

Rodrigo Junio Rodrigues Barros

# **Caracterização do Perfil Imunológico de Indivíduos com Sepses**

Programa de Pós graduação em Infectologia e Medicina Tropical

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Belo Horizonte, M.G.

2013

Rodrigo Junio Rodrigues Barros

# **Caracterização do Perfil Imunológico de Indivíduos com Sepses**

Orientadora: Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte do requisito para obtenção do título de mestre.

Programa de Pós graduação em Infectologia e Medicina Tropical

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Belo Horizonte, M.G.

2013



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



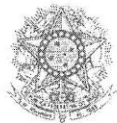
DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau, Marcus Vinícius Melo de Andrade e Silvana Maria Elói Santos, aprovou a defesa de dissertação intitulada: **“Caracterização do perfil imunológico de indivíduos com sepse”** apresentada pelo mestrando **Rodrigo Junio Rodrigues Barros** para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 06 de fevereiro de 2013.

Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau  
Orientadora

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Profa. Silvana Maria Elói Santos



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 34099640 FAX: (31) 34099641



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de RODRIGO JUNIO RODRIGUES BARROS, registro número 2011661573. No dia seis de fevereiro de dois mil e treze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar o trabalho final intitulado: "Caracterização do perfil imunológico de indivíduos com sepsis", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau/ orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Silvana Maria Elói Santos	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, o candidato foi considerado: Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 06 de fevereiro de 2013.

Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau [Assinatura]

Profa. Silvana Maria Elói Santos [Assinatura]

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade [Assinatura]

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior/Coordenador [Assinatura]

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde:  
Infectologia e Medicina Tropical  
Faculdade de Medicina - UFMG

**CONFERE COM ORIGINAL**  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina - UFMG

Esse trabalho foi realizado no Centro de Terapia Intensiva (CTI) do Hospital Risoleta Tolentino Neves (Belo Horizonte – MG) e no Laboratório de Biologia das Interações Celulares do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG).

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

*“ Ah! É uma qualidade maravilhosa, um verdadeiro dom do céu. Você sabe, há sementes por toda parte. Não só no chão, mas nos telhados das casas, no parapeito das janelas, nas calçadas das ruas, nas cercas e nos muros. Milhares e milhares de sementes que não servem pra nada. Estão ali esperando que um vento as carregue para um jardim ou para um campo.”*

**Maurice Druon**

Uma vez li uma frase de ELY, *You don't need many heroes if you choose carefully*, desde então, outro não é motivo a quem eu dedico este trabalho se não as minhas amigas e tutoras Dr<sup>a</sup> Tatjana Keesen e Dr<sup>a</sup> Erica Vieira que souberam, com sua sensibilidade, tornar mero conhecimento em uma belíssima amizade. Gratidão eterna...

AGRADECIMENTOS



Agradeço a Deus, quem me faz acordar todos dias e saber que mesmo com inúmeras barreiras eu consigo transpo-las e me tornar mais forte. Ele é um dos maiores responsáveis por eu estar aqui realizando este lindo trabalho.

As duas mulheres mais importantes da minha vida, minha Mãe e minha Irmã, vocês são minhas estrelas, minha fonte de força, meu conforto, meu bem mais precioso... todas as mais belas palavras ainda não bastam pra descrever o que vocês representam pra mim.

Ao André, pessoa fundamental em todos os momentos.

Ao Zé Diou, meu irmão emprestado.

Ao meu pai, que nas suas limitações, de uma forma ou de outra sempre me ajudou como pode.

A minha família, em especial Tio José Pedro.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Juliana, que desde o início acreditou em mim. Obrigado pelo conhecimento, pelo convívio e pela oportunidade. Muito obrigado!!!

Ao Prof. Jader, exemplo de caráter, ética e inteligência, pessoa fundamental na minha formação. Não existem palavras pra descrever a minha admiração, carinho e gratidão.

A querida amiga Prof<sup>a</sup> Andréia Laura, a quem sempre serei eternamente grato por tudo!!! Você foi a criadora desse sentimento de busca pelo conhecimento. Muitíssimo obrigado!!!

Ao meu nobre e grande amigo Alex (ex little cat), suas orações como sempre fazendo parte da minha vida e me tornando uma pessoa cada vez melhor.

Aos meus amigos Dedé e Luiza (forever "Run Boom").

Ao meu amigo e companheiro de estudos Vinícius (Dr Montiro).

As amigas, companheiras de trabalho e angústias, Dri e Prof<sup>a</sup> Micena, que sempre fizeram parte dos meus piores e melhores momentos.

Ao pessoal do LAMEX, em especial minhas “gatonas” Tati, Cris e Leidi.

Aos companheiros de trabalho, Prof. Dr. Fernando Botoni, Prof. Fabrício, Argenil, e Cristina, sem vocês este trabalho seria impossível.

Aos pacientes que participaram desse trabalho, e muitas vezes não conseguem imaginar a grandeza de sua contribuição para a ciência.

Aos funcionários do Hospital Risoleta Tolentino Neves.

Ao pessoal do LABIC que de alguma forma contribuíram pra este trabalho.

## Lista de Abreviações

APC	Alofococianina
APCs	Células apresentadoras de antígeno
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina
CD	Grupo de diferenciação ( <i>cluster of differentiation</i> )
CTI	Centro de terapia intensiva
CTLA-4	Antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico
CTLs	Células citolíticas
CXCR2	Receptor de quimiocina 2
Cy	Cychrome
DC	Células dendríticas
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
FITC	Isocianato de fluoresceína
FACS	Fluorecence Acitivated Cell Sorter
FL	Fluorescência
FSC	Forward Angle Light Scatter (Tamanho celular)
Foxp3	Fator de transcrição <i>forkhead box p3</i>
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano
HRTN	Hospital Risoleta Tolentino Neves
ICAM-1	Molécula-1 de adesão intercelular
IFN- $\gamma$	Interferon do tipo gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacarídeos
LTB	Leucotrieno
M1	Subtipo de macrófago 1
M2	Subtipo de macrófago 2
MFF	Solução fixadora
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MyD88	Proteína de diferenciação mielóide 88
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kapa B
NK	Células matadoras naturais ( <i>natural killer</i> )
NKT	Células T matadoras naturais ( <i>T natural killer</i> )

NO	Óxido nítrico
NS	Indivíduos saudáveis
PaCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de gás carbônico no sangue arterial
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PD-1	Morte porgramada -1
PD-L	Ligante de morte programa
PMN	Polimorfonuclear
PBS	Salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
S	Pacientes com sepse
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SSC	Side Angle Light Scatter (Granulosidade celular)
TCR	Receptor de Célula T
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral-beta
Th	Linfócito auxiliar ( <i>T helper</i> )
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
Th17	Resposta celular do tipo 17
TLR	Receptor do tipo Toll ( <i>Toll Like Receptor</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral - alpha
Treg	Célula T reguladora

# SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE FIGURAS.....	XVI
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XIII
1.0. INTRODUÇÃO.....	17
2.0. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1. SEPSE: DEFINIÇÕES E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	19
2.2. A RESPOSTA IMUNE NA SEPSE .....	21
2.2.1. Componentes celulares e mediadores inflamatórios .....	21
2.2.2. Teoria da hiperestimulação do sistema imune e da anergia.....	26
2.2.3. Células T e Sepses .....	27
3.0. OBJETIVOS.....	31
3.1. OBJETIVO GERAL .....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
4.0. MATERIAL E MÉTODOS .....	32
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	32
4.2. ANÁLISE <i>EX VIVO</i> DO FENÓTIPO CELULAR DOS LINFÓCITOS T E MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO .....	33
4.3. ESTRATÉGIAS DE ANÁLISE DAS POPULAÇÕES CELULARES.....	34
4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	37
5.0. RESULTADOS .....	38
5.1. PERFIL CLÍNICO DOS PACIENTES COM SEPSE .....	38
5.2. AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DE MONÓCITOS CD14 <sup>+</sup> DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM SEPSE .....	39
5.3. PERFIL FENOTÍPICO DOS LINFÓCITOS T TOTAL E CD4 <sup>+</sup> DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM SEPSE .....	41
5.4. PERFIL FENOTÍPICO DOS LINFÓCITOS T CD8 <sup>+</sup> DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM SEPSE.....	44
6.0. DISCUSSÃO.....	46

7.0. CONCLUSÃO .....	53
8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos anticorpos utilizados para caracterização das subpopulações de células T .....	34
Tabela 2: Relação dos anticorpos utilizados para caracterização dos monócitos .....	34
Tabela 3: Dados clínicos dos pacientes com sepse .....	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico. ....	20
Figura 2: Resposta imune a patógenos.....	24
Figura 3: Gráfico representativo da estratégia de análise utilizada para seleção de monócitos CD14 <sup>+</sup> expressando a citocina TNF- $\alpha$ em pacientes com sepse. ....	36
Figura 4: Gráfico representativo da estratégia de análise utilizada para seleção de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> expressando a citocina IFN- $\gamma$ em pacientes com sepse. ....	37
Figura 5: Análise da expressão de moléculas de reconhecimento de antígenos por monócitos CD14 <sup>+</sup> do sangue periférico. ....	39
Figura 6: Análise da expressão de moléculas co-estimuladoras monócitos CD14 <sup>+</sup> do sangue periférico.....	40
Figura 7: Análise da expressão de citocinas por monócitos CD14 <sup>+</sup> do sangue periférico.....	41
Figura 8: Análise da frequência de linfócitos T totais e CD4 <sup>+</sup> do sangue periférico. .	42
Figura 9: Análise da expressão de moléculas de ativação por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> do sangue periférico.....	43
Figura 10: Análise da expressão de citocinas por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> do sangue periférico.....	44
Figura 11: Análise da expressão de citocinas por linfócitos T CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico.....	45



## RESUMO

A gravidade da sepse está associada à resposta inflamatória sistêmica desencadeada pela inabilidade do sistema imune em circunscrever o crescimento de um microrganismo durante uma infecção. Vários mecanismos imunológicos têm sido propostos na infecção causada por microrganismos, como a atuação dos linfócitos e monócitos e a produção concomitante de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Entretanto a participação das células T CD4 e CD8 bem como dos monócitos/macrófagos na sepse ainda é pouco conhecida. A caracterização dessas células e o seu papel tem sido objeto de intenso estudo devido ao seu papel crítico na manutenção e/ou no controle da resposta aos microrganismos causadores da sepse. Desta forma, no presente estudo foram avaliados o perfil fenotípico dos monócitos CD14<sup>+</sup> e das populações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) em pacientes com sepse. Dentro desse contexto foram avaliados a expressão de moléculas ativadoras (CD62L e CD69), co-estimuladoras (CD80 e CD86), apoptóticas (Granzima A e B) e de reconhecimento de antígenos (TLR2 e TLR4), bem como a produção das citocinas pró-inflamatórias (IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e anti-inflamatória (IL-10). Nossos resultados mostraram que monócitos CD14<sup>+</sup> de pacientes com sepse apresentaram menor expressão das moléculas TLR-2, CD86, HLA-DR e aumento do TNF- $\alpha$  citoplasmático, e que pacientes com sepse possuem maior frequência de células CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> CD69<sup>+</sup>ativadas quando comparado com indivíduos saudáveis. As células T CD4<sup>+</sup> apresentaram maior expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10 enquanto os linfócitos CD8<sup>+</sup> apresentam maior frequência de granzima A e IFN- $\gamma$  nos pacientes com sepse em relação aos indivíduos saudáveis. Em conclusão, os resultados obtidos neste trabalho trouxeram um melhor entendimento sobre o perfil fenotípico dos monócitos e das células T nos pacientes com sepse e demonstrou-se a plasticidade dessa população celular, podendo atuar na supressão, modulação e até mesmo na manutenção da inflamação desencadeada pela sepse.

PALAVRAS-CHAVES: SEPSE, CITOCINAS, CÉLULAS T, MONÓCITOS

## ABSTRACT

The severity of sepsis is associated with the inability of the immune system to control the growth of the microorganism during infection. Several mechanisms have been proposed to explain how microorganisms cause immune infections. Some explanations are based on the activity of lymphocytes and monocytes with concomitant production of pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. However, the involvement of T cells CD4 and CD8 and monocytes in sepsis is still unknown. The characterization of these cells and their role has been the subject of intense study due to its critical role in maintaining and/or control of the response to microorganisms causing sepsis. In this study we evaluated the phenotypic profile of CD14<sup>+</sup> monocytes and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from patients with sepsis. Additionally, we analyzed the expression of activation (CD69), costimulatory molecules (CD80 and CD86), apoptotic markers (granzyme A and B) and TOLL LIKE receptors (TLR2 and TLR4), as well as proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$  and IFN-g) and anti-inflammatory cytokine (IL-10). Our results showed that CD14<sup>+</sup> monocytes from septic patients present lower expression of TLR-2, CD86, HLA-DR and increased expression of TNF- $\alpha$ . These patients also present higher frequency of CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> CD69<sup>+</sup> activated T cells in peripheral blood when compared to healthy donors. The CD4<sup>+</sup>T cells from septic patients present higher levels of IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-10 and CD8<sup>+</sup> T cells increased frequency of granzyme A and IFN- $\gamma$  when compared to healthy subjects. In conclusion, our results provide a better understanding of the phenotypic profile of monocytes and T cells from patients with sepsis and demonstrated the plasticity of these cells and may act in suppression, modulation and even in the maintenance of inflammation triggered by sepsis.

KEYWORDS: SEPSIS, CYTOKINES, T CELLS, MONOCYTES.

## 1.0. INTRODUÇÃO

A sepse resulta de uma interação entre o agente patogênico e o sistema imune levando a uma reação inflamatória acompanhada de manifestações sistêmicas que, em algumas circunstâncias, pode por em risco a vida do indivíduo uma vez que diversos órgãos, especialmente pulmões, fígado, rins e coração, apresentam insuficiência, que muitas vezes pode ser irreversível (Kasten *et al.*, 2010). Certamente, uma das dificuldades que podem ser encontradas é que a sepse humana ocorre de maneira diferente ao que é reproduzido experimentalmente com maior controle em modelos animais (Gosemann *et al.*, 2012). Dentre os fatores que diferenciam os eventos pode-se destacar a alta diversidade da resposta fisiológica e imunológica humana (Sriskandan *et al.*, 2008; Krishna *et al.*, 2011). Como parte desses mecanismos que levam à ineficiência dessas células não estão completamente esclarecidos satisfatoriamente, torna-se de extrema importância a necessidade de elucidar essas vias para uma melhor compreensão do papel molecular dessas células na progressão da sepse.

Alguns estudos demonstram que na sepse os componentes pró-inflamatórios atuam em conjunto com os componentes de anti-inflamatórios levando ao fenômeno conhecido como "paralisia imunológica" ou "reprogramação de leucócitos", que é caracterizado por anergia, apoptose e diminuição da capacidade de reconhecer antígenos por parte dos linfócitos (Hein *et al.*, 2010). Desta forma é induzido um estado de imunossupressão, que prejudica a eliminação do microrganismo na sepse complicando ainda mais o quadro de infecção (Saito *et al.*, 2008; Hein *et al.*, 2010).

Alguns estudos mostram que a gravidade da sepse se correlaciona com problemas de reconhecimento e apresentação de antígenos por parte de células APCs (Oberholzer *et al.* 2001). No processo de infecção da sepse os monócitos que entraram em contato com o antígeno, interagem principalmente com células T CD4<sup>+</sup> levando estas a proliferar e se tornarem células efetoras (Miller *et al.*, 2007). Estas células efetoras são importantes produtoras de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ , atuando nas células responsáveis pela eliminação da infecção (Enoh *et al.*, 2008). Existem controvérsias sobre o benefício desta citocina após um certo tempo de infecção, pois a resposta inflamatória exacerbada muitas vezes contribui para a

lesão de tecidos. Assim, a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, é necessária a fim de evitar grandes danos resultantes da resposta inflamatória (Voll *et al.* 1997). Voll e colaboradores (1997) sugerem que as células T CD4<sup>+</sup> podem controlar os aspectos da resposta imune inata durante a sepse. A infecção também provoca aumento de células T CD8<sup>+</sup> que eliminam o patógeno por lise de células lesadas e/ou infectadas através da secreção de proteases, tais como granzimas (Barber *et al.* 2006).

A alta diversidade na resposta imune levanta diversos questionamentos sobre os mecanismos que levam à ineficiência de células T na eliminação da infecção. Nesse contexto, compreender como as respostas celulares que influenciam a resposta inflamatória podem estar associadas à susceptibilidade ou à resistência as infecções, constituem importante alvo para esclarecer não somente como esses mediadores podem estar participando na sepse, mas compreender as limitações obtidas nos achados experimentais até o presente momento.

## 2.0. REVISÃO DA LITERATURA

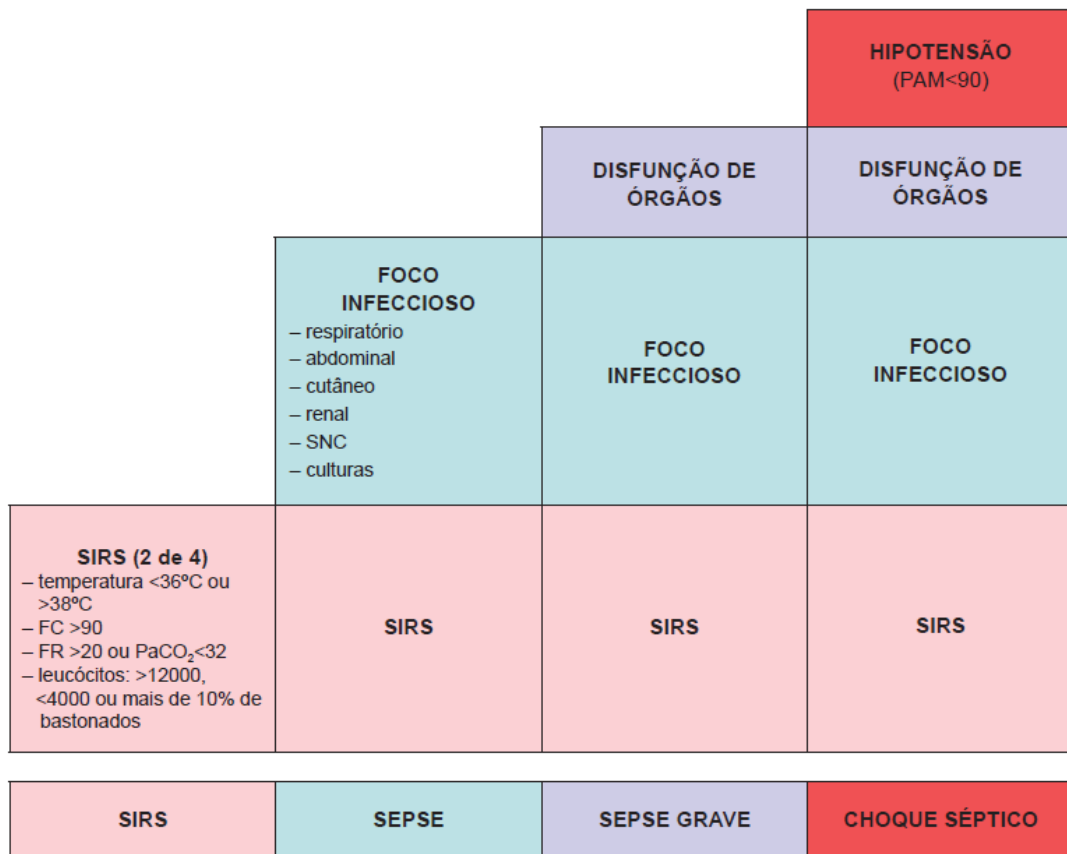
### 2.1. Sepses: definições e aspectos epidemiológicos

Definida geralmente como a resposta inflamatória sistêmica causada por uma infecção (Sriskandan *et al.*, 2008), a sepsis é considerada uma das maiores causas de morte entre pacientes admitidos em Centros de Terapia Intensiva (CTI), sendo uma doença desafiadora para a medicina. Muitas vezes o diagnóstico e o tratamento dessa doença não acontecem em tempo hábil, deixando margem para a ocorrência de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas. Embora os dados sejam escassos, estima-se que no Brasil sejam diagnosticados anualmente cerca de 400.000 novos casos de sepsis grave, com ocupação significativa dos leitos de terapia intensiva (Henkin *et al.*, 2009). Em outros países, a mortalidade total é de aproximadamente 30%, alcançando 40% em idosos, e 50% ou mais em pacientes com a síndrome mais grave, como o choque séptico (Henkin *et al.*, 2009). Contudo, no Brasil a mortalidade total é superior a 50%, estando acima de outros países em desenvolvimento (Teles *et al.*, 2008).

Estudo epidemiológico realizado em 75 CTI de todas as regiões do Brasil demonstrou que em uma população de 3.128 pacientes, 16,7% apresentaram sepsis, com mortalidade geral de 46,6%. Quando discriminados o estágio clínico em sepsis, sepsis grave e choque séptico, a incidência foi 19,6%, 29,6% e 50,8% e a mortalidade foi 16,7%, 34,4% e 65,3%, respectivamente, números considerados altos se comparados com outros países em desenvolvimento (Henkin *et al.*, 2009).

A sepsis resulta da interação entre o agente patogênico e o sistema imune levando ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória acompanhada de manifestações sistêmicas que, em algumas circunstâncias, pode por em risco a vida do indivíduo uma vez que diversos órgãos, especialmente pulmões, fígado, rins e coração, sofrem uma insuficiência, que muitas vezes pode ser irreversível (Kasten *et al.*, 2010). Em 1992, a sepsis foi definida pelo American College of Chest como "Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) associada à infecção" (Bone *et al.*, 2009). Na SIRS o indivíduo apresenta pelo menos duas das seguintes evidências clínicas: temperatura acima de 38°C ou abaixo de 36°C, taquicardia com

frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto, taquipnéia com frequência respiratória acima de 20 movimentos respiratórios por minuto ou hiperventilação com PaCO<sub>2</sub> (pressão parcial de gás carbônico no sangue arterial) abaixo de 32 mmHg, leucocitose acima de 12.000/mm<sup>3</sup>, leucopenia abaixo de 4.000/mm<sup>3</sup>. A concomitância de dois critérios de SIRS com um foco infeccioso confirma o diagnóstico de sepse (Henkin *et al.*, 2009). Na sua forma mais grave, a sepse grave, é caracterizada pela infecção associada a disfunções orgânicas com sinais de hipoperfusão, podendo ainda apresentar hipotensão com falência múltipla dos órgãos, caracterizando assim o choque séptico. (Figura 1).



**Figura 1:** Definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico.

SIRS: Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica; FC: frequência cardíaca; FR: frequência respiratória; SNC: sistema nervoso central; PAM: pressão arterial média.

Fonte: Henkin *et al.*, 2009.

Dentre os processos orgânicos relacionados com a alta taxa de mortalidade da sepse podemos ressaltar as acentuadas alterações hemodinâmicas, a lesão de órgãos secundários, a falência de múltiplos órgãos e o comprometimento da resposta imune celular (Guignant *et al.*, 2011).

## 2.2. A resposta imune na sepse

### 2.2.1. Componentes celulares e mediadores inflamatórios

Um fator determinante para a progressão da sepse é a interação que se estabelece entre a resposta imune e sua capacidade em circunscrever o foco infeccioso (Nduka *et al.*, 2009). O controle da infecção por microrganismos é mediado pela imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata consiste de mecanismos celulares e bioquímicos que são rapidamente acionados durante a infecção. No entanto, quando esta não consegue controlar o processo infeccioso, a imunidade adaptativa passa a desempenhar esse papel (Krishna *et al.*, 2011). Os monócitos e macrófagos desempenham um papel crítico na imunidade inata e adaptativa. Durante uma infecção, os macrófagos podem ser divididos em 2 subtipos, M1 e M2. O primeiro tipo é mais frequente no início do processo inflamatório e produz elevadas quantidades de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ) e espécies reativas de oxigênio. Já os macrófagos M2 estão associados com a fase de resolução da inflamação, produzem citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-13 e IL-10) e tem elevada atividade fagocítica (Chong *et al.*, 2011).

No processo inflamatório inicial da sepse prevalece a resposta imune inata mediada basicamente pelos receptores de reconhecimento padrão, como os receptores semelhantes a toll (TLR), principalmente TLR-2 e TLR-4, que juntamente com a molécula CD14 na superfície dos macrófagos reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Krishna *et al.*, 2011). Peptídeosglicanos de bactérias gram-positivas geralmente são reconhecidos por receptores TLR-2, enquanto lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas são reconhecidos por TLR-4. A ativação dos receptores TLR-2 e TLR-4 desencadeia uma cascata de eventos intracelulares que leva a translocação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B que promove a expressão das citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, da quimiocina IL-8, das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 e também da citocina moduladora IL-10 (Medzhitov *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2011; Lewis *et al.*, 2012).

Na sepse a imunidade mediada por células T tem um papel central na resposta aos microorganismos, tanto diretamente, por mediarem respostas celulares, quanto indiretamente, na regulação da produção de anticorpos. O direcionamento da resposta celular está ainda sobre o controle de quimiocinas e citocinas endógenas produzidas por diversas células do sistema imune no foco infeccioso, criando um ambiente inflamatório versus anti-inflamatório (Miller, *et al.*, 2007).

As citocinas podem ser agrupadas em duas subdivisões de acordo com suas funções pró e anti-inflamatória. Classicamente são descritas como citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , sendo as duas últimas amplamente estudadas em doenças cujo a patologia associada é de natureza inflamatória, como é o caso da sepse. A produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no foco infeccioso também caracteriza a fase inicial da sepse. Estas citocinas desencadeiam respostas sistêmicas que incluem taquicardia, leucocitose, taquipnéia e febre, todas as características fundamentais de uma resposta inflamatória sistêmica. As citocinas TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  ativam a imunidade adaptativa, que amplifica a imunidade inata. (Krishna *et al.*, 2012). Essas citocinas desencadeiam diversos mecanismos dentre eles o aumento na expressão de moléculas de adesão tanto no epitélio quanto nos neutrófilos permitindo que esses últimos migrem até o local da infecção, a estimulação de macrófagos e a apoptose também podem ser proporcionadas por essas citocinas (Beutler, 1995).

O IFN- $\gamma$  é produzido por células NK e células T, e exerce um papel importante na resposta imune contra patógenos intracelulares pela ativação de macrófagos, os quais exercem atividade microbicida pela síntese de óxido nítrico (NO) e pela produção de enzimas lisossomais. Essa citocina também auxilia no desenvolvimento de células Th1 (Mosmann *et al.*, 1989; Gollob, *et al.*, 1996).

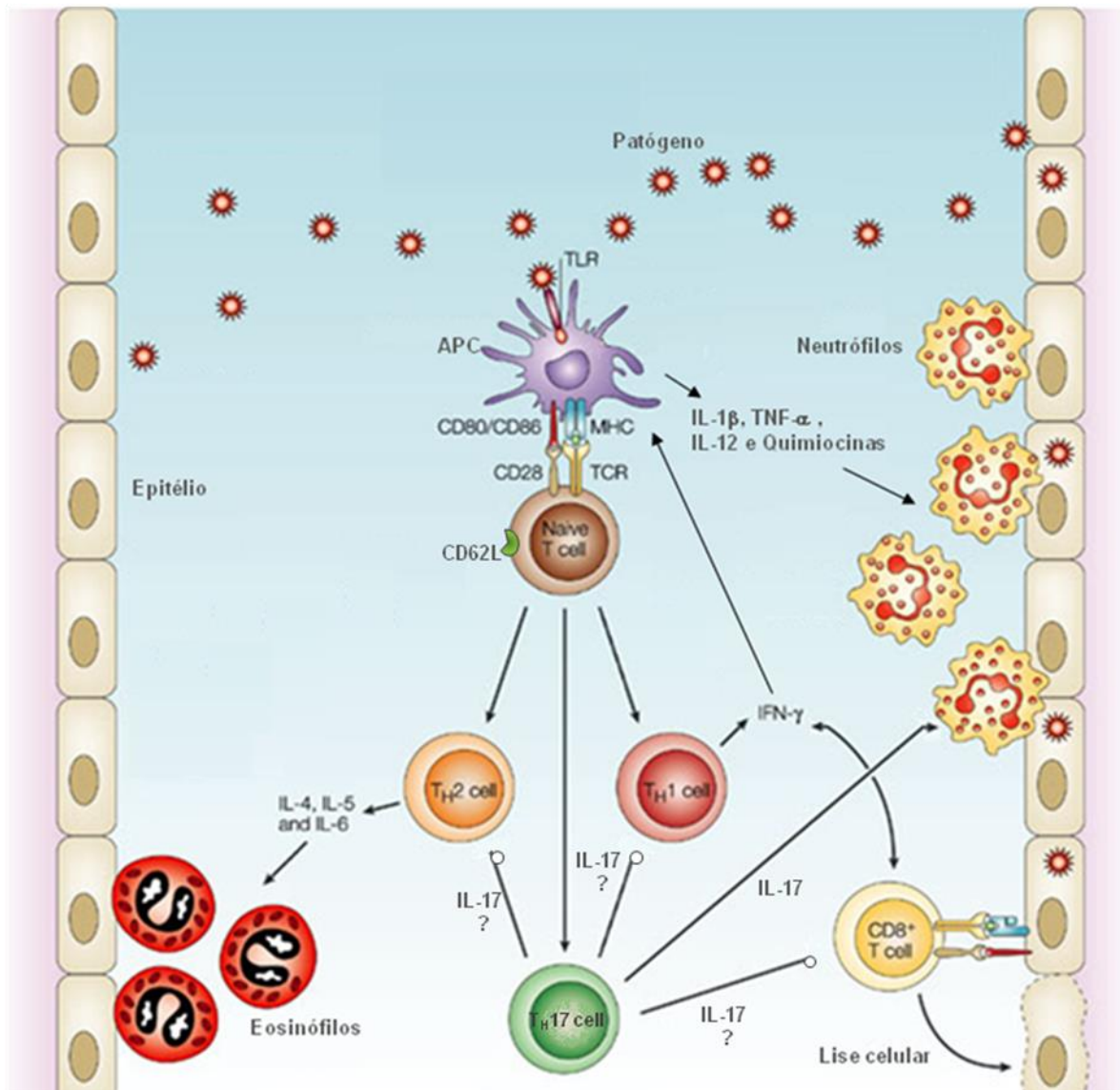
Em paralelo com a produção das citocinas pró-inflamatórias existe a produção de citocinas anti-inflamatórias podendo destacar uma importante citocina moduladora: a IL-10. Classificada como uma citocina pleiotrópica, esta é produzida por macrófagos, monócitos e alguns clones de células T e tem como principal função modular a resposta imune através da inibição da atividade macrófagos e células T ativadas (Muraille & Leo, 1998). A produção de citocinas anti-inflamatórias diante de uma infecção é importante na manutenção da resposta imune evitando a exacerbação da resposta por algum grupo de células (Mocci & Coffman, 1995; Muraille & Leo, 1998).



Outra importante citocina é a IL-17, produzida por células T CD4<sup>+</sup>, distintas das linhagens Th1 e Th2 clássicas (Langrish, et al. 2005). Essa citocina tem se mostrado uma importante indutora da autoimunidade, devido à promoção de inflamação tecidual e mobilização do sistema imune inato. Contudo, em alguns tecidos essa citocina pode desempenhar um papel modulador e protetor (Zhou, et al., 2007; Zhu, et al., 2010), além de estar envolvida em doenças infecciosas (Bettelli, et al., 2007; 2008).

Na fase mais tardia da sepse existe um predomínio da imunidade adaptativa, caracterizada por diferentes fases: reconhecimento de antígeno, ativação dos linfócitos específicos, fase efetora e retorno à homeostase com apoptose de clones efetores e manutenção de células de memória (Nduka et al., 2009).

Após a internalização de antígenos por células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente células dendríticas, os mesmos são processados e apresentados via moléculas de MHC para células T virgens que sofrem modificações permitindo que estas proliferem e se diferenciem em células efetoras capazes de produzir citocinas e substâncias citotóxicas (Figura 2). Essas células efetoras migram para o foco da infecção para exercerem suas funções (Lewis et al., 2012).



**Figura 2:** Resposta imune a patógenos.

APC: Célula apresentadora de antígeno; MHC: Complexo principal de histocompatibilidade; IL: interleucina; TLR: receptor do tipo Toll; TCR: Receptor de células T; TNF: Fator de necrose tumoral; IFN: Interferon; Th: Células T Helper; Treg: Célula T reguladora.

Fonte: Lewis *et al.*, 2012.

A ativação dos linfócitos requer dois sinais distintos. O primeiro é promovido pela ligação do receptor de célula T (TCR) mais o co-receptor CD4 ou CD8, ao MHC II (HLA-DR) ou MHC I, respectivamente, da APC. O segundo sinal é promovido por moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 que tem como receptor o CD28, presente nas células T. A interação entre CD80 e/ou CD86 ao CD28 libera sinais para as células T que induzem a expressão de proteínas anti-apoptóticas, estimulam a produção de fatores de crescimento e outras citocinas como IL-2, promovendo assim a ativação e sobrevivência das células T (Figura 2). Ao se ligar no seu receptor (CD25), a IL-2 induz a uma resposta proliferativa com intuito de expandir o número

de células específicas ao antígeno e consequente controle do patógeno. A molécula CD25, assim como CD69, pode ser utilizada para caracterizar fenotipicamente os linfócitos em seu estado ativado (Ziegler *et al.*, 1994).

Um segundo receptor para as moléculas CD80 e CD86 é o CTLA-4 (CD152), que é estruturalmente homólogo ao CD28. O CTLA-4 não é expresso constitutivamente na superfície da célula, no entanto, é rapidamente regulado positivamente após a ativação das células T. Sua função é inibir a ativação dessas células contrabalanceando os sinais liberados pelo CD28, emitindo assim um sinal inibitório às células T ativadas (Sharpe & Freeman, 2002).

Diante de uma resposta inflamatória exacerbada causada pela sepse a indução da apoptose por células ativadas é uma forma de regulação do sistema imune (Guignant, *et al.*, 2011). A molécula Fas (CD95) conhecida como receptor de morte, é expresso na maioria das células e está relacionado a apoptose através de sua ligação ao FasL (CD95L). O Fas L induzido em células T ativadas pode interagir com Fas na mesma célula ou em células vizinhas contribuindo para resposta das células T auxiliares e a manutenção da autotolerância (Beutler, 1995).

Além do mecanismo descrito anteriormente onde a existência de receptores e seus ligantes levam à morte da célula, existe a apoptose induzida pela exocitose de enzimas, denominadas granzimas, que ativam proteoliticamente as caspases (Suni *et al.*, 2005). As granzimas são enzimas proteases encontradas em vesículas no citoplasma de células NK, CTLs (T CD8<sup>+</sup>) e Treg (Shresta, *et al.*, 1999). As vesículas com esses grânulos expressam em seu interior as moléculas CD107 e CD63, e ao se fundir com a membrana da célula para degranulação esses marcadores ficam expressos na superfície indicando a exocitose (Suni *et al.*, 2005).

A interação do sistema imune com a agente infeccioso é um processo dinâmico no hospedeiro visando à eliminação da infecção e as estratégias microbianas para sobreviver aos mecanismos de defesa. A estimulação do sistema imune por diversos microrganismos gera diferentes respostas onde as imunidades inata e adaptativa procuram eliminar de forma eficiente o patógeno sem comprometer a estrutura e a função dos órgãos e sistemas do hospedeiro. Como em outras doenças, na sepse a resposta imune também acontece em prol do hospedeiro e as vezes pode ser eficiente contra os patógenos, mas devido à hiperresponsividade celular e outros mecanismos ainda pouco descritos, existe um

grau de comprometimento de múltiplos órgãos e sistemas (Sriskandan *et al.*, 2008; Nduka *et al.*, 2009).

### 2.2.2. Teoria da hiperestimulação do sistema imune e da anergia

A fase inicial da resposta contra a infecção pode ser contrabalanceada por uma resposta anti-inflamatória que atua diretamente nas funções imunológicas levando ao estado que muitos autores chamam de “imunoparalisia secundária” (Bandyopadhyay *et al.*, 2007; Sriskandan *et al.*, 2008). Diversos autores demonstraram a relevância da migração dos neutrófilos, do reconhecimento e desenvolvimento da resposta celular pelos macrófagos, células NK e linfócitos para o controle de infecções (Jacob, 1954; Salant *et al.*, 1976; Verdrengh & Tarkowski, 1997). Quando presentes no foco da infecção, neutrófilos, linfócitos e monócitos produzem as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e leucotrieno (LTB<sub>4</sub>) que participam na sinalização e indução das respostas imunes. Porém, quando presentes em níveis aumentados na circulação esses mesmos mediadores juntamente com IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  podem provocar uma hiporesponsividade em diferentes sistemas efetores.

Em relação aos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na falência da migração dos neutrófilos foi demonstrado, até o momento, que esse evento envolve a indução da síntese de óxido nítrico (Benjamim *et al.*, 2000) e a internalização de CXCR2 (Rios-Santos *et al.*, 2007), a ativação de receptores TLR (Alves-Filho *et al.*, 2009), a ativação de receptores de TNF- $\alpha$  (Secher *et al.*, 2009).

Além disso, os neutrófilos e macrófagos apresentam uma redução da migração e do mecanismo efetor, o que favorece a disseminação desses microrganismos, o que pode estar associado com a morte do indivíduo (Alves-Filho *et al.*, 2009).

Esse estado anérgico é caracterizado por uma primeira desativação dos monócitos, diminuindo a sua função fagocitária, a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas relacionadas à apresentação de antígeno (Sriskandan *et al.*, 2008). Além disso, foi também demonstrado que regulação da expressão do receptor de CD14 é um mecanismo efetor precoce que medeia a vida ou a morte dos monócitos, e a perda desse receptor desencadeia um processo de apoptose. (kessel *et al.*, 2009).

Em seguida há uma supressão linfocitária com diminuição na frequência dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e das células NK (Saito *et al.*, 2008). Além da baixa resposta proliferativa, os linfócitos T auxiliares/helper tipo 1 (Th1) se tornam hiporreativos, diminuindo a produção das citocinas inflamatórias como o IFN- $\gamma$ , por exemplo, assumindo um perfil do tipo 2 (Th2) com aumento da produção das citocinas moduladoras IL-4, TGF- $\beta$  e IL-10 (Pandiyani *et al.*, 2008). Notavelmente, Sriskandam e colaboradores (2008) relataram uma diminuição considerável na frequência de células B e T CD4<sup>+</sup> em baços de pacientes com sepse. A redução do número de células B é de particular importância, pois essas células não migram para o local da inflamação e como o baço é o local onde ocorrem as respostas imunológicas a antígenos provenientes do sangue, esta observação pode explicar parcialmente a deficiência na imunidade humoral observada em pacientes com sepse. Brunialti e colaboradores (2012) encontraram expressão aumentada das moléculas Fas (CD95) e FasL (CD95L), associadas a apoptose, em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com sepse, sugerindo que a falta de regulação na expressão dessas moléculas apoptóticas pode ser a base da fisiopatologia da SIRS.

### 2.2.3. Células T e Sepse

O papel dos linfócitos na sepse ainda é incerto, uma vez que acredita-se que os componentes pró-inflamatórios agem juntamente com os componentes anti-inflamatórios levando ao fenômeno conhecido por “paralisia imunológica” ou “reprogramação de leucócitos” que caracteriza-se por uma anergia dos linfócitos, apoptose e diminuição da capacidade de reconhecer antígenos (Hein *et al.*, 2010). Um grande número de células T ativadas é capaz de reduzir a infecção por um microrganismo, porém essas mesmas células podem levar a um dano tecidual (Nduka *et al.*, 2009). Por outro lado, um baixo número de células T ativadas pode levar a uma resposta ineficaz contra esses microrganismos (Kasten *et al.*, 2010).

Os linfócitos T podem ser divididos em dois subconjuntos principais. O primeiro são as células T CD4<sup>+</sup>, conhecidos também por células T auxiliares, que são basicamente responsáveis pelo reconhecimento de peptídeos antigênicos apresentados via MHC classe II pelas APCs. O segundo são as células T CD8<sup>+</sup>, ou

células T citotóxicas, estas também reconhecem peptídeos antigênicos no contexto de moléculas do MHC de classe I também expressos pelas APCs (Kasten *et al.*, 2010).

As células TCD4+ e CD8+ possuem uma variedade de funções que são moduladas basicamente por antígenos, moléculas co-estimuladoras e citocinas que estão presentes no microambiente onde se encontram (Miller, *et al.*, 2007). As respostas das células T podem ser precoces, intermediárias e tardias. As funções incluem o fluxo de cálcio e a fosforilação das principais proteínas de sinalização em resíduos de serina, treonina ou tirosina, as Intermediárias incluem citotoxicidade e produção de citocinas, e as tardias incluem proliferação, apoptose e indução a ativação (Hotchkiss *et al.*, 2006).

No processo de infecção da sepse, as APCs que entraram em contato com o antígeno, interagem com as células T CD4+ fazendo com que estas proliferem e ganhem parte da sua função efetora, seja pela expressão de receptores que regulam outras células ou pela secreção de citocinas. Estas citocinas desempenham um papel fundamental na determinação da diferenciação das células T CD4+ (Miller *et al.*, 2007). Embora a atuação das células T CD8+ seja pouca conhecida na sepse, alguns estudos mostraram o aumento da apoptose e correlacionaram esse fenômeno à função citotóxica das células T CD8+ (Hotchkiss *et al.*, 2006), que através da produção de enzimas proteolíticas podem lisar células infectadas (Tinsley *et al.*, 2000).

As células T naive, ou virgens, são identificadas pela elevada expressão de CD62L (selectina L), essas células T são significativamente diminuídas dentro das primeiras 24 h após a instalação do quadro de sepse devido à sua diferenciação em células efetoras com conseqüente diminuição da expressão de CD62L. (Rosenberg *et al.*, 2006). Alguns autores atribuem a baixa expressão de CD62L a memória efetora e demonstram em camundongos que estas células são poupadas da apoptose na sepse (Sallusto *et al.*, 2004; Mc Dunn *et al.*, 2006).

Como referido a resposta das células T ativadas durante a sepse pode ajudar no desaparecimento da infecção, mas ao custo do aumento do dano tecidual. Por outro lado, algumas células T ativadas podem proporcionar o crescimento bacteriano através da produção de citocinas anti-inflamatórias que atuam na resposta imune contra esses microrganismos (Bandyopadhyay *et al.*, 2007). Alguns estudos demonstraram que uma redução de determinadas subpopulações de células T

ativadas diminuíram a mortalidade em animais com sepse, sugerindo que a hiperresponsividade celular muitas vezes pode contribuir para piorar o quadro de infecção levando o indivíduo a morte (Martignoni *et al.*, 2008).

As células CD4<sup>+</sup> efectoras são importantes produtoras de IFN- $\gamma$  durante as primeiras 6 horas após a infecção, sendo essa citocina uma das principais indutoras da resposta inflamatória, atuando em células encarregadas de eliminar o foco infeccioso (Enoh *et al.*, 2008). Existem controvérsias quanto ao benefício dessa citocina após um certo tempo de infecção, ao passo que a resposta inflamatória exarcebada contribui para lesão tecidual. Portanto a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, torna-se necessária no intuito de evitar maiores danos decorrentes da resposta inflamatória (Voll *et al.*, 1997).

Um outro subtipo de células T importantes nos processos infecciosos são as Th17 e sua elucidação tem fornecido importantes contribuições sobre a interação das células T e a resposta imune inata nos processos que vão desde a autoimunidade a modulação da resposta imune (Aggarwal *et al.*, 2003). As células CD4<sup>+</sup> na presença de IL-6, IL-21 e TGF- $\beta$  podem se diferenciar fenotipicamente em Th17 (Mangan *et al.*, 2006; Bettelli *et al.*, 2008). Por outro lado o TNF- $\alpha$  produzido por monócitos pode estimular a produção de IL-23 inibindo a produção de IL-6 e TGF- $\beta$  interferindo na diferenciação das Th17 (Verreck *et al.*, 2004). No entanto, uma vez diferenciadas, as células Th17 são capazes de produzir uma grande variedade de citocinas, incluindo IL-17, IL-21, IL-22 e IFN- $\gamma$  (Roark *et al.*, 2008; Lexberg *et al.*, 2008). Os efeitos dessas citocinas envolvem desde recrutamento de células para focos de infecção a imunomodulação (Zhou *et al.*, 2007). A população efectora Th17 envolve uma complexa via de diferenciação e produção de citocinas que tem um papel central na mediação da resposta imune à infecção na sepse. Alguns estudos demonstraram uma plasticidade das células Th17 que as distinguem das subpopulações Th1 e Th2 (Lee *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010). Foi demonstrado que células Th17 tem capacidade de produzir citocinas diferentes dependendo do microambiente (Lexberg *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009;). Diante disso, estudos com animais com sepse demonstraram que a produção de IL-17 pode desempenhar um papel protetor (Flierl *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2009).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CTL) e células NK atuam principalmente contra patógenos intracelulares e tumores, secretando citocinas, como IFN- $\gamma$ , e grânulos

citotóxicos, como Granzimas A e B, que desencadeiam a apoptose. O grânulo mais abundante é a granzima B, uma serina protease, que induz a morte celular através da clivagem de caspases. Já a granzima A, uma triptase, é responsável pela ativação de caspase-independentes induzindo à morte celular, morfológicamente idêntica a apoptose (Chowdhry *et al.*, 2008; Beresford *et al.*, 1999; Shresta *et al.*, 1999).

Muito do conhecimento atual sobre as respostas de células T CD8+ para as infecções de um modo geral origina a partir de sistemas de modelos experimentais (Barber *et al.*, 2006). Nestes modelos, a infecção provoca expansão rápida de células T CD8+ efetoras e a ativação antígeno-específicas destas. A expansão dessas células efetoras são altamente susceptíveis à apoptose, desta forma a resposta logo elimina o patógeno através da lise da célula lesada (Barber *et al.*, 2006). Um estudo analisou as células T CD8+ em humanos acometidos por infecções crônicas (Murali-Krishna *et al.*, 1998) demonstrando que somente a apresentação do antígeno não é o suficiente para provocar a atividade destas células sendo necessário, além do reconhecimento antigênico, haver co-estimulação e atuação de citocinas pró-inflamatória, principalmente IFN- $\gamma$  (Cousens *et al.*, 1995). Na ausência de co-ativação tem-se uma supressão da resposta das células T CD8+, fenômeno importante para a manutenção da tolerância das células T periféricas (Krishna, *et al.*, 1996).

Diante do papel de cada subpopulação de linfócitos T na sepse, é notável que mais estudos são necessários para determinar o impacto das funções e interações dessas células no desenvolvimento da resposta imune bem como sua contribuição no prognóstico da sepse.



### **3.0. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o perfil fenotípico, dos monócitos e das células T CD4 e CD8 em pacientes hospitalizados com sepse.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Caracterizar em pacientes com sepse e indivíduos saudáveis:

- O perfil fenotípico dos monócitos CD14<sup>+</sup> através da expressão de moléculas de superfície CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), HLA-DR (MHCII), TLR2 e TLR4, bem como pela determinação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ ;
- O perfil fenotípico dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> através da expressão das moléculas de ativação CD69 e CD62L e das citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17;
- O perfil fenotípico dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> através da expressão das moléculas intracitoplasmáticas Granzimas A e B, e da citocina IFN- $\gamma$ .

## 4.0. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Caracterização da população estudada

Sangue periférico foi coletado de 15 indivíduos, aqui neste estudo denominados pacientes (S), com idade entre 25 e 57 anos de ambos os sexos, admitidos no Centro de Terapia Intensiva (CTI) do Hospital Risoleta Tolentino Neves (HRTN), que apresentavam diagnóstico clínico de sepse, bem como indivíduos que durante a internação no CTI por outras patologias desenvolveram este quadro clínico. Para seleção dos pacientes, foram realizados exames laboratoriais e clínicos utilizando os critérios de definição de sepse do consenso de 1992 com a colocação de foco infeccioso definido ou cultura positiva. Além disso os pacientes apresentavam um tempo de diagnóstico de sepse inferior a 24 horas e não estavam sob o uso de imunossupressores e antiinflamatórios esteróides e não esteróides. Estes também não apresentavam neoplasias, imunodeficiência primária ou secundária, insuficiência renal crônica com terapia de substituição da função renal e insuficiência hepática classificada como *Child-Pugh* (fator preditivo de sobrevida de doenças hepáticas) A, B ou C.

Para o controle foi coletado sangue periférico de 7 indivíduos, aqui neste estudo denominados saudáveis (NS), com idade entre 20 e 47 anos de ambos os sexos, que não apresentavam, aparentemente, enfermidades de qualquer natureza que poderia influenciar a resposta imunológica, ainda que transitórias, como resfriados ou rinites, e que não estivessem sob o uso de imunossupressores, antiinflamatórios e hormônios a pelo menos 30 dias. Vale ressaltar que tais parâmetros foram reforçados por exames laboratoriais.

Todos os procedimentos (coleta de sangue, preenchimento de TCLE, e outros) envolvendo indivíduos humanos foram realizados sob a coordenação e supervisão do Prof. Dr. Fernando Antônio Botoni e Dr. Argenil José Assis de Oliveira, do Hospital Risoleta Tolentino Neves (HRTN), sob aprovação do Comitê de Ética nº 03182712.2.0000.5149.

#### **4.2. Análise *ex vivo* do fenótipo celular dos linfócitos T e monócitos do sangue periférico**

O sangue periférico dos indivíduos foi recolhido em tubos a vácuo contendo o anticoagulante heparina sódica (Vacuntainer®). Amostras de sangue foram transferidas para tubos Falcon®, lavadas com PBS-W (PBS pH 7.4, contendo 0.5% BSA e 0.1% de azida sódica) e centrifugadas a 400g, por 10 minutos à 18°C. Posteriormente, as amostras foram lisadas e fixadas em 2mL de solução de lise comercial (FLS - BD, E.U.A) por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1mL de PBS-W e centrifugadas a 400g, por 10 minutos à 18°C. O conteúdo foi emborcado e o precipitado celular ressuscitado em PBS 1X na concentração de  $2 \times 10^5$  células por mL. Em seguida, as células foram transferidas para placa de 96 poços com fundo em “U” onde, então, foram incubadas na presença de anticorpos monoclonais (mAb) de superfície conjugados com isotiocianato de Fluoresceína (FITC), Ficoeritrina (PE), Cychrome (Cy), Cloreto de Peridina Clorofila (PerCP) ou Aloficocianina (APC) por 20 minutos a 4° C (Tabelas 1 e 2). As células foram lavadas com 200uL de PBS-W e centrifugadas a 400g, por 10 minutos à 18°C. O conteúdo foi emborcado e 200ul de solução fixadora - MFF adicionada aos poços.

Para a detecção de moléculas intracitoplasmáticas foram acrescentados aos poços 200uL de PBS-P (PBS, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) por 30 minutos à temperatura ambiente. Seguidos da adição de 20uL de anticorpos anti-moléculas intracitoplasmáticas marcadas com PE (Tabelas 1 e 2), diluídos 1:20 em PBS-P aos respectivos poços, e posteriormente incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 200uL de PBS-P e em seguida, com 200uL de PBS-W. No final, foram adicionados 200uL de solução fixadora MFF. As amostras contendo a suspensão celular foram utilizadas para aquisição de dados em citômetro de fluxo (FAScanto II - BD, E.U.A). Foram coletados em torno de 50.000 eventos totais.

**Tabela 1:** Relação dos anticorpos utilizados para caracterização das subpopulações de células T.

<b>Nome</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Clone</b>	<b>uL/Tubo</b>
<b>CD4 - PerCP</b>	BDPharmingen™	L200	2
<b>CD8 - FITC</b>	BDPharmingen™	RPA-T8	2
<b>CD62L - APC</b>	BDPharmingen™	DREG-56	2
<b>CD69 - PE</b>	BDPharmingen™	FN50	2
<b>IL-10 - PE</b>	BDPharmingen™	JES3-19F1	3
<b>IL-17 - PE</b>	BDPharmingen™	TC11-18H10	3
<b>IFN-<math>\gamma</math> - PE</b>	BDPharmingen™	4S.B3	3
<b>Granzima B - PE</b>	BDPharmingen™	GB11	3
<b>Granzima A - PE</b>	BDPharmingen™	MOPC-21	3

**Tabela 2:** Relação dos anticorpos utilizados para caracterização dos monócitos

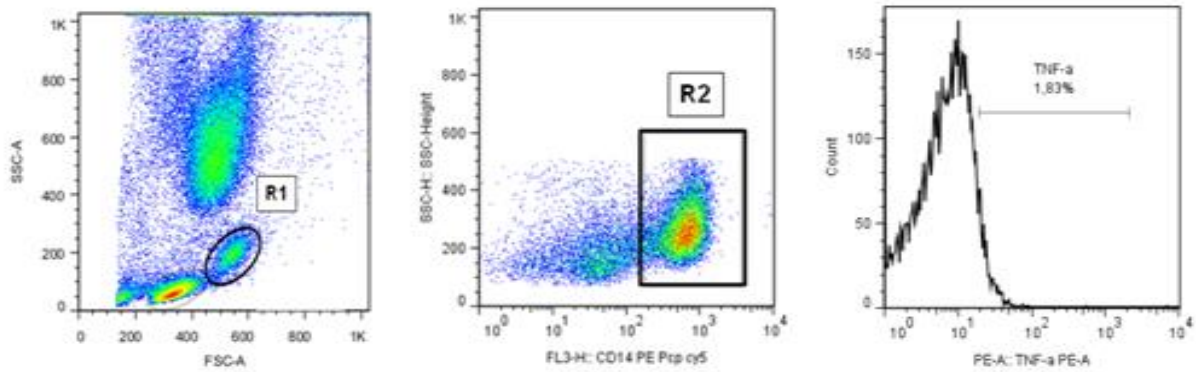
<b>Nome</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Clone</b>	<b>uL/Tubo</b>
<b>CD14 - PerCP</b>	BDPharmingen™	M5E2	2
<b>CD80 - PE</b>	BDPharmingen™	L307.4	2
<b>CD86 - PE</b>	BDPharmingen™	2331(FUN-1)	2
<b>CD282 - APC</b>	BDPharmingen™	MIH4	2
<b>CD284 - PE Cy7</b>	BDPharmingen™	MIH1	2
<b>HLA-DR - APC</b>	BDPharmingen™	G46-2.6	2
<b>IL-1<math>\beta</math> - PE</b>	BDPharmingen™	364-3B3-14	3
<b>IL-10 - FITC</b>	BDPharmingen™	C11.5	3
<b>TNF-<math>\alpha</math> - PE</b>	BDPharmingen™	Mab11	3

### 4.3. Estratégias de análise das populações celulares

O citômetro de fluxo (FACSCANTO II - BD, E.U.A) utilizado neste trabalho é equipado com três lasers, laser azul (488nm), laser vermelho (633nm) e laser violeta (605nm) que permitem a avaliação básica de 10 parâmetros: tamanho (FSC) e granulidade (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2), fluorescência do tipo 3 (FL3), fluorescência do tipo 4 (FL4), fluorescência do tipo 5 (FL5), fluorescência do tipo 6 (FL6), fluorescência do tipo 7 (FL7), fluorescência do

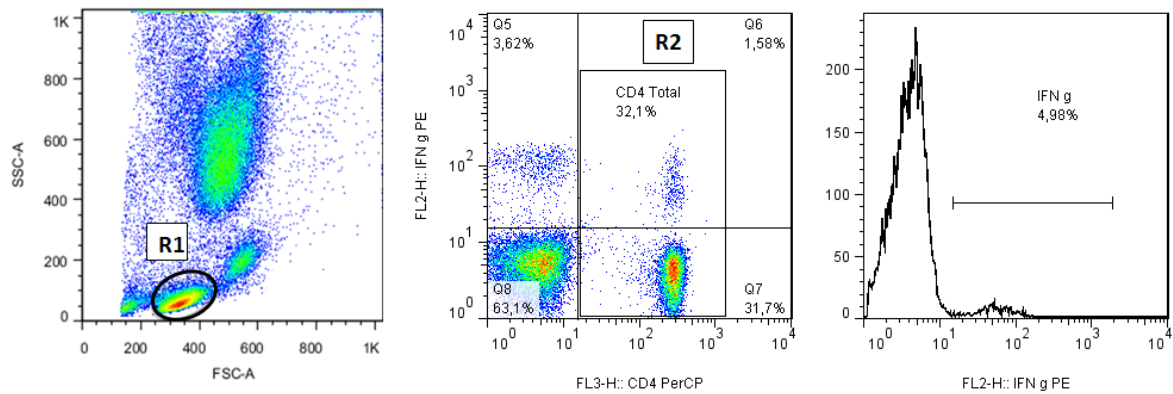
tipo 8 (FL8). FL1, FL2, FL3, FL4, FL5, FL6, FL7, FL8 correspondem respectivamente a sinais luminosos emitidos pela excitação de FITC, PE, PERCP (PERCP-Cy5.5), PE-Cy7, APC, APC-Cy7, Pacific blue (V450) e AmCyan. A identificação de populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e subpopulações, foram feitas através de um sistema de computador e do software "FlowJo7.6.5™ Tree Star (Ashland, OR, USA). Foram coletados 70.000 eventos para análise de todas as amostras. Esse software fornece um perfil de células de acordo com o tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Utilizando este perfil, seleciona-se as células que se deseja analisar (linfócitos ou monócitos), de acordo com o tipo de experimento. A análise leva em consideração aquela população de células selecionadas, avaliando o perfil fenotípico por emissão de fluoresceína. As Figura 3 e 4 ilustram a distribuição da população linfocitária e a população de monócitos respectivamente (R1), após os ajustes de ganhos de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Após a seleção da janela de interesse, analisa-se a intensidade de fluorescência apresentada pelas células presentes nesta janela, utilizando-se de gráficos de fluorescência.

Para garantirmos uma seleção segura para a população de monócitos foi construído um gráfico de fluorescência 1 para o marcador CD14 em função da granulosidade (Figura 3). A população analisada apresenta granulosidade intermediária e fortemente positiva para este fenótipo celular, sendo delimitada por um marcador (R2). Através desta abordagem podia-se obter uma população homogênea e bem definida, não só facilitando a seleção da população de interesse, como também garantindo a sua identificação de forma segura e padronizada. Após a seleção da janela de interesse (R2), analisava-se a intensidade de fluorescência apresentada pelas células presentes nesta janela, utilizando-se gráficos de fluorescência 1 (FL1) versus fluorescência 2 (FL2) (Figura 3) ou gráficos de histograma emitida pelos marcadores: TLR2, TLR4, CD80, CD86, HLA-DR, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) (Figura 3).



**Figura 3:** Gráfico representativo da estratégia de análise utilizada para seleção de monócitos CD14<sup>+</sup> expressando a citocina TNF- $\alpha$  em pacientes com sepse. Gráficos do tipo dot-plots demonstram a população de monócitos selecionados (Região R1) de acordo com os parâmetros morfológicos tamanho e granulosidade (FSCxSSC). A partir de R1 construiu-se gráficos de SSCxCD14, onde selecionou-se os monócitos CD14<sup>+</sup> (R2). A partir dessa segunda região, a expressão do segundo marcador (exemplificado pelo TNF- $\alpha$ ), foi realizada em gráficos de histogramas.

A análise de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foi feita segundo protocolo proposto por Baecher-Allan e colaboradores (2001). Primeiramente foi selecionada a população de linfócitos totais, denominada R1, baseada em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (Figura 4). Em seguida, gráficos de FL1 (CD4 ou CD8) versus FL2 (IFN- $\gamma$  por exemplo) foram construídos para identificar a população CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup> total (R2) (Figura 4). Em seguida, os histogramas contendo as células CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup> foram utilizados para quantificar os percentuais dos seguintes marcadores, por nós definidos: CD62L e IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$ , e Granzima A e B tomando como padrão o controle isotipo para evitar reações inespecíficas.



**Figura 4:** Gráfico representativo da estratégia de análise utilizada para seleção de linfócitos CD4<sup>+</sup> expressando a citocina IFN- $\gamma$  em pacientes com sepse. Dot-plots demonstram a população de linfócitos totais (R1) de acordo com os parâmetros morfológicos tamanho e granulosidade (FSCxSSC). Após a seleção de R1 construiu-se os gráficos de CD4xmarcador de interesse, onde selecionou-se CD4 total. A partir da região R2, a expressão do segundo marcador (exemplificado pela IFN- $\gamma$ ), foi realizada em gráficos de histogramas.

#### 4.4. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software JUMP 5.0.1® e GraphPad Prism 5.00® (San Diego, EUA). Todos os resultados desse estudo foram submetidos aos testes de outliers e normalidade (teste de Shapiro-Wilk). Aos resultados desse estudo que assumiram distribuição não-paramétrica, foi aplicado o teste de Mann-Witney. Para análise de variáveis não categóricas (variáveis não pareadas), realizou-se o teste t de student. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$

## 5.0. RESULTADOS

### 5.1. Perfil Clínico dos Pacientes com Sepsis

O perfil clínico do paciente com sepsis é bem caracterizado por diversos sinais e sintomas que são confirmados por exames clínicos e laboratoriais. Um dos dados laboratoriais observados no curso da doença é alteração na taxa de leucócitos que pode estar aumentada ( $>12000/\text{mm}^3$ ) ou diminuída ( $<4000/\text{mm}^3$ ). A análise dos resultados mostrou um aumento significativo na taxa de leucócitos dos pacientes com sepsis comparada com indivíduos saudáveis (Tabela 3). Apesar disso, observa-se uma diminuição no número de linfócitos circulantes nos pacientes com sepsis (Tabela 3).

**Tabela 3:** Dados clínicos dos pacientes com sepsis

Parâmetro	Pacientes com Sepsis (n=15)	Indivíduos saudáveis (n=7)
Idade	$50 \pm 9$	$35 \pm 3$
APACHE II	$26 \pm 5$	NA
Taxa Leucócitos ( $/\text{mm}^3$ )	$18876 \pm 4123$ (*)	$5696 \pm 462$ (*)
Taxa Linfócitos ( $/\text{mm}^3$ )	$1685 \pm 403$	$1944 \pm 201$
Óbitos (n)	3	0
Uso de antibiótico (n)	14	0
Ventilação (n)	11	NA
Uso de corticóides (n)	0	0

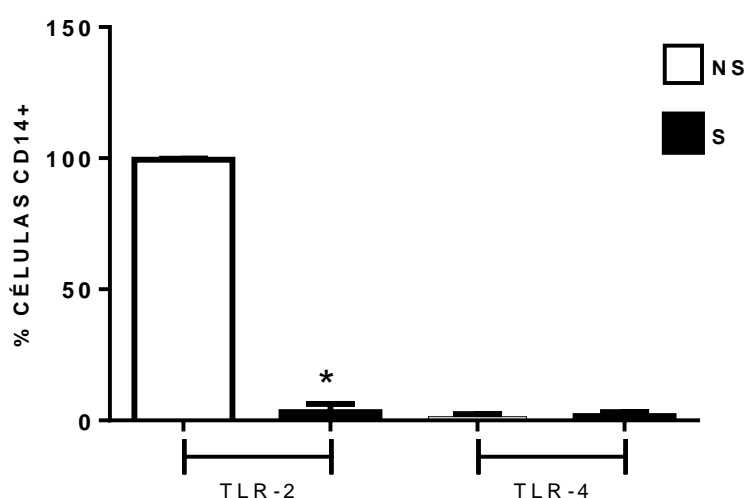
n, número de indivíduos; APACHE II, Índice de gravidade de pacientes em unidade de terapia intensiva; NA, não se aplica; (\*), dados estatisticamente significativos.



## 5.2. Avaliação fenotípica de monócitos CD14<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes com Seps

Os monócitos, assim como neutrófilos, macrófagos e células NK (*Natural Killer*), são células da imunidade inata efetoras contra infecções por microrganismos. A infecção por microrganismos ativam essas células levando a produção moléculas sinalizadoras que caem na circulação desencadeando diversos mecanismos efetores que vão diminuir a infecção (La Rosa *et al.*, 2012).

Inicialmente, na sepsse a resposta é mediada basicamente pelos receptores semelhantes a toll (TRL), principalmente TLR2 e TLR4 que são encontrados também na superfície dos monócitos CD14<sup>+</sup> e são responsivos a microrganismos o que podem levar a uma maior produção de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IFN- $\gamma$ ) e moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) (Krishna *et al.*, 2011). Como estes receptores possuem uma grande importância nas infecções de um modo geral, avaliou-se a expressão dos mesmos em monócitos presentes no sangue periférico dos pacientes com sepsse (S) e nos indivíduos saudáveis (NS). A análise dos dados mostrou uma diminuição na expressão de TLR2 nos monócitos CD14<sup>+</sup> dos indivíduos do grupo S em relação ao grupo NS. (Figura 5). Não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão de TLR4 em monócitos CD14<sup>+</sup> entre os grupos S e NS (Figura 5).



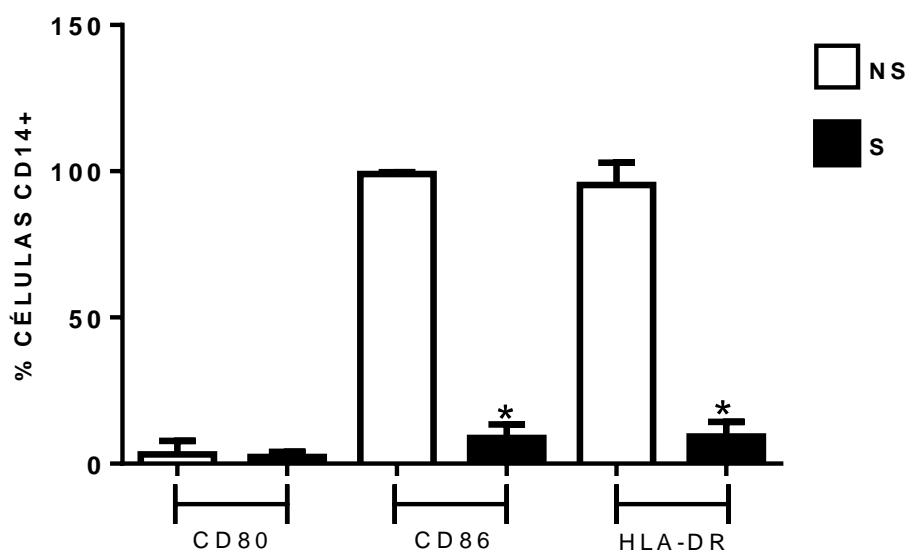
**Figura 5:** Análise da expressão de moléculas de reconhecimento de antígenos por monócitos CD14<sup>+</sup> do sangue periférico. Monócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NS (n=7), e S (n=15) foram avaliados no contexto ex vivo como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana

do percentual de células positivas para os marcadores de superfície celular TLR2 e TLR4 em monócitos CD14<sup>+</sup>.

(\*) representa diferença significativa entre os grupos NS e S com  $p < 0,05$ .

CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) são moléculas co-estimuladoras na ativação de células T, se ligam aos receptores CD28 ou CTLA-4 (CD152) podendo desencadear a produção de citocinas, a ativação de linfócitos T, a indução de apoptose, entre outras funções fundamentais para uma resposta imunoefetora das células mediante as infecções (Ward, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Dessa forma comparou-se a expressão dessas moléculas co-estimuladoras em monócitos do sangue periférico de indivíduos do grupo S e NS. A análise dos dados mostrou uma diminuição significativa no percentual de células CD14<sup>+</sup> co-expressando CD86 nos pacientes S em relação ao grupo NS. Não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão da molécula CD80 em monócitos CD14<sup>+</sup> entre os grupos estudados (Figura 6).

Afim de observar alguma alteração no que tange ao mecanismo de apresentação de antígenos, o marcador HLA-DR também foi analisado mostrando também uma diminuição significativa na expressão em monócitos CD14<sup>+</sup> em pacientes com sepse (S) com relação aos indivíduos saudáveis (NS). (Figura 6).



**Figura 6:** Análise da expressão de moléculas co-estimuladoras monócitos CD14<sup>+</sup> do sangue periférico.

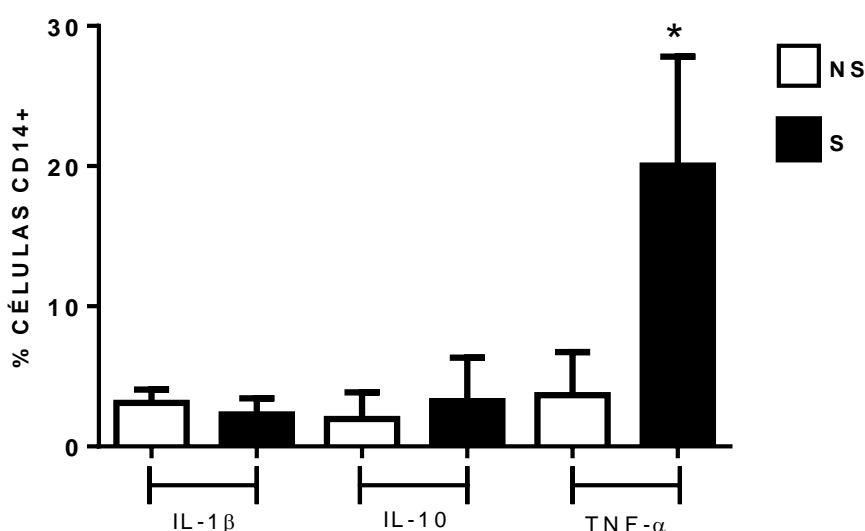
Monócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NS (n=7), e S (n=15) foram avaliados no contexto *ex vivo* como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para os marcadores de superfície celular CD80, CD86 e HLA-DR em monócitos CD14<sup>+</sup>.

(\*) representa diferença significativa entre os grupos NS e S com  $p < 0,05$ .

Os monócitos são produtores de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e também produzem o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  que ativam a imunidade adquirida que é responsável pela amplificação da imunidade inata (Krishna *et al.*, 2011).

A análise dos dados mostrou um aumento significativo no percentual de células CD14<sup>+</sup> co-expressando TNF- $\alpha$  nos pacientes S em relação ao grupo NS. (Figura 7).

Não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-10 em monócitos CD14<sup>+</sup> entre os grupos estudados (Figura 7).



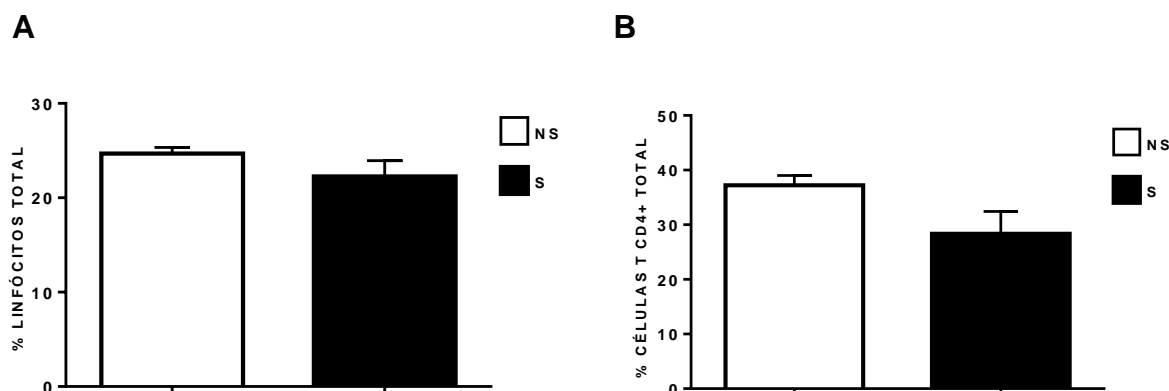
**Figura 7:** Análise da expressão de citocinas por monócitos CD14<sup>+</sup> do sangue periférico. Monócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NS (n=7), e S (n=15) foram avaliados no contexto *ex vivo* como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para as citocinas intracelulares IL-10, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em monócitos CD14<sup>+</sup>.

(\*) representa diferença significativa entre os grupos NS e S com  $p < 0,05$ .

### 5.3. Perfil fenotípico dos linfócitos T total e CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes com sepse

As análises fenotípicas dos linfócitos T totais e CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos saudáveis (NS) e de pacientes com sepse (S) foram realizadas na população linfocitária. A seleção dessas populações está demonstrada na Figura 4 (Material e Métodos). A análise da frequência da população das células T totais e

CD4<sup>+</sup> mostraram que estas não apresentaram diferenças significativas quando comparadas entre os grupos NS e S (Figura 8).



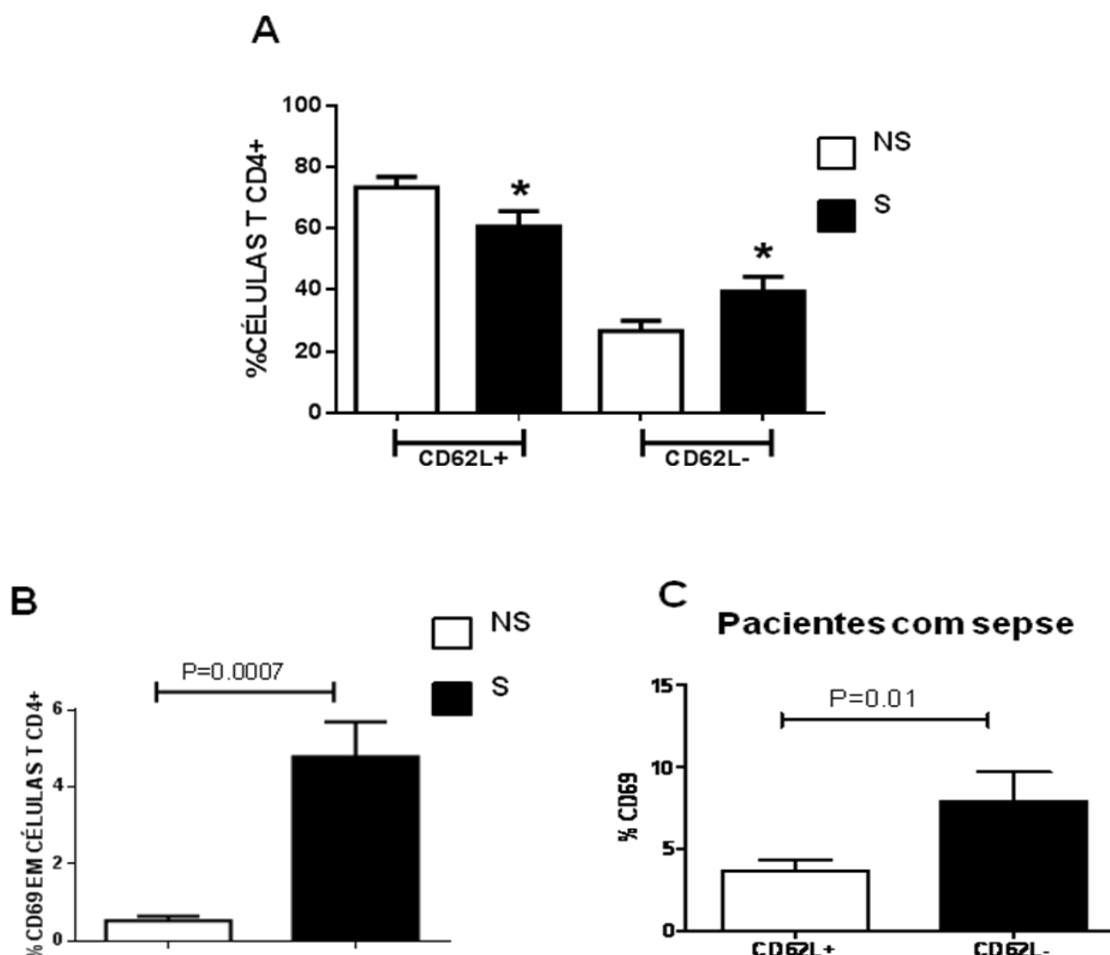
**Figura 8:** Análise da frequência de linfócitos T totais e CD4<sup>+</sup> total do sangue periférico. Linfócitos totais (A) e CD4<sup>+</sup> total (B) presentes no sangue periférico de indivíduos NS (n=7), e S (n=15) foram avaliados no contexto ex vivo como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador de superfície celular CD4<sup>+</sup>.

Com o objetivo de caracterizar o perfil fenotípico das células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico dos indivíduos saudáveis (NS) e de pacientes com sepse (S) foram analisadas as seguintes moléculas de superfície: CD69 e CD62L. A presença e/ou a perda dessas moléculas na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> é indicativo do estado de ativação celular.

A molécula CD62L é uma selectina relacionada a migração de linfócitos T virgens e a perda de CD62L indica células ativadas migrando para o foco inflamatório. Foi realizada uma análise comparativa da frequência de células T CD4<sup>+</sup> que expressam CD62L de pacientes com sepse e indivíduos saudáveis. A frequência média de CD62L<sup>+</sup> em células T CD4<sup>+</sup> foi menor no grupo S, em comparação com o NS ( $p = 0,04$ ). Além disso, a frequência de CD62L em células T CD4<sup>+</sup> foi maior nos pacientes com sepse que indivíduos saudáveis. (Figuras 9 A).

Para determinar o estado de ativação em células T CD4<sup>+</sup> de pacientes com sepse, foi avaliada a expressão de ativação precoce (CD69) em células T CD4<sup>+</sup> no total e dentro de células T CD4<sup>+</sup> que expressam CD62L<sup>+</sup> e CD62L<sup>-</sup>. Pacientes com sepse apresentaram um perfil mais elevado de ativação precoce ex vivo em células T CD4<sup>+</sup> analisados pela expressão de CD69 (Figura 9 B), quando comparado com indivíduos saudáveis. Além disso, células T CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> de pacientes com sepse apresentaram uma maior expressão de CD69 (Figura 9 C). O aumento na frequência

de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> expressando o marcador de ativação em comparação com células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> sugere que esta resposta pode estar relacionada com as células T CD4<sup>+</sup> efetoras ou células T CD4<sup>+</sup> efetoras de memória, uma vez que ambas as subpopulações sejam negativas para CD62L (Sallusto *et al.*, 2004).



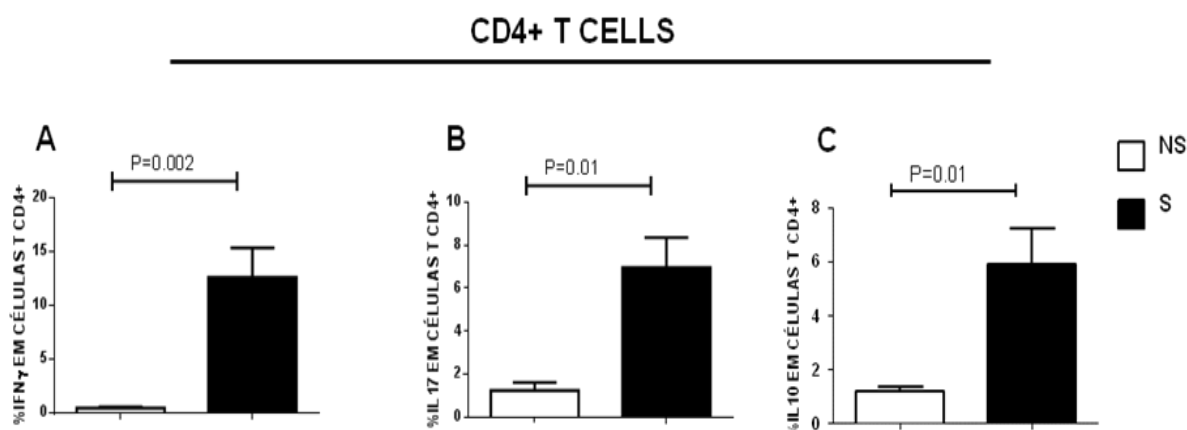
**Figura 9:** Análise da expressão de moléculas de ativação por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico. Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NS (n=7), e S (n=15) foram avaliados no contexto ex vivo como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para os marcadores de superfície celular CD69 e CD62L (A e B) e negativas para CD62L (A) em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Percentual de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (C) presentes no sangue periférico de pacientes com sepse foram avaliados quanto ao percentual de células positivas e negativas para o marcador CD62L.

(\*) representa diferença significativa entre os grupos NS e S com p<0,05.

As células T CD4<sup>+</sup> são uma das principais fontes produtoras de IFN- $\gamma$ , uma citocina pró-inflamatória ativadora de macrófagos e indutora de resposta do tipo Th1 (Gollob, et al., 1996). A IL-10, uma citocina moduladora, pode desencadear um efeito anti-inflamatório, podem também ser secretadas por essa subpopulação de linfócitos. Outra citocina importante produzida por células T CD4<sup>+</sup> é a IL-17 (Langrish

et al. 2005), que embora tenha ser uma importante indutora da auto-imunidade, pode desempenhar um papel imunomodulador (Zenewicz, et al. 2007).

A presença de IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10 em células T CD4<sup>+</sup> foram avaliadas tanto em pacientes com sepse quanto indivíduos saudáveis. Todas as citocinas avaliadas apresentaram uma expressão aumentada nas células T CD4<sup>+</sup> de pacientes com sepse em comparação com indivíduos saudáveis (Figuras 10 A, B e C). No entanto, IFN- $\gamma$  foi significativamente mais expresso em pacientes com sepse ( $12,6 \pm 8,1$ ) do que em indivíduos saudáveis ( $0,45 \pm 0,3$ ) (Figura 10 A). Estes resultados sugerem uma possível mudança no perfil de produção de citocinas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante um quadro de sepse.



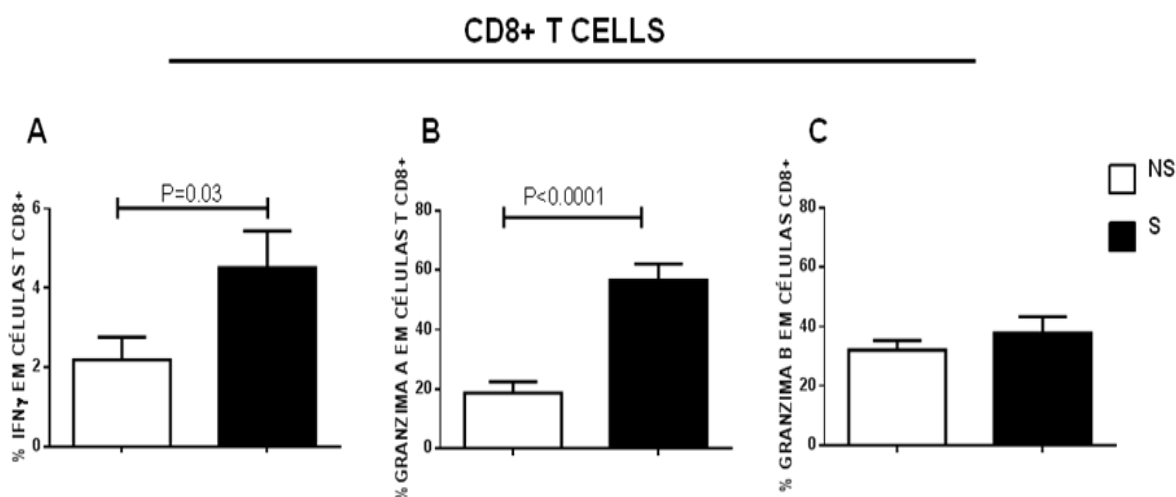
**Figura 10:** Análise da expressão de citocinas por linfócitos CD4<sup>+</sup> do sangue periférico. Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NS (n=7), e S (n=15) foram avaliados no contexto ex vivo como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para as citocinas intracelulares IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10 em linfócitos CD4<sup>+</sup>.

#### 5.4. Perfil fenotípico dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes com sepse

Assim como as células T CD4<sup>+</sup>, as célula T CD8<sup>+</sup> também são produtoras de IFN- $\gamma$  que pode aumentar a atividade citotóxica de células NK (Antikson et al., 1998). A expressão de IFN- $\gamma$  em células T CD8<sup>+</sup> teve um aumento significativo no grupo S comparado com o grupo NS (Figura 11 A).

Afim de melhor caracterizar a atividade citotóxica das células T CD8<sup>+</sup> na sepse, avaliou-se a expressão granzima A e B.

A expressão da granzima A e granzima B foi analisada em células T CD8<sup>+</sup> presentes em amostras de sangue periférico obtido de pacientes com sepse e indivíduos saudáveis. Os resultados das análises demonstraram que a expressão de granzima A em células T CD8<sup>+</sup> foi maior em pacientes com sepse quando comparada com indivíduos saudáveis (Figura 11 B). No entanto, a expressão granzima B em células T CD8<sup>+</sup> não mostraram diferença significativa entre os grupos S e NS (Figura 11 C).



**Figura 11:** Análise da expressão de citocinas por linfócitos CD8<sup>+</sup> do sangue periférico. Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NS (n=7), e S (n=15) foram avaliados no contexto ex vivo como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para a citocina IFN- $\gamma$  e as moléculas granzima A e granzima B em linfócitos CD8<sup>+</sup>.

## 6.0. DISCUSSÃO

A progressão da sepse é dependente da interação que se estabelece entre a resposta imune e sua capacidade em circunscrever o foco infeccioso (Nduka *et al.*, 2009). Dentro desse contexto o controle exercido pelos monócitos no sítio inflamatório é um processo que depende da natureza, do estado de ativação destas células e é coordenado por moléculas de apresentação, co-estimuladoras e receptores de reconhecimento de antígenos (Krishna *et al.*, 2011). A falta de uma resposta adequada das células T nos pacientes com sepse associada a outros mecanismos reguladores descontrolados podem esclarecer a exacerbação da resposta imune e forte resposta de monócitos observada nestes pacientes (Gregori *et al.*, 2012).

Alguns estudos demonstraram alterações nas funções de monócitos durante a sepse (Soehnlein *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). A diminuição da expressão de CD14 e HLA-DR na superfície de monócitos e aumento da produção de citocinas inflamatórias por essas células são alguns exemplos dessas alterações (Soehnlein *et al.*, 2010). Nossos resultados mostraram uma redução significativa na expressão de HLA-DR, CD86 e TLR-2 em monócito CD14<sup>+</sup> de pacientes com sepse (S) (figuras 5 e 6), reforçando a idéia de que na sepse o mecanismo de apresentação, co-estimulação e reconhecimento de antígeno podem estar comprometidos (Kasten *et al.*, 2010). Embora alguns autores descrevam o aumento dessas moléculas na sepse (Schaaf *et al.*, 2009; Armonstrong *et al.*, 2004) Bernard e colaboradores (2010) demonstraram que TLR, principalmente TLR-2 e TLR-4 diminuem a medida que o quadro de sepse evolui para choque.

A diminuição da expressão de TLR-2 neste estudo (Figura 5) é corroborada com Bernard e colaboradores (2010) que além de observarem esta redução, demonstraram uma correlação entre a expressão deste receptor com a produção de citocinas após estimulação com LPS inferindo que mesmo com estes receptores reduzidos em monócitos ainda existe produção de citocinas. Tal fenômeno também é observado neste estudo (Figura 7) onde foi demonstrado o aumento de TNF- $\alpha$  em pacientes com sepse em comparação com indivíduos saudáveis. Estes dados reforçam que na sepse a liberação de determinadas citocinas pode estar relacionada



a outros mecanismos além da ativação de receptores TLR e que a sepse pode induzir hiporresponsividade de monócitos no que tange a liberação de citocinas o que pode contribuir para o aumento da lesão tecidual e um prognóstico ruim.

Wakefield e colaboradores (1993) encontraram um aumento de HLA-DR em pacientes com complicações infecciosas após serem submetidos a procedimentos cirúrgicos. Apresentando resultados contrastantes, estudos realizados por Ditschkowski e colaboradores (1999) demonstraram uma diminuição na expressão de HLA-DR em pacientes com sepse acometidos por algum trauma, o que é corroborado pelos resultados obtidos neste trabalho (Figura 6). Essa diferença entre esses dois estudos talvez possa ser explicada por meio de avaliações divergentes e a condição em que cada paciente foi avaliado. O segundo estudo demonstrou que este fenômeno é iniciado após o segundo dia após o ferimento, e além disso, a expressão de HLA-DR em monócitos é influenciada pela gravidade do trauma e pela piora do quadro de sepse. Desta forma, pode-se sugerir que a sepse induz alterações na expressão de moléculas relacionadas a apresentação de antígenos, contribuindo de forma representativa para um desempenho ruim das funções celulares e conseqüente piora no quadro da sepse.

Durante a fase inicial da sepse alguns estudos mostraram que as células T podem reconhecer antígenos próprios que são liberados devido ao dano tecidual, entretanto dados obtidos em estudos de infecções crônicas sugerem que as células T reconhecem antígenos microbianos (Hesse, *et al.*, 2004; Kasten, *et al.*, 2004). Nesse contexto pode-se sugerir que com a diminuição da expressão de moléculas como HLA-DR nos monócitos, é provável que exista uma outra população celular seja responsável pelo processo de apresentação de antígeno.

Como demonstrado neste estudo, as principais moléculas responsáveis pela apresentação de antígeno, HLA-DR e CD86, estão diminuídas em pacientes com sepse (Figura 6), pode-se sugerir que células, como os linfócitos, possam estar com suas funções comprometidas. No entanto, muito pouco é conhecido a respeito da especificidade das células T e existem evidências de que essas células são uma população heterogênea que reage com peptídeos derivados tanto de tecidos próprios quanto antígenos estranhos (Mosmann, *et al.*, 1989; Muraille, *et al.*, 1998; Miller, *et al.*, 2007). Além disso, esses estudos sugerem que embora a ativação das células T seja antígeno específica, uma vez ativadas, essas células podem não só desenvolver funções efetoras, bem como inibir outras células T e os monócitos de

maneira antígeno não-específica (Thornton & Shevach, 2000). Dessa forma as células T também desempenham papéis importantes durante a atividade dos monócitos.

Dentro desse contexto, observamos que apesar do aumento na frequência de leucócitos nos pacientes com sepse em relação aos indivíduos saudáveis, o número de linfócitos totais está diminuído (Tabela 3). Em alguns trabalhos essa alteração é observada na sepse (Pandiyani *et al.*, 2008; Fortin *et al.*, 2010; Lewis *et al.*, 2012). De fato essa variação na taxa de leucócitos se deve a resposta que cada indivíduo com sepse desenvolve mediante a infecção.

O processo inflamatório que se estabelece na sepse promove uma ativação das células T CD4<sup>+</sup>, com isso tem-se um conseqüente aumento de diversas moléculas associadas a ativação e proliferação celular (Fortin *et al.*, 2010; Dios-Toro *et al.*, 2011). A expressão da molécula L-selectina (CD62L), relacionada com a migração, foi mostrada na maioria de células T virgens (Mosmann *et al.*, 1998; Sallusto, *et al.*, 2004) indicando que um aumento na expressão dessa molécula caracteriza fenotipicamente células não ativadas. De fato, no presente estudo foi observado um aumento significativo de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> do sangue periférico de pacientes com sepse (S) (Figura 9 A) reforçando a idéia da presença de um número maior de células T CD4<sup>+</sup> ativadas/diferenciadas migrando para o foco inflamatório em pacientes com sepse (S) quando comparados com indivíduos normais (NS).

A análise comparativa na frequência de células T CD4<sup>+</sup> que expressam CD62L demonstrou que células CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> são menores em pacientes com sepse (Figura 9 A), sugerindo que na sepse a maioria das células T CD4<sup>+</sup> estão ativadas. A confirmação desse estado de ativação é dada pela presença da molécula de ativação precoce CD69 corroborando com outros trabalhos (Ziegler, *et al.*, 1994; Ward, 2008; Sriskandan *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2008), que mostram um aumento significativo da expressão de CD69 nas células T CD4<sup>+</sup> de pacientes com sepse (S) se comparados com indivíduos saudáveis (Figura 9B). Tal achado ainda é confirmado pelo aumento da expressão de CD69 em células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> de pacientes com sepse (Figura 9C) reforçando que além das células T CD4<sup>+</sup> ativadas possuem um papel importante no desenvolvimento de uma resposta efetora durante a sepse (Brunialti *et al.*, 2012)., estas ainda podem estar relacionadas com a memória efetora (Sallusto *et al.*, 2004). Além disso, a diminuição da expressão de

CD62L e aumento de CD69 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com sepse reforça a idéia de que mesmo com esse aumento dessas células ativadas, ainda não é o suficiente pra diminuir a infecção, e apesar da diminuição das moléculas co-estimuladoras e de apresentação de antígenos estas ainda se diferenciam.

Na sepse, observa-se uma elevada resposta inflamatória induzida principalmente por citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ , devido a ação de células T. A citocina IFN- $\gamma$  induz a ativação de monócitos proporcionando uma função microbicida e a produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, bem como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Gollob et al., 1996).

Nossos resultados demonstraram um aumento da expressão de IFN- $\gamma$  tanto em células T CD4<sup>+</sup> (Figura 10 A) quanto T CD8<sup>+</sup> (Figura 11 A), sugerindo que estas células provavelmente estejam relacionadas com o processo inflamatório da sepse, induzindo outras populações celulares à ativação, função microbicida e produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Como o IFN- $\gamma$  modula o desenvolvimento de células T naíve (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) para um perfil ativado (Gollob et al., 1996), o aumento das células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> ativadas em pacientes com sepse observada em nossos resultados (Figura 9 A, B e C), sugerem que esta citocina possa estar envolvida na ativação das células T no processo inflamatório que ocorre na sepse.

Essas mesmas células T virgens citadas anteriormente, de acordo com o microambiente ou o tipo de resposta imune desencadeada, podem se diferenciar em células Th17 na presença de IL-6 e TGF- $\beta$  (Flierl et al., 2008). Em uma resposta inflamatória, o efeito da IL-17 nas células pode levar ao aumento da produção de quimiocinas, como CXCL1 e CXCL2 (Bettelli et al., 2008; Rendon et al., 2012), induzindo o recrutamento de neutrófilos aumentando a inflamação e a diminuição da carga bacteriana. Embora o papel da IL-17 na sepse ainda é pouco conhecido, sabe-se que esta citocina durante a infecção pode agir tanto de forma pró-inflamatória, principalmente no recrutamento de neutrófilos, quanto de forma imunomoduladora desenvolvendo uma função citoprotetora (Flierl et al., 2008; Rendon et al., 2012). Este mesmo trabalho encontrou um aumento de células produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-17, o que é condizente com o curso do processo inflamatório em pacientes com sepse.

Nossos resultados demonstraram um aumento da expressão de IL-17 em células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes com sepse (Figura 10 B),

sugerindo que assim como o IFN- $\gamma$ , a IL-17 também pode estar envolvida no processo inflamatório desencadeado pela sepse. Baseado em outros estudos não pode-se deixar de considerar que o aumento da expressão dessa citocina pelas células T CD4<sup>+</sup> também pode estar relacionado a algum mecanismo imunomodulador, uma vez que na sepse já foi observada a atuação de outros subtipos celulares com essa função (Flierl *et al.*, 2008).

Diante desse perfil inflamatório característico da sepse, a lesão de órgãos e tecidos é eminente. Contrapondo a isso, diversos estudos descrevem uma resposta anti-inflamatória no intuito de conter essa lesão causada pela hiperresponsividade das células e de seus produtos pró-inflamatórios (Florquin *et al.*, 1994; Gaus *et al.*, 1994; Sundstedt *et al.*, 1997; Hasko *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1999) Estudos recentes observaram uma redução na população de linfócitos e aumento da apoptose durante a sepse, com mudança de uma resposta Th 1 para um padrão de resposta Th2 (Brunialti *et al.*, 2012).

A IL-10 é uma das principais citocinas imunomoduladoras produzida por macrófagos e células T (Florquin *et al.*, 1994; Sundstedt *et al.*, 1997). Alguns trabalhos demonstraram que esta citocina aumenta a sobrevivência celular por um mecanismo ainda desconhecido (Lelievre *et al.*, 1998), ativa inibidores do ciclo celular (O'Farrell *et al.*, 2000) e inibe diretamente a proliferação das células T e a produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  por estas células (Taga *et al.*, 1992). Além disso, a IL-10 tem uma série de efeitos inibidores sobre a função das APCs, incluindo a regulação negativa na expressão de moléculas de MHC classe II (HLA-DR), (Waal *et al.*, 1991) e da expressão das moléculas CD80 e CD86 (Flores *et al.*, 1994). A IL-10 também inibe a síntese de TNF- $\alpha$  e IL-12 pelas APCs, incluindo monócitos, um fenômeno crítico para a indução das respostas pró-inflamatórias e as respostas das células T citolíticas (Moore *et al.*, 1993; . Aste-Amezaga *et al.*, 1998).

Estudos demonstraram que o principal papel da IL-10 na sepse é inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, diminuindo a gravidade da doença (Bean *et al.*, 1993). Os nossos resultados demonstraram que os pacientes com sepse tiveram um aumento significativo na percentagem de células T CD4<sup>+</sup> expressando IL-10 em comparação com indivíduos saudáveis (Figura 10C). Estes resultados sugerem que estas células podem estar envolvidos na redução da inflamação desempenhando um papel importante na regulação da resposta inflamatória. Dessa forma parece que

na sepse tanto a resposta pró-inflamatória quanto anti-inflamatória estão descontroladas, uma vez que não há uma harmonia dos mecanismos efetores dessas respostas (Muller-Alouf et al., 1996; Sundstedt et al., 1997; Torres et al., 1998; Chong et al., 2011; Lewis et al., 2012). Tal fato ainda pode ser confirmado pelos nossos dados que mostraram aumento significativo de diversas moléculas (IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10) (Figuras 10 e 11) fazendo com que a resposta celular não tenha um perfil definido o que acarreta um mal funcionamento dos mecanismos de eliminação do patógeno (Chong et al., 2011; Lewis et al., 2012).

Sabe-se que a gravidade da sepse determina o nível de apoptose de células T (Franchi et al., 2006). A medida que o número de células T apoptóticas fagocitada por macrófagos aumenta, o perfil de produção das citocinas anti-inflamatórias TGF- $\beta$  e IL-10 também aumenta, juntamente com a diminuição da expressão de MHC II (Medzhitov et al., 2000; Takahashi et al., 2006). Como já referido, esta mudança no perfil de citocinas pode resultar na redução da resposta inflamatória. No entanto, alguns estudos demonstraram que um aumento da apoptose na sepse grave pode estar relacionado a uma citoproteção por meio do aumento da resposta anti-inflamatória (Keir et al., 2007; Zhang et al., 2011).

Algumas moléculas apoptóticas regulam negativamente as células T, diminuindo a proliferação celular e a produção de citocinas inflamatórias, como IFN- $\gamma$ . (Gollob *et al.*, 1996) Além disso, pode levar a uma diminuição da expressão de receptores TLR pelos monócitos e macrófagos (Guignant *et al.*, 2011), fenômeno que pode ser verificados em nossos dados (Figura 5).

As células T CD8<sup>+</sup> podem atuar através da indução de morte pela liberação de granzima B, uma serino protease, cujos substratos apresentam especificidade similar à da família das caspases (Atkinson *et al.*, 1998; Darmon *et al.*, 1999; Gondek *et al.*, 2005). Estudos demonstram que imediatamente após ativação de células T, granzima B é rapidamente expressa, sugerindo que esta possui papel importante na eliminação de células infectadas. Embora esse fenômeno seja importante no processo de infecção da sepse, a análise dos dados demonstrou que as células T CD8<sup>+</sup> não tiveram alteração na expressão da molécula granzima B nos pacientes com sepse em relação aos indivíduos saudáveis (figura 12 C). Por outro lado nossos dados demonstraram um aumento da expressão de granzima A pelas células T CD8<sup>+</sup>, sugerindo que possa estar havendo uma tentativa de controle da

inflamação ou uma maior ativação da morte celular por granzima, o que poderia estar associado a piora no quadro da sepse.

Diante de todos os dados apresentados e baseado na literatura, os resultados indicam que poderia haver uma possível atuação das células T na reprogramação da função dos monócitos durante a sepse, uma vez que essas células estão diretamente relacionadas com a atividade dos monócitos e vice-versa (Soehnlein *et al.*, 2010).

Diante da caracterização das células T e monócitos na sepse, podemos observar em corroboração com outros estudos (Sriskandan *et al* 2008; Kessel *et al*, 2009; Gregori *et al* 2012) que as células T além do seu papel inflamatório, estas demonstraram também um possível papel citoprotetor, e a ausência da atividade destas células pode aumentar o dano tecidual, talvez pela supressão da ativação de células efetoras e até mesmo das APCs, como o próprio monócito, através da produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e IL-17), anti-inflamatória (IL-10) e moléculas apoptóticas (Granzimas A e B). Esses achados também podem contribuir para uma possível explicação para a “Paralisia imunológica” (Hotchkiss, *et al.*, 2006) referida neste trabalho, onde o sistema imune, no intuito de conter a inflamação desencadeada pela infecção, gera um desequilíbrio homeostático entre as resposta pró e anti-inflamatória. Somado a esse achado ainda podemos atribuir a esse fenômeno uma reduzida capacidade de apresentação de antígeno (Oberholzer, *et al.*, 2001) confirmada por nossos resultados nas populações de monócitos.

Neste estudo, existem diversas alterações nas moléculas relacionadas a apresentação (HLA-DR), reconhecimento (TLR-2) e co-estimulação (CD86) nos monócitos de pacientes com sepse em comparação com indivíduos saudáveis (Figuras 5 e 6), essas alterações podem estar relacionadas diretamente ao perfil encontrado nas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que também demonstraram alterações significativas na expressão das citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10) e demais moléculas relacionadas a ativação (CD69), diferenciação (CD62L) e apoptose (granzimas A e B). Assim, baseado na integração existente entre os processos e os produtos celulares na resposta imune, tanto os monócitos quanto as células T parecem atuar de forma conjunta na resposta inflamatória da sepse, seja no processo inflamatório e/ou imunomodulador. No entanto, este mecanismo usado por estas células ainda não está totalmente bem estabelecido. Assim, estudos mais detalhados sobre o papel dessas células durante a sepse são necessários.

## 7.0. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho trouxeram um melhor entendimento sobre o perfil fenotípico dos monócitos e das células T nos pacientes com sepse. Concluimos que os monócitos CD14<sup>+</sup> podem atuar juntamente com as células T, de forma direta ou indireta com uma resposta imune ineficaz contra os patógenos na sepse, principalmente pela alteração na expressão de marcadores de ativação e apresentação, bem como pela produção de citocinas. Concluiu-se também, que as células T apresentam uma plasticidade celular, podendo atuar na supressão, modulação e até mesmo na manutenção da inflamação em algumas respostas celulares, devido ao variado perfil de citocinas produzidas por estas células.

## 8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal, S., N. Ghilardi, et al. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. J Biol Chem **278**:1910-1914.

Alves-Filho, J. C., A. Freitas, et al. (2009). Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. Proc Natl Acad Sci USA **106** (10): 4018-23.

Aste-Amezaga, M., X. Ma, et al. (1998). Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. J Immunol **160**: 5936.

Atkinson, E. A., M. Barry, et al. (1998). Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. J Biol Chem **273**:21261-21266.

Ayala, A., G. Y. Song, et al. (2000). Immune depression in polymicrobial sepsis: The role of necrotic (injured) tissue and endotoxin. Crit Care Med **28**:2949–2955.

Bandyopadhyay, G., A. De et al. (2007). Negative signaling contributes to T-cell anergy in trauma patients. Crit Care Med **35**: 794-801.

Barber, R. C., L. Y. Chang, et al. (2006). Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury. Clin Med Res **4** (4): 250-5.

Bean, A. G., R. A. Freiberg, et al. (1993). Interleukin-10 protects mice against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock. Infect Immun **61**: 4937.

Benjamim, C. F., S. H. Ferreira e F. Q. Cunha. (2000). Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. J Infect Dis **182** (1): 214-23.



Beresford, P. J., Z. Xia, et al. (1999). Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. Immunity **10**:585-594.

Bettelli, E., T. Korn, M. Okuda, V. K. Huchroo. (2008). Induction and effector functions of T(H)17 cells. Nature **453**: 1051.

Bettelli, E., T. Korn, M. Okuda, V. K. Huchroo. (2007). T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. Nat Immunol **8**: 345.

Beutler, B. (1995). TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. J Investg Med **43**: 227.

Bone, R. C., R. A. Balk, et al. (2009). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. Chest **136** (5): 28.

Brunialti, M. K. C., M. C. Santos, et al. (2012) Increased Percentages of T Helper Cells Producing IL-17 and Monocytes Expressing Markers of Alternative Activation in Patients with Sepsis. Plos One **7** (5): 1-10.

Calandra, T., J. D. Baumgartner, et al (1990). Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. J Infect Dis, **161** (5): 982-7.

Chong, D. L., S. Sriskandan. (2011). Pro-inflammatory mechanisms in sepsis. Contrib Microbiol **17**:86–107.

Chowdhury, D., J. Lieberman. (2008). Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. Annu Rev Immunol **26**:389-420.

Cousens, L. P., J. S. Orange, et al. (1995). Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-g production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. J. Immunol **155**: 5690–5699

Dessing, M. C., M. Schouten, et al. (2008). Role Played by Toll-Like Receptors 2 and 4 in Lipoteichoic Acid-Induced Lung Inflammation and Coagulation. JInfect Dis **197**(2):245-52.

Diosa-Toro, M. A., A. Fabián, et al. (2011). Células con propiedades inmunoreguladoras y su impacto en la patogénesis de la sepsis. Rev Chil Infect **28** (6): 572-78.

Enoh, V.T., S. H. Lin et al (2008). CD4+ T-cell depletion is not associated with alterations in survival, bacterial clearance, and inflammation after cecal ligation and puncture. Shock **29**:56-64.

Flierl, M. A., D. Rittirsch, et al. (2008). Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. FASEB J **22**:2198-2205.

Flores, V. P. O., H. Reiser, et al (1994). Regulation of T helper cell responses in experimental murine schistosomiasis by IL-10. Effect on expression of B7 and B7-2 costimulatory molecules by macrophages. J Immunol **53**: 5190.

Florquin, S., Z. Amraoui, et al. (1994). Systemic release and protective role of IL-10 in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. J Immunol **153**: 2618.

Franchi, L., A. Amer, et al (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. Nat Immunol **7**:576–582.

Freitas, A., J. C. Alves-Filho, et al. (2009). IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. J Immunol **182**:7846-7854.

Gaus, H., T. Miethke, et al. (1994). Superantigen-induced anergy of V beta 8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells induces functional but non-proliferative T cells *in vivo*. Immunol **83**: 333.

Gollob, K. J., W. O. Dutra, R. L. Coffman. (1996). Early message expression of interleukin-4 and interferon-gama, but not of interleukin-2 and interleukin-10, reflects later polarization of primary CD4<sup>+</sup> T cell cultures. Eur J Immunol **26**: 1565.

Gondek, D. C., L. F. Lu, et al. (2005). Contact-mediated suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. J Immunol **174**: 1783-1786.

Gregori, S., K. S .Goudy, M. G. Roncarolo. (2012). The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. Front Immunol 3 (30): 1-12.

Guignant, C., A. Lepape, et al. (2011). Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. Crit Care Med **15** (2): 1-11.

Hasko, G., L. Virag, et al. (1998). The crucial role of IL-10 in the suppression of the immunological response in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. Eur J Immunol **28**: 1417.

Hein, F., F. Massin, et al (2010). The relationship between CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. Crit Care Med. **14**.

Henkin, C. S., J. C. Coelho, et al (2009). Sepse: Uma visão atual. Scientia Medica **19** (3): 135-45.

Hesse M, C. A. Piccirillo, et al. (2004). The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. J Immunol **172**: 3157-3166.

Hotchkiss R.S., K. W. McConnell, et al. (2006). TAT-BH4 and TAT-Bcl-xL peptides protect against sepsis-induced lymphocyte apoptosis in vivo. J Immunol **176**:5471-5477.

Jacob, G. F. (1954). The failure of the neutrophil response to pneumonia in Africans. East Afr Med J **31** (8): 367-71.

Kasten, K. R., J. Tscho, et al. (2010). T cells are potent early mediators of the host response to sepsis. Shock **34** (4): 327-36.

Kessel, A., E. Bamberger, et al. (2009). The role of T regulatory cells in human sepsis. J Autoimmun **32**: 211-15.

Krishna, K., L. L. Lau, et al. (1996). Analysis of cytotoxic T cell responses to dominant and subdominant epitopes during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. J. Immunol **157**: 5543–5554.

Krishna, S., L. S. Miller. (2011). Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. Semin Immunopathol **34**: 261-80.

Langrish, C. L., Y. Chen, et al. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med **201**: 233.

LaRosa, S. P., S. M. Opal. (2012). Immune Aspects of Sepsis and Hope for New Therapeutics. Curr Infect Dis Rep **14**: 474-83.

Lee, Y. K., H. Turner, et al. (2009). Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. Immunity **30**:92-107.

Lelievre, E., D. Sarrouilhe, et al. (1998). Preincubation of human resting T cell clones with interleukin-10 strongly enhances their ability to produce cytokines after stimulation. Cytokine **10**: 831.

Lewis, D. H., D. L. Chan, et al. (2012). The Immunopathology of Sepsis: Pathogen recognition, Systemic Inflammation, the Compensatory Anti-Inflammatory Response, and Regulatory T Cells. J Vet Intern Med **26**: 457–482.

Lexberg, M. H., A. Taubner, et al. (2008). Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. Eur J Immunol **38**:2654-2664.

Mangan, P. R., L. E. Harrington, et al. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature **441**:231-234.

Martignoni, A., J. Tschop et al. (2008). CD4-expressing cells are early mediators of the innate immune system during sepsis. Shock **29**:591-597.

Mc Dunn J.E., I. R. Turnbull, et al. (2006). Splenic CD4+ T cells have a distinct transcriptional response six hours after the onset of sepsis. J Am Coll Surg **203**:365Y375, 2006.

Medzhitov, R., C. Janeway. (2000). Innate immune recognition: Mechanisms and pathways. Immunol Rev **173**:89–97.

Miller, A., O. Lider, et al (1992). Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppresses both *in vitro* and *in vivo* immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen specific triggering. Proc Natl Acad Sci **89**: 421.

Miller, C., J. Ragheb. (1999). Anergy and cytokine-mediated suppression as distinct superantigen-induced tolerance mechanisms *in vivo*. J Exp Med **190**: 53.

Miller A. C, R. M. Rashid, E.M. Elamin (2007). The "T" in trauma: the helper T-cell response and the role of immunomodulation in trauma and burn patients. J Trauma **63**:1407-1417.

Mocci, S., R. L. Coffman. (1995). Incuction of a Th2 population from a polarized Leishmania-specific Th1 population by in vitro culture with IL-4. J Immunol **154**: 3779.

Moore, K. W., A. O'Garra, et al. (1993). Interleukin-10. Annu Rev Immunol **11**: 165.

Mosmann, T. R., R. L. Coffman. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol **7**: 145.

Muller-Alouf, H., J. E. Alouf, et al. (1996). Human pro- and anti-inflammatory cytokine patterns induced by Streptococcus pyogenes erythrogenic (pyrogenic) exotoxin A and C superantigens. Infect Immun **64**: 1450.

Muraille, E., O. Leo. (1998). Revisiting the Th1/Th2 paradigm. Scand J Immunol **47**: 1.

Murali-Krishna, K., et al. (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. Immunity **8**:177-187.

Nduka, O. O., J. E. Parrillo. (2009) The Pathophysiology of Septic Shock. Crit Care Clin **25**: 677-702.

Neumann, F., O. Lobitz, R. Fenk, et al. (2008). The sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score is predictive for survival of patients admitted to the intensive care unit following allogeneic blood stem cell transplantation. Ann Hematol, **87** (4): 299-304.

Oberholzer, A., C. Oberholzer, et al (2001). Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. Shock **16**:83-96.

- O'Farrell, A. M., D. A. Parry, et al. (2000). STAT3-dependent induction of p19INK4D by IL-10 contributes to inhibition of macrophage proliferation. J Immunol **164**: 4607.
- Pandiyan, P., M. J. Lenardo. (2008). The control of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell survival. Bio Dir **3** (6): 1-12.
- Rendon, J. L., M. A. Choudhry. (2012). Th17 cells: critical mediators of hostresponses to burn injury and sepsis. J Leuk Biol **92**: 529-38.
- Rios-Santos, F., J. C. Alves-Filho, et al. (2007). Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. Am J Respir Crit Care Med **175** (5): 490-97.
- Roark, C. L., P. L. Simonian, et al. (2008). Gammadelta T cells: an important source of IL-17. Curr Opin Immunol **20**:353-357.
- Rosenberg, S. A., C. Sportes et al. (2006). IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. J Immunother **29**:313-319.
- Saito, K., T. Wagatsuma, et al. (2008). Sepsis is characterized by the increases in percentages of circulating CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and plasma levels of soluble CD25. J. Exp. Med **216**: 61-68.
- Salant, D. J., A. M. Glover, et al. (1976). Depressed neutrophil chemotaxis in patients with chronic renal failure and after renal transplantation. J Lab Clin Med **88** (4): 536-45.
- Sallusto F., J. Geginat, A. Lanzavecchia. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. Annu Rev Immunol **22**: 745-763.

Shresta, S., T. A. Graubert, et al (1999). Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. Immunity **10**:595-605.

Secher, T., V. Vasseur, et al. (2009). Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. J Immunol **182** (12): 7855-64.

Sharpe, A. H., G. J. Freeman. (2002). The B7-CD28 superfamily. Nat Rev Immunol **2**(2):116-26.

Soehnlein, O., L. Lindbom.(2010). Phagocyte partnership during the on set and resolution of inflammation. Nature **10**: 427-39.

Sriskandan, S., D. M. Altmann. (2008). The immunology of sepsis. J Pathol **214**: 214-23.

Sundstedt, A., I. Hoiden, et al. (1997). Immunoregulatory role of IL-10 during superantigen-induced hyporesponsiveness *in vivo*. J Immunol **158**: 180.

Suni, M. A., V. C. Maino, H. T. Maecker. (2005). Ex vivo analysis of T-cell function. Cur Opin Immunol **17**: 434-40.

Taga, K., G. Tosato. (1992). IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. J Immunol **148**: 1143.

Takahashi, I., I. Nakagawa, et al. (1995). IL-12 rescues galactosamine-loaded mice from lethal shock triggered by staphylococcal enterotoxin. Biochem Biophys Res Commun **217**: 74.

Takahashi, K., T. Kawai, et al (2006). Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. J Immunol **176**:4520–4524.

Tinsley, K.W., S. L. Cheng, et al. (2000). Caspases -2, -3, -6, and -9, but not caspase-1, are activated in sepsis-induced thymocyte apoptosis. Shock **13**:1-7.



Teles, J. M., E. Silva, et al. (2008). Surviving sepsis campaign in Brazil. Shock **30**: 47-52.

Thornton A. M., E. M. Shevach. (2000). Suppressor effector function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. J Immunol **164**: 183-190.

Torres, B. A., H. M. Johnson. (1998). Modulation of disease by superantigens. Curr Opin Immunol **10**: 465.

Salomon, B., J. A. Blueston. (20010). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. Annu Rev Immunol **19**:225–252.

Vennet, F., C. S. Chung, et al. (2008). Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. J Leuko Bio **83**: 523-35.

Verdrengh, M., A. Tarkowski. (1997). Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by Staphylococcus aureus. Infect Immun **65** (7): 2517-21.

Verreck, F. A., T. de Boer, et al. (2004). Human IL-23 producing type 1 macrophages promote but IL-10Yproducing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A **101**:4560-4565.

Vincent, J. L., A. De Mendonca, et al. (1998). Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. Crit Care Med **26** (11): 1793-800.

Vincent, J. L., R. Moreno, et al. (1996). The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med **22** (7): 707-10.

Voll, R. E., M. Herrmann, et al. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. Nature **390**:350-351.

Waal, M. R., J. Abrams, et al. (1991). Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med **174**: 1209.

Waal, M. R., J. Haanen, et al. (1991). Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presentation capacity of monocytes *via* down-regulation of class II major histocompatibility complex expression. J Exp Med **174**: 915.

Waal, M. R., H. Yessel, et al. (1993). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4<sup>+</sup> T cell clones and resting T cells. J Immunol **150**: 4754.

Wakefield, C. H., P. D. Carey, et al. (1993). Changes in major histocompatibility complex II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. Br J Surg **80**:205-209.

Ward, P.A. (2008). Sepsis, apoptosis and complement. Biochem Pharm **76**:1383-88.

Zenewicz, L. A., G. D. Yancopoulos, et al. (2007). Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. Immunity **27**(4):647-59.

Zhang, Y., J. Li, et al. (2010). Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. Crit Care Med **15** (1): 1-9.

Ziegler, S. F., F. Ramsdell, et al (1994) The activation antigen CD69. Stem Cells **12**(5):456-65.

Zhou, L., I. I. Ivanov, et al (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. Nat Immunol **8**:967-974.

Zhu, J., W. E. Paul. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. Cell Res **20**:4-12.