas, além de ativar o sistema complemento (Bopst *et al.*, 1998; Ramadori & Christ, 1999; Horn *et al.*, 2000).

Finalmente, o estímulo de células dendríticas com antígenos de *S. aureus*, LPS e motivos CpG), que são reconhecidos pelos receptores TLR2, TLR4 e TLR9, respectivamente, aumentaram a expressão das moléculas co-estimulatórias B7-1 e B7-2 nas células dendríticas do baço, mas não em células de Langerhans. O que representa a importância do baço na imunidade inata às infecções bacterianas, como àquelas causadas por *S. aureus* (Mitsui *et al.*, 2004).

Nosso trabalho sugere que a prática de se realizar a cirurgia de remoção do baço, tanto após trauma como em patologias que acometem este órgão, deve ser repensada e reavaliada, a fim de se buscar alternativas que mantenham resquícios de tecido esplênico, tais como, esplenectomia parcial ou implante autógeno de tecido esplênico, e assim, conservar a capacidade de montar uma resposta imune satisfatória contra infecções que poderiam surgir em indivíduos asplênicos.



# OBJETIVOS

## 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da esplenectomia e do implante autógeno de baço na capacidade de camundongos de controlar a infecção endovenosa por *Staphylococcus aureus*.

## 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a evolução da infecção causada por *S. aureus* nos animais esplenectomizados, comparando com o grupo de animais esplenectomizados e autotransplantados e com os animais que sofreram operação simulada (grupo controle sham).
- Verificar o influxo de macrófagos e neutrófilos para os pulmões nos camundongos infectados por *S. aureus*.
- Avaliar os padrões histológicos no fígado e pulmões dos camundongos sujeitos aos diferentes procedimentos cirúrgicos e infecção por *S. aureus*.
- Verificar as populações celulares envolvidas na resposta imunológica e seu perfil de distribuição no baço, fígado e pulmões, após infecção por *S. aureus*.
- Avaliar os níveis de produção de citocinas e óxido nítrico NO em resposta à infecção por *S. aureus*.
- Avaliar a cinética de produção de citocinas e anticorpos em resposta à infecção por *S. aureus* no plasma dos camundongos infectados.



# MATERIAIS E MÉTODOS

### **3.1. Animais Experimentais**

Foram utilizados grupos de 33 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, de 8-10 semanas de idade. Os animais foram obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR-UFJF) e mantidos no setor de manutenção e experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB-UFJF, em microisoladores colocados em estantes climatizadas, tendo como forma de alimentação exclusivamente ração própria e água. Para cada experimento, os animais foram divididos em 3 grupos, assim distribuídos: Grupo Controle Sham (CT): 11 camundongos sujeitos à laparotomia e não sujeitos a esplenectomia; Grupo Esplenectomizado (SP): 11 camundongos esplenectomizados e Grupo Autotransplantado (AT): 11 camundongos esplenectomizados e autotransplantados no retroperitônio. O projeto está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA), e foi aprovado pela comissão de ética na experimentação animal (CEEA), da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora.

### **3.2. Procedimento Cirúrgico**

Após anestesia com cloridrato de quetamina 5%, cloridrato de Xilazina 2% e cloreto de sódio 0,9%, injetados pela via intra-peritoneal, foi realizada uma laparotomia com subsequente esplenectomia e ligação do pedículo vascular utilizando catgut 5.0 (Shalon, Goiânia, Brasil). Todas as operações foram realizadas em câmara de fluxo laminar, sob condições estéreis. O baço foi cortado em seis fragmentos com aproximadamente 2,5 mm de espessura e mantido em salina tampão fosfato (phosphate buffered saline – PBS) à temperatura ambiente. No grupo AT, o retroperitônio foi exposto próximo ao rim esquerdo e dois fragmentos foram alocados nas proximidades da veia abdominal sem fixação. Nenhuma diferença foi notada entre camundongos,

sujeitos à laparotomia com subsequente sutura (grupo sham), e camundongos não sujeitos à laparotomia. A sutura no tecido foi realizada utilizando nylon 4.0 (Shalon, Goiânia, Brasil). A morte de camundongos devido ao procedimento cirúrgico foi igual entre os grupos e não ultrapassou o limite de 20 % do total de animais.

### **3.3. Cepa Bacteriana**

Foi utilizada para este estudo a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – fundação Oswaldo Cruz (INCQS – FIOCRUZ, Brasil).

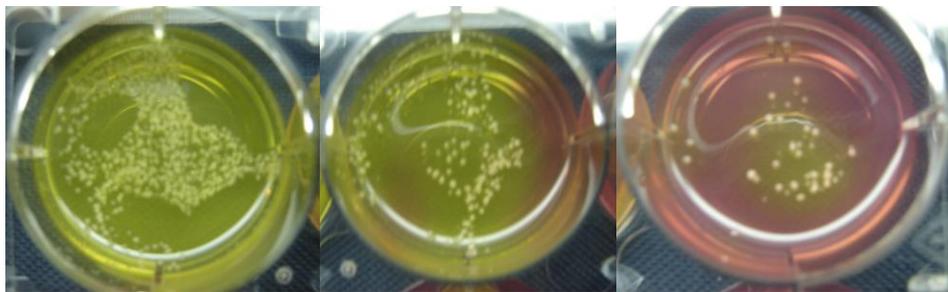
### **3.4. Meios e Condições de Cultivo**

Para o crescimento de *S. aureus*, foi utilizado meio ágar manitol salgado (OXOID), diluído em água livre de impurezas MilliQ (Millipore) e submetido à fervura e esterilização por meio de autoclave por 15 minutos. Placas NUNC de seis poços foram utilizadas como recipiente para o meio solidificado e as culturas foram mantidas em estufa a 37°C (Figura 3). Para o estoque e congelamento das bactérias, foi utilizado o meio de congelamento TSA (peptona 1,35 %,  $K_2HPO_4$  0,36 %,  $KH_2PO_4$  0,09 %, NaCl 0,45 % e glicerina 9 %) em água MilliQ, esterilizado em autoclave por 15 minutos.

### **3.5. Preparo do Antígeno de *S. aureus***

A cultura de *S. aureus* em meio ágar manitol salgado foi recuperada por meio da raspagem com utilização de alça de inoculação e homogeneizada em 10 ml de meio de congelamento TSA. Alíquotas de 1 ml foram preparadas e estocadas em tubos eppendorf (eppendorf) de 1,5 ml a -80°C

contendo as mesmas quantidades de UFC de *S. aureus*. O número de bactérias foi quantificado pela contagem do UFC resultante de diluições das alíquotas em placas contendo meio ágar manitol salgado e por meio da escala de McFarland, que corresponde a uma série de tubos contendo solução de sulfato de bário  $\text{BaSO}_4$  em diferentes concentrações e apresentando graus de turvação que podem ser comparados à turvação da cultura em estudo. O número de bactérias nas alíquotas, obtido por meio destes dois métodos, foi de  $1 \times 10^9$  UFC/ml. Uma alíquota foi diluída em 10 ml de meio de congelamento TSA ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) e submetida à centrifugação a 20000 rpm por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . O precipitado foi lavado duas vezes e ressuspendido com PBS estéril pH 7,2. Posteriormente foi rompido com o auxílio de esferas de vidro de aproximadamente 0,17 mm de diâmetro em tubos homogeneizadores por 2 a 3 minutos, sob constante crio clivagem com nitrogênio líquido. A solução foi centrifugada a 25000 rpm por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante, contendo os antígenos totais de *S. aureus*, foi coletado e armazenado em freezer  $-80^\circ\text{C}$  até o momento da utilização.



**Figura 3. UFC.** UFC de *S. aureus* 1:1, 1:10 e 1:100 em meio ágar Manitol salgado.

### 3.6. Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford

Triplicatas de 5 µl das amostras da proteína foram diluídas em 15 µl de água MilliQ. Para cada poço contendo as amostras, foram adicionados 180 µl do reagente de Bradford (0,01% de Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 % de etanol e 10 % de ácido fosfórico). A reação foi finalizada em 5 minutos e a intensidade de cor resultante foi lida em um comprimento de onda de 600 nm no leitor de microplacas. Para a calibração do aparelho, foram utilizados 20 µl de água MilliQ em 180 µl do reagente de Bradford como branco. A estimativa da quantidade de proteína nas amostras foi feita com base em uma curva padrão de uma solução de albumina bovina sérica (BSA) (Sigma) e ajustada para uma concentração final de 2 mg/ml.

### 3.7. Infecção e Análise da Resposta Imune

Trinta dias após a cirurgia os camundongos foram infectados pela via endovenosa, por meio do plexo orbital, com  $5 \times 10^6$  (100 µl) UFC de *S. aureus* ATCC 25923. Os animais não infectados receberam 100 µl de solução PBS estéril.

#### 3.7.1. Número de unidades formadoras de colônia (UFC)

Os animais foram então sacrificados seis dias após a infecção. Fragmentos dos fígados e pulmões foram retirados e colocados em tubos homogeneizadores, contendo PBS. Após maceração por meio de pistilo, foram feitas diluições seriadas do macerado em PBS nas concentrações de 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 e, em seguida, plaqueamos 50 µl das diluições nas placas de seis poços contendo ágar manitol salgado, deixando o último poço como controle negativo para o PBS, utilizado nas diluições. As placas foram encubadas em estufa a 37°C e o número de UFC foi contado visualmente após 48 horas (Figura 3).

### 3.7.2. Análise do influxo de neutrófilos e macrófagos para os pulmões

O influxo de neutrófilos para os pulmões foi mensurado indiretamente por meio do ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Fragmentos do pulmão foram removidos e congelados em nitrogênio líquido. Após descongelamento, o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato-EDTA pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,2 M NaPO<sub>4</sub>, 0,015 M NaEDTA) na proporção de 0,1 g de tecido por 1,9 ml de tampão, centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi submetido à lise hipotônica. Após centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05 M pH 5,4 contendo 0,5% de brometo de hexadecil-trimetil-amônio (HTAB). Alíquotas de 1 ml da suspensão foram transferidas para tubos Eppendorf (Eppendorf) de 1,5 ml e submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes foram diluídos em PBS antes da análise na concentração de 1:3 e a atividade da mieloperoxidase foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (DO) a 450 nm, utilizando-se substrato tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM). A leitura foi feita em leitor de microplacas (Spectramax 190 - Molecular Devices). Os resultados foram expressos em valores de absorbância por miligrama de tecido.

O infiltrado de macrófagos para os pulmões foi quantificado indiretamente por meio do ensaio da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG). Precipitados obtidos após centrifugação dos homogeneizados dos pulmões foram ressuscitados em 2 ml de solução salina contendo 0,1% v/v de Triton X-100, homogeneizados por meio de vórtex e centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. As amostras de sobrenadante, resultantes deste processo (100 µl) foram encubadas por 10 min com 100 µl de 2,24 mM *p*-nitrofenil-*N*-acetil-β-d-glicosamina (Sigma), preparado em 0,1 M de tampão citrato/fosfato pH 4,5. A reação foi parada por meio da adição de

100 µl de tampão glicina 0,2 M pH 10,6. A hidrólise do substrato foi determinada pela medida da absorbância no comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos em valores de absorbância por miligrama de tecido.

### **3.7.3. Análise histológica e morfométrica**

Fragmentos de fígados e pulmões foram fixados em tampão formalina 10 % e processados em parafina para coloração por hematoxilina e eosina (H&E) (Merck). Cortes histológicos de cerca de 3 µm foram removidos dos blocos e corados com H&E. Foram escolhidos de maneira randômica 10 campos em cada corte, perfazendo um total de 100 campos para cada órgão (fígado ou pulmão), e 200 campos para cada grupo (5 camundongos infectados com 2 cortes para cada órgão). O número de granulomas nos fígados foi determinado em microscópio com a lente no aumento de 200x. A área dos infiltrados inflamatórios nos pulmões (análise morfométrica) foi determinada com a utilização do software NIH Image Analysis (versão 1.61) pela média da relação entre área do infiltrado inflamatório e área do campo analisado ( $A_{ij}/A_i$ ) em microscópio com a lente no aumento de 100x.

### **3.7.4. Avaliação de marcadores celulares no baço e no pulmão**

Fragmentos do baço e dos pulmões foram colocados em composto Tissue-Tek OCT (Sakura), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C para análise por imunohistoquímica. Os fragmentos foram cortados a 4 µm em criostato (DAMON) e colocados em lâminas silanizadas (Starfrost). As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 16 horas para secagem, fixadas em acetona por 5 min, deixando secar por 10 min à temperatura ambiente. Para bloqueio da atividade da peroxidase endógena, as lâminas foram encubadas com solução PBS

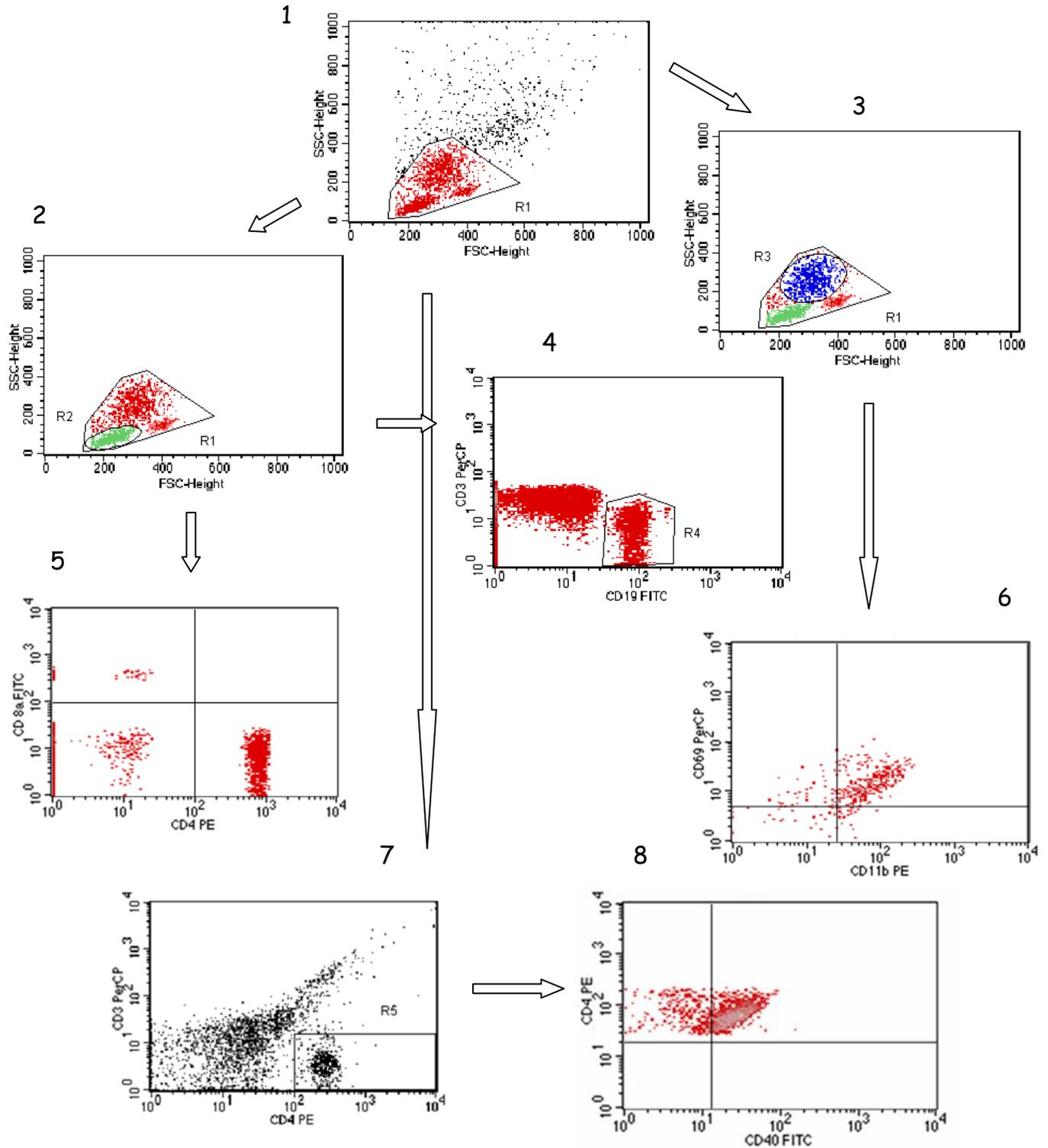
contendo 0,3 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por aproximadamente 10 min. Posteriormente, as ligações inespecíficas foram bloqueadas por meio da utilização de solução de bloqueio PBS contendo albumina bovina sérica 1% (bovine serum albumin – BSA). As lâminas foram encubadas com anticorpos monoclonais diluídos 1:50 também em PBS/BSA 1% e aplicados sobre os cortes em um volume de 100 µl. Foram utilizados anticorpos monoclonais de captura para as seguintes moléculas: CD4, CD5, CD11b, CD19, CD25 e CD40, além do controle isotípico IgG2a (BD Pharmingen). As lâminas foram mantidas em câmara úmida por 2 horas e então foi aplicado o anticorpo biotilado diluído 1:100 em PBS/BSA 1%. Após 30 min, as lâminas foram encubadas com o conjugado estreptavidina/peroxidase por 30 min para posteriormente receberem o substrato DAB (3,3'-diaminobenzidina) (BD Pharmingen) por 3 a 5 min no escuro. Logo após, foram contra coradas com hematoxilina (Merck). Todo o procedimento de encubação foi realizado em câmara úmida e entre cada etapa as lâminas foram lavadas com 3 banhos de PBS por 2 min cada, como descrito previamente com adaptações (Hofman, 2002).

### **3.7.5. Determinação dos subtipos celulares e coleta do plasma**

Amostras de sangue foram obtidas 24 horas, 48 horas e 6 dias após infecção por *S. aureus* através de sangramento pelo plexo orbital e coletadas em tubos de 1,5 ml contendo citrato de sódio 3 % com utilização de pipeta Pasteur rinsada com o mesmo anti-coagulante. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min a 4 °C e os plasmas foram coletados e armazenados em tubos de 0,6 ml em freezer - 20 °C. No sexto dia, os camundongos foram sacrificados e fragmentos do fígado, baço e pulmões foram coletados, colocados em placas de Petri contendo 5 ml de PBS e macerados com o pistilo de uma seringa estéril. Macerados do fígado e dos pulmões foram digeridos com collagenase (solução de 100 UI/ml) em 5 ml de meio RPMI contendo soro fetal bovino 10 % no banho-maria a 37°C por 40 minutos. Os macerados dos três órgãos foram filtrados

em uma tela de 70  $\mu\text{m}$  (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) para tubos de 15 ml. As suspensões de células obtidas do fígado, baço e pulmão foram centrifugadas por 8 min a 1000 rpm e 4°C. Após descarte do sobrenadante, os eritrócitos foram removidos pela adição de tampão de lise Tris/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  em um pH de 7,65 e as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI 1640 (Gibco). A viabilidade celular foi determinada por meio do método de exclusão por trypan blue e as células passaram novamente por centrifugação por 8 min a 1000 rpm e 4°C. O sedimento de células foi então ressuscitado em tampão de marcação (PBS, soro fetal bovino 3% e ázida sódica 0,005%) a 4°C numa concentração de células de  $2 \times 10^7$  células/ml.

Suspensões celulares a  $10^6$  (50  $\mu\text{l}$ ) foram adicionadas aos tubos contendo os anticorpos nas diluições recomendadas pelo fabricante e foram encubadas por 20 minutos em banho de gelo para mais tarde serem acrescentados 400  $\mu\text{l}$  de tampão de marcação. Finalmente, a suspensão celular foi mantida no gelo até a análise por citometria de fluxo. Os subtipos celulares foram mensurados por meio de citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson), utilizando o “gate” indicado para tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 4) e os seguintes critérios: neutrófilos – gate R3,  $\text{CD11b}^+$  e  $\text{CD69}^+$ ; macrófagos – gate R5,  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD40}^+$  e  $\text{CD3}^-$ ; células T  $\text{CD4}^+$  – gate R2,  $\text{CD3}^+$  e  $\text{CD4}^+$ ; células T  $\text{CD8}^+$  – gate R2,  $\text{CD3}^+$  e  $\text{CD8a}^+$ ; células B – gate R2 e gate R4 ( $\text{CD19}^+$ ). Foram utilizados os seguintes anticorpos: PerCP controle isotópico IgG1 $\kappa$ ; PE controle isotópico IgG3 $\kappa$ ; FITC controle isotópico IgG1 $\kappa$ ; PerCP anti-CD3; PerCP anti-CD69; FITC anti-CD19; FITC anti-CD80; FITC anti-CD40; FITC anti-CD8a; PE anti-CD152; PE anti-CD11b; PE anti-CD4 (Pharmingen, USA).



**Figura 4. Gates utilizados.** Modelos de gates utilizados para baço, fígado e pulmões visando separar as populações celulares (R1 – linfócitos, granulócitos e macrófagos), (R2 – linfócito T auxiliar –  $CD4^+$  e linfócito T citotóxico –  $CD8^+$ ), (R3 – granulócitos –  $CD11b^+$  e  $CD69^+$ ), (R2 e R4 – células B –  $CD19^+$ ) e (R1 e R5 – macrófagos –  $CD4^+$ ,  $CD40^+$  e  $CD3^+$ ) (10000 eventos por amostra);

### 3.7.6. Perfil e cinética de produção de citocinas e óxido nítrico (NO)

Fragmentsos de fígados e pulmões foram homogeneizados em solução salina de Hanks (HBSS) contendo inibidor de protease (100 µl/10 ml; Sigma-Aldrich Co) na proporção de 0,1 g de tecido para cada ml de solução, posteriormente as amostras foram centrifugadas a 25000 rpm a 4°C para coletar o sobrenadante, que então foi armazenado em alíquotas de 100 µl em freezer -80°C. Amostras de plasma foram obtidas em diferentes períodos após infecção por *S. aureus* (24 horas, 48 horas e 6 dias). A ligação dos anticorpos foi detectada por meio do complexo estreptoavidina-biotina peroxidase (Southern Biotechnology Associates), TMB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi interrompida com a utilização de ácido sulfúrico 1 M, de acordo com as especificações do fabricante (R&D). As placas foram lidas em leitor de microplacas (Spectramax 190 - Molecular Devices) no comprimento de onda de 450 nm. As amostras foram comparadas com a curva padrão de anticorpo recombinante IL-1 $\alpha$ , IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e os valores foram expressos na concentração de pg/ml. Os níveis de NO nos homogeneizados dos fígados e pulmões dos animais infectados por *S. aureus* também foram avaliados por meio do método de Griess. Um volume de 100 µl das amostras foi retirado e a ele foram adicionados 100 µl do reagente de Griess (sulfanilamida 1 % p/v em ácido fosfórico H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5% +  $\alpha$ -naftil-etilenodiamina 0,1% v/v em água). As placas foram lidas em leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. A concentração de nitrito nas amostras foi calculada a partir da curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio NaNO<sub>2</sub>.

### 3.7.7. Detecção de anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a

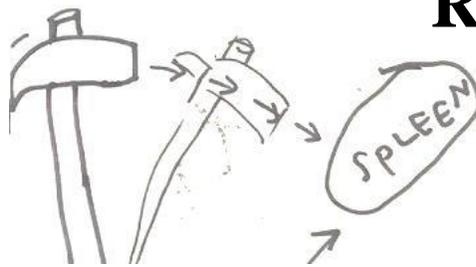
No sexto dia de infecção, amostras de sangue foram coletadas por meio do plexo orbital de camundongos dos três grupos CT, AT e SP. Os soros dos animais foram obtidos e utilizados para a

avaliação da resposta imune humoral, e dos isótipos presentes (IgM, IgG1 e IgG2a), por meio do ensaio de ELISA. Placas de 96 poços (Maxisorp; Nunc) foram encubadas 16 horas com antígeno total recuperado de cultura de *S. aureus* em tampão carbonato, pH 9,6 a 4°C. Após lavar as placas com PBS-Tween 20, foi adicionada solução bloqueio (PBS contendo Tween 20 0,05%, mais soro fetal bovino 10 %) por 2 h a 37°C. Os soros provenientes dos camundongos infectados foram diluídos na proporção de 1:100 em PBS-Tween 20, colocados nas placas e incubados por 2 h a 37°C. A fim de determinar os níveis de IgM, IgG1 e IgG2a, foram adicionadas às placas moléculas de anticorpo conjugadas a peroxidase anti-IgM, anti-IgG1 ou anti-IgG2a (Sigma). A reação se desenvolveu com a adição de 200 µM de *o*-fenilenodiamina OPD (Sigma) e 0,04 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 % e as placas foram lidas em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) no comprimento de onda de 492 nm.

### **3.8. Análise Estatística**

A normalidade dos dados foi confirmada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Todos os resultados foram expressos por meio da média ± SEM (erro padrão). As análises estatísticas foram feitas por meio dos testes *t* de students ou Mann-Whitney (quando as variáveis rejeitavam a normalidade) em um pacote estatístico (GraphPad Prizm software®).

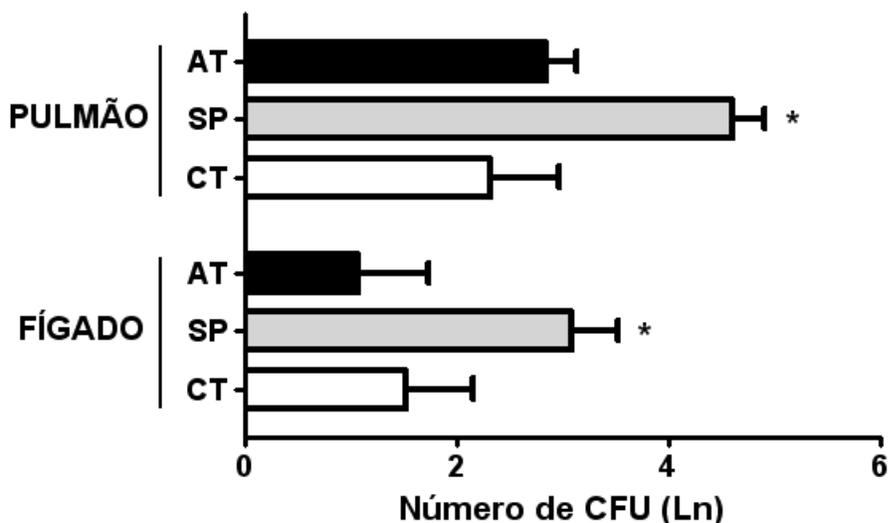
Spleen DAMAGED



## RESULTADOS

#### 4.1. Autotransplante de baço restaura a resistência de camundongos BALB/c esplenectomizados submetidos à infecção por *S. aureus*

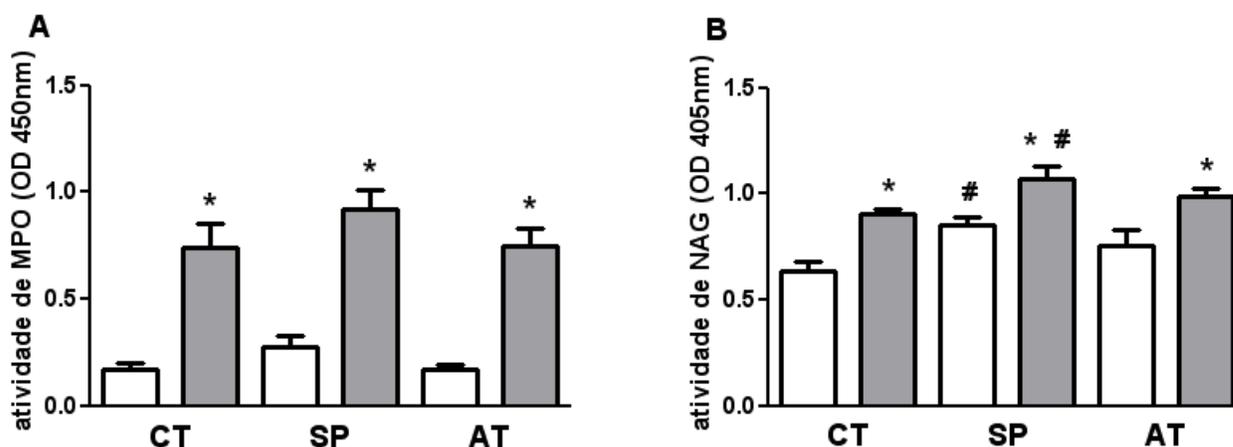
A importância do baço no controle da infecção por *S. aureus* foi avaliada por meio da contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC), no fígado e nos pulmões dos animais infectados. A Figura 5 demonstra que um maior número de UFC de *S. aureus* foi observado no grupo SP em comparação com os grupos CT e AT, tanto no fígado quanto nos pulmões, e que o número de UFC de *S. aureus* nestes dois órgãos é similar nos grupos CT e AT após infecção. Nossos resultados sugerem que autotransplante de baço pode restaurar a resposta imune frente à infecção por *S. aureus* após esplenectomia a níveis similares àqueles observados no grupo controle (Figura 5).



**Figura 5.** Autotransplante de baço restaura a resistência de camundongos BALB/c esplenectomizados submetidos à infecção por *S. aureus*. Grupos de camundongos BALB/c foram infectados com *S. aureus* ( $5 \times 10^6$  UFC/camundongo), 30 dias após cirurgia. No sexto dia após infecção, o número de UFC nos pulmões e no fígado foi determinado. Os resultados indicam a média de um total de 5 camundongos e são representativos de três experimentos independentes. CT = grupo controle operação simulada, SP = grupo esplenectomizado, AT = grupo autotransplantado. \*  $p < 0.05$ , significativo versus grupos CT e AT.

#### 4.2. Atividade de MPO e NAG em homogeneizados de pulmão de camundongos BALB/c é aumentada com infecção por *S. aureus*

A média das quantidades relativas de mieloperoxidase (MPO) presente nos pulmões, uma medida indireta da presença de neutrófilos, foi maior nos camundongos do grupo SP ( $0,92 \pm 0,09$  absorbância/100mg de tecido), quando comparado aos grupos CT ( $0,74 \pm 0,1$ ) e AT ( $0,75 \pm 0,09$ ), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 6A). A média das quantidades relativas de N-acetilglicosaminidase (NAG), uma medida indireta da presença de macrófagos, foi maior nos pulmões dos camundongos do grupo SP ( $1,07 \pm 0,06$ ), quando comparado aos grupos CT ( $0,91 \pm 0,02$ ) e AT ( $0,98 \pm 0,04$ ) (Figura 6B). Estes dados sugerem uma maior resposta imune inflamatória nos pulmões de camundongos esplenectomizados após infecção por *S. aureus*.



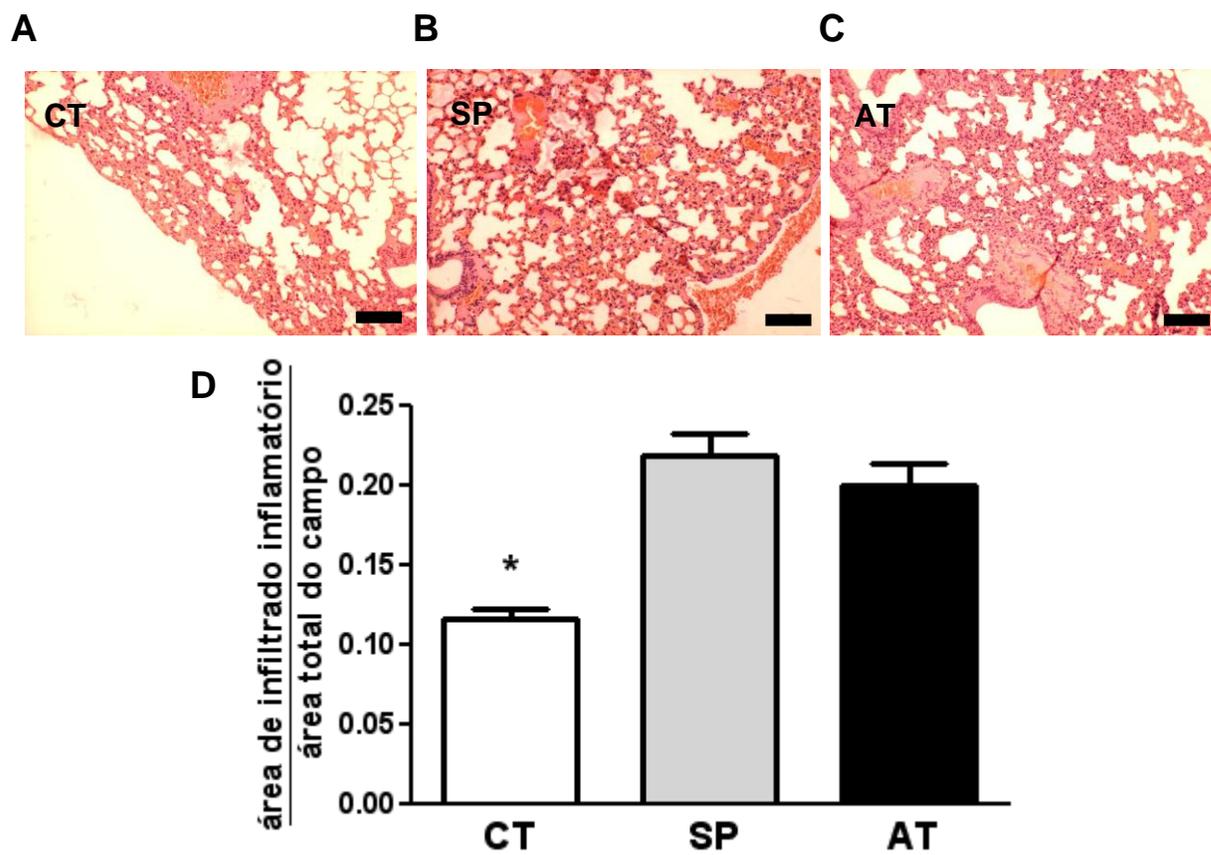
**Figura 6. Atividade de MPO e NAG em homogeneizados de pulmão de camundongos BALB/c é aumentada com infecção por *S. aureus*.** O acúmulo de neutrófilos (A) e macrófagos (B) nos pulmões de camundongos BALB/c foi avaliado também por meio dos métodos indiretos baseados nas atividades de MPO e NAG, respectivamente. As barras representam a média dos valores de absorbância de cinco camundongos não infectados (barra branca) e seis camundongos infectados por *S. aureus* (barra cinza). \*  $p < 0,05$  versus camundongos não infectados. #  $p < 0,05$  versus grupos CT e AT. Os resultados indicados apresentam os valores de um experimento representativo entre três experimentos independentes, que tiveram resultados semelhantes.

### **4.3. Camundongos esplenectomizados apresentam maior acúmulo de macrófagos e neutrófilos nos pulmões e a realização de autotransplante de baço induz o aumento de células CD19<sup>+</sup> após infecção por *S. aureus***

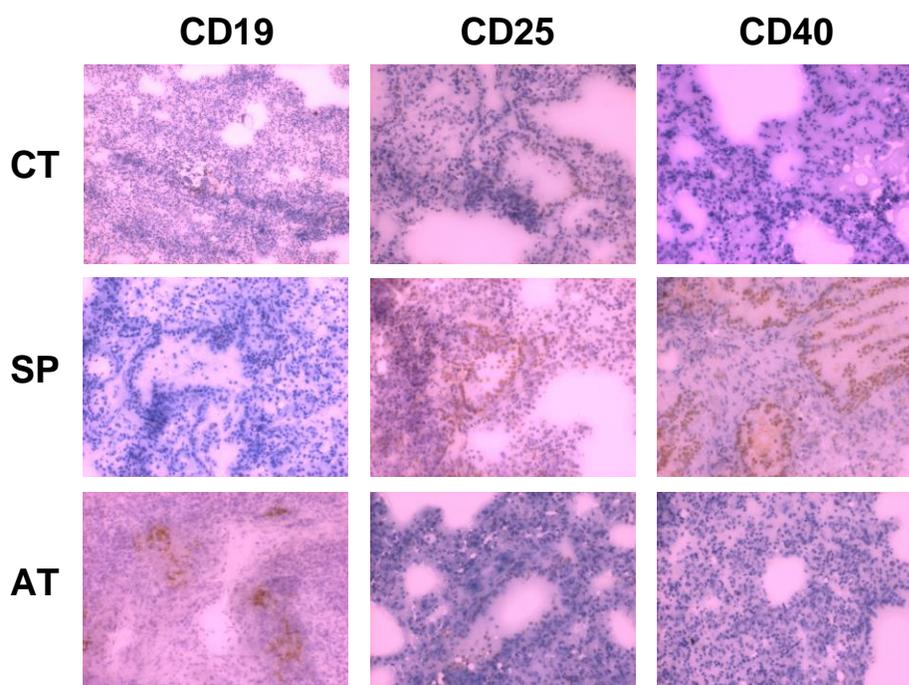
A resposta inflamatória nos pulmões, induzida pela infecção com *S. aureus* em camundongos dos grupos CT, AT e SP, foi também investigada pela medida das áreas dos infiltrados inflamatórios e pela detecção de leucócitos por meio de imunohistoquímica e citometria de fluxo. O grupo SP mostrou maior expansão de infiltrado inflamatório nos pulmões ( $0,22 \pm 0,01$ ), que foi estatisticamente significativo com relação ao grupo CT ( $0,12 \pm 0,01$ ), mas não diferiu quanto ao grupo AT ( $0,20 \pm 0,02$ ) de acordo com a média da relação entre a medida das áreas dos infiltrados inflamatórios e o campo analisado ( $A_{ij}/A_t$ ) (Figura 7).

Uma maior densidade de células marcadas para CD25 e CD40 foi observada nos pulmões dos camundongos pertencentes ao grupo SP quando comparado aos grupos CT e AT. Por outro lado, houve maior densidade de células marcadas para CD19 nos pulmões dos camundongos do grupo AT quando comparado aos grupos CT e SP (Figura 8 e Tabela 1). A análise por citometria de fluxo, mostrou maior influxo de neutrófilos (gate R3, CD11b<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>) e macrófagos (gate R5, CD4<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup>) no grupo SP, quando comparado aos grupos CT e AT. No entanto, confirmando os resultados de imunohistoquímica, a porcentagem de células B (gate R4 e CD19<sup>+</sup>) foi maior no grupo AT quando comparado aos grupos CT e SP (Figura 9).

Tomados em conjunto, estes dados indicam diferenças nos infiltrados inflamatórios observados nos grupos AT e SP, e sugerem que a esplenectomia predispõe a uma maior susceptibilidade à infecção por *S. aureus* que é acompanhada por maior resposta inflamatória nos pulmões dos animais submetidos a este procedimento cirúrgico.



**Figura 7. Maior área de infiltrado inflamatório nos pulmões de camundongos BALB/c esplenectomizados após infecção por *S. aureus*.** Fotomicrografia demonstrando a área de infiltrado inflamatório nos pulmões dos camundongos infectados por *S. aureus* (A, B e C). A média da relação entre a medida das áreas dos infiltrados inflamatórios e o campo analisado nos grupos CT, AT e SP está representada no gráfico (D). Os resultados são representativos de um total de 100 campos analisados, 10 campos para cada corte de um total de 10 cortes por grupo. Barra (■) = 100  $\mu$ m. CT = grupo controle, SP = grupo esplenectomizado e AT = grupo autotransplantado. \*  $p < 0.05$  versus grupos SP e AT.



**Figura 8. Detecção de células positivas para os marcadores CD19, CD25 e CD40 em cortes de pulmão de camundongos BALB/c infectados por *S. aureus*.** Fotomicrografia demonstrando a presença dos marcadores de superfície nos pulmões de camundongos dos grupos CT = controle, SP = esplenectomizado e AT = autotransplantado após infecção por *S. aureus*. Dados são representativos de um experimento utilizando 5 animais infectados.

**Tabela 1. Proporção de lâminas positivas para os marcadores de superfície presentes nos pulmões dos camundongos infectados por *S. aureus***

marcador	CT <sup>a</sup>	SP <sup>b</sup>	AT <sup>c</sup>
CD19	(2/5) <sup>d</sup>	(1/5)	(4/5) *
CD25	(2/5)	(5/5) *	(2/5)
CD40	(1/5)	(4/5) *	(1/5)

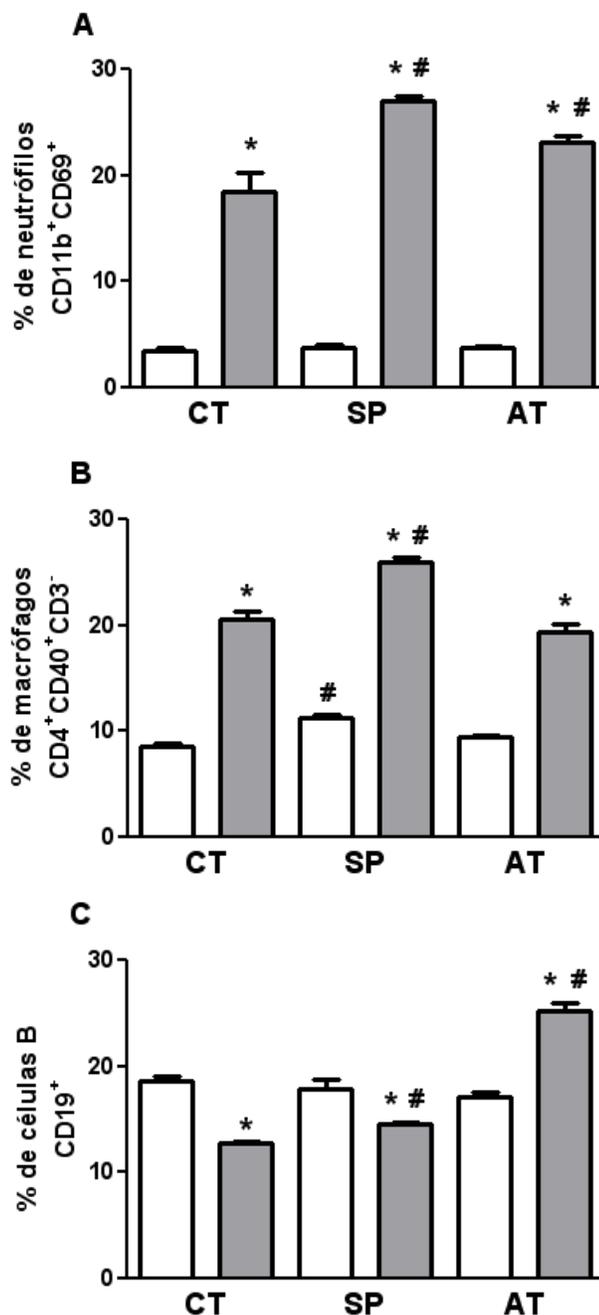
<sup>a</sup> CT = grupo controle

<sup>b</sup> SP = grupo esplenectomizado

<sup>c</sup> AT = grupo autotransplantado

<sup>d</sup> número de lâminas positivas em cinco lâminas examinadas

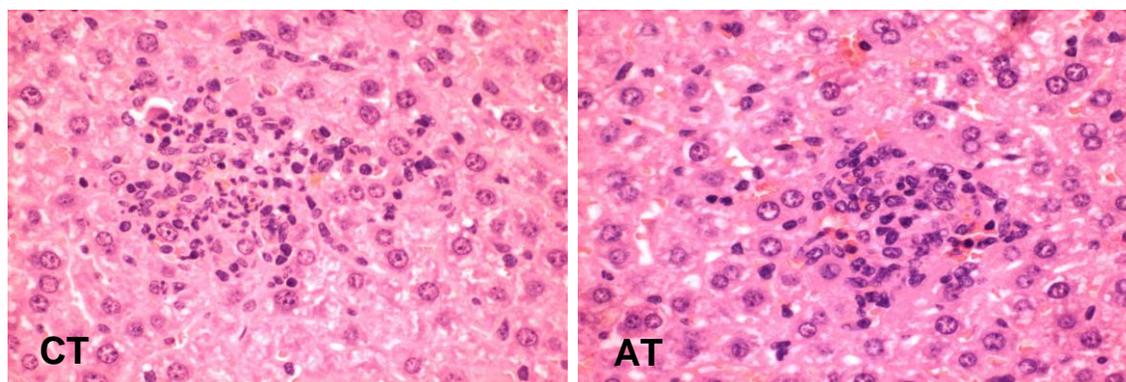
\* p < 0,05, significativo quando comparado com os outros grupos



**Figura 9.** Porcentagem de neutrófilos, macrófagos e células B nos pulmões de camundongos BALB/c infectados por *S. aureus*, por meio de citometria de fluxo. Utilizando os gates indicados em materiais e métodos obtivemos a porcentagem de neutrófilos (gate R3, CD11b<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>) (A), macrófagos (gate R5, CD4<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup>) (B) e células B (gate R4 e CD19<sup>+</sup>) (C) nos pulmões de camundongos não infectados (barra branca) e nos pulmões de camundongos infectados por *S. aureus* (barra cinza). \*  $p < 0,05$  versus camundongos não infectados. #  $p < 0,05$  versus outros grupos estudados. Os resultados indicados representam um experimento com 5 camundongos infectados por *S. aureus* e 5 camundongos injetados com PBS e são representativos de três experimentos independentes.

#### **4.4. Camundongos esplenectomizados e infectados apresentam maior expressão de CTLA-4 no fígado e a realização de autotransplante de baço induz um influxo de neutrófilos similar ao observado no grupo controle**

Granulomas foram observados nos lobos hepáticos dos camundongos dos grupos CT e AT, porém, o número destes granulomas estava bastante reduzido no grupo SP (Figura 10 e Tabela 2). A análise por citometria de fluxo demonstrou menor porcentagem de CTLA-4, uma molécula conhecida por sua capacidade de imunoregulação (Bour-Jordan & Bluestone, 2002) (Figuras 11A e 11B) e maior porcentagem de neutrófilos (gate R3, CD11b<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>) (Figura 11C) nos grupos CT e AT, após infecção por *S. aureus*. Estes resultados sugerem um maior influxo de neutrófilos para o fígado dos camundongos dos grupos CT e AT quando comparado com os camundongos do grupo SP e uma ausência de resposta imune eficiente, de contenção da infecção por *S. aureus*, no fígado de camundongos do grupo SP.



**Figura 10. Formação de granulomas no fígado de camundongos infectados.** Fotomicrografia demonstrando granulomas formados no parênquima hepático de camundongos dos grupos CT e AT após infecção por *S. aureus*. Os resultados são representativos de um total de 10 cortes por grupo, conforme exemplificado na Tabela 2.

**Tabela 2. Número de granulomas no fígado de camundongos infectados por *S. aureus***

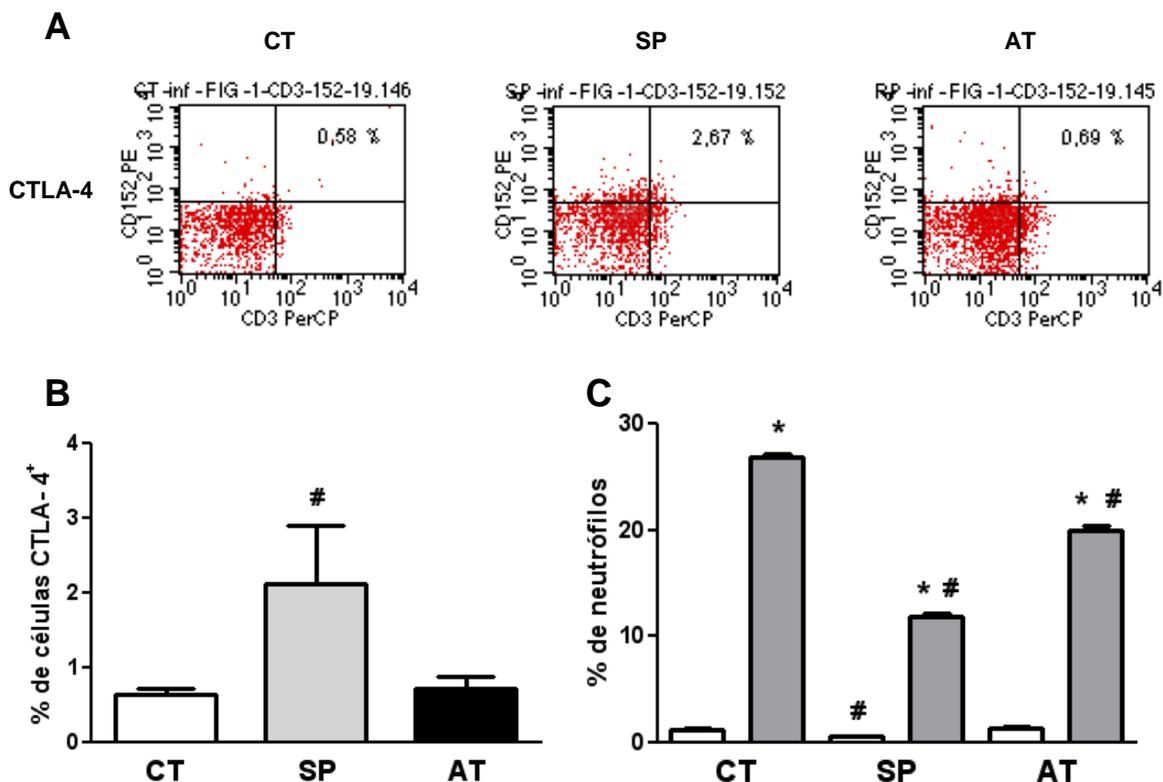
Camundongo	CT <sup>a</sup>		SP <sup>b</sup>		AT <sup>c</sup>	
	corte 1	corte 2	corte 1	corte 2	corte 1	corte 2
1	0	1	1	1	1	6
2	8	3	0	0	1	0
3	6	6	0	0	4	1
4	4	3	0	0	3	5
5	3	4	0	0	1	1
<b>Número médio de granulomas</b>	<b>(3,8 ± 0,8)</b>		<b>(0,2 ± 0,1)*</b>		<b>(2,3 ± 0,6)</b>	

<sup>a</sup> CT = grupo controle

<sup>b</sup> SP = grupo esplenectomizado

<sup>c</sup> AT = grupo autotransplantado

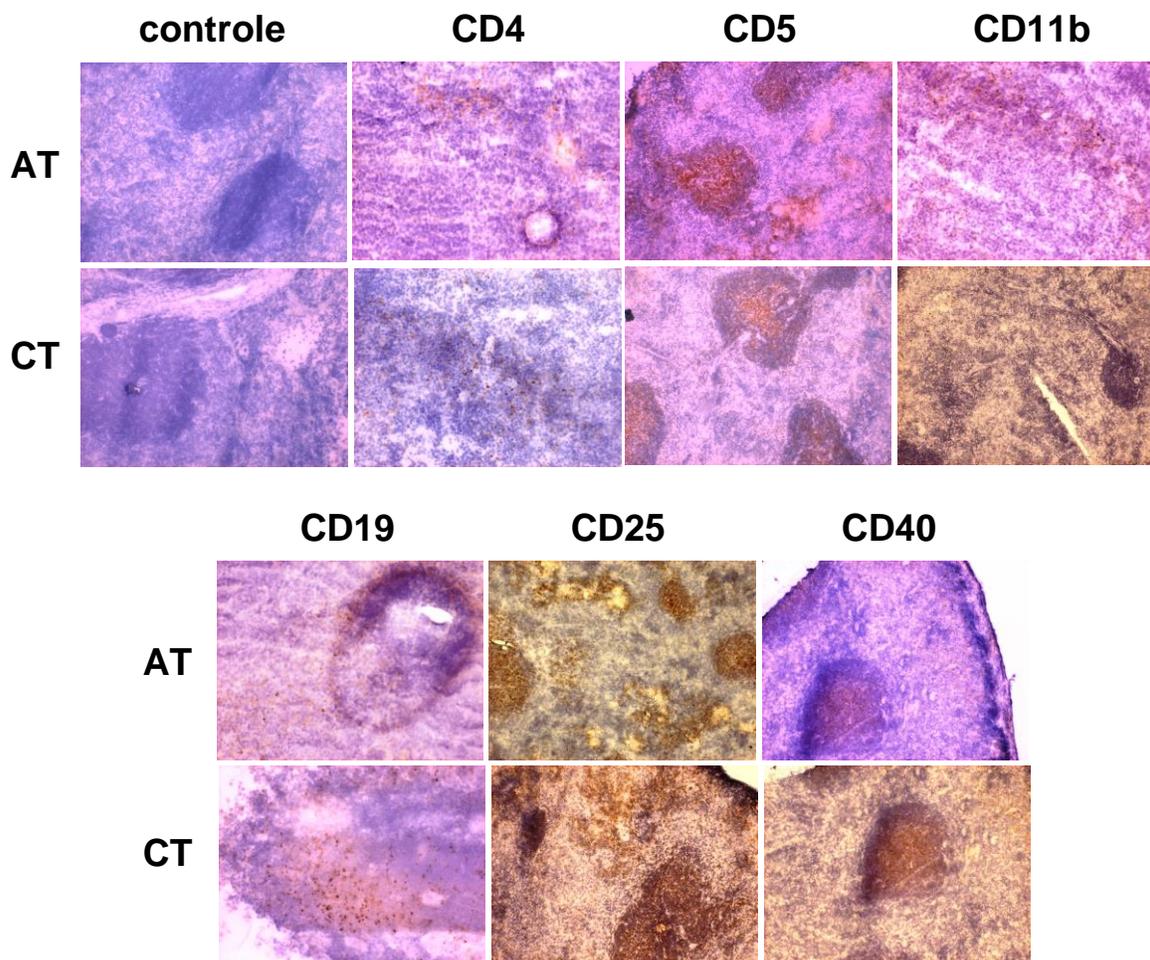
\* p < 0,05, significativo versus grupos CT e AT.



**Figura 11. Porcentagem de neutrófilos e células CTLA-4<sup>+</sup> presentes no fígado de camundongos BALB/c.** Diagramas de citometria representam um camundongo infectado de cada grupo (A). Utilizando os gates indicados em materiais e métodos obtivemos a porcentagem de células T (gate R2, CD3<sup>+</sup>) que expressaram CTLA-4 (A e B) e neutrófilos (gate R3, CD11b<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>) (C) no fígado de camundongos BALB/c. \* p < 0,05 versus camundongos não infectados. # p < 0,05 versus outros grupos estudados. Nas Figuras A e B, os resultados indicados representam um experimento com 5 camundongos infectados por *S. aureus*. Na Figura C, não infectados (barra branca) e infectados por *S. aureus* (barra cinza), os resultados indicados representam um experimento com 5 camundongos infectados por *S. aureus* e 5 camundongos injetados com PBS.

#### **4.5. Infecção por *S. aureus* causa aumento semelhante de células B, células T, macrófagos e neutrófilos no tecido esplênico de camundongos autotransplantados e controle**

A seguir, foi avaliada a distribuição de leucócitos (CD4, CD5, CD11b e CD19), bem como marcadores de ativação celular (CD25 e CD40) nos fragmentos esplênicos transplantados, a fim de comparar com o perfil de células encontrado no baço dos camundongos CT. A análise por imunohistoquímica demonstrou semelhança nos níveis de expressão das moléculas de superfície citadas acima, no baço de camundongos dos grupos CT e AT após infecção por *S. aureus* (Figura 12). Nas análises por citometria de fluxo, as porcentagens de células T auxiliares (gate R2, CD3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>), células B (gate R4 e CD19<sup>+</sup>), macrófagos (gate R5, CD4<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup>) e neutrófilos (gate R3, CD11b<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>) aumentaram no baço dos camundongos infectados com *S. aureus* quando comparado aos camundongos não infectados, enquanto a quantidade relativa de células T CD8 (gate R2, CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) não se alterou. Foi observada uma maior porcentagem de células B no grupo AT em relação ao grupo CT nos animais não infectados, mas após infecção, a quantidade de células B para os dois grupos foi estatisticamente semelhante (Tabela 3). Apesar de ter sido observada uma tendência de menores proporções de células T CD4, macrófagos e neutrófilos no grupo AT em relação ao grupo CT, esta diminuição não ocorreu em níveis significativos. Estes resultados sugerem que o tecido autotransplantado aparenta capacidade de montar uma resposta imune com ativação e proliferação celular semelhante ao baço de camundongos controle e estão de acordo com os resultados obtidos previamente pelo nosso grupo com relação às características histológicas do tecido esplênico autotransplantado (Nunes *et al.*, 2005 – anexo 1).



**Figura 12. Coloração por imunohistoquímica de cortes do baço de camundongos BALB/c infectados por *S. aureus*.** Fotomicrografia demonstrando a presença de marcadores de superfície no baço de camundongos dos grupos CT e AT após infecção por *S. aureus*. Foram utilizados anticorpos específicos controle isotípico anti-IgG2a, anti-CD4, anti-CD5, anti-CD11b, anti-CD19, anti-CD25 e anti-CD40. Os resultados indicados são representativos de três experimentos utilizando 5 camundongos infectados por *S. aureus* em cada grupo.

**Tabela 3. Diferenças na porcentagem dos subtipos celulares no baço dos camundongos infectados e não infectados por *S. aureus*.**

Subtipos celulares	CT <sup>a</sup>		AT <sup>b</sup>	
	Não infectado	Infectado	Não infectado	Infectado
<b>Célula T CD4</b>	28,09 ± 1,9	35,33 ± 1,8 *	24,58 ± 1,7	31,65 ± 1,2 *
<b>Célula T CD8</b>	5,62 ± 0,7	5,20 ± 0,5	5,96 ± 0,8	5,03 ± 0,8
<b>Células B</b>	18,41 ± 0,6	27,71 ± 2,7 *	23,70 ± 1,6 #	33,62 ± 1,8 *
<b>Macrófagos</b>	16,71 ± 0,8	21,77 ± 4,2 *	15,95 ± 1,4	20,70 ± 1,7 *
<b>Neutrófilos</b>	4,96 ± 0,7	9,51 ± 1,7 *	4,46 ± 0,5	8,62 ± 0,7 *

<sup>a</sup> CT = grupo controle

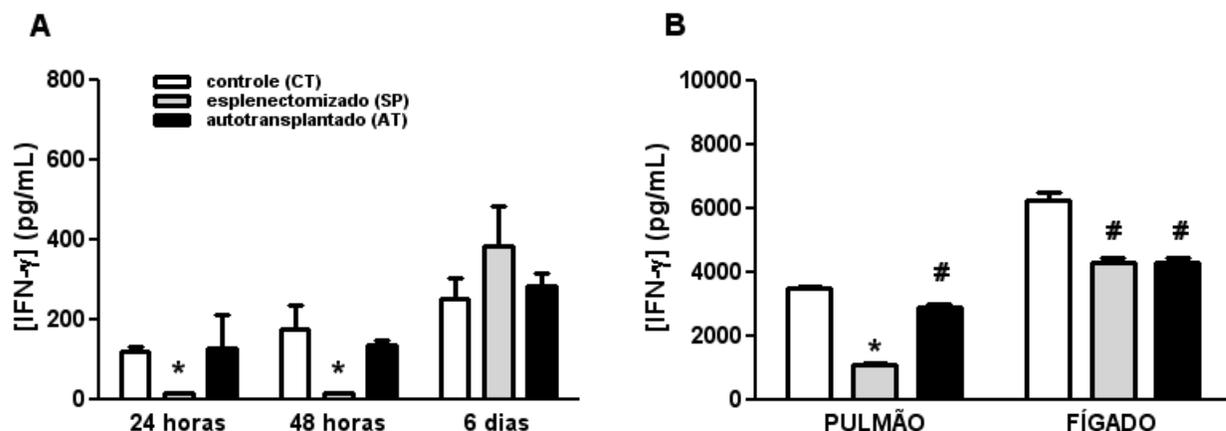
<sup>b</sup> AT = grupo autotransplantado

\* p < 0,05, significativo versus camundongos não infectados

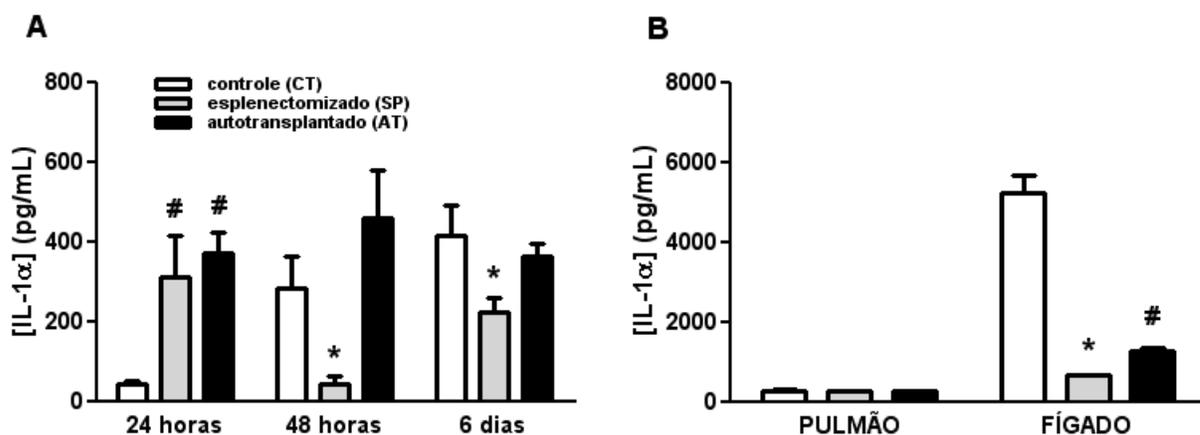
# p < 0,05, significativo versus grupo CT

#### **4.6. Infecção de camundongos esplenectomizados por *S. aureus* induz um perfil de resposta imune que favorece a disseminação da infecção, com baixos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ e NO, e altos níveis de IL-10**

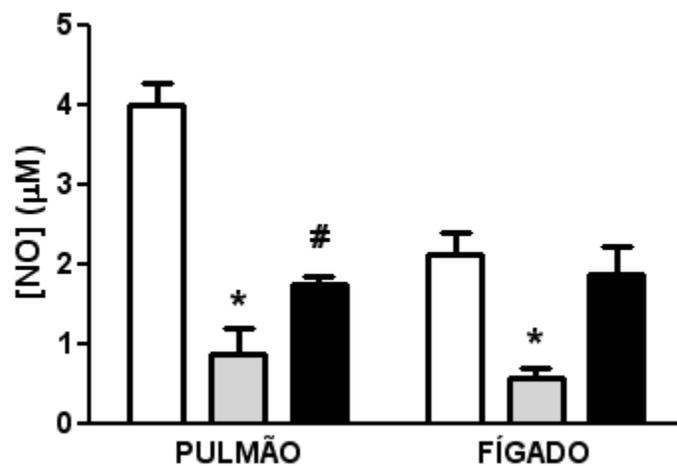
Camundongos dos grupos CT e AT apresentaram níveis elevados de IFN- $\gamma$  e IL-1 $\alpha$  no plasma quando comparados aos camundongos do grupo SP, após infecção por *S. aureus* (Figuras 13A e 14A). Tanto nos pulmões quanto no fígado, o grupo CT apresentou os níveis maiores de IFN- $\gamma$  sendo que o grupo AT apresentou níveis de produção intermediários desta citocina nos pulmões (Figura 13B). Seguindo um perfil semelhante ao observado para a produção de IFN- $\gamma$ , os níveis de NO observados no fígado e nos pulmões dos camundongos infectados foram superiores para o grupo CT com relação aos grupos AT e SP, com o grupo AT apresentando níveis intermediários de NO e o grupo SP tendo os menores níveis (Figura 15). Não conseguimos detectar níveis de produção de óxido nítrico no plasma dos camundongos infectados. Os níveis de produção de IL-1 $\alpha$  nos pulmões dos camundongos infectados foram baixos nos três grupos CT, AT e SP, porém, no fígado foi observada maior produção de IL-1 $\alpha$  nos camundongos do grupo CT, sendo que novamente o grupo AT apresentou níveis intermediários de produção (Figura 14B). Os níveis de IL-10 no plasma foram significativamente maiores nos camundongos do grupo SP 24 horas após infecção quando comparado com o grupo CT (Figura 16A), enquanto que os homogeneizados dos pulmões apresentaram níveis elevados de IL-10 no grupo SP quando comparado a ambos os grupos, CT e AT (Figura 16B). A produção de TNF- $\alpha$  no plasma dos camundongos do grupo SP foi maior quando comparado à produção observada em camundongos dos grupos CT e AT (Figura 17A). Com relação aos pulmões e fígados, a produção de TNF- $\alpha$  foi maior no fígado e menor nos pulmões dos camundongos do grupo SP quando comparado aos grupos CT e AT (Figura 17B).



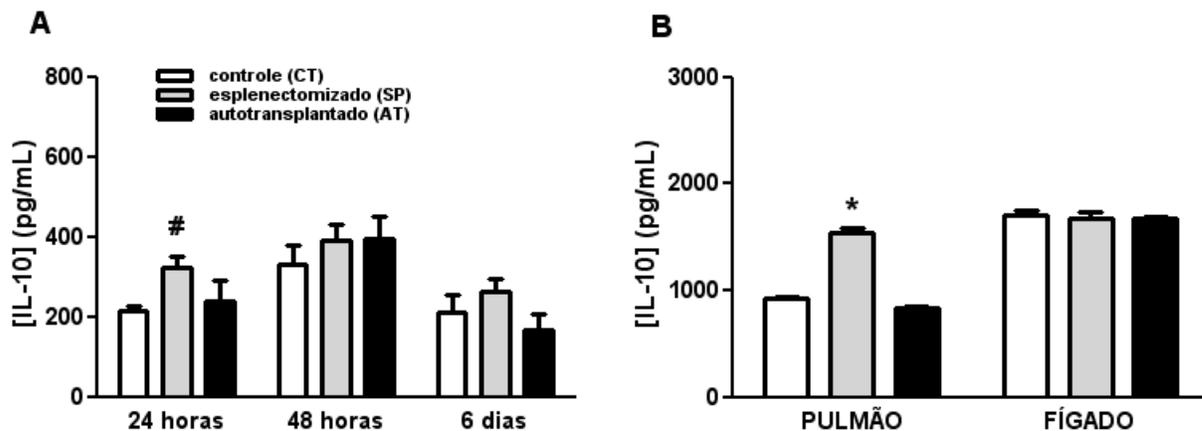
**Figura 13. Níveis de IFN- $\gamma$  no plasma, fígado e pulmões de camundongos BALB/c infectados com *S. aureus*.** Os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos no plasma (A), pulmão e fígado (B) de camundongos BALB/c infectados por *S. aureus* foi avaliado por meio do método de ELISA para dosagem de citocinas. \*  $p < 0.05$ , versus grupos CT e AT. #  $p < 0.05$ , versus grupo CT. Os resultados indicados são representativos de três experimentos independentes.



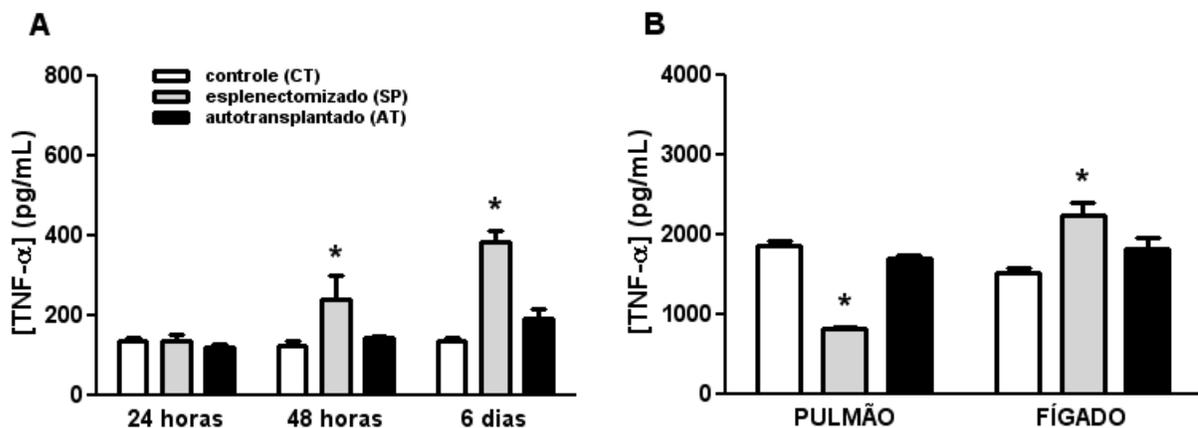
**Figura 14. Níveis de IL-1 $\alpha$  no plasma, pulmão e fígado de camundongos BALB/c infectados com *S. aureus*.** Os níveis de IL-1 $\alpha$  produzidos no plasma (A), pulmão e fígado (B) de camundongos BALB/c infectados por *S. aureus* foi avaliado por meio do método de ELISA para dosagem de citocinas. \*  $p < 0.05$ , versus grupos CT e AT. #  $p < 0,05$ , versus grupo CT. Dados representativos de três experimentos independentes.



**Figura 15. Níveis de NO produzidos em camundongos BALB/c em resposta à infecção por *S. aureus*.** Os níveis de NO produzidos no pulmão e no fígado de camundongos BALB/c infectados por *S. aureus* foi avaliado por meio do método de Griess. \*  $p < 0.05$ , versus grupos CT e AT. #  $p < 0,05$ , versus grupo CT. Dados representativos de três experimentos independentes.



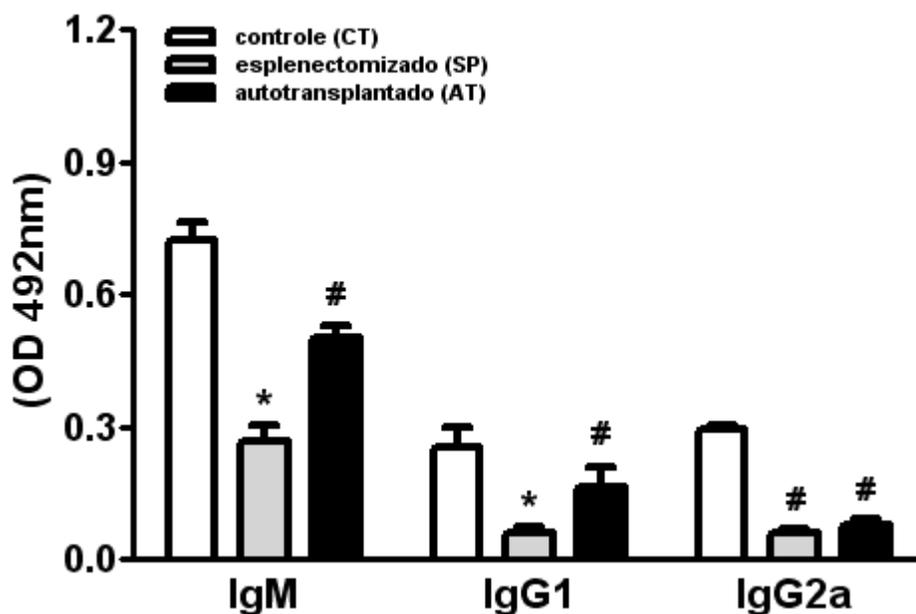
**Figura 16. Níveis de IL-10 no plasma, pulmão e fígado de camundongos BALB/c infectados com *S. aureus*.** Os níveis de IL-10 produzidos no plasma (A), pulmão e fígado (B) de camundongos BALB/c infectados por *S. aureus* foi avaliado por meio do método de ELISA para dosagem de citocinas. \*  $p < 0,05$ , versus grupos CT e AT. #  $p < 0,05$ , versus grupo CT. Os resultados indicados são representativos de três experimentos independentes.



**Figura 17. Níveis de TNF- $\alpha$  no plasma, pulmão e fígado de camundongos BALB/c infectados com *S. aureus*.** Os níveis de TNF- $\alpha$  produzidos no plasma (A), pulmão e fígado (B) de camundongos BALB/c infectados por *S. aureus* foi avaliado por meio do método de ELISA para dosagem de citocinas. \*  $p < 0,05$ , versus grupos CT e AT. Dados representativos de três experimentos independentes.

#### **4.7. Autotransplante de baço restaura parcialmente a resposta imune humoral após infecção por *S. aureus* em camundongos esplenectomizados**

Diferenças significativas entre os grupos CT, AT e SP foram observadas nos níveis de anticorpos anti-*S. aureus* detectados no soro dos camundongos infectados. O grupo CT apresentou os níveis maiores de IgM, IgG1 e IgG2a quando comparado aos grupos AT e SP. O grupo AT apresentou níveis intermediários para IgM e IgG1, enquanto o grupo SP apresentou os níveis menores. Não ocorreram diferenças significativas entre os grupos AT e SP com relação aos níveis séricos de IgG2a (Figura 18). Estes resultados indicam que autotransplante de baço auxilia na montagem de uma resposta imune humoral capaz de responder à infecção por *S.aureus*.



**Figura 18.** Efeito da esplenectomia nos níveis de anticorpos específicos anti-*S. aureus* produzidos no soro de camundongos BALB/c infectados. Camundongos foram infectados pela via endovenosa com  $5 \times 10^6$  UFC de *S. aureus* 30 dias após a cirurgia. Anticorpos das classes IgM, IgG1 e IgG2a específicos para antígenos de *S. aureus* foram avaliados no soro 6 dias após infecção por meio do método de ELISA. Os resultados apresentam a média de seis camundongos de um experimento representativo entre três experimentos com resultados semelhantes. \*  $p < 0.05$ , versus grupos CT e AT. #  $p < 0.05$ , versus grupo CT.



# DISCUSSÃO

Durante muito tempo o baço foi considerado um órgão supérfluo e não essencial à vida (McClusky *et al.*, 1999). Atualmente, apesar de ainda ocorrerem cirurgias de retirada deste órgão em muitas patologias onde o procedimento pode ser justificado, persiste o tratamento de remoção cirúrgica em situações onde a preservação seria a melhor opção. Um exemplo marcante disto se situa em relatos de esplenectomia em pacientes acometidos por trauma esplênico e acidentes iatrogênicos, situações muito comuns no dia-a-dia de qualquer centro cirúrgico (Christo, 2001; Peitzman, *et al.*, 2001). Existem alternativas de preservação do tecido esplênico, que consistem desde esplenectomia parcial até transplante autólogo do órgão visando à manutenção das atividades esplênicas, tais como, filtração do sangue para retirada de eritrócitos senescentes, reciclagem de ferro e resposta imune (Mebius & Kraal, 2005).

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a importância do baço no combate à infecção causada por *Staphylococcus aureus*, um patógeno oportunista reconhecido como um dos principais agentes causadores de infecções hospitalares (Rooijackers *et al.*, 2005). Para isso, avaliamos alguns dos parâmetros importantes no entendimento de características da resposta imune em camundongos sujeitos à esplenectomia (grupo SP) ou sujeitos à esplenectomia e autotransplante de baço no retroperitônio (grupo AT), sítio eletivo para o nosso grupo devido à facilidade técnica no procedimento cirúrgico e o menor risco de complicações, quando comparado a outros sítios intra-abdominais (Nunes *et al.*, 2005).

Resultados de contagem de UFC em animais esplenectomizados e infectados por bactérias têm sido controversos na literatura. Utilizando um modelo de infecção por *meningococcus* em camundongos BALB/c, Loggie & Hinchey demonstraram que animais esplenectomizados apresentaram número de UFC no sangue em níveis similares aos observados nos animais não esplenectomizados, além da sobrevivência não ser diferente entre os dois grupos. Estes autores sugeriram que a esplenectomia, por si só, não era um fator de predisposição para sepse (Loggie &

Hinchey, 1986). Kuranaga e colaboradores demonstraram que a esplenectomia poderia reduzir o crescimento de UFC de *Listeria monocytogenes* no fígado de camundongos C57BL/6, após infecção pela via endovenosa (Kuranaga *et al.*, 2005). O menor número de UFC observado nos camundongos esplenectomizados teve forte associação a uma maior produção de IFN- $\gamma$  no fígado destes animais nas fases iniciais da infecção, quando comparado com o fígado e o baço dos camundongos controle sham. Uma baixa produção de IFN- $\gamma$  foi relacionada ao maior crescimento bacteriano no baço e mais tarde no fígado, levando os autores a sugerir que a *Listeria* estaria explorando uma resposta imune Th1 ineficiente no baço dos animais controle para depois superar a resposta imune no fígado do hospedeiro. Todavia, existem fortes evidências da participação do baço na proteção contra infecções bacterianas, tanto causadas por bactérias Gram positivas quanto por bactérias Gram negativas (Altamura *et al.*, 2001). A infecção pela via intranasal por *Haemophilus influenzae* resultou em maior número de UFC desta bactéria no sangue de ratos esplenectomizados, quando comparado com ratos controle sham, embora o mesmo estudo tenha demonstrado que o tratamento com anticorpos anti-constituintes da cápsula de *H. influenzae*, quando utilizado em doses elevadas, resultou em níveis de UFC semelhantes nos dois grupos de animais (Rubin *et al.*, 1988). A proteção contra *Streptococcus pneumoniae* também foi avaliada em ratos Wistar infectados pela via endovenosa, por Nielsen e colaboradores. Foi observado que o índice de sobrevivência nestes animais teve correlação positiva com o aumento do peso de tecido esplênico residual observado, ou seja, a sobrevivência foi maior nos ratos controle sham e autotransplantados com cem por cento da massa esplênica, seguidos por: ratos com esplenectomia parcial, ratos com autotransplante de cinquenta por cento da massa esplênica e ratos apenas esplenectomizados (Nielsen *et al.*, 1983). Nossos resultados de contagem do UFC sugerem que o autotransplante de baço pode restaurar a resposta imune frente à infecção por *S. aureus* após esplenectomia a níveis similares àqueles observados no grupo controle.

Observação de cortes histológicos do fígado de camundongos dos grupos CT, AT e SP, infectados por *S. aureus*, mostraram que apesar do menor número de UFC no fígado, os camundongos dos grupos CT e AT apresentaram maior número de granulomas quando comparado aos camundongos do grupo SP. Vale ressaltar, porém, que o acúmulo de leucócitos nos tecidos não tem necessariamente correlação direta com grau de infecção, mas sim com exacerbação da resposta imune local (Limmer *et al.*, 1998; Knolle & Gerken, 2000). Exemplificando isto, observamos presença de infiltrado inflamatório nos pulmões dos camundongos infectados dos três grupos, e embora a área de infiltrado inflamatório tenha se apresentado maior nos camundongos dos grupos AT e SP, o número de UFC nos pulmões destes animais foi diferente, com o grupo AT apresentando contagem de UFC com valores de aproximadamente um log menores em relação ao grupo SP.

Devido à dificuldade de se realizar análise por imunohistoquímica no fígado, já que há grandes concentrações de peroxidase endógena neste órgão, procuramos novas metodologias a fim de buscar respostas a aparente incongruência entre os resultados de UFC e a contagem de granulomas. A análise por citometria de fluxo no fígado, revelou maior porcentagem de neutrófilos nos camundongos dos grupos CT e AT quando comparado aos camundongos do grupo SP e maior porcentagem da molécula co-estimulatória CTLA-4 no grupo SP com relação aos grupos CT e AT. Os neutrófilos são considerados os principais personagens no combate à infecção por *S. aureus* devido a sua capacidade fagocítica após opsonização de bactérias por proteínas do sistema complemento e anticorpos (Rooijackers *et al.*, 2005; Foster, 2005; Xu *et al.*, 1992). O CTLA-4 é uma molécula co-estimulatória que se liga às moléculas CD80 e CD86 (B7-1 e B7-2), assim como o CD28, porém, gera sinais inibitórios para a célula T induzindo tolerância ou anergia e diminuição da proliferação deste subtipo celular (Walunas *et al.*, 1994; Perez *et al.*, 1997). Dados encontrados na literatura permitem-nos especular um trabalho conjunto realizado pelos dois

órgãos, baço e fígado, na decisão entre resposta ou anergia frente ao contato com antígenos provenientes da corrente sanguínea (Kosugi *et al.*, 1992; Gregory *et al.*, 1996). A participação do baço neste trabalho conjunto torna-se fundamental ao combinar o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo (Mebius & Kraal, 2005). Assim, uma possível explicação para os granulomas formados no fígado dos camundongos dos grupos CT e AT e quase ausentes no fígado dos camundongos do grupo SP é a capacidade dos animais que possuem tecido esplênico de tornar o fígado um ambiente propício para uma efetiva resposta imune de contenção do avanço da infecção por *S. aureus*, por meio do influxo e da ação de neutrófilos e da quebra do ambiente normalmente tolerogênico encontrado neste órgão (Knolle & Gerken, 2000).

As análises por imunohistoquímica nos pulmões, também auxiliaram no entendimento das diferentes respostas dos grupos de camundongos estudados ao evidenciar que os subtipos celulares presentes nos infiltrados inflamatórios de cada grupo apresentaram diferenças importantes em sua composição. Houve maior detecção de células CD19<sup>+</sup> nos pulmões dos camundongos infectados do grupo AT, enquanto que os camundongos infectados do grupo SP apresentaram maior marcação de células CD25<sup>+</sup> e CD40<sup>+</sup>, marcadores conhecidos como moléculas co-estimulatórias importantes (Paulnock, 1992; Maxwell *et al.*, 2004), fornecendo indícios de maior ativação da resposta inflamatória nos pulmões dos camundongos deste grupo. O CD40 quando expresso em níveis elevados está associado ao aumento da resposta inflamatória e conseqüente aumento de danos nos pulmões (Dong *et al.*, 2008). O CD25, apesar de ser um marcador característico de células T regulatórias, está associado à ativação de células T CD4 (Fehérvári & Sakaguchi, 2004). A densidade elevada destes dois marcadores nos pulmões pode ser um indicativo de maior resposta imune inflamatória como visualizado nos resultados para infiltrado inflamatório nos camundongos do grupo SP. Considerando que CD19, um marcador mais conhecido por sua utilização na seleção de células B, também é uma importante molécula co-estimulatória, com a propriedade de induzir a

ativação de proteínas do sistema complemento e a consequente opsonização de bactérias para a fagocitose realizada principalmente pelos neutrófilos (Weintraub & Goodnow, 1998; Oakes, 1981). Os elevados níveis de CD19 encontrados nos pulmões dos camundongos do grupo AT podem representar um mecanismo imunológico auxiliar presente nestes animais, favorecendo a ação dos fagócitos e, conseqüentemente, contendo a infecção por *S. aureus*, o que está de acordo com o menor número de UFC observado neste grupo, quando comparado com o grupo SP. Com relação aos pulmões dos camundongos do grupo CT, nossa hipótese é que as bactérias foram contidas e eliminadas de uma forma muito mais efetiva no fígado e no baço destes animais e, portanto, o infiltrado inflamatório observado nos pulmões dos camundongos deste grupo foi menor em relação aos grupos AT e SP. Estes dados foram confirmados pela análise por citometria de fluxo nos pulmões, que demonstrou também maior influxo de neutrófilos (gate R3, CD11b<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>) e macrófagos (gate R5, CD4<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup>) no grupo SP, quando comparado aos grupos CT e AT, enquanto camundongos do grupo AT apresentaram maior porcentagem de células B (gate R4 e CD19<sup>+</sup>), quando comparado com os grupos CT e SP.

Exigiu nossa atenção a tendência dos camundongos do grupo AT em apresentar valores intermediários de produção de citocinas no plasma, fígado e pulmões quando comparado com os grupos CT e SP. A queda na produção de IFN- $\gamma$  (Maioli *et al.*, 2007; Kuranaga *et al.*, 2005), associada ao aumento na produção de IL-10 em camundongos esplenectomizados pode explicar, em parte, a maior susceptibilidade dos camundongos deste grupo à infecção por *S. aureus*, quando comparado aos camundongos dos grupos CT e AT. O IFN- $\gamma$  aumenta as funções microbicidas dos macrófagos, além de estimular a expressão de receptores de alta afinidade para IgG e proteínas do complemento, que estão envolvidos na opsonização e fagocitose de microrganismos (Park-Min *et al.*, 2007). A IL-10 é um modulador essencial da resposta imune inflamatória, sendo capaz de inibir a atividade microbicida, em parte, por meio do bloqueio da produção endógena de TNF- $\alpha$

(Steinhauser *et al.*, 1999). O TNF- $\alpha$  tem demonstrado uma participação efetiva no combate a infecções bacterianas. Trata-se de uma citocina fundamental no desenvolvimento da resposta inflamatória, aumentando a expressão de moléculas de adesão além de induzir a produção de quimiocinas nas células do endotélio, recrutando então, fagócitos para o sítio de infecção. Porém, TNF- $\alpha$  quando em níveis sistêmicos elevados, é considerado perigoso e um risco para o paciente (Baud & Karin, 2001; Alexander *et al.*, 1991).

Os níveis elevados de TNF- $\alpha$  no fígado podem estar correlacionados com a maior expressão de CTLA-4 nos animais do grupo SP, uma vez que já foi descrita a participação de TNF- $\alpha$ , liberado por células de Kupffer, na regulação da resposta de células T CD4 estimuladas por LPS (Knolle & Gerken, 2000). Os níveis baixos de TNF- $\alpha$  nos pulmões dos camundongos infectados do grupo SP têm forte associação com os elevados níveis de IL-10 e com o maior número de UFC nestes animais, e estão de acordo com dados da literatura que demonstram importante função protetora do TNF- $\alpha$  em infecções por *S. aureus* (Hultgren *et al.*, 1998; Oviedo-Boyso *et al.*, 2008). Lau e colaboradores demonstraram que animais que sofreram esplenectomia apresentaram ineficiente atividade fagocítica e microbicida dos macrófagos alveolares (Lau *et al.*, 1983). De fato, linfonodos pulmonares em camundongos esplenectomizados apresentam maior quantidade de bactérias do que em camundongos controle em resposta ao desafio por pneumococo (Hebert *et al.*, 1994). Alguns autores demonstraram que a ação de IL-10, associada à sepse, pode prejudicar a função efetora de macrófagos alveolares (Steinhauser *et al.*, 1999).

A presença de ácido lipoteicóico (LTA) na superfície de *S. aureus* permite o reconhecimento deste patógeno por meio dos receptores do tipo toll 2 (TLR2) (Schröder *et al.*, 2003). Além disso, a participação de outros receptores peculiares ao baço, como o MARCO e o SIGNR1, também auxiliam no reconhecimento de *S. aureus*. Os sinais exercidos por estes receptores estimulam a produção de IL-12 que por sua vez estimula a secreção de IFN- $\gamma$ . Os baixos

níveis de produção de IFN- $\gamma$  nos animais do grupo SP e sua maior susceptibilidade à infecção sugerem participação crucial do baço na resistência à infecção por *S. aureus*, confirmando dados que indicam sua importância na ativação da resposta imune contra patógenos provenientes da corrente sanguínea (Jouanguy *et al.*, 1999; Mebius & Kraal, 2005).

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória reconhecida como um dos principais mediadores de alterações metabólicas observadas após trauma e infecção. Esta citocina apresenta efeitos pleiotrópicos sobre o sistema imune, podendo ativar os macrófagos a exercer diversas funções, tais como fagocitose e produção de citocinas (Dinarello & Wolff, 1993). A IL-1 é secretada principalmente por monócitos, sendo que macrófagos murinos exibem uma transição de IL-1 $\beta$  para IL-1 $\alpha$  na maturação de monócitos para macrófagos inflamatórios (Beuscher *et al.*, 1992). Os elevados níveis observados para IL-1 $\alpha$  no plasma e no fígado dos camundongos dos grupos CT e AT, juntamente com a maior proteção nestes animais quando comparado aos camundongos do grupo SP, demonstram que esta citocina tem participação efetiva na resposta imune contra *S. aureus*. A IL-1 auxilia na adesão e na quimiotaxia de leucócitos devido ao aumento da expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 e induz a ativação do “burst” oxidativo nos macrófagos e neutrófilos, auxiliando em suas funções efetoras (Kirkham, 1991; Dinarello, 1996; Guthrie *et al.*, 1984). A elevada produção de NO, associada a maior produção de IFN- $\gamma$  e IL-1 $\alpha$  nos camundongos dos grupos CT e AT, além da menor susceptibilidade encontrada nestes grupos, quando comparado ao grupo SP, demonstra a importância destas moléculas na resposta imune contra o *S. aureus*. O NO tem demonstrado ser importante no controle tanto da septicemia como da artrite em camundongos Swiss infectados por *S. aureus* (McInnes *et al.*, 1998). O desafio de camundongos BALB/c com certas exotoxinas de *S. aureus*, tais como TSST-1 e SEB, induziu síndrome de choque tóxico mediada por células T nestes animais, sendo que este efeito foi aumentado com a administração de inibidores da NOS (óxido nítrico sintase – enzima responsável

pela produção de NO) (Florquin *et. al.*, 1994). Todavia, componentes da parede celular de *Staphylococcus*, tais como peptidoglicano e ácido lipoteicóico, podem induzir falência múltipla de órgãos em ratos por meio de um mecanismo dependente de NO (De Kimpe *et. al.*, 1995). Portanto, a produção de NO em resposta à infecção por *S. aureus* pode ter conseqüências tanto benéficas quanto deletérias para o hospedeiro quando não controlada.

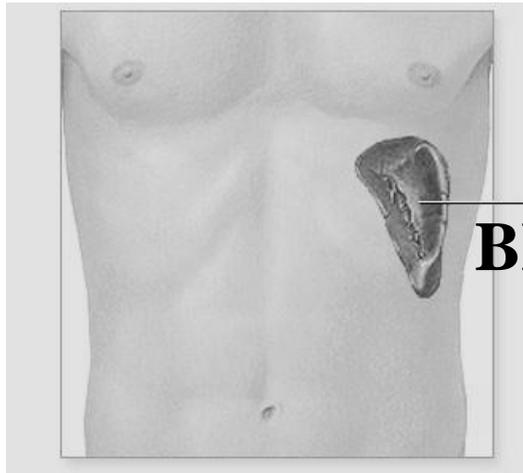
Outra atividade importante do baço é a sua capacidade de produzir anticorpos específicos, principalmente da classe IgM, em resposta a antígenos apresentados por macrófagos (Altamura *et. al.*, 2001). Esta capacidade nos permite fazer algumas especulações sobre a ação destes anticorpos e sua importância nos resultados de proteção já mencionados. A capacidade do baço de produzir IgM e tuftsin é um mecanismo importante na ativação da cascata de proteínas do sistema complemento, um importante componente da resposta imune inata que auxilia na opsonização (Cooper, 1985; De Ciutiis *et. al.*, 1978), facilitando a fagocitose, o aprisionamento e a destruição de patógenos. Assim, a possibilidade do reconhecimento de moléculas PAMPs por meio dos receptores do tipo toll, além de outros receptores, como o SIGNR1 e o MARCO, presentes na superfície dos macrófagos, é significativamente aumentada (Mebius & Kraal, 2005). Este processo de reconhecimento de patógenos conhecido como a fase cognitiva da resposta imune, se encontra, portanto, interconectado à resposta prévia ou concomitante no baço, capaz de reconhecer polissacarídeos presentes principalmente em bactérias encapsuladas e bactérias Gram positivas, como *S. aureus*. Na resposta T independente do tipo 2, que ocorre frente a polissacarídeos, a maior parte das células B se diferencia em plasmócitos produtores de anticorpos (Zandvoort & Timens, 2002), o que nos leva a considerar este mecanismo como um forte aliado na resposta imune dirigida a este patógeno. De fato, observamos maior produção de IgM e IgG1 em camundongos que apresentaram menor susceptibilidade à infecção por *S. aureus*.



# CONCLUSÕES

- O autotransplante de baço restaura a resistência relativa de camundongos BALB/c esplenectomizados frente à infecção por *S. aureus* conforme verificado nos maiores números de UFC no fígado e nos pulmões de camundongos do grupo SP quando comparado aos camundongos dos grupos CT e AT.
- A infecção por *S. aureus* causou influxo de neutrófilos e macrófagos para os pulmões dos camundongos dos três grupos estudados, sendo que camundongos do grupo SP apresentaram maior acúmulo de neutrófilos e macrófagos nos pulmões.
- A resposta imune no baço parece influenciar o fígado na contenção da infecção por *S. aureus*. Os fígados de camundongos dos grupos CT e AT apresentaram resposta imune com formação de granulomas que estiveram praticamente ausentes no fígado dos camundongos do grupo SP.
- A área de infiltrado inflamatório foi maior nos pulmões dos camundongos dos grupos AT e SP quando comparado ao grupo CT.
- Camundongos do grupo AT apresentaram marcadores celulares no baço de uma maneira qualitativa e quantitativa semelhante a aquela observada no baço dos camundongos do grupo CT indicando que o tecido autotransplantado é funcional com relação à capacidade de montar uma resposta imune.
- Após infecção por *S. aureus*, camundongos do grupo AT apresentaram maior quantidade de células B nos pulmões, quando comparados com camundongos dos grupos CT e SP.
- Camundongos esplenectomizados apresentaram maior densidade de CD25 e CD40 nos pulmões, quando comparados com os camundongos dos grupos CT e AT, possivelmente devido a uma maior ativação da resposta imune inflamatória.
- Camundongos do grupo SP apresentaram perfil de produção de citocinas e NO peculiar quando comparado aos camundongos dos grupos CT e AT. Este perfil pode ter favorecido a disseminação da infecção.

- Animais dos grupos CT e AT apresentaram resposta imune humoral no baço, com elevada produção de IgM e IgG1, favorecendo a opsonização, a fagocitose e o controle da infecção por *S. aureus*.



# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## Referências Bibliográficas

- ADACHI, O., KAWAI, T., TAKEDA, K., MATSUMOTO, M., TSUTSUI, H., SAKAGAMI, M., NAKANISHI, K., AKIRA, S. 1998. Targeted disruption of the *MyD88* gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. **Immunity**. 9:143-150.
- ADKINS, B., BU, Y., CEPERO, E. 2000. Exclusive Th2 primary effector function in spleen but mixed Th1/Th2 function in lymph nodes of murine neonates. **J. Immunol.** 164:2347.
- AFZALI, B., LOMBARDI, G., LECHLER, R. I., LORD, G. M. 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. **Clin Exp Immunol.** 148(1):32-46.
- ALEXANDER, H. R., SHEPPARD, B. C., JENSEN, J. C., LANGSTEIN, H. N., BURESH, C. M., VENZON, D., WALKER, E. C., FRAKER, D. L., STOVROFF, M. C., NORTON, J. A. 1991. Treatment with recombinant human tumor necrosis factor-alpha protects rats against the lethality, hypotension, and hypothermia of gram-negative sepsis. **J Clin Invest.** 88(1):34-39.
- ALTAMURA, M., CARADONNA, L., PELLEGRINO, N. M., URGESI, G., MINIELLO, S. 2001. Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** 23(2):153-161.
- ANDO, K., MIYANO, T., YAMATAKA, A., LANE, G., KOBAYASHI, H., SHIMIZU, T., YAMASHIRO, Y. 1997. Torsion of autotransplanted splenic tissue in Gaucher disease. **J Pediatr Surg.** 32(5):747-749.

- AVENDANO, R. H. 1997. Traumatismo esplênico. **Cuad. Cir.** 11:71-78.
- BASU, A., CHAKRABATI, G., SAHA, A., BANDYOPADHYAY, S. 2000. Modulation of CD11c<sup>+</sup> splenic dendritic cell functions in murine visceral leishmaniasis: correlation with parasite replication in the spleen. **Immunology.** 99(2):305-313.
- BAUD, V., KARIN, M. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol.** 11(9):372-377.
- BEER, E. 1928. Development and progress of surgery of the spleen. **Ann Surg.** 88(3):335-346.
- BEUSCHER, H. U., RAUSCH, U. P., OTTERNESS, I. G., RÖLLINGHOFF, M. 1992. Transition from interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) to IL-1 $\alpha$  production during maturation of inflammatory macrophages in vivo. **J Exp Med.** 175(6):1793-1797.
- BOPST, M., HAAS, C., CAR, B., EUGSTER, H. P. 1998. The combined inactivation of tumor necrosis factor and interleukin-6 prevents induction of the major acute phase proteins by endotoxin. **Eur J Immunol.** 28(12):4130-4137.
- BOUR-JORDAN, H., BLUESTONE, J. A. 2002. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. **J Clin Immunol.** 22(1):1-7.
- BRADSHAW, P. H., THOMAS, C. G. Jr. 1982. Partial splenectomy and overwhelming infection in rats. **J Surg Res.** 32(2):173-175.
- BRAVO DE ALBA, Y., CAZENAVE, P. A., MARCHE, P. N. 1995. Bacterial superantigen specificities of mouse T cell receptor V beta 20. **Eur J Immunol.** 25(12):3425-3430.

- CESTA, M. F. 2006. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicol Pathol.** 34(5):455-465.
- COLLINS, L. V., ERIKSSON, K., ULRICH, R. G., TAKOWSKI, A. 2002. Mucosal tolerance to a bacterial superantigen indicates a novel pathway to prevent toxic shock. **Infect Immun.** 70(5):2282-2287.
- CHRISTO, M. C. 1962. Segmental resections of the spleen. **Hospital.** 62:575-590.
- CHRISTO, M. C. 2001. Baço, cirurgia e história. **Rev. Med. Minas Gerais.** 11:251-254.
- CLAASSEN, E., KORS, N., DIJKSTRA, C. D., VAN ROOIJEN, N. 1986. Marginal zone of the spleen and the development and localization of specific antibody forming cells against thymus-dependent and thymus-independent type-2 antigens. **Immunology.** 57:399-403.
- COOPER, M. J., WILLIAMSON, R. C. 1984. Splenectomy: indications, hazards and alternatives. **Br. J. Surg.** 71:173-180.
- COOPER, N. R. 1988. Complement and infectious agents. **Rev Infect Dis.** 10 Suppl 2:S447-S449.
- CROSBY, W. H. 1983. An historical sketch of splenic function and splenectomy. **Lymphology.** 16(2):52-55.
- CYSTER, J. G. 1997. Signaling thresholds and interclonal competition in preimmune B-cell selection. **Immunol Rev.** 156:87-101.
- DE BOER, J., SUMNER-SMITH, G., DOWNIE, H. G. 1972. Partial splenectomy technique and some hematologic consequences in the dog. **J Pediatr Surg.** 7(4):378-381.

- DE CIUTIIS, A., POLLEY, M. J., METAKIS, L. J., PETERSON, C. M. 1978. Immunologic defect of the alternate pathway-of-complement activation postsplenectomy: a possible relation between splenectomy and infection. **J Natl Med Assoc.** 70(9):667-670.
- DE KIMPE, S. J., KENGATHARAN, M., THIEMARMANN, C., VANE, J. R. 1995. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 92(22):10359-10363.
- DINARELLO, C. A., WOLFF, S. M. 1993. The role of interleukin-1 in disease. **N Engl J Med.** 328:106.
- DINARELLO, C. A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood.** 87(6):2095-2147.
- DINGES, M., ORWIN, P., SCHLIEVERT, P. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Rev.** 13:16-34.
- DONG, L., WANG, S., CHEN, M., LI, H., BI, W. 2008. The activation of macrophage and upregulation of CD40 costimulatory molecule in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **J Biomed Biotechnol.** 2008:852571.
- ELOMAA, O., KANGAS, M., SAHLBERG, C., TUUKKANEN, J., SORMUNEN, R., LIAKKA, A., THESLEFF, I., KRAAL, G., TRYGGVASON, K. 1995. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. **Cell.** 80(4):603-609.
- FARIA, A. M., WEINER, H. L. 2005. Oral tolerance. **Immunol Rev.** 206:232-259.

- FEHÉRVARI, Z., SAKAGUCHI, S. 2004. CD4<sup>+</sup> Tregs and immune control. **J Clin Invest.** 114(9):1209-1217.
- FLEISCHER, B. 1994. Superantigens. **APMIS.** 102(1):3-12.
- FLO, T. H., SMITH, K. D., SATO, S., RODRIGUEZ, D. J., HOLMES, M. A., STRONG, R. K., AKIRA, S., ADEREM, A. 2004. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. **Nature.** 432(7019):917-921.
- FLORQUIN, S., AMRAOUI, Z., DUBOIS, C., DECUYPER, J., GOLDMAN, M. 1994. The protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. **J Exp Med.** 180(3):1153-1158.
- FONTENOT, J. D., GAVIN, M. A., RUDENSKY, A. Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **Nat Immunol.** 4(4):330-336.
- FOSTER, T. J. 2005. Immune evasion by staphylococci. **Nat Rev Microbiol.** 3(12):948-958.
- GEIJTENBEEK, T. B., GROOT, P. C., NOLTE, M. A., VAN VLIET, S. J., GANGARAM-PANDAY, S. T., VAN DUIJNHOFEN, G. C., KRAAL, G., VAN OOSTERHOUT, A. J., VAN KOOYK, Y. 2002. Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. **Blood.** 100(8):2908-2916.
- GRAY, H. 1854. On the structure and use of the spleen. London, John W. Parker and Son.
- GREGORY, S. H., SAGNIMENI, A. J., WING, E. J. 1996. Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. **J Immunol.** 157(6):2514-2520.

- GRESHAM, H. D., LOWRANCE, J. H., CAVER, T. E., WILSON, B. S., CHEUNG, A. L., LINDBERG, F. P. 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. **J Immunol.** 164(7):3713-3722.
- GRUENHEID, S., GROS, P. 2000. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. **Curr Opin Microbiol.** 3(1):43-48.
- GUTHRIE, L. A., MCPHAIL, L. C., HENSON, P. M., JOHNSTON, R. B. Jr. 1984. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. **J Exp Med.** 160(6):1656-1671.
- HACKAM, D. J., ROTSTEIN, O. D., ZHANG, W., GRUENHEID, S., GROS, P., GRINSTEIN, S. 1998. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. **J Exp Med.** 188(2):351-364.
- HAMEL, M. E., EYNON, E. E., SAVELKOUL, H. F., VAN OUDENAREN, A., KRUISBEEK, A. M. 1995. Activation and re-activation potential of T cells responding to staphylococcal enterotoxin B. **Int. Immunol.** 7(7):1065-1077.
- HEBERT, J. C. 1989. Pulmonary antipneumococcal defenses after hemisplenectomy. **J Trauma.** 29(9):1217-1221.
- HEBERT, J. C., O' REILLY, M., YUENGER, K., SHATNEY, L., YODER, D. W., BARRY, B. 1994. Augmentation of alveolar macrophage phagocytic activity by granulocyte colony stimulating factor and interleukin-1: influence of splenectomy. **J Trauma.** 37:909-912.

- HOFMAN, F. 2002. Immunohistochemistry. **Curr Protoc Immunol**. Chapter 21:Unit 21.4.
- HORAN, M., COLEBATCH, J. H. 1962. Relation between splenectomy and subsequent infection: a clinical study. **Arch Dis Child**. 37:398-412.
- HORN, F., HENZE, C., HEIDRICH, K. 2000. Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. **Immunobiology**. 202(2):151-167.
- HULTGREN, O., EUGSTER, H. P., SEDGWICK, J. D., KÖRNER, H., TARKOWSKI, A. 1998. TNF/Lymphotoxin- $\alpha$  double-mutant mice resist septic arthritis but display increased mortality in response to *Staphylococcus aureus*. **J Immunol**. 161(11):5937-5942.
- IVANOV, I. I., MCKENZIE, B. S., ZHOU, L., TADOKORO, C. E., LEPELLEY, A., LAFAILLE, J. J., CUA, D. J., LITTMAN, D. R. 2006. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. **Cell**. 126(6):1121-1133.
- IWASAKI, A., KELSALL, B. L. 2001. Unique functions of CD11b<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. **J Immunol**. 166(8):4884-4890.
- JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. 2002. Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. 5<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre: Artmed, 767p.
- JOUANGUY, E., DÖFFINGER, R., DUPUIS, S., PALLIER, A., ALTARE, F., CASANOVA, J. L. 1999. IL-12 and IFN- $\gamma$  in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. **Curr Opin Immunol**. 11(3):346-351.
- KALINSKI, P., HILKENS, C. M., WIERENGA, E. A., KAPSENBERG, M. L. 2000. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal.

**Immunol Today.** 12:561-567.

KING, H., SHUMACKER, H. B. Jr. 1952. Splenic studies. 1. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. **Ann. Surg.** 136:239-242.

KIRKHAM, B. 1991. Interleukin-1, immune activation pathways, and different mechanisms in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.** 50(6):395-400.

KNOLLE, P. A., GERKEN, G. 2000. Local control of the immune response in the liver. **Immunol Rev.** 174:21-34.

KOPPEL, E. A., LUDWIG, I. S., HERNANDEZ, M. S., LOWARY, T. L., GADIKOTA, R. R., TUZIKOV, A. B., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M., VAN KOOYK, Y., APPELMEL, B. J., GEIJTENBEEK, T. B. 2004. Identification of the mycobacterial carbohydrate structure that binds the C-type lectins DC-SIGN, L-SIGN and SIGNR1. **Immunobiology.** 209(1-2):117-127.

KOSUGI, I., MURO, H., SHIRASAWA, H., ITO, I. 1992. Endocytosis of soluble IgG immune complex and its transport to lysosomes in hepatic sinusoidal endothelial cells. **J Hepatol.** 16(1-2):106-114.

KNUTSON, M., WESSLING-RESNICK, M. 2003. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. **Crit Rev Biochem Mol Biol.** 38(1):61-88.

KURANAGA, N., KINOSHITA, M., KAWABATA, T., SHINOMIYA, N., SEKI, S. 2005. A defective Th1 response of the spleen in the initial phase may explain why splenectomy helps prevent a Listeria infection. **Clin Exp Immunol.** 140(1):11-21.

- KUWAJIMA, S., SATO, T., ISHIDA, K., TADA, H., TEZUKA, H. OHTEKI, T. 2006. Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. **Nat Immunol.** 7:740-746.
- LANGEVELD, M., GAMADIA, L. E., TEN BERGE, I. J. M. 2006. T-lymphocyte subset distribution in human spleen. **Eur J Clin Invest.** 36:250-256.
- LANOUE, A., CLATWORTHY, M. R., SMITH, P., GREEN, S., TOWNSEND, M. J., JOLIN, H. E., SMITH, K. G., FALLON, P. G., MCKENZIE, A. N. 2004. SIGN-R1 contributes to protection against lethal pneumococcal infection in mice. **J Exp Med.** 200(11):1383-1393.
- LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F. 2001. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. **Nature Immunol.** 2(6):487-492.
- LAU, H. T., HARDY, M. A., ALTMAN, R. P. 1983. Decreased pulmonary alveolar macrophage bactericidal activity in splenectomized rats. **J Surg Res.** 34(6):568-571.
- LIAUNIGG, A., KASTBERGER, C., LEITNER, W., KURZ, M. E., BERGMANN, E. S., SEIFRIEDSBERGER, M., WEINLICH, D., PIMPL, W., THALHAMER, J. 1992. Regeneration of autotransplanted splenic tissue at different implantations sites. **Cell Tissue Res.** 269(1):1-11.
- LIMMER, A., SACHER, T., ALFERINK, J., KRETSCHMAR, M., SCHÖNRICH, G., NICHTERLEIN, T., ARNOLD, B., HÄMMERLING, G. J. Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. **Eur J Immunol.** 28(8):2395-2406.

- LIN, H., MONACO, G., SUN, T., LING, X., STEPHENS, C. XIE, S., BELMONT, J., ARLINGHAUS, R. 2005. Bcr-Abl-mediated suppression of normal hematopoiesis in leukemia. **Oncogene**. 24(20):3246-3256.
- LIU, Y. J., OLDFIELD, S., MACLENNAN, I. C. M. 1988. Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones. **Eur J Immunol**. 18:355-362.
- LIU, Y. J., ZHANG, J., LANE, P. J. L, CHAN, E. Y. T., MACLENNAN, I. C. M. 1991. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. **Eur J Immunol**. 21:2951-2962.
- LIU, Y. J. 1997. Sites of B lymphocyte selection, activation, and tolerance in spleen. **J Exp Med**. 186(5):625-629.
- LIU, Y. J., ARPIN, C. 1997. Germinal center development. **Immunol R**. 156:111-126.
- LIVINGSTON, C. D., LEVINE, B. A., SIRINEK, K. R. 1983. Site of splenic autotransplantation affects protection from sepsis. **Am J Surg**. 146(6):734-737.
- LODER, F., MUTSCHLER, B., RAY, R. J., PAIGE, C. J., SIDERAS, P., TORRES, R., LAMERS, M. C., CARSETTI, R. 1999. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. **J Exp Med**. 190(1):75-89.
- LOGGIE, B. W., HINCHEY, E. J. Does splenectomy predispose to meningococcal sepsis? An experimental study and clinical review. **J Pediatr Surg**. 21(4):326-330.
- MAIOLI, T. U., CARNEIRO, C. M., ASSIS, F. A., FARIA, A. M. 2007. Splenectomy does not

- interfere with immune response to *Leishmania major* infection in mice. **Cell Immunol.** 249(1):1-7.
- MATSUNO, K., EZAKI, T., KOTANI, M. 1989. Splenic outer periarterial lymphoid sheath (PALS): an immunoproliferative microenvironment constituted by antigen-laden marginal metallophils and ED2-positive macrophages in the rat. **C T Res.** 257:459-70.
- MAXWELL, J. R., ROSSI, R. J., MCSORLEY, S. J., VELLA, A. T. 2004. T cell clonal conditioning: a phase occurring early after antigen presentation but before clonal expansion is impacted by toll-like receptor stimulation. **J Immunol.** 172(1):248-259.
- MAYO, W. J. 1910. Principles underlying surgery of the spleen. **JAMA.** 54:14-18.
- MAYO, W. J. 1928. A review of 500 splenectomies with special reference to mortality and end results. **Ann Surg.** 88(3):409-415.
- MCCLUSKY, D. A., SKANDALAKIS, L. J., COLBORN, G. L., SKANDALAKIS, J. E. 1999. Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery – part 1. **World J Surg.** 23(3):311-325.
- MCCLUSKY, D. A., SKANDALAKIS, L. J., COLBORN, G. L., SKANDALAKIS, J. E. 1999. Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery – part 2. **World J Surg.** 23(5):514-526.
- MCINNES, I. B., LEUNG, B., WEI, X. Q., GEMMELL, C. C., LIEW, F. Y. 1998. Septic arthritis following *Staphylococcus aureus* infection in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **J Immunol.** 160(1):308-315.

- MEBIUS, R. E., KRAAL, G. 2005. Structure and function of the spleen. **Nat Rev Immunol.** 5(8):606-616.
- MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. A. Jr. 2000. The toll receptor family and microbial recognition. **Trends Microbiol.** 8:452-456.
- MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. A. Jr. 2000. How does the immune system distinguish self from nonself? **Semin Immunol.** 12:185-188.
- MIKO, I., BRATH, E., FURKA, I., KOVACS, J., KELVIN, D., ZHONG, R. 2001. Spleen autotransplantation in mice: a novel experimental model for immunology study. **Microsurgery.** 21(4):140-142.
- MIKO, I., BRATH, E., NEMETH, N., FURKA, A., SIPKA, S. Jr., PETO, K., SERFOZO, J., KOVACS, J., IMRE, S., BENKO, I., GALUSKA, L., SIPKA, S., ACS, G., FURKA, I. 2007. Spleen autotransplantation. Morphological and functional follow-up after spleen autotransplantation in mice: a research summary. **Microsurgery.** 27(4):312-316.
- MITSUI, H., WATANABE, T., SAEKI, H., MORI, K., FUJITA, H., TAKA, Y., ASAHINA, A., NAKAMURA, K., TAMAKI, K. 2004. Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. **J Invest Dermatol.** 122(1):95-102.
- MORGENSTERN, L. 1975. History of spleen surgery. **AORN J.** 22(4):639-649.
- MORRIS, D. H., BULLOCK, F. D. 1919. The importance of the spleen in resistance to infection. **Ann Surg.** 70:513-521.

- MUNDAY, J., FLOYD, H., CROCKER, P. R. 1999. Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. **J Leukoc Biol.** 66(5):705-711.
- MURAILLE, E., DE SMEDT, T., ANDRIS, F., PAJAK, B., ARMANT, M., URBAIN, J., MOSER, M., LEO, O. 1997. Staphylococcal enterotoxin B induces an early and transient state of immunosuppression characterized by V- $\beta$ -unrestricted T cell unresponsiveness and defective antigen-presenting cell functions. **J Immunol.** 158(6):2638-2647.
- NIELSEN, J. L., ANDERSEN, H. M., HANSEN, K. B., SAKSO, P., KRISTENSEN, E. S., SORENSEN, F. H. 1983. Protective effect of implanted autologous splenic tissue in splenectomized rats exposed to i.v. *Streptococcus pneumoniae*. **Scand J Haematol.** 30(4):367-373.
- NOLTE, M. A., HOEN, E. N., VAN STIJN, A., KRAAL, G., MEBIUS, R. E. 2000. Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analyses of the cellular composition of the splenic compartments. **Eur J Immunol.** 30:626-634.
- NORRIS, R. P., VERGIS, E. N., YU, V. L. 1996. Overwhelming postsplenectomy infection: a critical review of etiologic pathogens and management. **Infect Med.** 13:779.
- NUNES, S. I., REZENDE, A. B., TEIXEIRA, F. M., FERREIRA, A. P., ALVES, M. M., JAMEL, N., ASSIS, R. V., TEIXEIRA, H. C. 2005. Antibody response of autogenous splenic tissue implanted in the abdominal cavity of mice. **World J Surg.** 29(12):1623-1629.
- OAKES, D. D. 1981. Splenic trauma. **Curr Probl Surg.** 18(6):341-401.
- OEHEN, S., ODERMATT, B., KARRER, U., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R.,

- LÓPEZ-MACÍAS, C. 2002. Marginal zone macrophages and immune responses against viruses. **J Immunol.** 169(3):1453-1458.
- OVIEDO-BOYSO, J., BARRIGA-RIVERA, J. G., VALDEZ-ALARCÓN, J. J., BRAVO-PATIÑO, A., CÁRABEZ-TREJO, A., Cajero-Juárez, M., Baizabal-Aguirre, V. M. 2008. Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF- $\kappa$ B and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . **Scand J Immunol.** 67(2):169-176.
- PARK-MIN, K. H., SERBINA, N. V., YANG, W., MA, X., KRYSTAL, G., NEEL, B. G., NUTT, S. L., HU, X., IVASHKIV, L. B. 2007. Fc $\gamma$ RIII-dependent inhibition of interferon- $\gamma$  responses mediates suppressive effects of intravenous immune globulin. **Immunity.** 26(1):4-6.
- PAULNOCK, D. M. 1992. Macrophage activation by T cells. **Curr Opin Immunol.** 4(3):344-349.
- PEITZMAN, A. B., FORD, H. R., HARBRECHT, B. G., POTOKA, D. A., TOWNSEND R. N. 2001. Injury to the spleen. **Curr Probl Surg.** 38(12):932-1008.
- PEREZ, V. L., VAN PARIJS, L., BIUCKIANS, A., ZHENG, X. X., STROM, T. B., ABBAS, A. K. 1997. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. **Immunity.** 6(4):411-417.
- PERLA, D., MARMORSTON-GOTTESMAN, J. 1930. Studies on Bartonella muris anemia of albino rats. **J Exp Med.** 52:131-135.
- PETROIANU, A. 2003. O baço. CLR Balieiro Editores Ltda.

- PETROIANU, A., RESENDE, V., SILVA, R. G. 2005. Late postoperative follow-up of patients undergoing subtotal splenectomy. **Clinics**. 60(6):473-478.
- PETROIANU, A., PETROIANU, L. P. 2005. Splenic autotransplantation for treatment of portal hypertension. **Can J Surg**. 48(5):382-386.
- POUCHÈ, A., SAVOLDI, F., COLOMBI, A., TIBERIO, G., TURANO, A. 1987. Effect of splenectomy and hemisplenectomy on pneumococcal infection and bacteria clearance in the rat. **Eur Surg Res**. 19(2):86-90.
- PROFT, T., FRASER, J. D. 2003. Bacterial superantigens. **Clin Exp Immunol**. 133:299-306.
- PROJAN, J., NOVICK, R. 1997. The molecular basis of pathogenicity. In *The Staphylococci in human disease*. (Grossley, K. B. and Archer, G. L. eds.), Churchill Livingstone. 55-81.
- PULENDRAN, B., TANG, H., DENNING, T. L. 2008. Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. **Curr Opin Immunol**. 20:61-67.
- QURESHI, S. T., LARIVIERE, L., LEVEQUE, G., CLERMONT, S., MOORE, K. J., GROS, P., MALO, D. 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). **J Exp Med**. 189:615-625.
- RAMADORI, G., CHRIST, B. 1999. Cytokines and the hepatic acute-phase response. **Semin Liver Dis**. 19(2):141-155.
- RATLEDGE, C., DOVER, L. G. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annu Rev Microbiol**. 54:881-941.
- REID, M. M. 1994. Splenectomy, sepsis, immunization and guidelines. **Lancet**. 344:970-971.

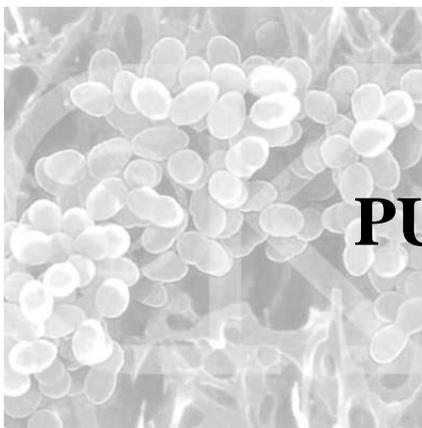
- REIS e SOUSA, C., DIEBOLD, S. D., EDWARDS, A. D., ROGERS, N., SCHULZ, O., SPORRI, R. 2003. Regulation of dendritic cell function by microbial stimuli. **Pathol Biol.** 51(2):67-68.
- ROOIJAKKERS, S. H. M., KOK VAN KESSEL, P. M., VAN STRIJP, J. A. G. 2005. Staphylococcal innate immune evasion. **Trends Microbiol.** 13(12):596-601.
- ROSNER, F. 1972. The spleen in the Talmud and other early Jewish Writings. **Bull Hist Med.** 46(1):82-85.
- ROSSI, R. J., MURALIMOHAN, G., MAXWELL, J. R., VELLA, A. T. 2004. Staphylococcal enterotoxins condition cells of the innate immune system for toll-like receptor 4 stimulation. **Int Immunol.** 16(12):1751-1760.
- RUBIN, L. G. 1988. Anticapsular antibody requirements for protection against experimental Haemophilus influenzae type b bacteremia after splenectomy. **Infect Immun.** 56(4):984-986.
- SCHLIEVERT, P. M., ASSIMACOPOULOS, A. P., CLEARY, P. P. 1996. Severe invasive group A streptococcal disease: clinical description and mechanisms of pathogenesis. **J Lab Clin Med.** 127(1):13-22.
- SCHRODER, N. W. 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. **J Biol Chem.** 278:15587-15594.
- SCHULZ, O., EDWARDS, A. D., SCHITO, M., ALIBERTI, J., MANICKASINGHAM, S., SHER, A., REIS E SOUSA, C. 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. **Immunity.** 13(4):453-462.

- SHARMA, R., MONDAL, A., KASHYAP, R., CHAKRAVARTY, S. K., SAWROOP, K., SINGH, T. 1996. Radiolabeled denatured RBC scintigraphy in autologous splenic transplantation. **Clin Nucl Med.** 21(7):534-536.
- SHORTMAN, K., NAIK, S. H. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic cell development. **Nat Rev Immunol.** 7:19-30.
- SINGER, D. B. 1973. Post-splenectomy sepsis. **Perspect Pediatr Pathol.** 1:285-311.
- SMITH, K. 2007. Iron metabolism at the host pathogen interface: Lipocalin 2 and the pathogen-associated *iroA* gene cluster. **Int J Biochem Cell Biol.** 39(10):1776-1780.
- SPÖRRI, R., REIS E SOUSA, C. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4<sup>+</sup> T cell populations lacking helper function. **Nat Immunol.** 6:163-170.
- SRISKANDAN, S., COHEN, J. 1999. Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from gram-negative sepsis. **Infect Dis Clin North Am.** 13(2):397-412.
- STAGER, S., MAROOF, A., ZUBAIRI, S., SANOS, S. L., KOPF, M., KAYE, P. M. 2006. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. **Eur J Immunol.** 36(7):1764-1771.
- STEINHAUSER, M. L., HOGABOAM, C. M., KUNKEL, S. L., LUKACS, N. W., STRIETER, R. M., STANDIFORD, T. J. 1999. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. **J Immunol.** 162(1):392-399.
- SZABO, S. J., SULLIVAN, B. M., STEMMANN, C., SATOSKAR, A. R., SLECKMAN, B. P.,

- GLIMCHER, L. H. 2002. Distinct effects of T-bet in Th1 lineage commitment and IFN- $\gamma$  production in CD4 and CD8 T cells. **Science**. 295(5553):338-342.
- TAKIMOTO, H., YOSHIKAI, Y., KISHIHARA, K., MATSUZAKI, G., KUGA, H., OTANI, T., NOMOTO, K. 1990. Stimulation of all T cells bearing V beta 1, V beta 3, V beta 11 and V beta 12 by Staphylococcal enterotoxin A. **Eur J Immunol**. 20(3):617-621.
- TIMENS, W. 1991. The human spleen and the immune system: not just another lymphoid organ. **Res Immunol**. 142:316.
- TOKURA, Y., YAGI, J., O'MALLEY, M., LEWIS, J. M., TAKIGAWA, M., EDELSON, R. L., TIGELAAR, R. E. 1994. Superantigenic staphylococcal endotoxins induce T-cell proliferation in the presence of Langerhans cells or class II-bearing keratinocytes and stimulate keratinocytes to produce T-cell-activating cytokines. **J Invest Dermatol**. 102(1):31-38.
- TRAUB, A., GIEBINK, G. S., SMITH, C., KUNI, C. C., BREKKE, M. L., EDLUND, D., PERRY, J. F. 1987. **N Engl J Med**. 317(25):1559-1564.
- VAN DEN DOBBELSTEEN, G. P., BRUNEKREEF, K., KROES, H., VAN ROOIJEN, N., VAN REES, E. P. 1993. Enhanced triggering of mucosal immune responses by reducing splenic phagocytic functions. **Eur J Immunol**. 23:1448.
- VAN WYCK, D. B., WITTE, M. H., WITTE, C. L., THIES, A. C. Jr. 1980. Critical splenic mass for survival from experimental pneumococemia. **J Surg Res**. 28(1):14-17.
- VAZ, N., FARIA, A. M., VERDOLIN, B. A., CARVALHO, C. R. 1997. Immaturity, ageing and oral tolerance. **Scand J Immunol**. 46(3):225-229.

- VERHOEF, J. 2004. Staphylococci and other micrococci. In *Infectious Disease* (Cohen, J. and Powderly, W. G., eds.), Elsevier (Mosby). 2119-2132.
- VESALIUS, A. 1543. *De Humani Corporis Fabrica Libri Septum*. Basel, Switzerland, Johannes Oporinus.
- VIRCHOW, R. 1852. Über blutkörperchenhaltige zellen. **Virchows Arch.** 4:515-540.
- VON KÖLLIKER, A. 1854. *Manual of human microscopical anatomy*. Lippincott. 561-562.
- WALLACE, D., FROMM, D., THOMAS, D. 1982. Accessory splenectomy for idiopathic thrombocytopenic purpura. **Surgery.** 91(2):134-136.
- WALUNAS, T. L., LENSCHOW, D. J., BAKKER, C. Y., LINSLEY, P. S., FREEMAN, G. J., GREEN, J. M., THOMPSON, C. B., BLUESTONE, J. A. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. **Immunity.** 1(5):405-413.
- WEINTRAUB, B. C., GOODNOW, C. C. 1998. Immune Responses: costimulatory receptors have their say. **Curr Biol.** 8(16):R575-R577.
- WILKINS, B. S. 2002. The spleen. **Br J Haematol.** 117(2):265-274.
- WLUKA, A., OLSZEWSKI, W. L. 2006. Innate and adaptive processes in the spleen. **Ann Transplant.** 11(4):22-29.
- XU, S., ARBEIT, R. D., LEE, J. C. 1992. Phagocytic killing of encapsulated and microencapsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. **Infect Immun.** 60(4):1358-1362.

- YANG, J., GOETZ, D., LI, J. Y., WANG, W., MORI, K., SETLIK, D., DU, T., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., STRONG, R. BARASCH, J. 2002. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. **Mol Cell**. 10(5):1045-1056.
- YONEYAMA, H., MATSUNO, K., TODA, E., NISHIWAKI, T. MATSUO, N., NAKANO, A., NARUMI, S., LU, B. GERARD, C., ISHIKAWA, S., MATSUSHIMA, K. 2005. Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. **J Exp Med**. 202:425-435.
- ZANDVOORT, A., TIMENS, W. 2002. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. **Clin Exp Immunol**. 130(1):4-11.
- ZHENG, W., FLAVELL, R. A. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. **Cell**. 89(4):587-596.



# PUBLICAÇÕES

## Publicações

### 7.1. Publicações referentes à tese

NUNES, S. I., REZENDE, A. B., TEIXEIRA, F. M., FERREIRA, A. P., ALVES, M. M., JAMEL, N., ASSIS, R. V., TEIXEIRA, H. C. 2005. Antibody response of autogenous splenic tissue implanted in the abdominal cavity of mice. **World J Surg.** 29(12):1623-1629.

TEIXEIRA, F. M., FERNANDES, B. F., REZENDE A. B., MACHADO, R. R. P., ALVES, C. C. S., PEROBELLI, S. M., NUNES, S. I., FARIAS, R. E., RODRIGUES, M. F., FERREIRA, A. P., OLIVEIRA, S. C., TEIXEIRA, H. C. 2008. *Staphylococcus aureus* infection after splenectomy and splenic autotransplantation in BALB/c mice. **Clin Exp Imm** 154(2):255-263.

TEIXEIRA, H. C., REZENDE, A. B., TEIXEIRA, F. M., NUNES, S. I. 2008. Preservar o baço é possível e necessário. **Ciência Hoje.** 251:40-44.

### 7.2. Publicações no período, não relacionadas à tese

DE ALMEIDA, M. V., TEIXEIRA, F. M., DE SOUZA, M. V., AMARANTE, G. W., ALVES, C. C., CARDOSO, S. H., MATTOS, A. M., FERREIRA, A. P., TEIXEIRA, H. C. 2007. Thalidomide analogs from diamines: Synthesis and evaluation as inhibitors of TNF- $\alpha$  production. **Chem Pharm Bull (Tokyo).** 55(2):223-226.

TEIXEIRA, F. M., TEIXEIRA, H. C., FERREIRA, A. P., RODRIGUES, M. F., AZEVEDO, V., MACEDO, G. C., OLIVEIRA, S. C. 2006. DNA vaccine using *Mycobacterium bovis* Ag85B antigen induces partial protection against experimental infection in BALB/c mice. **Clin Vaccine Immunol.** 13(8):930-935.



**ANEXOS**

# *Staphylococcus aureus* infection after splenectomy and splenic autotransplantation in BALB/c mice

F. M. Teixeira,\* B. F. Fernandes,\*  
A. B. Rezende,\* R. R. P. Machado,\*  
C. C. S. Alves,\* S. M. Perobelli,\*  
S. I. Nunes,\* R. E. Farias,†

M. F. Rodrigues,\* A. P. Ferreira,\*  
S. C. Oliveira‡ and H. C. Teixeira\*

Departments of \*Parasitology, Microbiology  
and Immunology and †Morphology, Biological  
Sciences Institute, Federal University of Juiz  
de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, and

‡Department of Biochemistry and Immunology,  
Federal University of Minas Gerais, Belo  
Horizonte, Brazil

Accepted for publication 27 May 2008

Correspondence: Henrique C. Teixeira, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

E-mail: henrique.teixeira@ufjf.edu.br

## Introduction

Misconceptions about the spleen have hindered the development of knowledge about its function and importance for the organism. For a long time the spleen was regarded as a superfluous organ, which could be removed without side effects [1]. A change in attitude began with the description of overwhelming post-splenectomy infection [2]. Overwhelming infection is a serious clinical situation, occurring 58 times more frequently in patients subjected to splenectomy than in the general population, harming mainly children [3]. The adult spleen is perfused with more than 200 ml of blood per minute and functions as a filter that prolongs contact time of blood cells and molecules with splenic phagocytes, thereby facilitating phagocytosis and presentation of foreign antigens [4,5].

Evaluation of the impact of splenic autotransplantation technique is justified due to the high incidence of total

## Summary

Splenectomy results in an increased risk of sepsis. The autogenous transplant of the spleen is an option for preserving splenic functions after total splenectomy. In this study, the capacity of animals undergoing autogenous spleen transplantation to respond to *Staphylococcus aureus* infection was investigated. BALB/c mice were divided into three groups: splenectomy followed by autotransplantation in the retroperitoneum (AT), splenectomized only (SP) and operated non-splenectomized sham control (CT). Thirty days after surgery the mice were infected intravenously with *S. aureus*. Splenectomized mice had a higher number of colony-forming units (CFU) of *S. aureus* in liver and lungs in comparison with either AT or with CT mice ( $P < 0.05$ ). Higher CFU numbers in lung of SP mice correlated with elevated production of interleukin-10 associated with a lower production of interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$ . However, systemically, the level of tumour necrosis factor- $\alpha$  was higher in the SP group than in CT or AT. Lower titres of specific anti-*S. aureus* immunoglobulin (Ig)M and IgG1 were observed 6 days after infection in SP mice in comparison either with the AT or CT groups. Thus, splenectomy is detrimental to the immune response of BALB/c mice against infection by *S. aureus* which can be re-established by autogenous implantation of the spleen.

**Keywords:** antibody response, cytokines, spleen, *Staphylococcus aureus*, transplantation

splenectomies. The spleen is the organ most affected in closed abdominal trauma, and is also highly susceptible to iatrogenic injuries [6]. Haematological indications for splenectomy result in high incidence of sepsis and death after infection by *Pneumococcus*, *Meningococcus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Staphylococcus* and *Streptococcus* [5,7,8]. The idea of distributing spleen segments into different sites in the abdomen is not new. It is based on splenosis, which is the implantation of splenic tissue fragments resulting from trauma [9].

In order to maintain splenic function, autogenous splenic implantation into various sites including the subcutaneous tissue, retroperitoneum, rectal muscle and the greater omentum have been described [10]. The greater omentum has been used most commonly, but neither histological and immunological patterns nor graft acceptance have been found to differ significantly between the greater omentum and the retroperitoneum [11].

Complications of the spleen autotransplant in the greater omentum have been described, such as cases of torsion of the implants, anaemia and subphrenic abscesses due to necrosis of the implanted tissue, and the retroperitoneum presented higher technical facility when compared with the greater omentum [10,11].

The *S. aureus*, a Gram-positive bacterium that can inhabit the skin and mucous membranes without causing pathologies, can also induce possibly fatal diseases, mainly through toxin liberation. This bacterium was chosen as infection model due to its importance to immunocompromised patients, being one of the most important agents causing community- and hospital-acquired infections, including pneumonia [12]. The critical role of neutrophils in the defence against staphylococcal infection is supported by recurrent infections in individuals with chronic granulomatous disease and by studies with neutrophil-depleted mice [13]. *In vitro* studies have shown that killing of *S. aureus* by neutrophils is not optimal unless antibodies and other opsonins are present. Clinical studies in splenectomized patients have shown that there is an immediate and prolonged fall in plasma tuftsin levels, which leads to a defect in neutrophil phagocytosis and a defective complement activation via the alternative pathway [14,15].

Interferon (IFN)- $\gamma$  and interleukin (IL)-10 are among the cytokines capable of modulating the immune response, providing activation of effector mechanisms or anergy during the immune response against microbial antigens [16]. IFN- $\gamma$  enhances the microbicidal function of macrophages, and stimulates the expression of high-affinity receptors for immunoglobulin (Ig)G and complement proteins. IgG and complement molecules are involved in the opsonization and phagocytosis of particulate microbes [17]. IL-10 has been identified as a crucial modulator of inflammatory responses. IL-10 inhibits bactericidal activity *in vitro* by blocking endogenous production of tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  [18]. TNF- $\alpha$  has been shown to act in combating bacterial infections. It is a key cytokine in the development of inflammatory responses, enhancing the expression of adhesion molecules aside from inducing the production of chemokines in endothelial cells, and recruiting phagocytes to the infection site. TNF- $\alpha$ , when released at systemic levels, as in sepsis provoked by Gram-negative bacteria, is considered detrimental to the host [19,20].

The purpose of this study was to evaluate whether the autogenous splenic graft in the retroperitoneum can restore immunological functions of splenectomized mice during *S. aureus* infection and to seek the possible mechanisms related to the restoration of these functions. In this paper, splenic graft is shown to modulate the number of *S. aureus* and this effect could be associated with the cytokine profile described locally and systemically, and with the serum levels of IgM and IgG1 in infected mice possessing or lacking spleen.

## Material and methods

### Animals and surgical protocol

Experiments were performed with female BALB/c mice from 8 to 10 weeks old. The animals were grouped in the following way: (i) control group (CT), 11 mice subjected to midline laparotomy with subsequent laparorrhaphy; (ii) splenectomized group (SP), 11 mice subjected to splenectomy; and (iii) autotransplanted group (AT), 11 mice subjected to splenectomy and autotransplantation in the retroperitoneum. After anaesthesia (0.9 NaCl, 2% xylazine, 5% ketamine, injected intraperitoneally), a midline laparotomy was performed with subsequent splenectomy and binding of the vascular pedicle and short vessels with 5-0 catgut (Shalon, Goiânia, Brazil). All operations were performed under sterile conditions. The spleen was cut into six slices about 2.5 mm thick and kept in physiological saline at room temperature. In the AT group, the retroperitoneum was opened near the left kidney, and two pieces were placed close to the large abdominal blood vessel without fixation [11]. Skin closure was performed using a 4-0 running polyglactin suture. In the CT group, midline laparotomy, spleen mobilization and isolation of splenic vessels with subsequent laparorrhaphy was performed. The project was approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Juiz de Fora (no. 14/2003).

### Infection and colony-forming units score

Thirty days after surgery, six mice of each group were infected by intravenous bolus injection of  $5 \times 10^6$  colony-forming units (CFU) of *S. aureus* (ATCC 25923) obtained from the National Institute of Quality Control in Health (Oswaldo Cruz foundation, Rio de Janeiro). Animals were then killed 6 days after infection. Lungs and livers fragments from individual animals were homogenized in phosphate-buffered saline (PBS), serially diluted 10-fold and plated on mannitol. The mannitol salt agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) was prepared according to the manufacturer's instructions. This medium was dispensed into six-well plates (Corning Inc., Corning, NY, USA), and incubated at 37°C. CFU numbers were counted visually after 2 days' culture.

### Myeloperoxidase assay

The relative extent of neutrophil accumulation in the lungs was measured indirectly by assaying myeloperoxidase (MPO) activity, as described previously [21]. Briefly, a portion of the left lung was removed and snap-frozen in liquid nitrogen. Upon thawing, the tissue (0.1 g of tissue per 1.9 ml buffer) was homogenized in pH 4.7 buffer (0.1 M NaCl, 0.2 M NaPO<sub>4</sub>, 0.015 M Na ethylenediamine tetraacetic acid), centrifuged at 3000 g for 10 min and the pellet

subjected to hypotonic lyses. After a further centrifugation, the pellet was resuspended in 0.05 M NaPO<sub>4</sub> buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide. Results were expressed as change in optical density (OD) per milligram wet tissue.

#### *N*-acetylglucosaminidase assay

Infiltration of mononuclear cells in the lungs was quantified indirectly by measuring the levels of lysosomal enzyme *N*-acetylglucosaminidase (NAG) present at high levels in activated macrophages [22]. Pellets obtained after the centrifugation of lung homogenates were suspended in 2.0 ml cooled saline containing 0.1% v/v Triton X-100, vortex-homogenized and centrifuged at 4°C for 10 min at 1500 g. Samples of the resulting supernatant (100 µl) were incubated for 10 min with 100 µl of 2.24 mM *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-β-d-glucosaminide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), prepared in 0.1 M citrate/phosphate buffer (pH 4.5). The reaction was terminated by the addition of 100 µl 0.2 M glycine buffer pH 10.6. Hydrolysis of the substrate was determined by measuring the colour absorption at 405 nm. NAG activity was expressed as change in OD per milligram wet tissue.

#### Histological investigation and morphometric analysis

Lung specimens were fixed in 10% neutrally buffered formalin and embedded with paraffin for haematoxylin and eosin (H&E) staining. Histological cuts about 3 µm thick were removed from all the blocks and dyed with H&E staining. The inflammatory infiltration area in the lungs (morphometric analysis) was measured on 10 randomly chosen microscopic fields at ×100 magnification with the help of NIH Image Analysis software (version 1.61) (Bethesda, MD, USA) as the mean of area of inflammatory infiltrations divided by area of field analysed ( $A_i/A_t$ ).

#### The IFN-γ, TNF-α and IL-10 detection by enzyme-linked immunosorbent assay

Lung and liver samples were homogenized in Hank's balanced salt solution containing protease inhibitor cocktail (100 µl/10 ml; Sigma-Aldrich) in a ratio of 0.1 g of tissue in 1 ml of the solution, and centrifuged at 2000 g at 4°C to collect the supernatant which was stored at -70°C in 100 µl aliquots. Blood was collected (approximately 300 µl/mouse) by retro-orbital plexus sampling into microtubes (Axygen, Union City, CA, USA) containing 10% final volume of 3% sodium citrate (w/v) at different times after infection (24 h, 48 h and 6 days) using sodium citrate-pretreated Pasteur pipettes. Plasma samples were separated by centrifugation at 300 g for 30 min and frozen at immediately -70°C. Spleens and spleen fragments were macerated and passed through steel mesh to obtain single-cell suspensions. The cells were washed twice

with sterile PBS then cultured in RPMI-1640 medium supplemented with penicillin G-sodium (100 U/ml), streptomycin sulphate (100 µg/ml), amphotericin B (250 ng/ml) and 10% fetal bovine serum and then placed at  $2 \times 10^5$  cells/well in 96-well tissue culture plates. Murine IFN-γ, TNF-α and IL-10 levels were determined in plasma, in the supernatant of splenocytes and in macerated lung and liver by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

#### Specific antibody detection

Mice were bled 6 days after infection, and individual sera were tested for antibody responses by ELISA. Plates (96-well) (Maxisorp; Nunc, Rochester, NY, USA) were incubated overnight with whole cell lysate *S. aureus* antigen at 10 µg/ml in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, at 4°C. Then, blocking solution [PBS containing Tween 20 (0.05%) plus 10% fetal bovine serum] was added for 2 h at 37°C. Sera from infected mice were diluted 1 : 100 in PBS-Tween 20, added to plates and incubated for 2 h at 37°C. To determine total serum IgM and IgG1, plates were treated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgM molecule (1:10 000; Sigma) or peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG1. The reaction mixture was developed by the addition of 200 µmol of *o*-phenylenediamine (Sigma) and 0.04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction was stopped by the addition of 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and plates were then read at 492 nm using an ELISA reader (SPECTRAMAX 190; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

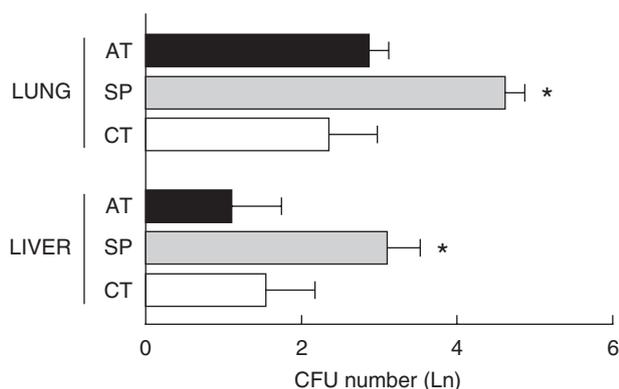
#### Statistical analysis

Normality of data was confirmed by a cumulative normal probability plot and Kolmogorov-Smirnov test. All results are expressed as mean ± standard error of the mean (s.e.m.). Statistical analyses were performed with Student's *t*-test for parametric values or Mann-Whitney *U*-test for non-parametric values using the GraphPad Prism 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

### The *S. aureus* CFU in liver and lungs

The number of *S. aureus* CFU in liver and lungs of infected BALB/c mice was evaluated 6 days after infection. Figure 1 shows that a higher number of *S. aureus* CFU in liver and lungs was observed in the SP group in comparison with either the CT group or the group splenectomized and subsequently receiving autotransplant (AT). Our data indicate that the number of *S. aureus* CFU in liver and lungs is similar in the CT or AT infected groups, suggesting that splenic autotransplantation can restore the immune response against *S. aureus* infection after splenectomy.



**Fig. 1.** Evidence that splenectomized BALB/c mice are more susceptible to *Staphylococcus aureus* infection and that splenic autotransplantation increases resistance to *S. aureus*. Groups of BALB/c mice were infected intravenously with  $5 \times 10^6$  *S. aureus* 30 days after surgery. At day 6 post-infection, the number of colony-forming units per lung and liver was determined. Data represent means of six mice from a representative experiment. CT = control group (white bar), SP = splenectomized group (grey bar), AT = autotransplanted group (black bar). \* $P < 0.05$  versus CT and AT groups.

#### Detection of MPO and NAG activity in lung homogenates and morphometric analysis of inflammatory infiltration in the lungs

The MPO and the NAG activities were assayed in left lung homogenates of SP, AT and CT mice infected with *S. aureus*. The relative quantities of MPO present in the lungs, an indirect indicator of the number of infiltrating neutrophils, was only slightly increased in the SP infected mice ( $0.92 \pm 0.09$  absorbance/100 mg tissue) in relation to the AT ( $0.75 \pm 0.09$ ) and CT ( $0.74 \pm 0.1$ ) infected groups (Fig. 2a). The relative levels of NAG, an indirect indicator of the number of infiltrating macrophages, was slightly augmented in SP infected mice ( $1.07 \pm 0.06$ ) in comparison with the AT group ( $0.98 \pm 0.04$ ) and significantly higher in comparison with the CT ( $0.91 \pm 0.02$ ) group (Fig. 2b). Although not differing markedly in the MPO and NAG assays, the SP infected mice showed expansion of inflammatory infiltrations in the lungs ( $0.22 \pm 0.01$   $A_{ii}/A_t$ ), which was significantly greater than that observed in the CT group ( $0.12 \pm 0.01$ ), but did not differ from the inflammatory infiltration area observed in the AT group ( $0.20 \pm 0.02$ ) at day 6 post-infection, as demonstrated by histopathology (Fig. 2c–e).

#### Cytokine profile

The IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 secretion induced by *S. aureus* infection was quantified in plasma from the SP, AT and CT infected groups. Cytokine production was measured by ELISA. Higher levels of IFN- $\gamma$  were detected in the plasma of

the AT and the CT groups, both at 24 h and 48 h after infection, in comparison with the SP group. At 6 days of infection levels of IFN- $\gamma$  increased markedly in the SP group, but did not differ significantly from those observed in CT and AT groups (Fig. 3a). IL-10 levels in plasma, in contrast, were significantly higher only in SP mice 24 h after infection in comparison with CT mice (Fig. 3b). Plasma levels of TNF- $\alpha$  were higher in SP mice after 48 h and after 6 days of infection in comparison with both AT and CT groups (Fig. 3c). Loss of weight was most dramatic in SP infected mice, although also notable in the AT infected group (Fig. 3d). These data suggest a systemic effect of increased TNF- $\alpha$  production in weight loss, as shown in previous work in other diseases [23].

The IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 were measured in liver and lung homogenates 6 days after *S. aureus* infection. Higher levels of IFN- $\gamma$  were detected in lung and liver homogenates from the CT infected mice ( $3480 \pm 124$  and  $6209 \pm 268$  respectively). IFN- $\gamma$  production was also higher in the lung of AT mice ( $2894 \pm 75$ ), in comparison with the SP group ( $1093 \pm 39$ ,  $P < 0.05$ ). Similar levels of IFN- $\gamma$  were detected in liver homogenates of AT ( $4299 \pm 134$ ) and SP ( $4305 \pm 136$ ) groups (Fig. 4a). Figure 4b shows that TNF- $\alpha$  production was lower in the lung and higher in the liver of SP mice ( $808 \pm 20$  and  $2225 \pm 176$  respectively) in relation to the CT ( $1861 \pm 56$  and  $1518 \pm 61$ ) and AT ( $1689 \pm 50$  and  $1804 \pm 176$ ) groups. IL-10 levels in lung homogenates were higher in SP mice ( $1540 \pm 40$ ) in comparison with either the CT ( $920 \pm 20$ ) or AT groups ( $840 \pm 20$ ) ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference for IL-10 production in the liver of the three groups studied (Fig. 4c).

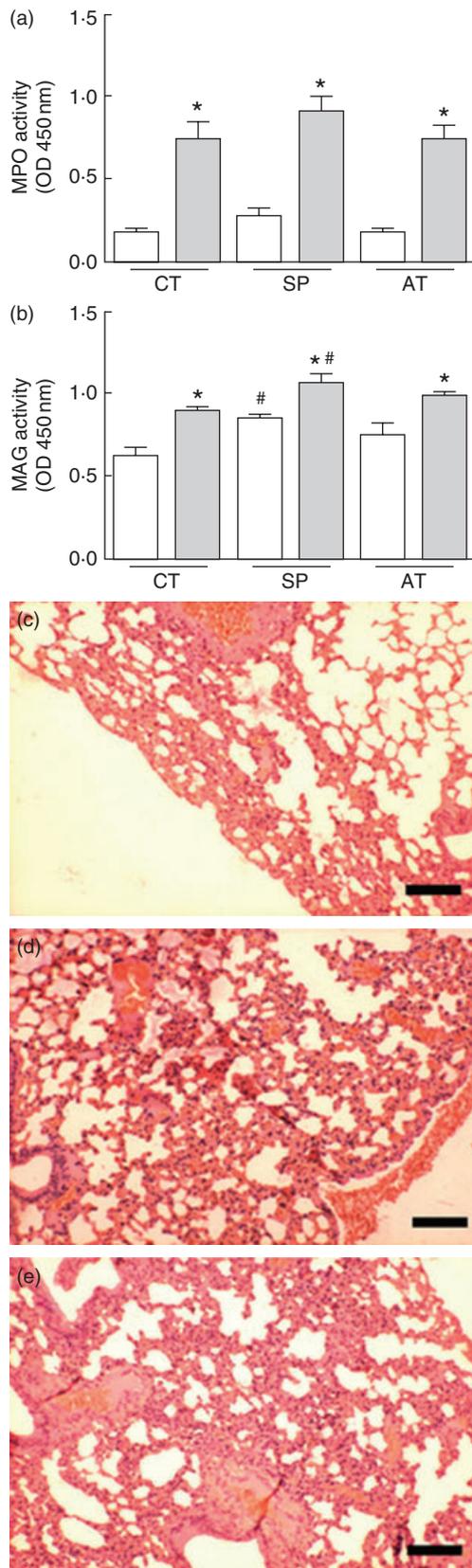
Levels of IFN- $\gamma$  in supernatants of spleen cell cultures were similar between the CT ( $439 \pm 37$ ) and AT ( $442 \pm 18$ ) mice, suggesting that the IFN- $\gamma$  response in implanted splenic tissue is as efficient as in the intact spleen.

#### Serum levels of *S. aureus*-specific IgM and IgG1 antibodies

The levels of anti-*S. aureus* antibodies in the serum of infected mice differed significantly among the three groups studied. The control group showed the highest level of *S. aureus*-specific IgG1 ( $0.25 \pm 0.02$ ) and IgM ( $0.72 \pm 0.01$ ). The AT group showed an intermediary level of anti-*S. aureus* IgG1 ( $0.11 \pm 0.02$ ) and IgM ( $0.50 \pm 0.03$ ), while the SP group showed the lowest levels of IgG1 ( $0.06 \pm 0.01$ ) and IgM ( $0.26 \pm 0.01$ ) (Fig. 5). These levels in the AT group, although not as high as found in the CT group, demonstrate the function of the humoral immune system in recipients of autotransplant.

#### Discussion

The current study presents as main contribution the following findings: (i) infection by *S. aureus* in splenectomized (SP) mice resulted in higher CFU numbers in the liver and

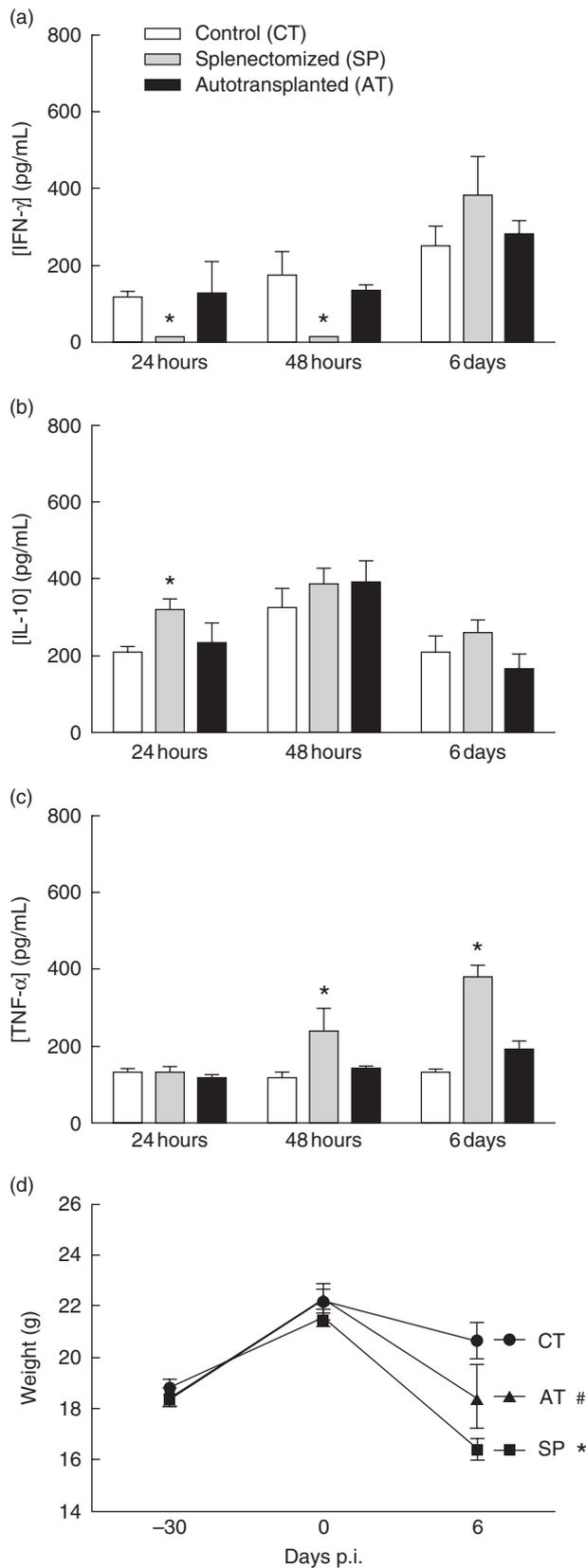


**Fig. 2.** Myeloperoxidase (MPO) and *N*-acetylglucosaminidase (NAG) activity in lung homogenates and morphometric analysis of inflammatory infiltration in the lungs after *Staphylococcus aureus* infection. Neutrophil (a) and macrophage (b) accumulation in lungs was evaluated by indirect methods based on MPO and NAG activities respectively. Results represent the average of the optical density values of six infected (grey bar) and five non-infected (white bar) mice from a representative experiment. Photomicrograph showing inflammatory infiltration in lungs of *S. aureus* infected control (c), splenectomized (d) and autotransplanted (e) mice. The inflammatory infiltration area was measured as described previously. \* $P < 0.05$  versus non-infected; # $P < 0.05$  versus control group. Bar = 100  $\mu\text{m}$ .

lungs when compared with mice splenectomized and receiving spleen autotransplant (AT) and when compared with CT animals; (ii) analysis of the MPO and NAG assays showed that all the groups studied presented similar influx of neutrophils and macrophages in lungs after *S. aureus* infection; however, the morphometric analysis indicated a greater inflammatory area in SP and AT mice compared with CT mice; (iii) SP animals showed a lower production of IFN- $\gamma$  in plasma and lungs associated with a higher production of TNF- $\alpha$  in plasma and IL-10 in lungs; and (iv) levels of specific *S. aureus* IgM and IgG1 production were significantly lower in the SP group when compared with AT and CT mice.

Results of CFU measurements in splenectomized mice after bacterial infections have been controversial. Eskitürk and collaborators [24] have contested the importance of the spleen for protection against pulmonary sepsis provoked by intranasal infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Kuranaga *et al.* demonstrated that splenectomy could reduce the growth of *Listeria monocytogenes* after intravenous infection [25]. However, in our understanding, there is strong evidence demonstrating the participation of the spleen in protecting against Gram-positive and Gram-negative bacterial infections [7,8,26,27]. This is the first study showing that autogenous implantation of the spleen can enhance the host capacity to control *S. aureus* infection.

The MPO and NAG assays demonstrated that the intravenous *S. aureus* infection caused a strong influx of neutrophils and macrophages into the lungs of all groups of mice studied. The SP group had a predominant influx of macrophages. Morphometric analysis indicated that the area of inflammation was greater for the SP and AT groups. This greater inflammatory area in AT mice seems to be due in part to a high influx of B cells (data not shown). The extension of the inflammatory infiltrate in the lungs of the infected animals seems to be proportional to the number of bacteria present in the tissue. This can explain the largest infiltrate in the SP group. The production of MPO and NAG, in spite of showing a small increase in the SP group, did not differ remarkably from the CT and AT groups. Our findings suggest the possibility that there are differences in the degree



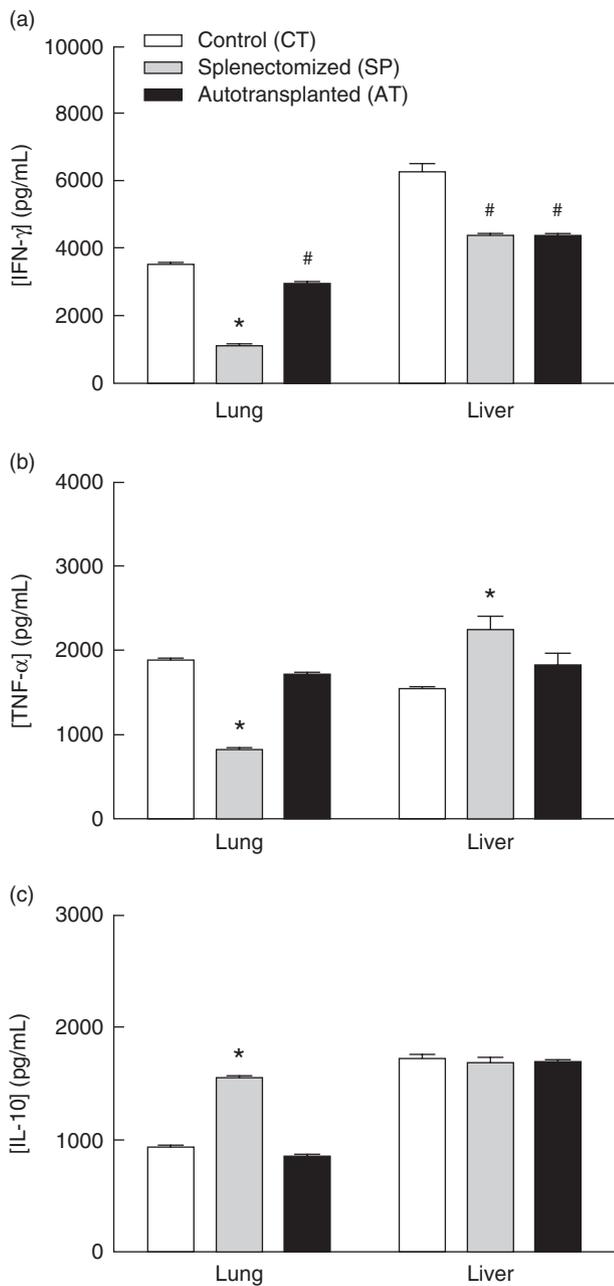
**Fig. 3.** Effect of splenectomy on plasma levels of interferon (IFN)- $\gamma$ , interleukin (IL)-10 and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and on weight loss after *Staphylococcus aureus* infection. Groups of BALB/c mice were infected intravenously with  $5 \times 10^6$  *S. aureus* 30 days after surgery. IFN- $\gamma$  (a), IL-10 (b) and TNF- $\alpha$  (c) levels in plasma were evaluated at different times after infection by enzyme-linked immunosorbent assay. The body weights of infected mice were recorded before surgery (day -30), before infection (day 0) and at day 6 post-infection. Data represent means of six infected mice. \* $P < 0.05$  versus CT and AT groups; # $P < 0.05$  versus SP.

of activation of the cells present in the infiltrate, as those enzymes are increased in activated cells.

To look for indicators of cell activation associated possibly with resistance to *S. aureus* infection after splenectomy, we compared the production of cytokines in SP, AT and CT groups. Lower IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels observed in the lungs of SP mice may be associated with a reduced macrophage activation at the site of infection which facilitates bacterial growth. IFN- $\gamma$  production was similar in spleen cells after infection with *S. aureus* in AT and CT mice, which suggests that autotransplantation does not affect the IFN- $\gamma$  response. The presence of lipoteichoic acid on the surface of *S. aureus* enables recognition of these pathogens through Toll-like receptor 2 [28]. Signalling by these receptors stimulates the production of IL-12 which, in turn, stimulates secretion of IFN- $\gamma$ . The low production of IFN- $\gamma$  by SP mice and their greater susceptibility to infection suggest a fundamental role of the spleen in the resistance to infection by *S. aureus*, confirming findings which indicate their importance in the activation of the immune response to blood-borne pathogens [29,30].

Animals of the SP group infected with *S. aureus* had less production of TNF- $\alpha$  in the lungs, which contrasted with the elevated levels of this cytokine in the liver and in the plasma. These data suggest a greater production of this cytokine at systemic level, which is associated with the loss of weight in these mice. Our data agree with the results observed in the literature, which demonstrate that TNF- $\alpha$  can play a protective role in infections caused by *S. aureus*; however, it is damaging to the host when released into the bloodstream [31,32].

Elevated levels of IL-10 are associated with higher *S. aureus* CFU numbers detected in the lungs of SP mice, and are in accordance with findings reported by Lau *et al.* [33]. These authors demonstrated that asplenic animals have a defect in bactericidal and phagocytic activities of alveolar macrophages. In fact, pulmonary lymph nodes in splenectomized mice are replenished with more live bacteria than in sham operated mice in response to a pneumococcal aerosol challenge [34]. Some authors have observed that abdominal sepsis syndrome resulted in significant impairment in alveolar macrophage effector cell function, which is mediated, in part, by sepsis-induced expression of IL-10. However, there is a consensus on the importance of this cytokine in the control of immune



**Fig. 4.** Effect of splenectomy on interferon (IFN)- $\gamma$ , interleukin (IL)-10 and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  levels in lung and liver homogenates after *Staphylococcus aureus* infection. Mice were infected intravenously with  $5 \times 10^6$  *S. aureus* 30 days after surgery. IFN- $\gamma$  (a), TNF- $\alpha$  (b) and IL-10 (c) levels in lung and liver homogenates were evaluated at day 6 post-infection by enzyme-linked immunosorbent assay. Data represent means of six mice from a representative experiment. \* $P < 0.05$  versus CT and AT groups; # $P < 0.05$  versus CT.

response, in the resolution of infection, avoiding the accumulation of lesions in the tissue [35].

The spleen is vital for first-line defence, being especially equipped for rapid humoral immune responses against blood-borne antigens. Once coated with complement,

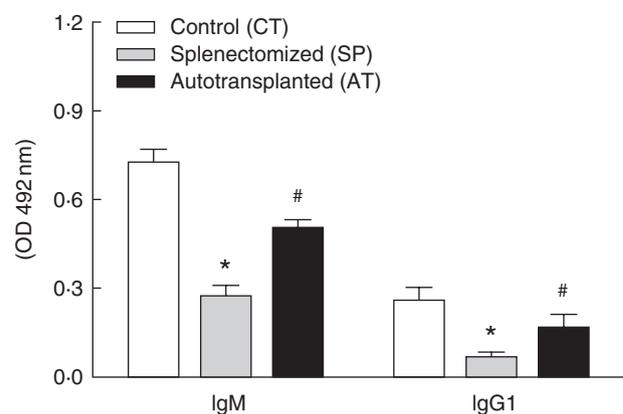
bacteria and viruses become circulating immune complexes [36]. The low levels of IgM and IgG1 found in the splenectomized mice, both in our study and in other reports found in the literature [4,11,26,27,36], indicate the possibility of low opsonization or removal of immunocomplexes in the spleen and the liver, compromising phagocytosis and microbial clearance by phagocytes [37].

Sipka *et al.* showed that splenectomy increases the number of neutrophils in the periphery, but the presence of a transplanted spleen can partially counteract this effect. However, despite the lower number of neutrophils, the phagocytic activity of these cells seems to be higher in autotransplanted and control animals than in splenectomized mice [38]. As demonstrated previously, asplenic patients have a higher level of circulating immune complexes than normal subjects [39].

The incapacity of asplenic individuals to mount an appropriate immune response after vaccination, together with the need for the use of antibiotics and the incidence of infections in these individuals, is an indication of the importance of the autotransplant approach in the case of trauma or damage to the spleen [40,41]. Our results indicate that the spleen autotransplant technique is an alternative strategy when total splenectomy is inevitable and partial splenectomy is not viable, in order to maintain splenic function and a better prognosis in the combat of the infections caused by *S. aureus* and other pathogens.

#### Acknowledgements

This work was supported by FAPEMIG (CDS 255/03), CNPq (471696/2004-8) and PQI-CAPES no. 070, Brazil.



**Fig. 5.** Effect of splenectomy on serum levels of anti-*Staphylococcus aureus* immunoglobulin (Ig)M and IgG1 antibodies. Mice were infected intravenously with  $5 \times 10^6$  *S. aureus* 30 days after surgery. Anti-*S. aureus* IgM and IgG1 antibodies were evaluated in serum at day 6 post-infection by enzyme-linked immunosorbent assay. Data represent means of six mice from a representative experiment. \* $P < 0.05$  versus CT and AT groups; # $P < 0.05$  versus CT.

## References

- 1 Mc Clusky DA, Skankalakakis LJ, Colborn GL, Skandalakis JE. Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery. Part 1. *World J Surg* 1999; **23**:311–25.
- 2 King H, Shumacker HB Jr. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. *Ann Surg* 1952; **136**:239–42.
- 3 Miko I, Brath E, Furka I, Kovacs J, Kelvin D, Zhong R. Spleen autotransplantation in mice: a novel experimental model for immunology study. *Microsurgery* 2001; **21**:140–2.
- 4 Timens W. The human spleen and the immune system: not just another lymphoid organ. *Res Immunol* 1991; **142**:316–20.
- 5 Peitzman AB, Ford HR, Harbrecht BG, Potoka DA, Townsend RN. Injury to the spleen. *Curr Probl Surg* 2001; **38**:932–1008.
- 6 Resende V, Petroianu A. Functions of the splenic remnant after subtotal splenectomy for treatment of severe splenic injuries. *Am J Surg* 2003; **185**:311–5.
- 7 Pisters PW, Pachter HL. Autologous splenic transplantation for splenic trauma. *Ann Surg* 1994; **219**:225–35.
- 8 Bohnsack JF, Brown EJ. The role of the spleen in resistance to infection. *Annu Rev Med* 1986; **37**:49–59.
- 9 Buchbinder JH, Lipkoff CJ. Splenosis. *Surgery* 1939; **6**:927–34.
- 10 Liaunigg A, Kastberger C, Leitner W *et al.* Regeneration of autotransplanted splenic tissue at different implantation sites. *Cell Tissue Res* 1992; **269**:1–11.
- 11 Nunes SI, Rezende AB, Teixeira FM *et al.* Antibody response of autogenous splenic tissue implanted in the abdominal cavity of mice. *World J Surg* 2005; **29**:1623–9.
- 12 Rooijackers SHM, Van Kessel KPM, Van Strijp JAG. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol* 2005; **13**:596–601.
- 13 Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 2005; **3**:948–58.
- 14 Xu S, Arbeit RD, Lee JC. Phagocytic killing of encapsulated and microencapsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1992; **60**:1358–62.
- 15 De Ciutiis A, Polley MJ, Metakis LJ, Peterson CM. Immunologic defect of the alternate pathway-of-complement activation post-splenectomy: a possible relation between splenectomy and infection. *J Natl Med Assoc* 1978; **70**:667–70.
- 16 Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2005; **206**:232–59.
- 17 Park-Min KH, Serbina NV, Yang W *et al.* Fc $\gamma$ RIII-dependent inhibition of interferon- $\gamma$  responses mediates suppressive effects of intravenous immune globulin. *Immunity* 2007; **26**:67–78.
- 18 Steinhauser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* 1999; **162**:392–9.
- 19 Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001; **11**:372–7.
- 20 Alexander HR, Sheppard BC, Jensen JC *et al.* Treatment with recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$  protects rats against the lethality, hypotension, and hypothermia of Gram-negative sepsis. *J Clin Invest* 1991; **88**:34–9.
- 21 Matos IM, Souza DG, Seabra DG, Freire-Maia L, Teixeira MM. Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. *Eur J Pharmacol* 1999; **376**:293–300.
- 22 Bailey PJ. Sponge implants as models. *Methods Enzymol* 1988; **162**:327–34.
- 23 Wan Y, Xue X, Li M *et al.* Prepared and screened a modified TNF- $\alpha$  molecule as TNF- $\alpha$  autovaccine to treat LPS induced endotoxemic shock and TNF- $\alpha$  induced cachexia in mouse. *Cell Immunol* 2007; **246**:55–64.
- 24 Eskitürk A, Söyletir G, Peker O *et al.* The effects of experimental splenic autotransplantation and imipenem-cilastatin treatment in postsplenectomy *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *Res Exp Med* 1995; **195**:163–9.
- 25 Kuranaga N, Kinoshita M, Kawabata T, Shinomiya N, Seki S. A defective Th1 response of the spleen in the initial phase may explain why splenectomy helps prevent a *Listeria* infection. *Clin Exp Immunol* 2005; **140**:11–21.
- 26 Altamura M, Caradonna L, Amati L, Pellegrino NM, Urgesi G, Miniello S. Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001; **23**:153–61.
- 27 Leemans R, Harms G, Rijkers GT, Timens W. Spleen autotransplantation provides restoration of functional splenic lymphoid compartments and improves the humoral immune response to pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin Exp Immunol* 1999; **117**:596–604.
- 28 Schröder NW, Morath S, Alexander C *et al.* Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 2003; **278**:15587–94.
- 29 Jouanguy E, Döffinger R, Dupuis S, Pallier A, Altare F, Casanova JL. IL-12 and IFN- $\gamma$  in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol* 1999; **11**:346–51.
- 30 Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:606–16.
- 31 Hultgren O, Eugster HP, Sedgwick JD, Körner H, Tarkowski A. TNF/lymphotoxin- $\alpha$  double-mutant mice resist septic arthritis but display increased mortality in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 1998; **161**:5937–42.
- 32 Oviedo-Boyso J, Barriga-Rivera JG, Valdez-Alarcón JJ *et al.* Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF- $\kappa$ B and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Scand J Immunol* 2008; **67**:169–76.
- 33 Lau HT, Hardy MA, Altman RP. Decreased pulmonary alveolar macrophage bactericidal activity in splenectomized rats. *J Surg Res* 1983; **34**:568–71.
- 34 Hebert JC, O'Reilly M, Yuenger K, Shatney L, Yoder DW, Barry B. Augmentation of alveolar macrophage phagocytic activity by granulocyte colony stimulating factor and interleukin-1: influence of splenectomy. *J Trauma* 1994; **37**:909–12.
- 35 Reddy RC, Chen GH, Newstead MW *et al.* Alveolar macrophage deactivation in murine septic peritonitis: role of interleukin 10. *Infect Immun* 2001; **69**:1394–401.
- 36 Zandvoort A, Timens W. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin Exp Immunol* 2002; **130**:4–11.
- 37 Johansson AG, Løvdal T, Magnusson KE, Berg T, Skogh T. Liver cell uptake and degradation of soluble immunoglobulin G immune complexes *in vivo* and *in vitro* in rats. *Hepatology* 1996; **24**:169–75.

- 38 Sipka S Jr, Brath E, Toth FF *et al.* Distribution of peripheral blood cells in mice after splenectomy or autotransplantation. *Microsurgery* 2006; **26**:43–9.
- 39 Timens W, Leemans R. Splenic autotransplantation and the immune system. *Ann Surg* 1992; **215**:256–60.
- 40 Sumaraju V, Smith LG, Smith SM. Infectious complications in asplenic hosts. *Infect Dis Clin North Am* 2001; **15**:551–65.
- 41 Davies JM, Barnes R, Milligan D. Update of guidelines for the prevention and treatment of infection in patients with an absent or dysfunctional spleen. *Clin Med* 2002; **2**:440–3.

# Antibody Response of Autogenous Splenic Tissue Implanted in the Abdominal Cavity of Mice

Sérgio I. Nunes, MD, PhD,<sup>1</sup> Alice B. Rezende, MD,<sup>1</sup> Francisco M. Teixeira, MS,<sup>1</sup>  
Ana Paula Ferreira, PhD,<sup>1</sup> Márcio M.J. Alves, MD, PhD,<sup>2</sup> Nelson Jamel, MD, PhD,<sup>3</sup>  
Raimunda V.C. Assis, MD, PhD,<sup>4</sup> Henrique C. Teixeira, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>2</sup>Department of Collective Health, Faculty of Medicine, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>3</sup>Department of Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>4</sup>Department of Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil

---

## Abstract

There is still controversy about the immunologic function of autotransplanted splenic tissue. In this study, splenic autotransplantation was performed in the abdominal cavity of mice, and the plaque-forming cell (PFC) assay was used to investigate the frequency of antibody-forming cells in response to sheep red blood cell (SRBC) immunization. BALB/c mice were divided into four groups according to the location of the autogenous graft: intraomental (IO), free peritoneal splenosis (FPS), retroperitoneal (RP), and nongrafted control (CT). Thirty days after surgery the mice were immunized intraperitoneally with SRBCs, and 4 days later splenic immunoglobulin M anti-SRBC-secreting cells were determined by counting the number of PFCs. All the immunized mice showed increased numbers of PFCs that were about 2 logs higher than those in the nonimmunized controls ( $P < 0.005$ ). The frequencies of anti-SRBC-producing cells in the tissues grafted in various sites of the abdominal cavity (IO, FPS, RP), in the normal spleen from nonoperated controls (CT), or in the sham-operated control group (SCT) were not notably different ( $5582 \pm 2475$  PFC/ $10^7$  cells for IO;  $4849 \pm 1856$  for FPS;  $6604 \pm 2903$  for RP;  $5940 \pm 5029$  for CT; and  $6172 \pm 2203$  for SCT). Similar histology with small architectural variations was observed in all implants; less white pulp was involved, and there was more congestion in the red pulp, with extensive sinusoids and reticular fiber proliferation. This study shows that the T cell-dependent antibody response in implanted splenic tissues is as efficient as in the intact spleen, with no difference between the graft sites studied. This immune response does not depend on the slight architectural variations observed in the splenic implants.

---

The importance of the splenic autotransplant technique is justified by the high incidence of total

splenectomy, the spleen being the most affected organ during blunt trauma as well as highly susceptible to iatrogenic incidents.<sup>1,2</sup> Since the nineteenth century splenectomy has been the treatment advised after splenic trauma, although current studies indicate that this procedure is not exempt from complications.<sup>3</sup> It is accepted

---

Correspondence to: Henrique C. Teixeira, PhD, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil, e-mail: henrique.teixeira@ufjf.edu.br

that important alterations in hematologic physiology occur after splenectomy, compromising the immune system. The overwhelming postsplenectomy infection syndrome is much more frequent in patients subjected to splenectomy than in the general population, affecting children primarily.<sup>4,5</sup> Moreover, partial or complete maintenance of the spleen preserves its important capacity for filtration of cells and particles and can avoid alterations of the lipid metabolism that occur after splenectomy.<sup>6,7</sup> There are still situations where splenectomy is a therapeutic option, as for portal hypertension, but loss of splenic function is not desirable.<sup>7,8</sup> Methods for conserving the spleen have been described, such as splenorrhaphy, partial splenectomy, subtotal splenectomy, arterial ligatures, and application of hemostatic agents.<sup>2,8</sup> In situations where complete splenectomy is inevitable, autotransplant is an alternative for preserving a satisfactory immunologic response.<sup>9</sup>

Autogenous grafting of the spleen has been shown to be a viable procedure. Scintigraphic studies have revealed the presence of captive tissue in autotransplanted fragments,<sup>1,10,11</sup> and histopathologic analysis has shown that the architecture of the autograft is similar to that of normal spleen.<sup>12-18</sup> In addition, preservation of its phagocytic capacity and the absence of Howell-Jolly corpuscles in peripheral blood have been described after autotransplantation of the spleen.<sup>1,7,14</sup> Both intraperitoneal and extraperitoneal locations have been used as implant sites for the experimental technique of autogenous spleen graft.<sup>3,18,19</sup> The most frequent scenario of autotransplantation in humans involves implanting sections of splenic parenchyma into pouches created in the greater omentum because of the favorable revascularization, portal drainage, and omental bacterial clearance.<sup>12,17</sup> However, there have been complications associated with intraomental splenic autotransplantation, such as torsion of the implant, anemia, and subphrenic abscesses due to necrosis of the implanted tissue.<sup>2,19</sup> Although many studies have attempted to elucidate the immunologic function of autotransplanted splenic tissue, a general consensus has not been achieved.

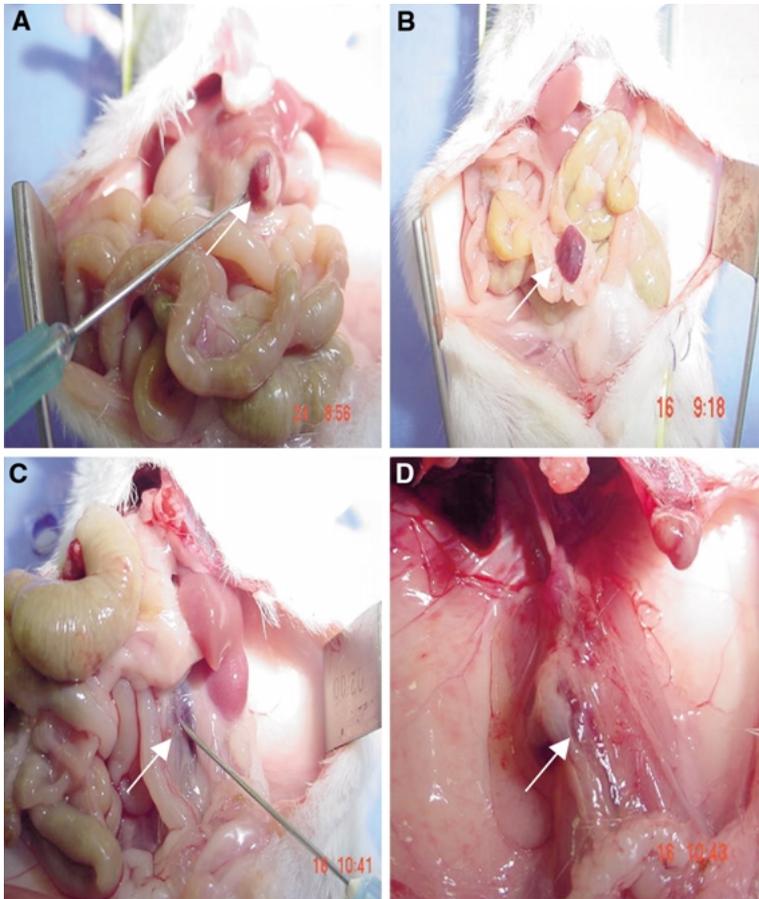
To learn more about the immunologic properties of splenic implants, the present study evaluated the frequencies of antibody-forming cells against sheep erythrocytes in immunized BALB/c mice 30 days after splenic autotransplantation in the peritoneal cavity. Grafts were located in the greater omentum and retroperitoneum and as free splenosis in the peritoneal cavity. The histologic examination of these splenic implants is also outlined.

## MATERIALS AND METHODS

Experiments were performed with 80 isogenic mice of the BALB/c lineage, all females, 10 to 12 weeks old. The animals were grouped in the following way: (1) control group (CT), with the mice not subjected to splenectomy; (2) intraomental group (IO), with autotransplantation in the greater omentum; (3) free peritoneal splenosis group (FPS), with autotransplantation in the peritoneal cavity; and (4) retroperitoneal group (RP), with autotransplantation in the retroperitoneum. An additional group of mice was used to study the effect of laparotomy on anti-sheep red blood cell (SRBC) plaque-forming cell (PFC) responses, which we call the sham surgery control (SCT) group. The project was approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Juiz de Fora (No. 14/2003).

After anesthesia with phosphate-buffered saline (PBS)-chloral hydrate (4%, 8  $\mu$ l/g body weight, injected intraperitoneally), a midline laparotomy was performed with subsequent splenectomy and binding of the vascular pedicle and short vessels with 5.0 catgut (Shalon, Goiânia, Brazil). All operations were done under sterile conditions. The spleen was cut into six slices about 2.5 mm thick and kept in physiologic saline at room temperature. In the RP group, the retroperitoneum was opened near the left kidney, and two pieces were placed close to the large abdominal blood vessel without fixation. In the IO group, two fragments were placed in pockets of the greater omentum, where they were sutured with 5.0 catgut. In the FPS group, two fragments were placed loose in the peritoneal cavity without fixation (splenosis). Skin closure was done using a 4.0 running polyglactin suture. In the SCT group, midline laparotomy with subsequent laparorrhaphy was performed.

A direct hemolytic plaque assay was used for estimating the number of immunoglobulin M (IgM)-producing B cells.<sup>20,21</sup> Seven mice of each group were immunized intraperitoneally with 0.1 ml of a 10% SRBC suspension (in PBS, pH 7.2) 30 days after splenic autotransplantation. Four days later the animals were sacrificed, and the spleen or splenic autotransplants were removed. Tests were performed in duplicate in solutions containing washed spleen cells or transplant cells in RPMI medium ( $10^5$  to  $5 \times 10^6$  cells, 0.1 ml), washed SRBCs (1:3, 20  $\mu$ l), fresh guinea pig serum as a complement source (1:10, 50  $\mu$ l), and 0.5% Difco agar/DEAE-dextran (250  $\mu$ l). The mixture was poured into a petri dish to form a thin, semisolid top layer. The number of PFCs was determined after 4 hours of incubation at 37°C and expressed as PFCs/ $10^7$  cells.



**Figure 1.** Photograph of splenic implants. Splenic fragments implanted in the greater omentum (A), free peritoneal splenosis (B), and retroperitoneal sites (C, D). Mice were killed by cervical displacement. Arrow: implanted tissue.

For PFC studies from lymph nodes, single cell suspensions from inguinal and periaortic lymph nodes were prepared from nonimmunized or immunized mice killed on day 4 after SRBC immunization. Cell viability was determined by the trypan blue exclusion test. The peripheral blood was obtained from the left axillary artery. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from a heparinized pool (2–3 ml/2 animals) with Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA) by density gradient centrifugation at 1700 rpm for 30 minutes at room temperature. PBMCs and lymph node cells were washed twice in PBS and resuspended in RPMI 1640 medium.

For histologic evaluation, the splenic fragments were fixed in 10% formaldehyde before processing for 14 hours and then embedded in paraffin. Histologic sections about 3  $\mu$ m thick were removed from all the blocks and dyed with hematoxylin-eosin; a histochemical reaction was also undertaken for reticular fibers using ammonia silver solution. All material was evaluated by the same observer who considered: (1) general structures of the organ and the presence of the capsule; (2) the morphologic pattern of the white pulp, the existence

of primary and secondary follicles, lymphocyte expansion through reactivity with tingible-body macrophages, and mitoses; (3) the condition of the red pulp and sinusoids, evaluated mainly through the reticulum and determining the diameter; and (4) the presence of giant cells and epithelioid cells.

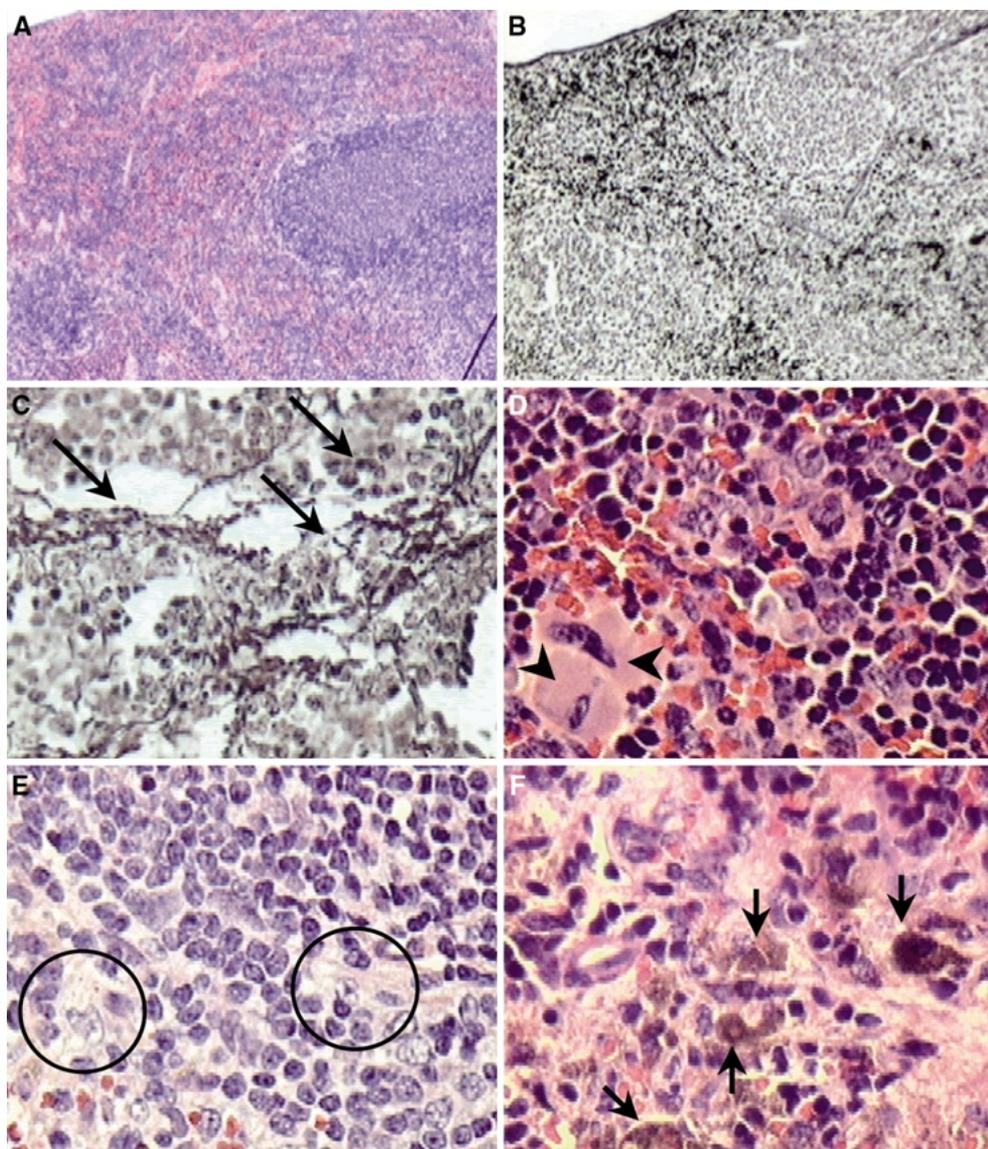
The groups tested were compared by nonparametric analysis using the Kruskal-Wallis test. A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### Autogenous Splenic Implants

Several anatomic sites have been described as suitable for spleen autotransplant, including the omentum and the peritoneum (free peritoneal splenosis).<sup>3,12</sup> In this study autogenous spleen grafts were prepared in the retroperitoneum and the results compared with those at sites more commonly used (IO and FPS).

All animals that had undergone splenic autotransplantation had gross evidence of viable splenic implants



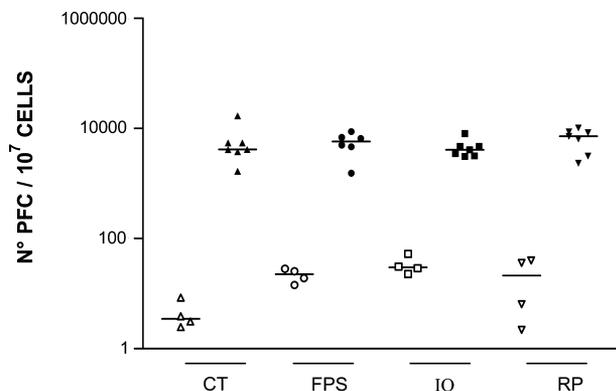
**Figure 2.** Photomicrograph of a retroperitoneal splenic implant. **A.** White and red pulp stained with hematoxylin-eosin. **B, C.** Reticulin fibers (**B**) and sinusoids (**C**) with proliferation of the reticulin fibers (long arrows) stained with ammonia silver solution. **D–F.** Note the presence of giant cells (arrowhead), immunoblasts (circle), and macrophages phagocytosing hemosiderotic pigments (short arrows) in the periphery of secondary follicles. (**A, B**  $\times 40$ ; **C**  $\times 200$ ; **D–F**  $\times 400$ )

(Fig. 1). The survival rate of the transplanted mice was 97.72% (43/44). The average operating times were similar for the groups:  $7.3 \pm 2.1$  minutes for IO,  $8.6 \pm 1.5$  minutes for FPS, and  $7.7 \pm 2.0$  minutes for RP. Adhesions were found in 66.6% (8/12) of the IO animals, 40.0% (4/10) of the FPS animals, and 18.2% (2/11) of the RP animals.

### Histologic Evaluation

The histologic pattern of control spleens and transplanted splenic fragments were evaluated 34 days after autotransplantation. The main alterations found among the original and transplanted spleens were in respect to loss of the original capsule and formation of thick fibrous tissue on cut surfaces of the fragments as well

as the presence of granulation tissue, giant cells, and macrophages phagocytosing hemosiderotic pigments in the periphery (Fig. 2). Animals with implants showed autotransplanted tissue with a structure similar to that of the normal spleen, but minor differences were observed in all implanted groups, such as slight volume reduction of white pulp, congested red pulp, and sinusoids with a more extensive but less organized pattern and with proliferation of the reticular fibers (Fig. 2). No significant histologic differences were observed between the original spleen and implanted splenic fragments from mice stimulated with SRBCs. Epithelioid cells, some giant cells, mitosis, immunoblasts, and macrophages containing cellular remnants were observed in the periphery of secondary follicles in SRBC-immunized mice (Fig. 2).

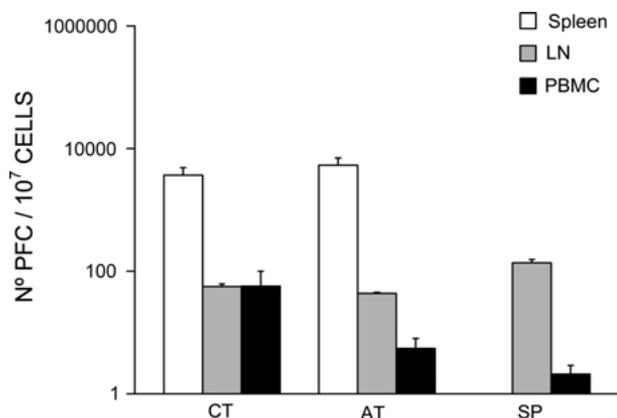


**Figure 3.** Immunoglobulin M (IgM) plaque-forming cells (PFC) response in splenic implants. Mice were immunized with  $2 \times 10^8$  sheep red blood cells (SRBC) 30 days after splenic autotransplantation. The number of spleen cells producing anti-SRBC antibodies was determined in the immunized (black symbols) and nonimmunized (white symbols) groups 4 days after immunization by counting the number of PFCs after 4 hours of spleen cell culture. CT: control spleen; FPS: free peritoneal splenosis implant; IO: intraomental implant; RP: retroperitoneal implant. Bars indicate median values.

### Plaque-forming Cell Assay

The hemolytic plaque assay was used to determine if the antibody response of the autotransplanted tissue is preserved; this response is due to the activity of the splenic cells present in the autotransplanted tissue. Figure 3 shows that SRBC-immunized animals had an increase in the number of splenic anti-SRBC PFCs of log 2 in relation to the nonimmunized animals ( $P < 0.0005$ ). At day 4 after SRBC immunization, the number of anti-SRBC PFCs per  $10^7$  splenic cells were similar in all of the studied groups ( $P = 0.582$ ):  $5582 \pm 2475$  in the IO group,  $4849 \pm 1856$  in the FPS group,  $6604 \pm 2903$  in the RP group, and  $5940 \pm 5029$  in the control group. To discard the possibility of any effect of laparotomy on the PFC responses, a sham surgery group was evaluated. Anti-SRBC PFC responses were evaluated 4 days after immunization in three groups (34 days after surgery in the groups that underwent operation): the sham surgery group controls (SCT), the splenectomized/autotransplanted group (AT), and the nonoperated control group (CT). As expected, the number of IgM-PFCs was similar in the three groups studied:  $6172 \pm 2203$  in the SCT group,  $5305 \pm 585$  in the AT group, and  $4237 \pm 903$  in the CT group. The number of PFC responses in the nonimmunized animals was also similar among these groups, at less than 100 PFCs/ $10^7$  cells (data not shown).

An additional experiment examining IgM anti-SRBC responses in lymph nodes and peripheral blood was



**Figure 4.** The IgM-plaque forming cells' (PFCs) response in lymph nodes and peripheral blood. Mice were immunized with  $2 \times 10^8$  sheep red blood cells (SRBCs) 30 days after splenic autotransplantation. The number of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), lymph node cells (LNs), and splenic cells producing anti-SRBC antibodies was determined 4 days after immunization by counting the number of PFCs. CT: nonoperated control group; AT: autotransplanted in the retroperitoneum; SP: splenectomized and nontransplanted group.

performed to analyze PFC responses in a splenectomized but not autotransplanted group compared to transplanted animals and a control group. The three groups studied were a splenectomized/autotransplanted in the retroperitoneum group (AT); a splenectomized/nontransplanted control group (SP); and a nonoperated control group (CT). The PFC numbers were much higher in spleens or in splenic autotransplanted fragments than in lymph nodes or peripheral blood. In the three groups studied, the PFC numbers in lymph nodes were not significantly different, although they were slightly higher in the SP group. The PBMC anti-SRBC response was measured as an indicator of response from both spleen and lymph nodes. Both groups in which the spleen was removed had a dramatic decline in PBMC-PFCs, but it was even lower in the SP group (Fig. 4).

### DISCUSSION

The most important findings of this study are the following: (1) The histologic and immunologic patterns at the autotransplanted sites do not differ significantly from each other. (2) Histologic structures observed in the implants are similar to normal splenic tissue 34 days after surgery, or 4 days after immunization with SRBCs. (3) The frequency of cells secreting anti-SRBC antibodies in transplanted tissues was comparable to that found in the original organ.

Splenic autotransplantation is technically easy. There is strong evidence that the autotransplanted graft is anatomically viable, and its histology is similar to that of the normal spleen.<sup>12–18</sup> The small histologic alterations seen in our study, such as size reduction of the white pulp, increased congestion in red pulp with extensive sinusoids, and reticular fiber proliferation, might be related to the time elapsed between surgery and evaluation (34 days), which is too short a time to detect complete regeneration of the transplanted fragments. However, similar changes in the immunoarchitecture of splenic implants have been found to occur between 41 and 180 days in Lewis rats, suggesting that the term “mature transplants” is a misconception.<sup>19,22,23</sup> On the other hand, Leemans *et al.*, demonstrated the presence of regenerated splenic tissue 18 weeks after intraomental autotransplantation of splenic tissue in Wistar rats, with a largely restored white pulp.<sup>24</sup> These discrepancies may reflect strain- and age-related differences. Nevertheless, it is assumed that the younger the recipient and the donor, the better is regeneration and perfusion of the regenerated splenic tissue.<sup>24,25</sup>

Evidence exists that alterations of immunologic markers that naturally occur after splenectomy do not appear after autotransplantation.<sup>1,9,26</sup> Close to normal serum levels of tuftsin, properdin, IgG, and IgM have been observed after autotransplantation,<sup>1,7,14</sup> as well as preservation of the phagocytic capacity against pneumococci. This is because opsonin antibodies levels are not altered<sup>26,27</sup>. However, broad conclusions based on various microorganism clearance or host mortality studies published to date on autotransplantation are problematic because of the variety of animal models, infecting organisms, infecting routes, age differences of the animals, and heterogeneous transplantation techniques<sup>3</sup>. The present study showed that all of the autotransplanted splenic grafts studied were immunologically active. Four weeks after transplantation, the number of cells capable of setting up an immune response against SRBCs is the same as that of the original spleen. Fast adaptation and functionality of the transplanted tissue can be decisive factors in guaranteeing the animal with the transplant appropriate resistance to infection.

Our data are in accord with studies in which normal numbers of IgM PFCs were detected 3 to 4 months after splenic implantation in both omental and subcutaneous transplants in rats<sup>19</sup>. Consistent with this assumption, a restored serum antibody response to intravenous challenge with SRBCs was described after intraperitoneal and subcutaneous splenic autotransplantation, with no rise in the asplenic animals<sup>27</sup>. In this

study, PFC numbers in lymph nodes were not significantly different among the groups studied after intraperitoneal immunization with SRBCs, although they were slightly higher in the splenectomized group, which may indicate compensation for the lost spleen. Moreover, a dramatic decline in PBMC-PFC numbers was observed in asplenic animals, but it was even lower in the splenectomized but not autotransplanted group. This result suggests that there is a benefit from autotransplantation with respect to PFC responses after splenectomy.

Most important is the study of how these groups respond to infectious agents. Preliminary studies from our laboratory suggest that the capacity of SP mice to control infection caused by intracellular (*Mycobacterium bovis*) and extracellular (*Staphylococcus aureus*) infectious agents is markedly decreased in comparison to that in the AT and CT groups (F.M. Teixeira *et al.*, manuscript in preparation). The discrete architectural alterations observed in the splenic implants do not interfere with the T cell-dependent antibody response of the autotransplanted tissue. This is the first study that has measured the number of antibody-secreting cells in splenic implants in mice and the first to use the PFC method to describe the immunologic function of implants in the retroperitoneum.

Several studies have tried to define the site of graft implants, the consensus today being that the abdomen—more precisely the greater omentum—is the best place, mainly owing to its venous drainage being entirely through the portal vein<sup>3,28</sup>. In our study, all the evaluated sites had results similar to those exhibited by normal spleen in relation to the regeneration of splenic tissue. However, there was more formation of adhesions in the tissue implanted in the greater omentum in this study. We cannot formally exclude the possibility that the suture thread used for the intraomental implants contributed to the complications in this scenario. Furthermore, in the case of the omentum autotransplant site, torsion of the omentum has been described as a cause of acute abdomen<sup>11,19</sup> and aseptic necrosis of the graft<sup>29</sup>. We suspect that the same type of adhesions observed in our model could occur in humans. The subject merits further study.

Our results suggest that the site of autotransplantation does not affect the antibody response. All sites studied showed preservation of tissue architecture and functional ability to respond to T cell-dependent antigens. The autotransplant in the retroperitoneum had the lowest complication rate, and its clinical application in humans deserves attention.

## ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by FAPEMIG (No. 255/03) and CNPq (No. 471696/2004-8). S.I.N. was given a doctoral fellowship from CAPES.

## REFERENCES

- Resende V, Petroianu A. Functions of the splenic remnant after subtotal splenectomy for treatment of severe splenic injuries. *Am J Surg* 2003;185:311–315.
- Christo MC, DiDio LJA. Anatomical and surgical aspects of splenic segmentectomies. *Ann Anat* 1997;179:461–474.
- Pisters PWT, Pachter HL. Autologous splenic transplantation for splenic trauma. *Ann Surg* 1994;219:225–235.
- King H, Shumacker HB Jr. Splenic studies. I. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. *Ann Surg* 1952;136:239–242.
- Horan M, Colebatch JH. Relation between splenectomy and subsequent infection: a clinical study. *Arch Dis Child* 1962;37:398–412.
- Jamel MJ, Refinetti RA, Silva MM, *et al.* Papel do remanescente esplênico no perfil lipídico. *Arq Bras Cir Dig* 2002;15:105–107.
- Brandt CT, Araujo LB, Barbosa CM. Autotransplantation of spleen tissue in children with mansonic schistosomiasis who underwent splenectomy: evaluation of splenic residual functions. *Acta Cir Bras* 1998;13:212–216.
- Buntain WL, Gould HR. Splenic trauma in children and techniques of splenic salvage. *World J Surg* 1985;9:398–409.
- Leemans R, Manson W, Snijder JAM, *et al.* Immune response capacity after human splenic autotransplantation: restoration of response to individual pneumococcal vaccine subtypes. *Ann Surg* 1999;229:279–285.
- Ando K, Miyano T, Yamataka A, *et al.* Torsion of autotransplanted splenic tissue in Gaucher disease. *J Pediatr Surg* 1997;32:747–749.
- Sharma R, Mondal A, Kashyap R, *et al.* Radiolabeled denatured RBC scintigraphy in autologous splenic transplantation. *Clin Nucl Med* 1996;21:534–536.
- Mikó I, Bráth E, Furka I, *et al.* Spleen autotransplantation in mice: a novel experimental model for immunology study. *Microsurgery* 2001;21:140–142.
- Gomez L, Egido R, Guarino G, *et al.* Studio istologico del trapianto splenico sperimentale nei ratti. *Minerva Chir* 2000;55:741–744.
- Pabst R. Regeneration of autotransplanted splenic fragments: basic immunological and clinical relevance. *Clin Exp Immunol* 1999;117:423–424.
- Moore FA, Moore EE, Moore GE, *et al.* Fivefold enlargement of implants in a splenic autotransplant recipient. *Surgery* 1993;113:462–465.
- Petroianu A. Avaliação da função fagocitária em remanescentes de esplenectomia subtotal e auto-implante esplênico autógeno. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003;25:25–30.
- Weber T, Hanisch E, Baum RP, *et al.* Late results of heterotopic autotransplantation of splenic tissue into the greater omentum. *World J Surg* 1998;22:883–889.
- Cooney DR, Dearth JC, Swanson SE, *et al.* Relative merits of partial splenectomy, splenic reimplantation and immunization in preventing postsplenectomy infections. *Surgery* 1979;86:561–569.
- Liaunigg A, Kastberger C, Leitner W, *et al.* Regeneration of autotransplanted splenic tissue at different implantation sites. *Cell Tissue Res* 1992;269:1–11.
- Jerne NK, Nordin AA. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 1963;140:405.
- Teixeira HC, Calich LM, Singer-Vermes LM, *et al.* Experimental paracoccidioidomycosis: early immunosuppression occurs in susceptible mice after infection with pathogenic fungi. *Braz J Med Biol Res* 1987;20:587–589.
- Dickerman JD, Horner SR, Coil JA, *et al.* The protective effect of intraperitoneal splenic autotransplants in mice exposed to an aerosolized suspension of type III *Streptococcus pneumoniae*. *Blood* 1979;54:354–358.
- Pabst R, Reilmann H. Regeneration of heterotopically transplanted autografts of splenic tissue. *Cell Tissue Res* 1980;209:137–143.
- Leemans R, Harms G, Rijkers GT, *et al.* Spleen autotransplantation provides restoration of functional splenic lymphoid compartments and improves the humoral immune response to pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin Exp Immunol* 1999;117:596–604.
- Pabst R, Westermann J, Rothkötter HJ. Immunoarchitecture of regenerated splenic and lymph node transplants. *Int Rev Cytol* 1991;128:215–259.
- Likhite VV. Protection against fulminant sepsis in splenectomized mice by implantation of autochthonous splenic tissue. *Exp Hematol* 1978;6:433–439.
- Schwartz AD, Dadash-Zadeh M, Goldstein R, *et al.* Antibody response to intravenous immunization following splenic autotransplantation in Sprague-Dawley rats. *Blood* 1977;49:779–783.
- Livinstone CD, Levine BA, Sirinek KR. Site of splenic autotransplantation affects protection from sepsis. *Am J Surg* 1983;146:734–737.
- Tzoracoleftherakis E, Alivizatos V, Kalfarentzos F, *et al.* Complications of splenic tissue reimplantation. *Ann R Coll Surg Engl* 1991;73:83–86.