

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

Efeitos da esplenectomia  
na homeostase de órgãos e sítios linfóides  
em camundongos BALB/c

Magda Luciana de Paula Rosa

Belo Horizonte  
2010

**MAGDA LUCIANA DE PAULA ROSA**

Efeitos da esplenectomia  
na homeostase de órgãos e sítios linfóides  
em camundongos BALB/c

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria  
Co-Orientadora: Dra. Tatiani Uceli Maioli

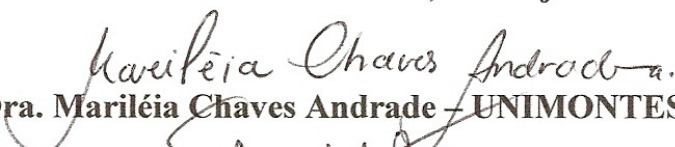
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2010




Universidade Federal de Minas Gerais -  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 - Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MAGDA LUCIANA DE PAULA ROSA.** Aos vinte e sete dias do mês de janeiro de 2010 às 9:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Efeitos da esplenectomia na homeostase de diversos órgãos em camundongos BALB/c” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão Profa. Ana Maria Caetano de Faria da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Mariléia Chaves Andrade da Universidade Estadual de Montes Claros, aprovada; Dr. Tomaz Aroldo da Mota Santos da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Tatiani Uceli Maioli, co-orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo tratar a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de janeiro de 2010.

  
 Dra. Mariléia Chaves Andrade – UNIMONTES

  
 Dr. Tomaz Aroldo da Mota Santos – UFMG

  
 Prof. Paulo Sérgio Lacerda Beirão  
 Coordenador “pro tempore” do Curso  
 de Pós Graduação em  
 Bioquímica - Imunologia  
 ICB - UFMG

  
 Dra. Tatiani Uceli Maioli – co-orientadora – UFMG

  
 Dra. Ana Maria Caetano de Faria – orientadora - UFMG

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Aos meus pais, Mércio e Lia que com simplicidade me ensinaram a encontrar força na fé, a caminhar na ética e a procurar viver a vida com muita alegria. Partiram cedo demais... Mas vivem em cada pedaço do meu coração.

À Afonso, meu amor, por todo apoio e carinho. Por chorar junto comigo e por me fazer rir e gargalhar sempre. Conviver com você me torna uma pessoa melhor. Sem você eu não conseguiria seguir adiante. Obrigada!

Aos meus irmãos e irmã, Mercinho, Mauro, Marcos e Mârcia, por caminharmos juntos, superando tristezas e compartilhando alegrias. Cada um do seu jeito faz minha vida mais feliz.

À Clarinha que nem bem chegou, já trouxe esperança e mudou nossas vidas!

...Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos...

Antoine de Saint-Exupéry

## AGRADECIMENTOS

À Ana Caetano de Faria, pelo aprendizado ao longo desses anos, pela confiança depositada em mim e por me acolher no LIB.

À Tati pelo carinho e amizade e pelo apoio durante as horas infindáveis nas leituras do FACS.

Aos professores Nelson, Claudinha e Tomaz que sempre enriqueceram meu aprendizado.

À Léia, por ter me acolhido no LIB, me ensinado os primeiros conhecimentos necessários a um pesquisador e pela alegria e bom humor contagiantes. Obrigada por ter confiado em mim. Sou muito grata a você!

À Frank, pelo carinho, amizade, incentivo e socorro nos momentos cruciais. Você não tem idéia do quanto foi importante pra mim.

À Josy, verdadeiramente meu braço direito, por acordar várias vezes às cinco da manhã e me ajudar em todos os experimentos. Vivemos juntas esse mestrado desde o início, desde a prova de inglês! Muito obrigada!!!

Ao Rafa, caladinho mais trabalhador, meu braço esquerdo, sempre disponível em me ajudar. Muito obrigada!

Ao André pela alegria contagiante, convívio fácil e ajuda nos experimentos com CFSE.

À Érica Leandro, sempre com a carinha boa e disponível para me salvar todas as vezes na compensação do CFSE.

À Raphaela pelo carinho, amizade e apoio durante todos os momentos, alegres ou difíceis que passei. Sua amizade foi imprescindível!

À Andrezza, pela sua sinceridade e jeitinho inquieto, consegue trazer leveza e verdade para o LIB.

À Dani, pela amizade que perdura desde os tempos de iniciação científica! Éta saudade!

À Elaine, pela amizade, carinho e por ter me apresentado ao FACS.

À Samara e Taís pela amizade e convívio agradável, coisas raras hoje em dia.

À Nilda, carinha sempre boa arrumando nossa bagunça.

À Ildinha, na batalha diária pelo cuidado com os camundongos.

À todos os colegas do LIB pelo convívio e aprendizado.

À Líliam, amiga desde sempre, sabe me aturar e me entender nos momentos diversos. Você é muito especial pra mim!

Às Filhas da PUC, Cris, Diana, Marcella e Nanô pela amizade, carinho e apoio. Vocês fazem minha vida ficar mais leve.

À Michele Mendes Barsante, quem me ensinou a gostar do baço e me apresentou à esplenectomia. Sou eternamente grata a você.

Aos meus irmãos e irmã, Mercinho, Mauro, Marcos e Márcia e a Dalva, Laura e Daniel, pelo companheirismo, carinho e preocupação dispensados a mim.

Ao Afonso pela paciência, amor, amizade e apoio sempre me incentivando a buscar a realização do sonho de fazer ciência.

Aos meus pais, Lia e Mércio, exemplos de fé, dedicação e luta, pelo apoio e incentivo constantes e por me ensinarem a importância da buscar incessante pelo conhecimento.

E a Deus e Nossa Senhora da Piedade que me guiam e me iluminam pelos caminhos da vida.

Muito obrigada a todos!

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

O corpo, devido ao peso, tende para o lugar que lhe é próprio, porque o peso não só tende para baixo, mas também para o lugar que lhe é próprio. Assim o fogo encaminha-se para cima, e a pedra para baixo. O azeite derramado sobre a água aflora à superfície. A água vertida sobre o azeite submerge-se debaixo deste: movem-se segundo o seu peso e dirigem-se para o lugar que lhes compete. As coisas que não estão no próprio lugar agitam-se, mas quando o encontram, ordenam-se e repousam.

O meu amor é o meu peso. Para qualquer parte que vá, é ele quem me leva.

Santo Agostinho em "Confissões"



## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| Lista de Figuras.....  | I         |
| Lista de Abreviaturas.....   | III       |
| Resumo.....  | V         |
| Abstract.....  | VII       |
| <br>   |           |
| <b>1 - INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 - O baço e a cirurgia esplênica: aspectos históricos.....  | 1         |
| 1.2 - O baço: aspectos anatômicos, morfológicos e funcionais.....  | 4         |
| 1.3 - Componentes imunológicos inatos e adaptativos do baço.....   | 7         |
| 1.4 - Alterações causadas pela esplenectomia.....  | 10        |
| <b>2 - OBJETIVOS.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>14</b> |
| 3.1 - Animais Experimentais.....   | 14        |
| 3.2 - Procedimento Cirúrgico.....  | 14        |
| 3.3 - Preparação de extratos de tecidos.....   | 14        |
| 3.4 - Medida dos níveis de citocinas do sobrenadante de extratos de tecidos por ELISA.....                                     | 15        |
| 3.5 - Obtenção dos soros.....  | 16        |
| 3.6 - Medida dos níveis de imunoglobulinas séricas totais por ELISA.....   | 16        |
| 3.7 - Medida dos níveis de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 séricas totais por ELISA.....   | 17        |
| 3.8 - Medida dos níveis de IgE sérica total por ELISA.....   | 18        |
| 3.9 - Preparação de suspensão das células linfóides.....   | 18        |
| 3.9.1 - Meio de cultura.....   | 19        |
| 3.9.2 - Preparação das suspensões celulares do baço, timo, linfonodos inguinais, linfonodos mesentéricos, placas de Peyer..... | 19        |
| 3.9.3 - Preparação das suspensões celulares do fígado.....   | 19        |
| 3.9.4 - Preparação das suspensões celulares da medula óssea.....   | 20        |
| 3.9.5 - Preparação das suspensões celulares do lavado peritoneal.....  | 20        |
| 3.10 - Contagem de células viáveis.....  | 21        |
| 3.11 - Análise fenotípica das células por citometria de fluxo.....   | 21        |
| 3.11.1 - Análise da expressão de marcadores de população, moléculas de adesão e co-estimuladoras por citometria de fluxo.....  | 21        |

|   |    |
|---|----|
| 3.12 - Preparação das suspensões celulares da medula óssea, timo e baço para transferência.....   | 22 |
| 3.13 - Marcação celular com CFSE.....   | 23 |
| 3.14 - Contagem do número de células produtoras de imunoglobulinas através da técnica de ELISPOT.....   | 23 |
| 3.15 - Análise estatística. ....  | 24 |
| 3.16 - Aquisição e análise dos dados em Citometria de Fluxo.....  | 25 |
| 3.17 - Protocolos Experimentais.....  | 27 |
| 3.17.1 - Protocolo 1: Caracterização das populações linfóides em diferentes órgãos após esplenectomia.....  | 27 |
| 3.17.2 - Protocolo 2: Análise da dinâmica de distribuição de linfócitos transferidos .....  | 28 |
| 3.17.3 - Protocolo 3: Análise da expressão de moléculas de adesão e co-estimuladoras nos linfócitos B1a e B2.....                                   | 29 |
| 3.17.4 - Protocolo 4: Avaliação da atividade local e sistêmica dos linfócitos B.....  | 30 |
| <b>4 - RESULTADOS</b> .....   | 31 |
| 4.1 - Após a esplenectomia, o sistema imune foi capaz de recompor a coleção de células linfóides. ....  | 31 |
| 4.2 - O número de linfócitos em cada órgão se alterou após a esplenectomia.....   | 33 |
| 4.3 - A dinâmica de distribuição dos linfócitos transferidos para animais esplenectomizados foi alterada.....                                       | 37 |
| 4.4 - A esplenectomia alterou o número de linfócitos B1a e B2 expressando moléculas de adesão e co-estimuladoras.....                               | 40 |
| 4.5 - A atividade local e sistêmica dos linfócitos B é afetada pela ausência do baço.....   | 42 |
| 4.6 - A produção de citocinas em extratos de tecidos da medula óssea, timo, linfonodos mesentéricos está alterada em animais esplenectomizados..... | 46 |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....   | 48 |
| 5.1 - Os efeitos da esplenectomia no número total de células linfóides dos órgãos analisados.....   | 48 |
| 5.2 - Os efeitos da esplenectomia no número de linfócitos em cada órgão analisado.....  | 51 |

|   |    |
|---|----|
| 5.3 - Os efeitos da esplenectomia na dinâmica de distribuição de linfócitos transferidos. ....  | 53 |
| 5.4 - Efeitos da esplenectomia no número de células B1a e B2 marcadas com moléculas de adesão e co-estimuladoras nos órgãos analisados.....   | 57 |
| 5.5 - Os efeitos da esplenectomia, no número de células produtoras de imunoglobulinas na medula óssea, timo e linfonodos mesentéricos e nos níveis de imunoglobulinas IgG, IgA, IgM e IgE no soro. .... | 61 |
| 5.6 - Os efeitos da esplenectomia na produção de citocinas em extratos de tecidos da medula óssea, timo e linfonodos mesentéricos.....  | 62 |
| <b>6 - CONCLUSÃO</b> .....  | 65 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 68 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Corte histológico do baço.....  | 5  |
| <b>Figura 2:</b> Análise de linfócitos da medula óssea.....  | 25 |
| <b>Figura 3:</b> Análise de linfócitos da medula óssea expressando molécula de adesão.....   | 26 |
| <b>Figura 4:</b> Somatório do número absoluto de células linfóides da MO, timo, LnM, Lnl, PP, fígado, sangue e lavado peritoneal.....                                    | 31 |
| <b>Figura 5:</b> Somatório do número absoluto de células linfóides do baço, MO, timo, LnM, Lnl, PP, fígado, sangue e lavado peritoneal.....                              | 32 |
| <b>Figura 6:</b> Número absoluto de células CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> na MO, timo, LnM, Lnl, PP, fígado, sangue e lavado peritoneal.....                         | 33 |
| <b>Figura 7:</b> Número absoluto de células CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> na MO, timo, LnM, Lnl, PP, fígado, sangue e lavado peritoneal.....                         | 34 |
| <b>Figura 8:</b> Número absoluto de células CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup> na MO, timo, LnM, Lnl, PP, fígado, sangue e lavado peritoneal.....                        | 35 |
| <b>Figura 9:</b> Número absoluto de células CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> na MO, timo, LnM, Lnl, PP, fígado, sangue e lavado peritoneal.....                        | 36 |
| <b>Figura 10:</b> Número absoluto de linfócitos TCD4, TCD8 e B da medula óssea, marcados com CFSE, transferidos para animais dos grupos controle e esplenectomizado..... | 37 |
| <b>Figura 11:</b> Número absoluto de linfócitos TCD4, TCD8 e B do timo, marcados com CFSE, transferidos para animais dos grupos controle e SB.....                       | 38 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 12:</b> Número absoluto de linfócitos TCD4, TCD8 e B do baço, Marcados com CFSE, transferidos para animais dos grupos controle e SB.....   | 39 |
| <b>Figura 13:</b> Número absoluto de linfócitos B1 expressando as moléculas de adesão CD62L, $\alpha 4\beta 7$ , e co-estimuladoras CD40 e CD21..... | 40 |
| <b>Figura 14:</b> Número absoluto de linfócitos B2 expressando as moléculas de adesão CD62L, $\alpha 4\beta 7$ , e co-estimuladoras CD40 e CD21..... | 41 |
| <b>Figura 15:</b> Número de células produtoras de Ig, IgG, IgA e IgM na medula óssea.....  | 42 |
| <b>Figura 16:</b> Número de células produtoras de Ig, IgG, IgA e IgM no timo.....  | 43 |
| <b>Figura 17:</b> Número de células produtoras de Ig, IgG, IgA e IgM nos LnM....   | 44 |
| <b>Figura 18:</b> Produção de IgG, IgM, IgA e IgE séricas totais.....  | 45 |
| <b>Figura 19:</b> Produção de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 séricas totais.....  | 45 |
| <b>Figura 20:</b> Produção de IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ e IFN- $\gamma$ do extrato celular da medula óssea.....                                      | 46 |
| <b>Figura 21:</b> Produção de IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ e IFN- $\gamma$ do extrato celular do timo.....  | 47 |
| <b>Figura 22:</b> Produção de IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ e IFN- $\gamma$ do extrato celular dos LnM.....  | 47 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Antigen Presentating Cell - Célula Apresentadora de Antígeno.

C: camundongos controle

CFSE: 5-and 6-carboxyfluorescein succinimidyl Ester

ELISA: Enzime Linked Immunosorbent Assay – Ensaio Imunoenzimático

FACS: Fluorescence- activated cell sorter – Citometria de fluxo

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

FSC: Dispersão Frontal (Forward Scatter)

HEVs: Vênulas do endotélio alto

IFN: Interferon

IFPE: Infecção Fulminante Pós-esplenectomia

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

LnI: Linfonodos inguinais

LnM: Linfonodos mesentéricos

LPe: Lavado peritoneal

LPS: Lipopolissacárides

MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal

MO: Medula óssea

OPD: Ortofenileno-diamino, substrato cromogênico da HRP

PALS: Bainha Linfóide Periarteriolar

PBMC: Células Mononucleares do sangue Periférico

PBS: Phosphate Buffered Saline – Salina tamponada com fosfato

PBS      P:      Tampão      fosfato      Salínico      Permeabilizante

PBS W: Tampão fosfato Salínico de Lavagem

PE: Ficoeritrina

PP: Placas de Peyer

RPMI: Meio de cultivo celular

SB: camundongos sem baço

SSC: Dispersão Lateral (Side Scatter)

TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor beta

TLR: Receptores tipo Toll

## RESUMO

O baço age como um filtro, na medida em que remove do sangue células sanguíneas e microrganismos, bem como células cobertas por anticorpos, em condições fisiológicas ou patológicas. Por sua anatomia e localização, o baço é o principal órgão envolvido no início da resposta imune a antígenos presentes na circulação. Apesar da remoção cirúrgica do baço estar associada ao risco de infecção subsequente, as indicações para a esplenectomia total, para determinadas patologias, continuam existindo. Apesar disto, as conseqüências da ausência do baço sobre os órgãos e sítios linfóides têm sido pouco avaliadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar como o sistema imune se reorganiza na ausência do baço, através do estudo dos efeitos da esplenectomia em vários órgãos e sítios linfóides 30 dias após a esplenectomia. Nossos resultados sugerem que a retirada do baço afeta o sistema imune de maneira global. A análise do número de células das principais populações linfóides não demonstrou aumento do número de linfócitos no sangue tampouco no somatório dos órgãos avaliados em camundongos esplenectomizados (SB). No entanto, quando esses órgãos foram analisados individualmente, apresentaram alterações no número de linfócitos, principalmente na MO, timo, LnM e LPe. O estudo da migração de linfócitos em camundongos SB revelou uma preferência de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> pela MO. Apesar de também migrarem para a MO, os linfócitos B se distribuíram de uma maneira mais ampla pelos outros órgãos. O número de células expressando moléculas de ativação também estava modificado nos órgãos analisados: observamos uma diminuição no número de células B1a e B2 ativadas no LPe. As células B2 presentes na MO apresentaram um perfil



ativado. Além disso, camundongos SB apresentaram níveis reduzidos de imunoglobulinas IgA, IgM e IgG, sendo que nesta última, os subtipos alterados encontrados foram IgG2b e IgG3. Camundongos SB apresentaram níveis basais alterados de citocinas em extratos de tecidos da MO, timo e LnM. De uma maneira geral camundongos SB produziram níveis reduzidos de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , porém, células dos LnM desses camundongos apresentaram uma produção mais elevada de IFN- $\gamma$ . Ao investigarmos o número de células produtoras de anticorpos também observamos modificações importantes na MO, timo e LnM. Algumas dessas alterações podem ser interpretadas como mecanismos compensatórios ou de adaptação às perturbações causadas pela ausência do baço, órgão envolvido em funções imunológicas centrais. Esses animais de fato se adaptam à ausência do baço já que eles sobrevivem e são capazes de produzir vários tipos de respostas imunes.

## ABSTRACT

The spleen acts as a filter, as it removes the blood cells and micro-organisms and cells covered by antibodies in physiological or pathological conditions. For its location and anatomy, the spleen is the main organ involved in early immune responses to blood-borne antigens. Despite the fact that removal of the spleen is associated with risk of subsequent infection, recommendation for total splenectomy still exists as a therapeutic aid for certain conditions. However, the impact of spleen removal on other lymphoid organs has been poorly evaluated. Herein we evaluate how the immune system reorganize its components in the absence of the spleen by studying the splenectomy in various lymphoid organs and sites 30 days thereafter. Spleen removal affected the immune system as a whole. There was no increase in the number of lymphocytes, either in blood or in the sum of the evaluated organs in splenectomized (SP) mice. However, when organs and sites were analyzed individually, changes in the number of lymphocytes were noticed in bone marrow (BM), thymus, mesenteric lymph nodes (MLn) and peritoneal cavity (PC). Migration studies of injected lymphocytes in SP mice showed a trend of TCD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup> towards BM. B lymphocytes were more widely spread to other organs. The number of cells expressing activation molecules was also changed in SP mice: we observed a decrease in the number of activated B1a and B2 cells in PC, and an increase in activated B2 cells in BM. Moreover, SP mice showed reduced levels of IgA, IgM and IgG, IgG2b and IgG3. SP mice showed altered basal levels of cytokines in tissue extracts of BM, thymus and MLn. In general, SP mice produced low levels of IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$ . However, MLn cells of these mice showed a higher production of IFN- $\gamma$ . Finally, the number of antibody-producing cells in BM, thymus and MLn were also altered in SP mice. Our hypothesis is that some of these changes can be interpreted as compensatory mechanisms needed for adapting to the disturbances caused by the absence of the spleen. Adaptation does occur since splenectomized mice survive and are able to activate several types of immune responses.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O Baço e a cirurgia esplênica: aspectos históricos

Desde os tempos antigos são atribuídas ao baço funções que posteriormente foram comprovadas pela ciência. Contando apenas com o recurso da observação povos antigos descreveram esse órgão corretamente sob o ponto de vista morfológico e funcional (Petroianu *et al.*, 2003).

O documento mais antigo conhecido sobre o baço pertence aos chineses, que o posicionam como um dos quatro órgãos do corpo responsáveis pela defesa do organismo, pelo fornecimento de energia para outros órgãos e pela digestão. Realmente o baço está envolvido em todas essas funções. A começar pela dita defesa, esse órgão é o maior responsável pela remoção de antígenos da circulação através da fagocitose realizada por macrófagos esplênicos. O baço ainda contém cerca de 25% de todos os linfócitos do organismo, nele são produzidas imunoglobulinas além de citocinas. O fornecimento de energia pode ser explicado pelo fato do baço liberar hemácias na circulação de muitos mamíferos quando estes estão em situações que demandam esforço sistêmico. O papel do baço na digestão pode ser relacionado tanto à digestão microscópica exercida pelos macrófagos esplênicos quanto à sua participação na formação de bilirrubinas (Petroianu *et al.*, 2003).

Na cultura hebraica, segundo livros da tradição histórica, o baço seria responsável por produzir o riso e a alegria, mas também possuiria a função de triturar as impurezas do sangue. Além disso, acreditava-se que o baço também era responsável pela sonolência e pela apatia. A primeira indicação de esplenectomia também pertence à história hebraica. A cirurgia teria sido realizada, na época do Rei David, em 50 soldados para que estes pudessem correr com maior velocidade. É interessante considerarmos que naquela época a malária e a esquistossomose mansônica, doenças que provocam a esplenomegalia, eram endêmicas em todo o Oriente Médio. O aumento do baço provocaria anemia pelo armazenamento intenso de sangue e assim explicaria a apatia e a sonolência observadas. Portanto, se a esplenectomia

fosse realizada poderia aumentar o desempenho dos soldados uma vez que o desconforto abdominal e a fraqueza, provocadas pela esplenomegalia e anemia respectivamente, seriam resolvidas e a alegria restabelecida. Este efeito da retirada do baço na melhora do desempenho físico foi comprovado pelas pesquisas realizadas em 1922. Ratos esplenectomizados eram mais velozes e resistentes em corridas quando comparados com ratos que possuíam o baço intacto (McClusky *et al.*, 1999; Wilkins, 2002; Petroianu *et al.*, 2003).

Segundo escritos de Erisistratus, considerado o fundador da anatomia, o baço possuía, como única função, contrabalancear o fígado possibilitando equilíbrio corpóreo e fazendo com que a pessoa não se encurvasse para a direita. É pertinente lembrar que o aumento do baço ocorria em consequência da malária e da esquistossomose, endêmicas no Egito naquela época (século III a.C.). Assim, as dimensões do baço eram consideradas equivalentes às do fígado (Petroianu *et al.*, 2003; Wilkins, 2002).

O primeiro a descrever a cápsula esplênica foi Highmore, mas Marcello Malpighi, fundador da anatomia microscópica foi o responsável pelo grande avanço científico na morfologia esplênica. Seus estudos, realizados por volta de 1686, resultaram no conhecimento sobre a cápsula esplênica e suas inserções intraparenquimatosas sob a forma de trabéculas. Ao comparar o baço a uma fruta, denominou o parênquima de polpa e observou sua divisão em duas partes, que, pela cor encontrada nos cadáveres, foram chamadas de polpa vermelha e polpa branca. Segundo Malpighi, a polpa branca era formada por estruturas que pareciam glândulas que, por não possuir ductos visíveis, lançavam “sombras” na circulação sanguínea (Petroianu *et al.*, 2003; Crosby, 1983; Wilkins, 2002)..

Outro grande momento, a ser destacado ainda sobre a história da morfologia esplênica, foi quando Aschoff e Landau, em 1913, descreveram o sistema reticuloendotelial, no qual o baço se destaca como um dos seus órgãos mais importantes (Petroianu *et al.*, 2003).

A respeito da história da fisiologia esplênica, Platão pode ser citado. Segundo o filósofo, o baço teria como função retirar as impurezas do corpo e principalmente do fígado. Desde essa época (século V a.C.) já estava estabelecida, no ocidente, a função de depuração do organismo exercida pelo

baço, que somente teve sua comprovação científica no século XIX. Estudos científicos iniciados com Ecker e Von Kölliker em 1847 constataram que corpúsculos de hemácias eram removidos da circulação sanguínea e retidos no baço, onde eram destruídos (Petroianu *et al.*, 2003).

O primeiro registro de esplenectomia bem sucedida é atribuído a Adrian Zacarelli, em 1549, que retirara o baço gigante de uma mulher de 24 anos. A cirurgia foi rápida, conduzida sob sedação com várias drogas, incluindo bebida alcoólica, e a evolução da paciente no pós-operatório foi adequada. Em 1578, outra esplenectomia total foi documentada pelo médico Guilielmi Ballonni. Segundo Ballonni, a operação foi realizada por um barbeiro e, diante da vida normal que o paciente teve após a cirurgia, surgiu o questionamento da necessidade do baço para a vida. Ao longo da história, essa dúvida já havia sido levantada por muitos cirurgiões e pesquisadores e infelizmente continua atual e é a principal responsável pelas esplenectomias realizadas indiscriminadamente (Mayo, 1928; Petroianu *et al.*, 2003).

Por causa das importantes funções atribuídas ao baço, o receio de retirá-lo ainda era grande, apesar dos bons resultados obtidos com as esplenectomias. Assim, a partir do século XVII, foram realizados estudos em modelos animais com o objetivo de melhorar a compreensão sobre os efeitos da esplenectomia. Como esses estudos não mostraram adversidades ocasionadas pela retirada do baço, já que os animais continuavam vivos e aparentemente normais, os pesquisadores concluíram que esse órgão de fato não era essencial à vida. Conseqüentemente, a esplenectomia deixou de ser considerada perigosa e passou a ser praticada amplamente não só em casos de traumatismos abdominais, mas também em outras doenças como púrpura trombocitopênica, esferocitose, síndrome de Banti, anemia hemolítica, doença de Gaucher entre outras (Beer, 1928; Petroianu *et al.*, 2003).

Esse conceito permaneceu como um paradigma até que, em 1952, um trabalho publicado por King e Schumacker Jr. demonstrou uma correlação entre a ausência do baço e a ocorrência de “infecções bacterianas fulminantes” em crianças que haviam sido anteriormente esplenectomizadas por esferocitose. A taxa de mortalidade pela infecção alcançava 40% dessas crianças. (King & Schumacker, 1952; Petroianu *et al.*, 2003). Posteriormente, surgiu uma série de relatos de infecções pós-esplenectomia, quadro

caracterizado pelo início súbito, de curso fulminante e mortalidade elevada, sendo 58 vezes mais freqüente em pacientes esplenectomizados do que na população em geral (Morris & Bullock, 1919; Petroianu *et al.*, 2003). Primeiramente a “infecção fulminante pós-esplenectomia” (IFPE) foi relacionada principalmente a crianças que haviam sido esplenectomizadas por desordens hematológicas (Horan & Colebatch, 1962). Posteriormente, em 1973, foi relatado que a “infecção fulminante pós-esplenectomia” era observada também em adultos e que poderia acontecer em qualquer tempo (Singer, 1973). Nos dois primeiros anos, a mortalidade varia de 50 a 75%, mas pode ocorrer quarenta anos mais tarde (Miko, 2001).

Os principais microrganismos responsáveis pelo quadro de infecção fulminante pós esplenectomia são: *Meningococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, sendo o *Pneumococcus* o principal agente causador (Singer, 1973).

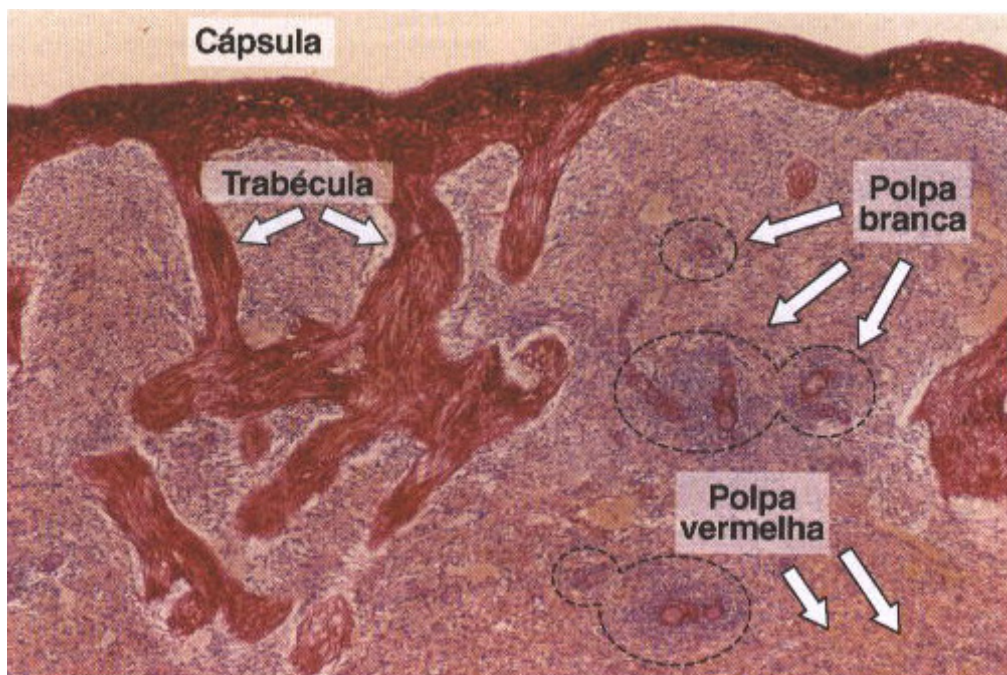
Apesar da remoção cirúrgica do baço estar associada ao risco de infecção subsequente, as indicações para a esplenectomia total continuam existindo para alguns pacientes portadores de determinadas patologias como, por exemplo, púrpura trombocitopênica, esferocitose e pancitopenia (Wallace *et al.*, 1982; Cooper & Williamson, 1984; Peitzman *et al.*, 2001).

## **1.2 O baço: aspectos anatômicos, morfológicos e funcionais.**

O baço é o segundo maior órgão linfóide do organismo, apresenta forma alongada, cor vermelho-púrpura, com diâmetros aproximadamente de 12 x 7 x 4cm. No adulto, pesa entre 100 e 250g e é encontrado no hipocôndrio esquerdo. É o maior órgão do sistema reticuloendotelial, localiza-se em uma região entre a circulação sistêmica e a circulação porta. Recebe sangue arterial principalmente pela artéria esplênica, derivada do tronco celíaco, e a drenagem venosa é processada através da veia esplênica, que forma a veia porta. Em um adulto de 70Kg passam pelo parênquima esplênico 350 litros de sangue a cada 24 horas. (Petroiano *et al.*, 2003). Esse órgão inicia seu desenvolvimento próximo à sexta semana de vida fetal como uma condensação de células mesodérmicas. O evento inicial de formação das células esplênicas é o

desenvolvimento da placa mesodérmica esplênica, derivada do mesoderma adjacente ao estômago e ao pâncreas (Brendolan *et al.*, 2007; Hecksher-Sorensen *et al.*, 2004).

O baço é envolvido por uma cápsula fibrosa, de tecido conjuntivo denso, que origina trabéculas para o interior do órgão, região denominada polpa esplênica. Esse compartimento é dividido em duas partes distintas: a polpa vermelha e a polpa branca (Tischendorf, 1985). A polpa vermelha constitui a maior parte do baço. É a região especializada em remover eritrócitos envelhecidos ou alterados e plaquetas. Nesse compartimento, o sangue arterial chega pelas veias esplênicas aferentes. Dentro da polpa vermelha, há a formação de um arranjo de fibras reticulares, fibroblastos e macrófagos que fagocitam os eritrócitos que passam pelas fibras. A fagocitose de eritrócitos é importante para a reciclagem do ferro (Mebius & Kraal, 2005). Após a fagocitose, os macrófagos funcionam como unidades recicladoras fornecendo matéria-prima para a formação de novos eritrócitos. As hemácias são hidrolisadas nos fagossomos dos macrófagos e o grupo heme derivado dessa lise é catabolizado em biliverdina, monóxido de carbono e íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ). Depois disso, o ferro é distribuído para as demais células ou estocado ligado a ferritina (Knutson & Wessling-Resnick, 2003).



**Figura 1:** Corte do baço onde se observa a cápsula que emite trabéculas para o interior do órgão. A polpa branca, com suas arteríolas, está circundada por uma linha interrompida. A polpa vermelha circunda a polpa branca e ocupa a maior parte do órgão (Junqueira & Carneiro, 2004).

A anatomia da polpa vermelha não é adequada somente para filtrar o sangue, pela combinação de um sistema de vasos venosos abertos, mas também contém macrófagos que possuem propriedades especiais para fagocitar e destruir bactérias e para facilitar o metabolismo do ferro. O ferro é importante tanto para a sobrevivência de bactérias como do hospedeiro. Vários patógenos competem pelo ferro no soro e tecidos secretando moléculas (sideróforos) que possuem uma alta afinidade por essa substância se ligando a ela e transportando-a de volta para a bactéria através de receptores específicos (Ratledge, C. & Dover, L. G., 2000). Após o encontro da bactéria com o macrófago e do início de sua ativação através da sinalização pelos receptores tipo toll (TLR), os macrófagos podem secretar moléculas (lipocalina 2) que seqüestram o ferro ligado aos sideróforos, limitando assim o crescimento bacteriano. (Flo, T. H. *et al.*, 2004). A lipocalina 2 é produzida por várias células mielóides, mas essa produção pode ser facilmente induzida particularmente em macrófagos encontrados na polpa vermelha (Mebius & Kraal, 2005).

A polpa branca consiste de tecido linfóide circundado pela polpa vermelha, sendo o compartimento imunologicamente ativo do baço. Nela são distinguidas três regiões principais: a bainha linfóide periarteriolar (PALS), os folículos linfóides, contidos nas PALS, e a zona marginal, que separa a polpa branca da polpa vermelha (Van Ewijk & Nieuwenhuis P., 1985). Os linfócitos T e B ocupam áreas distintas no baço, sendo as células T encontradas predominantemente na PALS e as células B nos folículos linfóides. A organização e a manutenção da polpa branca são controladas por quimiocinas específicas que atraem células T e B para seus respectivos compartimentos, estabelecendo assim as zonas específicas da polpa branca (Mebius & Kraal, 2005). A zona marginal é uma importante área de passagem de células que deixam a corrente sanguínea e entram na polpa branca. Além de ser uma área de transição, a zona marginal contém um grande número de células residentes que, não só possuem propriedades únicas, como também parecem depender umas das outras para estabelecer e manter a integridade dessa região. Dois subconjuntos de macrófagos podem ser encontrados nesse local. O primeiro subconjunto, constituído de macrófagos denominados macrófagos da zona marginal, forma um anel externo de macrófagos que se caracterizam por



expressar uma lectina tipo C (SIGNR1) e o receptor de macrófago com estrutura de colágeno (MARCO). O segundo subconjunto, constituído de macrófagos denominados macrófagos metalofílicos da zona marginal, está localizado mais próximo da polpa branca, forma um anel interno de macrófagos que expressam a molécula de adesão sialoadesina (SIGLEC1). Entre os dois subconjuntos de macrófagos, são encontradas células B da zona marginal e um subtipo de células dendríticas. Estudos indicam que células B da zona marginal e macrófagos da zona marginal influenciam uns aos outros. Tem sido atribuído aos linfócitos B um papel na organização e integridade da zona marginal. Além disso, estudos demonstram que o receptor de macrófago com estrutura de colágeno (MARCO), expresso em macrófagos da zona marginal, é essencial para a retenção de linfócitos B na zona marginal (Cesta, M. F., 2006; Elomaa, O. *et al.*, 1995; Karlsson, M. C. *et al.*, 2003; Martin, F. & Kearney, J. F., 2002; Mebius & Kraal, 2005).

### **1.3 Componentes imunológicos inatos e adaptativos do baço**

O baço age como um filtro, na medida em que remove do sangue células sanguíneas e microrganismos, bem como células cobertas por anticorpos, em condições fisiológicas ou patológicas (Wolf *et al.*, 1999). Por sua anatomia e localização, o baço é o principal órgão envolvido no início da reatividade imunológica a antígenos presentes na circulação (Tischendorf, 1985).

Uma das atividades importantes de um órgão linfóide secundário é iniciar a reatividade imunológica a antígenos drenados para esse sítio (Van den Eertwegh *et al.*, 1994). No baço, os componentes da reatividade imune inata e adaptativa podem ser eficientemente ativados tornando-o um órgão importante para a homeostase imunológica (Mebius & Kraal, 2005). Células residentes na zona marginal expressam receptores específicos, alguns dos quais exclusivos para essa região, que contribuem para uma eficiente captura de antígenos e patógenos presentes no sangue (Gordon, S., 2002). SIGNR1 e MARCO são receptores específicos da zona marginal que, juntamente com receptores do tipo toll (TLR), reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). O SIGNR1 se liga a antígenos de polissacarídeos, tais como

lipoarabinomanana, que está presente na superfície da *Mycobacterium tuberculosis*, levando à internalização e à degradação do patógeno. SIGNR1 possui importância crucial na captura e destruição de *Streptococcus pneumoniae* além de infecções virais (Geijtenbeek, T. B. et al. 2002; Kang, Y. S. et al., 2003). O receptor MARCO pode reconhecer vários patógenos, entre eles *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Existe um reconhecimento complementar entre os receptores SIGNR1 e MARCO por esses patógenos (Elomaa, O. et al., 1995).

Macrófagos metalofílicos da zona marginal, que expressam a molécula de adesão SIGLEC1, são os principais produtores de interferon- $\alpha$  e  $\beta$  após o contato sistêmico com vírus. Curiosamente, os macrófagos da zona marginal são caracterizados pela falta de expressão de MHC II. Assim, foi proposto que a ativação subsequente de células B da zona marginal ocorre pelo contato com produtos degradados do patógeno que foram opsonizados pelo complemento (Mebius & Kraal, 2005).

As células B da zona marginal detectam com eficiência patógenos presentes no sangue e se ativam de maneira rápida se diferenciando em células produtoras de IgM ou se tornando capazes de funcionar como células apresentadoras de antígenos (Lopes-Carvalho, T & Kearney, J. F., 2004).

Após ativação na zona marginal, algumas células residentes, como as células B e subpopulações de células dendríticas, podem migrar para a polpa branca. Após a captação de antígenos solúveis, células B da zona marginal se transformam em potentes APCs capazes de ativar linfócitos TCD4<sup>+</sup> virgens (Attanavanich, K & Kearney, J. F., 2004).

Após ativação, células dendríticas do sangue, que estão temporariamente presentes na zona marginal, são induzidas a migrar para a polpa branca. Esse processo é crucial para o início da reatividade imune adaptativa (Ato, M., et al., 2002).

A entrada das APCs na polpa branca, em particular na zona de células T (PALS), é um importante passo para o início da reatividade imune envolvendo linfócitos. A organização geral e imunofisiológica da polpa branca é muito semelhante à estrutura e função dos linfonodos. Uma diferença importante é a maneira pela qual os linfócitos entram nos diferentes órgãos linfóides. Nos linfonodos, a maioria dos linfócitos entra através das vênulas de endotélio alto

(HEVs) e dos vasos linfáticos aferentes. No baço, todas as células entram na polpa branca através da zona marginal. Nessa região, células imunes inatas, bem como células B da zona marginal, estão localizadas sendo, por isto, muito efetivas na fagocitose e destruição de patógenos presentes no sangue. No início da ativação dos componentes linfóides da reatividade imunológica, as células dendríticas do sangue são as responsáveis pela captura de antígenos (sejam eles bactérias ou proteínas) e pelo transporte dos mesmos para o baço. Ao entrar no baço, essas células dendríticas medeiam a diferenciação inicial e a sobrevivência de células B para que estas se tornem plasmoblastos produtores de anticorpos. Na entrada das APCs na polpa branca, células T se tornam ativadas resultando em aumento da expressão de CXCR5 e diminuição da expressão de CCR7 por essas células, o que lhes permite migrar para a borda dos folículos linfóides. Nos folículos linfóides, a ligação do receptor antigênico das células B com o antígeno induz o aumento da expressão de CCR7 levando à migração desses linfócitos para a borda dos folículos linfóides, onde recebem auxílio das células T ativadas. Após o contato com as células T ativadas, os linfócitos B trocam de isotipo dentro do folículo linfóide e migram para a polpa vermelha, para a zona marginal ou permanecem nos centros germinativos (Nolte, M. A., et al., 2000; Balazs, M. *et al.*, 2002; Ansel, K. M., *et al.*, 1999; Reif, K. *et al.*, 2002; Pape, K. A. *et al.*, 2003).

O mecanismo preciso que explica a saída de linfócitos da polpa branca e a rota anatômica exata usada por essas células ainda não são conhecidos. Assume-se que os linfócitos deixam a polpa branca através de canais de transição que servem como passagens para a zona marginal e para a polpa vermelha e assim atingir a corrente sanguínea (Mitchell, 1973).

O tipo de reatividade imunológica, desencadeada pela entrada de antígenos no corpo e na circulação, depende do ambiente onde acontecerá a sinapse imunológica, que representa a apresentação antigênica em todos os seus detalhes, e depende também das moléculas e células presentes, induzindo uma eventual resposta ou tolerância a esses antígenos. Vários fatores partícipes desse contexto de ativação são fundamentais na determinação do tipo de reatividade ativada: perfil de citocinas, sinais co-estimuladores, tipos celulares envolvidos e estágio de desenvolvimento dessas células (Vaz *et al.*, 1997; Lanzavecchia & Sallusto, 2001).

#### 1.4 Alterações causadas pela esplenectomia

O papel crucial do baço na proteção contra patógenos presentes no sangue foi demonstrado em estudos de pacientes esplenectomizados e em camundongos que não conseguem montar respostas adequadas aos diversos antígenos bacterianos (Amlot & Hayes, 1985).

A capacidade fagocítica dos macrófagos esplênicos é fundamental para a remoção de bactérias do sangue. Em ratos imunizados com polissacarídeos de pneumococo, a esplenectomia conduz ao acúmulo de polissacarídeos nos linfonodos e à retenção de complexos imunes, aumentada nos folículos dos mesmos (Van den Dobbelsteen et al., 1993).

As principais modificações na resposta imune causadas pela retirada do baço são: aumento do número de leucócitos no sangue periférico (Balsalobre & Carbonell-Tatay, 1991), redução da atividade fagocitária (Shennib *et al.*, 1983), redução da IgM sérica (Drew *et al.*, 1984), menor atividade da via alternativa do complemento e diminuição de substâncias ligadas à ativação de macrófagos, como tuftsina (Spirer *et al.*, 1977).

Estudos que avaliaram as conseqüências imunológicas, em longo prazo, em humanos que sofreram esplenectomia após traumatismo, demonstraram uma redução no percentual de células TCD4<sup>+</sup>, sendo observado um menor percentual da subpopulação de células T virgens CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> na circulação sanguínea (Karakantza *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 1999).

Em relação à produção de citocinas após estimulação com lipopolissacarídeo (LPS), camundongos esplenectomizados mostraram um aumento da capacidade de produção de IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  por macrófagos e uma redução dessa capacidade por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células dos linfonodos mesentéricos. Esses achados sugerem que a esplenectomia modula a função imune de forma distinta nos diferentes compartimentos do organismo (Shih-ching *et al.*, 2004). A esplenectomia não levou a alteração nos níveis séricos da produção de IFN- $\gamma$ , porém foram detectados níveis aumentados de IL-10 em camundongos que receberam tratamento com injeção intravenosa de LPS (Ikuta *et al.*, 2004). Porém, em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* a

esplenectomia promoveu a redução dos níveis séricos de IFN- $\gamma$  (Wood *et al.*, 1984).

Estudos em camundongos com artrite induzida por polímero de peptídeo glicano e polissacarídeo de *Streptococcus pyogenes* demonstraram que a esplenectomia era capaz de promover mudanças na resposta celular, incluindo redução no percentual de monócitos e células T e aumento no percentual de linfócitos B (Kimpel *et al.*, 2003).

Em relação a doenças parasitárias um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que camundongos C57Bl/6 esplenectomizados (SB) são tão resistentes a infecção por *Leishmania major* quanto camundongos da mesma linhagem com baço. Nesse experimento não foi observada diferença no tamanho das lesões, na parasitemia, tampouco na produção de IFN- $\gamma$  entre os grupos SB e controle (Maioli *et al.*, 2007). No entanto, em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* a esplenectomia alterou o desenvolvimento da infecção reduzindo a parasitemia no sangue, mas aumentando a presença de parasitos no fígado. Nos animais esplenectomizados, a concentração de IFN- $\gamma$  estava reduzida não somente no soro, mas também no fígado onde os parasitos se concentraram na ausência do baço (Maioli, 2008).

Outro trabalho realizado em nosso laboratório mostra que a esplenectomia não afeta a indução da tolerância oral a Ovalbumina (Ova), mas leva a uma diminuição da produção de IFN- $\gamma$  pelas células dos linfonodos inguinais estimuladas *in vitro* com Ova (Barsante, 2001).

Muitos estudos foram realizados para avaliar o efeito da esplenectomia pós-traumática, em consequência de doenças auto-imunes e sanguíneas, além de seu efeito em doenças parasitárias. No entanto, as consequências da ausência do baço sobre os órgãos e sítios linfóides têm sido pouco avaliadas. Sabe-se que a retirada do baço afeta a função imune de maneira sistêmica e ao mesmo tempo distinta nos diferentes compartimentos do organismo. Porém, o indivíduo esplenectomizado, mesmo que com limitações e maiores riscos de infecções, sobrevive. Assim, este trabalho busca um melhor entendimento sobre como o sistema imune se reorganiza na ausência do baço através do estudo dos efeitos da esplenectomia na homeostase dos órgãos e sítios linfóides.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Caracterizar os efeitos da esplenectomia na homeostase do sistema imune pela análise das populações linfóides e da atividade dessas células.

### **2.2 Objetivos Específicos**

#### **2.2.1 Caracterizar as populações linfóides em diferentes órgãos e sítios após esplenectomia.**

- Caracterizar, por citometria de fluxo, as populações celulares linfóides ( $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD19^+CD5^+$ ,  $CD19^+CD5^-$ ) nos seguintes órgãos: linfonodos mesentéricos, linfonodos inguinais, placas de Peyer, medula óssea, timo, fígado, sangue e lavado peritonial em camundongos normais e esplenectomizados.

#### **2.2.2 Analisar a dinâmica de distribuição de linfócitos transferidos para animais esplenectomizados.**

- Analisar por citometria de fluxo, através da marcação fluorescente (CFSE), a migração das células  $TCD4^+$ ,  $TCD8^+$  e B, nos órgãos e sítios linfóides de camundongos normais e esplenectomizados.

#### **2.2.3. Analisar os efeitos da esplenectomia na expressão de moléculas de adesão e co-estimuladoras nos linfócitos B1a e B2.**

- Analisar por citometria de fluxo, o perfil das moléculas de adesão  $CD62L$ ,  $\alpha4\beta7$ ,  $CD40$ ,  $CD21$  expressas em células linfóides de camundongos normais e esplenectomizados.

#### **2.2.4. Avaliar os efeitos da remoção cirúrgica do baço na atividade local e sistêmica dos Linfócitos B.**

- a) Analisar o número de células produtoras de imunoglobulinas.
  - Contar através da técnica ELISPOT as células produtoras das imunoglobulinas Ig total, IgG, IgA e IgM na medula óssea, timo e linfonodos mesentéricos.
  
- b) Analisar a produção de imunoglobulinas no soro.
  - Medir através da técnica ELISA as imunoglobulinas IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM e IgE utilizando o soro de camundongos normais e esplenectomizados.

#### **2.2.5. Analisar os efeitos da esplenectomia na produção de citocinas em extratos de tecidos.**

- Medir através da técnica ELISA a produção das citocinas IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$  em extratos de tecidos da medula óssea, timo, linfonodos mesentéricos e soro de camundongos normais e esplenectomizados.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais Experimentais**

Foram utilizados, nesse trabalho, camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com 8 a 10 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central (CEBIO) e mantidos no biotério do Laboratório de Imunobiologia do ICB-UFMG. Os animais permaneceram em ambiente com controle de iluminação e receberam água e comida sem restrições durante todo o tempo do experimento.

O projeto está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo número 10/2007).

#### **3.2 Procedimento Cirúrgico**

Os camundongos foram anestesiados pela via intraperitoneal com uma solução contendo Cloridrato de Ketamina, Cloridrato de 2-(2,6-xilino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina e salina fisiológica 0,9%. Após a anestesia, os baços dos animais foram retirados cirurgicamente através de um corte de 1cm na lateral esquerda do abdome. Posteriormente, o tecido foi suturado com fio cirúrgico de nylon 4.0. Logo após a cirurgia, os animais ficaram aquecidos a 37°C até retornarem da anestesia e depois foram levados para o biotério. A morte de camundongos devido ao procedimento cirúrgico não ultrapassou o limite de 8% do total de animais. Os animais foram deixados 30 dias em recuperação antes da sua utilização nos experimentos porque constatamos, em estudos anteriores do nosso laboratório, que após esse período, não havia nenhum sinal inflamatório no peritônio desses animais (BARSANTE, 2001).

#### **3.3 Preparação de extratos de tecidos**

Os órgãos (medula óssea, timo e linfonodos mesentéricos) foram retirados, imediatamente lavados com PBS 1X gelado, secos, pesados,



picotados e colocados em tampão de extração contendo inibidores de proteases (1ml para cada 100mg de tecido). Em seguida o material foi triturado em um misturador até que se obteve uma solução homogênea. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos e os sobrenadantes coletados e estocados a -20°C para posterior medida de citocinas.

### **3.4 Medida dos níveis de citocinas do sobrenadante de extratos de tecidos por ELISA**

As placas foram sensibilizadas com 100µl/poço de anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) reativos contra IL-4, IL-10, IFN-γ, TGF-β, 1µg/ml, diluídos em tampão de cobertura, e mantidas por toda noite a 4°C. No dia seguinte, foi feito o bloqueio com 200µl/poço de PBS-caseína à temperatura ambiente durante uma hora. Após esse tempo foram adicionados os sobrenadantes coletados dos extratos de tecidos (medula óssea, timo e linfonodos mesentéricos) que foram incubados durante toda a noite a 4°C. No dia seguinte, foram colocados 100µl/poço dos anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) de detecção, específicos para IL-4, IL-10, IFN-γ, TGF-β, de camundongos, marcados com biotina e as placas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em uma diluição de 1:10000 (100µl/poço) foi adicionada e incubada por uma hora a temperatura ambiente. As placas foram reveladas através da incubação com 100µl/poço do substrato da peroxidase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) juntamente com um cromógeno (OPD) diluídos em tampão citrato (100µl/poço). A reação foi interrompida pela adição 20µl/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N), as placas foram lidas no leitor automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando filtro de 492nm. Foram utilizadas curvas padrão obtidas a partir da diluição de concentrações conhecidas de citocinas recombinantes. As concentrações utilizadas para cada citocina foram: IL-4 (1ng/ml), IL-10

(5ng/ml), IFN- $\gamma$  (20ng/ml), TGF- $\beta$  (5ng/ml). Os resultados foram expressos em concentração.

### **3.5 Obtenção dos soros**

Os animais foram previamente anestesiados utilizando 200 $\mu$ l de solução de Cloridrato de Ketamina e Xilazina. Em seguida, o sangue foi coletado através de uma incisão na veia axilar e coletado em tubos cônicos de 1,5ml. Os soros foram obtidos após coagulação por centrifugação a 2500 rpm e estocados a -20°C para posterior análise dos títulos de imunoglobulinas.

### **3.6 Medida dos níveis de imunoglobulinas séricas totais por ELISA**

As microplacas de poliestireno de 96 poços (Sarstedt e NUNC) foram sensibilizadas com 100 $\mu$ l por poço de anticorpos policlonais de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos (1:2000, Southern Biotechnology Associate Inc. ), diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas overnight a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com salina contendo 0,05% Tween-20 (solução salina-Tween) (SIGMA Chemical Co.) e bloqueadas com 200 $\mu$ l por poço de 0,25% caseína diluída em PBS (PBS-caseína) por, no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com salina-Tween, em seguida os soros foram adicionados (100 $\mu$ l por poço) em diluições seriadas (fator 0.5) a partir de 1:40000 para imunoglobulinas totais (Ig) e IgG, 1:2000 para IgM e IgA, e mantidas a 37°C durante uma hora. Para controle positivo foram utilizados anticorpos purificados de camundongos de cada isotipo (Southern Biotechnology Associate Inc.), além do controle negativo da própria placa sem adição de soro (branco). Em seguida as placas foram lavadas com salina-Tween e incubadas com 100 $\mu$ l/poço das soluções de anticorpos policlonais de cabra específicos para cadeias  $\gamma$ ,  $\mu$  e  $\alpha$  ou Ig total ligados à biotina (1:10000) (Southern Biotechnology Associate Inc.), durante uma hora a 37°C. Novamente as placas foram lavadas com salina-Tween e incubadas com 100 $\mu$ l/poço de uma solução de estreptavidina conjugada à

peroxidase (Southern Biotechnology Associate Inc.) em uma diluição de 1:15000 por uma hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com salina-Tween e reveladas com 100µl/poço de uma solução de peróxido de hidrogênio como substrato e OPD como reagente de cor em tampão citrato pH 4,5. Ao final, a reação foi detectada através de uma leitura no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader) usando filtro de 492nm. Os resultados foram expressos em valores de absorbância menos a absorbância do branco.

### **3.7 Medida dos níveis de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 séricas totais por ELISA**

As microplacas de poliestireno de 96 poços (NUNC) foram sensibilizadas com 100µl por poço de anticorpos de cabra anti-imunoglobulinas (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) de camundongos (1:4000, Southern Biotechnology Associate Inc. ), diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas overnight a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com salina-Tween e bloqueadas com 200µl por poço de PBS-caseína por, no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com salina-Tween, em seguida os soros foram adicionados (100µl por poço) em diluições seriadas (fator 0.5) a partir de 1:2000 para IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 e mantidas a 37°C durante duas horas. Para controle positivo foram utilizados anticorpos purificados de camundongos de cada isotipo (Southern Biotechnology Associate Inc.), além do controle negativo da própria placa sem adição de soro (branco). Em seguida as placas foram lavadas com salina-Tween e incubadas com 100µl/poço de solução de anticorpo policlonais de cabra específicos para cadeias  $\gamma$  ligados à HRP (1:10000) (Southern Biotechnology Associate Inc.), durante uma hora a 37°C. Novamente as placas foram lavadas com salina-Tween e reveladas com 100µl/poço de uma solução de peróxido de hidrogênio como substrato e OPD como reagente de cor em tampão citrato pH 4,5. Ao final, a reação foi detectada através de uma leitura no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model

450 Microplate Reader) usando filtro de 492nm. Os resultados foram expressos em valores de absorvância menos a absorvância do branco.

### **3.8 Medida dos níveis de IgE sérica total por ELISA**

As microplacas de poliestireno de 96 poços (NUNC) foram sensibilizadas com 50µl por poço de anticorpo de rato anti-IgE de camundongo (1:250, Southern Biotechnology Associate Inc. ), diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas overnight a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com salina-Tween e bloqueadas com 200µl por poço de PBS-caseína por, no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com salina-Tween, em seguida os soros totais foram adicionados (50µl por poço) e mantidas a temperatura ambiente, protegidas da luz, durante duas horas. Para controle positivo foi utilizado anticorpo purificado de camundongo do isotipo em questão (Southern Biotechnology Associate Inc.), além do controle negativo da própria placa sem adição de soro. Em seguida as placas foram lavadas com salina-Tween e incubadas com 50µl/poço da solução do anticorpo de rato anti-camundongo específico para cadeia  $\epsilon$  ligado à biotina (1:10000) (Southern Biotechnology Associate Inc.), durante uma hora a temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas com salina-Tween e incubadas com 50µl/poço de uma solução de estreptavidina conjugada à peroxidase (Southern Biotechnology Associate Inc.) em uma diluição de 1:15000 por uma hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com salina-Tween e reveladas com 100µl/poço de uma solução de peróxido de hidrogênio como substrato e OPD como reagente de cor em tampão citrato pH 4,5. Ao final, a reação foi detectada através de uma leitura no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader) usando filtro de 492nm. Os resultados foram expressos em valores de absorvância menos a absorvância do branco.

### **3.9 Preparação de suspensão das células linfóides**

### **3.9.1 Meio de cultura**

Foi utilizado meio RPMI 1640 como meio incompleto enriquecido com 2mM de L-glutamina, 50 $\mu$ M de 2-mercapto-etanol, 100U/ml de penicilina, 100 $\mu$ g/ml de fungizona, 1mM de piruvato de sódio, 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 25mM de HEPES e 5-10% de soro fetal bovino inativado.

### **3.9.2 Preparação das suspensões celulares do baço, timo, linfonodos inguinais, linfonodos mesentéricos, placas de Peyer**

As suspensões de células do baço, timo, linfonodos inguinais (Lnl), linfonodos mesentéricos (LnM), placas de Peyer (PP), foram preparadas de acordo com a seguinte técnica padronizada em nosso laboratório:

Os órgãos foram retirados e mantidos em meio incompleto. O baço, timo, LnM foram colocados em macerador de vidro e pressionado em meio incompleto. O Lnl e PP foram macerados utilizando as extremidades ásperas de lâminas de vidro. Posteriormente as suspensões celulares foram transferidas para tubos de 10ml e centrifugadas a 1200 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e as células foram ressuspensas em meio completo e posteriormente foram contadas as células viáveis.

Obs: No caso do baço, desprezar o sobrenadante e acrescentar 9ml de água bidestilada para lisar as hemácias e imediatamente depois, adicionar 1ml de PBS 10X concentrado para restabelecer a osmolaridade e interromper a lise. A suspensão foi centrifugada novamente a 1200 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Desprezar o sobrenadante, ressuspender as células em PBS contendo 2% de BSA e 0,1% de azida e contar as células viáveis.

### **3.9.3 Preparação das suspensões celulares do fígado**

As suspensões de células do fígado foram preparadas de acordo com a seguinte técnica padronizada em nosso laboratório:

O fígado foi picado em pequenos pedaços numa placa de Petri contendo meio completo (5 ml). Esse macerado foi transferido para tubos falcon de 15ml e mantido no gelo. Posteriormente foi adicionada uma solução de colagenase tipo IV e incubada por 60 minutos em estufa a 37°C. Essa mistura foi filtrada e o volume completado para 15ml com PBS. Posteriormente os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 1200rpm a 4°C. As hemácias foram lisadas com tampão de lise (4,5ml de cloreto de amônio em H<sub>2</sub>O e 0,5ml de Tris em H<sub>2</sub>O pH= 7,5) e os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 1200rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS contendo 2% de BSA e 0,1% de azida e as células viáveis foram contadas.

#### **3.9.4 Preparação das suspensões celulares da medula óssea**

As suspensões de células da medula óssea foram preparadas de acordo com a seguinte técnica padronizada em nosso laboratório:

O fêmur foi retirado e lavado inserindo uma seringa contendo 5ml de meio completo na diáfise e na cabeça do osso. A medula óssea foi transferida para um tubo de 15ml utilizando a seringa (ao passar pela agulha a medula óssea é macerada). Os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 1200rpm a 4°C. O sobrenadante descartado, as células foram ressuspensas em PBS contendo 2% de BSA e 0,1% de azida e as células viáveis foram contadas.

#### **3.9.5 Preparação das suspensões celulares do lavado peritoneal**

As suspensões de células do lavado peritoneal foram preparadas de acordo com a seguinte técnica padronizada em nosso laboratório:

O peritônio foi exposto e, utilizando uma seringa, foram injetados 5ml de meio completo na cavidade peritoneal. O abdome foi agitado vigorosamente para facilitar a liberação das células do peritônio. Com a mesma seringa, a solução injetada na cavidade foi coletada e transferida para um tubo de 15ml. Os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 1200rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em PBS contendo 2% de BSA e 0,1% de azida e posteriormente contadas as células viáveis.

### **3.10 Contagem de células viáveis**

Para a contagem de células viáveis, foi utilizado o corante eritrocina que cora células mortas. Foi preparada uma solução estoque contendo 0,8mg/ml de eritrocina em meio RPMI completo. Para a contagem, foi misturado 50µl da suspensão celular em volume igual de eritrocina e esta foi colocada na Câmara de Neubauer. Foram contadas as células não coradas (viáveis) e as células coradas (não viáveis) em um microscópio óptico. O número de células foi calculado pela fórmula:

$n^{\circ} \text{ células/ml} = (n^{\circ} \text{ células viáveis} \times \text{diluição} \times 10^4) / n^{\circ} \text{ de campos contados na Câmara de Neubauer}$

### **3.11 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo**

#### **3.11.1 Análise da expressão de marcadores de população, moléculas de adesão e co-estimuladoras por citometria de fluxo**

As suspensões celulares, obtidas como descrito anteriormente, foram ressuspensas em PBS contendo 2% de soro fetal bovino e 0,1% de azida sódica e ajustadas para  $2 \times 10^7$  células/ml. Os anticorpos monoclonais anti-marcadores fenotípicos, anti-marcadores de adesão e estimulação, marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), CyChrome ou ficoeritrina (PE) foram previamente diluídos em PBS contendo 2% de Albumina Bovina Sérica (SIGMA). Em uma placa com fundo U foram colocados 25µl/poço da suspensão celular juntamente com 10µl/poço de solução de anticorpos. As células e os anticorpos foram então incubados por 30 minutos a 4°C e ao abrigo da luz. Após a incubação as placas foram centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm a 4°C, o sobrenadante foi desprezado por inversão rápida e, em seguida, lavadas com PBS-azida por duas vezes. Ao final as células foram ressuspensas em 200µl de solução fixadora MacFacsFix, e posteriormente foi feita a leitura no citômetro de fluxo.

Para a obtenção dos dados foram utilizadas as seguintes combinações de anticorpos reativos com moléculas da superfície das seguintes células:

CD3FITC / CD4 PE: Subpopulação de linfócitos T CD4.

CD3 FITC / CD8 PE: Subpopulação de linfócitos T CD8.

CD19 Cy : População linfócitos B2.

CD19 Cy / CD5 FITC: População de linfócitos B1;

CD19 Cy / CD62L PE: População linfócitos B2.

CD19 Cy /  $\alpha 4\beta 7$  PE: População linfócitos B2.

CD19 Cy / CD40 PE: População linfócitos B2.

CD19 Cy / CD21 PE: População linfócitos B2.

CD19 Cy / CD5 FITC / CD62L PE: População de linfócitos B1;

CD19 Cy / CD5 FITC /  $\alpha 4\beta 7$  PE: População de linfócitos B1;

CD19 Cy / CD5 FITC / CD40 PE: População de linfócitos B1;

CD19 Cy / CD5 FITC / CD21 PE: População de linfócitos B1;

### **3.12 Preparação das suspensões celulares da medula óssea, timo e baço para transferência**

Camundongos doadores foram sacrificados e tiveram seus órgãos (baço, timo e medula óssea) removidos e colocados em meio de cultura RPMI incompleto (meio RPMI 1640-Gibco BRL) e mantidos sempre em gelo. As suspensões celulares foram obtidas como descrito anteriormente. As suspensões celulares de cada órgão foram agrupadas e as células viáveis foram contadas.

### **3.13 Marcação celular com CFSE (5-and 6-carboxyfluorescein succinimidyl ester)**



As suspensões celulares obtidas como descrito anteriormente foram ressuspensas numa concentração de  $1 \times 10^8$  células/mL em RPMI incompleto. Posteriormente as células foram marcadas com o corante CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) que foi mantido em solução estoque 0,5 mM em dimetilsulfóxido (DMSO) a  $-20^\circ\text{C}$ . As células foram marcadas diluindo-se a solução estoque de CFSE 1000 vezes na suspensão de células (concentração final 0,5  $\mu\text{M}$ ) e incubando 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Após a marcação, soro fetal bovino (FCS) foi adicionado a uma concentração final de 5% e as células foram imediatamente centrifugadas e lavadas com RPMI incompleto. Um total de  $1 \times 10^8$  células viáveis foi injetado, via intravenosa, no plexo retro-orbital de cada camundongo dos grupos controle e sem baço.

### **3.14 Contagem do número de células produtoras de imunoglobulinas através da técnica de ELISPOT**

As suspensões celulares da medula óssea, timo e linfonodo mesentérico foram obtidas como descrito anteriormente. Essa técnica foi realizada da seguinte maneira como padronizado em nosso laboratório:

No primeiro dia placas NUNC foram incubadas com 50 $\mu\text{l}$  por poço de anticorpo policlonal de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongo (1:1500) diluído em tampão K1K2 (pH 8,0; 0,05M) por toda a noite a  $4^\circ\text{C}$ .

No segundo dia as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-TWEEN 0,05% e bloqueadas com 200 $\mu\text{l}$  por poço de PBS-Caseína 0,25%, por uma hora a  $37^\circ\text{C}$ . As placas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS-TWEEN 0,05% e posteriormente foram adicionados nos primeiros poços 200 $\mu\text{l}$ /poço das suspensões celulares na concentração de  $2 \times 10^6$  células/ml. Nos poços restantes foram adicionados 100 $\mu\text{l}$  de meio completo e foram realizadas diluições seriadas (fator 0.5). Para controle negativo da placa em alguns poços não foram adicionadas suspensões celulares. As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 4h. Durante a incubação as placas não foram movimentadas. Após esse período as placas foram lavadas com água-Tween 0,05% mergulhando-as numa cuba por 40 segundos, para que as

células fossem lisadas. Posteriormente as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-TWEEN 0,05%, mergulhando-as numa cuba por 10 minutos. Após as lavagens foram adicionados 50µl/poço de anticorpos biotinizados anti-imunoglobulinas de camundongo, específicos para cada isotipo, diluídos em PBS-Caseína (Ig total, IgG, IGA, IgM). As placas então foram incubadas por uma noite inteira a 4°C.

No terceiro dia as placas foram colocadas a temperatura ambiente por 10 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-TWEEN 0,05%, mergulhando-as numa cuba por 10 minutos. Posteriormente as placas foram incubadas com 50µl/poço de uma solução de estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina (Southern Biotechnology Associate Inc.) em uma diluição de 1:8000, em PBS-Caseína, por uma hora a 37°C. Elas foram lavadas 4 vezes com PBS-TWEEN 0,05%, mergulhando-as numa cuba por 10 minutos. Após esse período as placas foram incubadas com 50µl/poço de uma solução substrato contendo 1mg/ml de BCIP-Sigma B-6149, pH 10,25, por 2 horas a 37°C até que os pontos apareceram. Posteriormente foram lavadas com água destilada e deixadas secando ao ar.

Os pontos foram contados e expressos como o número de pontos/número constante de células (N° pontos/10<sup>6</sup> células).

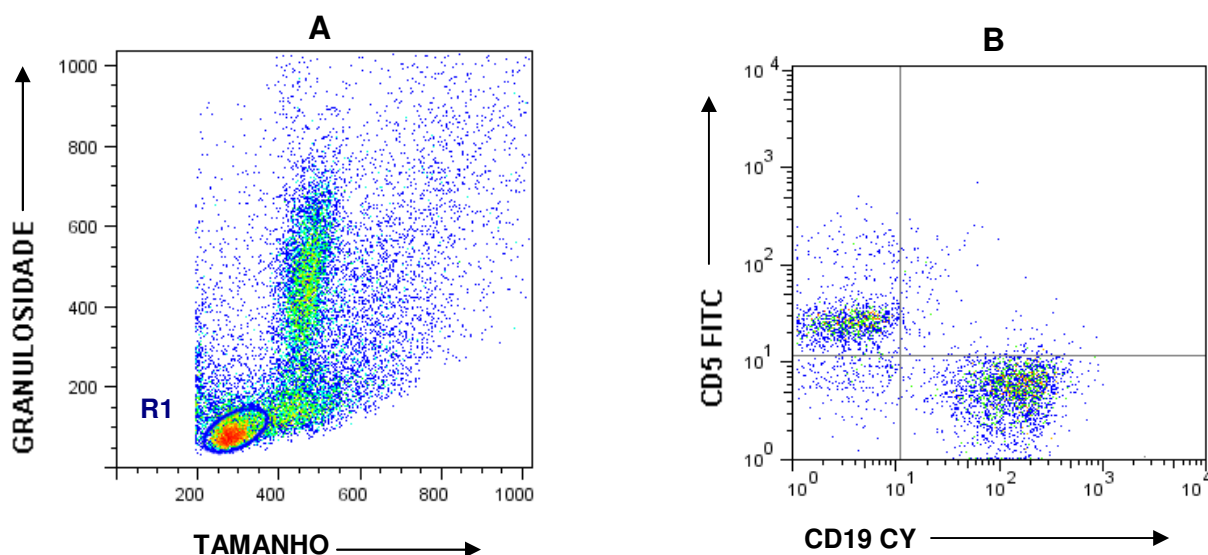
### **3.15 Análise estatística**

A análise estatística de comparação entre os grupos experimentais foi feita através do Teste t de *Student* para computar a diferença ente os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  (95% de confiança). Todos os resultados foram expressos por meio da média  $\pm$  SEM (erro padrão).

### 3.16 Aquisição e análise dos dados em Citometria de Fluxo

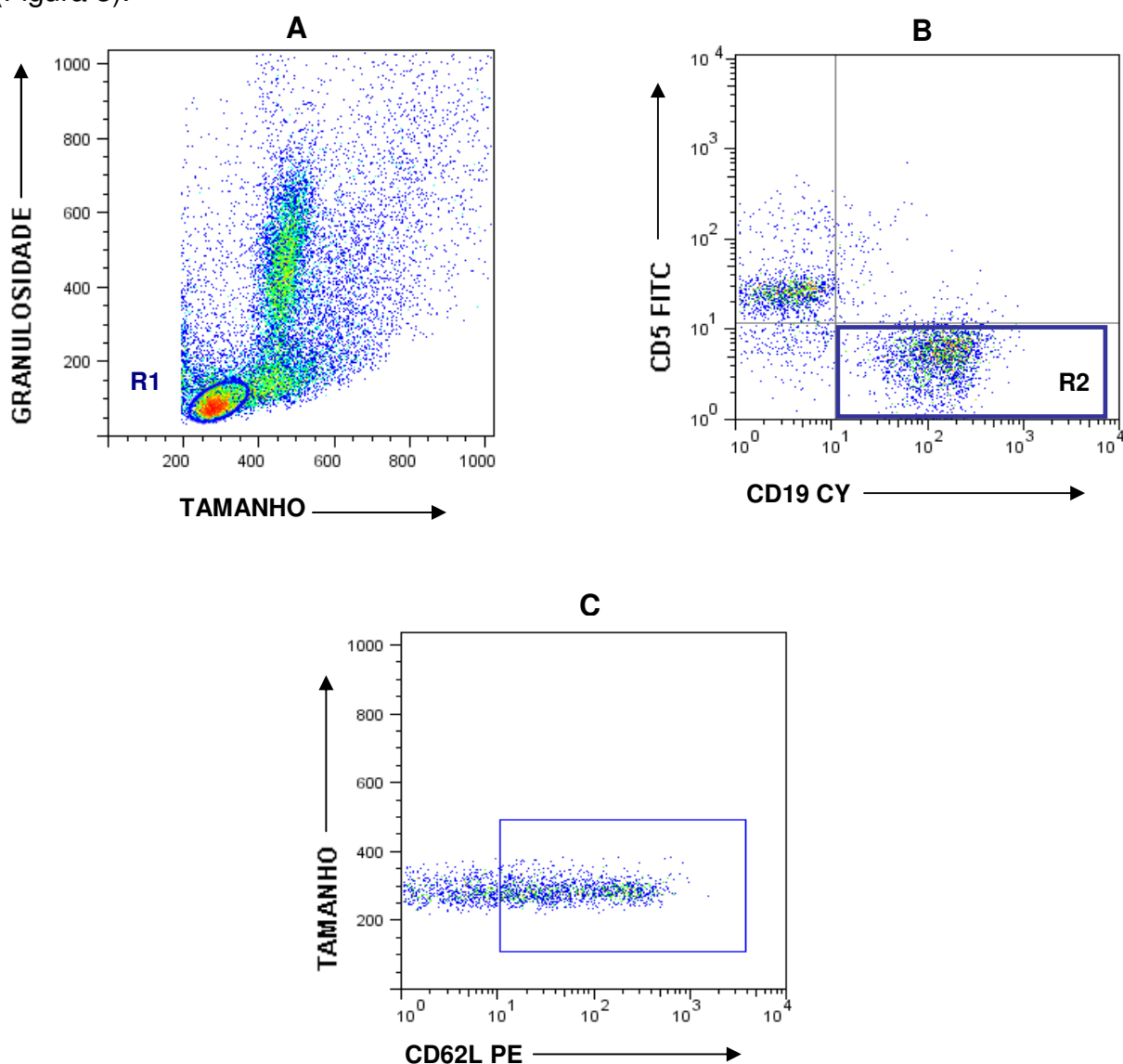
Todas as amostra de células obtidas foram analisadas em citômetro de fluxo FACScan. As análises foram realizadas utilizando-se o software denominado FlowJo. Em todos os experimentos foram coletados 30.000 eventos.

A determinação do fenótipo celular foi realizada como representado na forma esquemática na Figura 2. Primeiro selecionamos a população de linfócitos baseada em aspectos morfométricos através do gráfico tamanho (Dispersão Frontal - FSC - Forward Scatter) *versus* granulosidade (Disperção Lateral - SSC - Side Scatter). Após a seleção da população de linfócitos, utilizando o “gate” R1, outro gráfico bidimensionai de distribuição de fluorescência 1 (FITC) *versus* fluorescência 2 (PE) ou Fluorescência 3 (CY), contendo a população selecionada, foi obtido, e este continha o número absoluto de células das subpopulações fluorescentes.



**FIGURA 2:** Análise de linfócitos da medula óssea. **(A)** Perfil celular da medula óssea em gráfico tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). **(B)** Perfil de análise da população de linfócitos B selecionada no “gate” R1, em gráfico de fluorescência 1 (CD5 FITC) *versus* fluorescência 3 (CD19 CY).

Para a análise do número de linfócitos expressando moléculas de adesão e co-estimuladoras também selecionamos a população de linfócitos baseada em aspectos morfométricos através do gráfico tamanho *versus* granulosidade. Após a seleção da população de linfócitos, utilizando o “gate” R1, outro gráfico bidimensional de distribuição de fluorescência 1 (FITC) *versus* fluorescência 3 (CY), contendo a população selecionada, foi obtido, e este continha o número absoluto de células das subpopulações fluorescentes. Através da seleção da população de interesse CD19<sup>+</sup> (“gate” R2), um terceiro gráfico tamanho *versus* fluorescência 2 (CD62L PE) foi obtido (Figura 3).



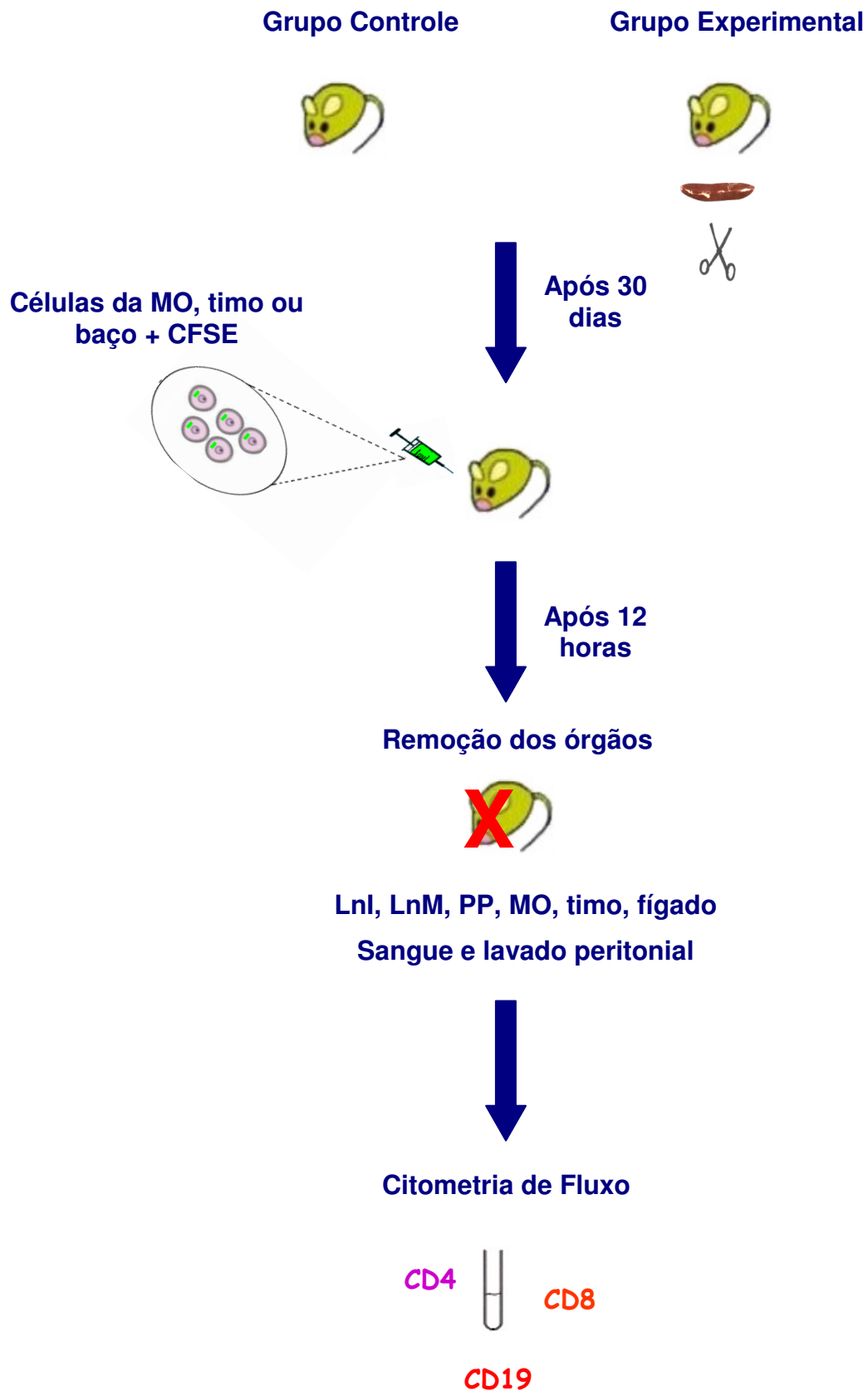
**FIGURA 3:** Análise de linfócitos da medula óssea expressando a molécula CD62L. **(A)** Perfil celular da medula óssea em gráfico tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). **(B)** Perfil de análise da população de linfócitos B selecionada no “gate” R1, em gráfico de fluorescência 1 (CD5 FITC) *versus* fluorescência 3 (CD19 CY). **(C)** Perfil de análise da população de linfócitos CD19<sup>+</sup> selecionada no “gate” R2, em gráfico de tamanho *versus* fluorescência 2 (CD62L PE).

### 3.17 Protocolos Experimentais

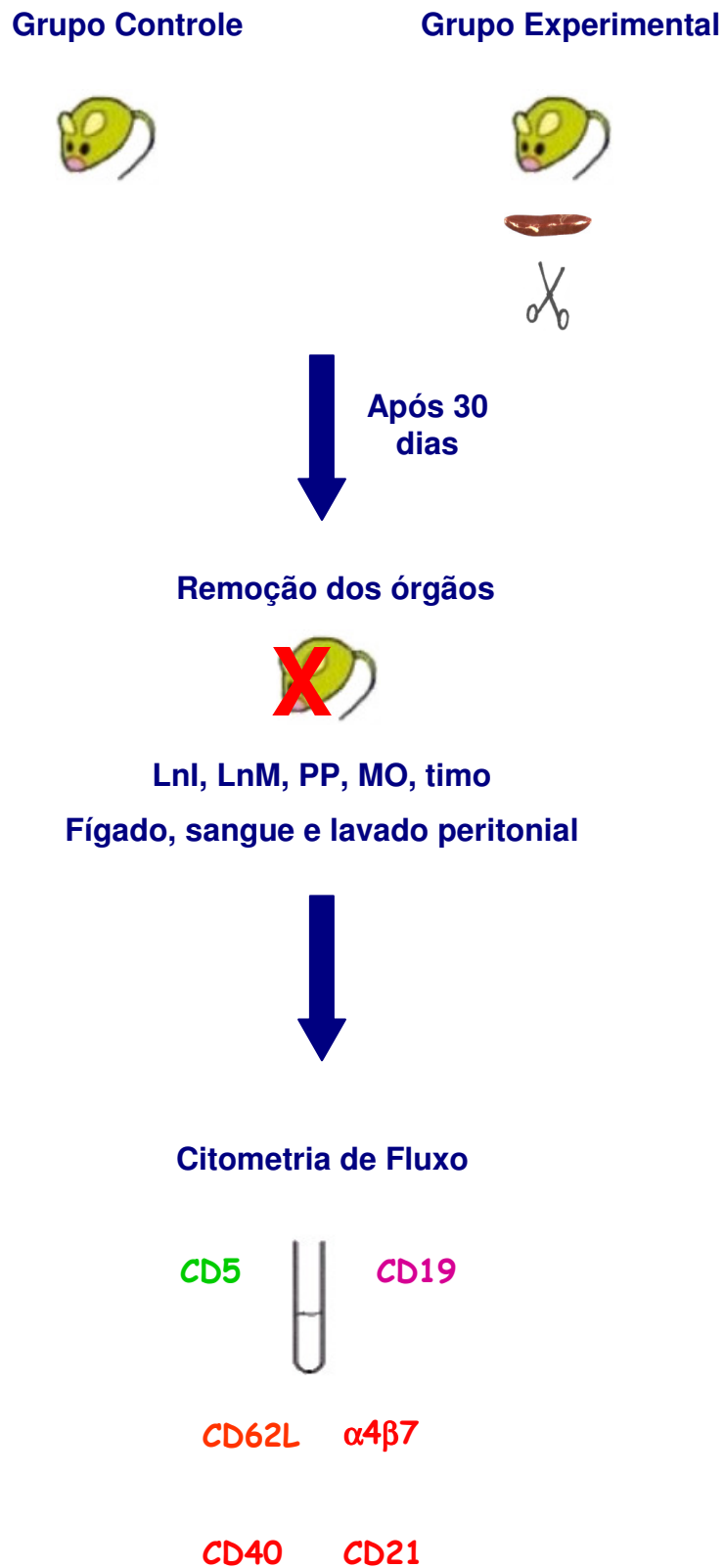
#### 3.17.1 Protocolo 1: Caracterização das populações linfóides em diferentes órgãos após esplenectomia.



**3.17.2 Protocolo 2: Análise da dinâmica de distribuição de linfócitos transferidos para animais do grupo controle e esplenectomizado.**

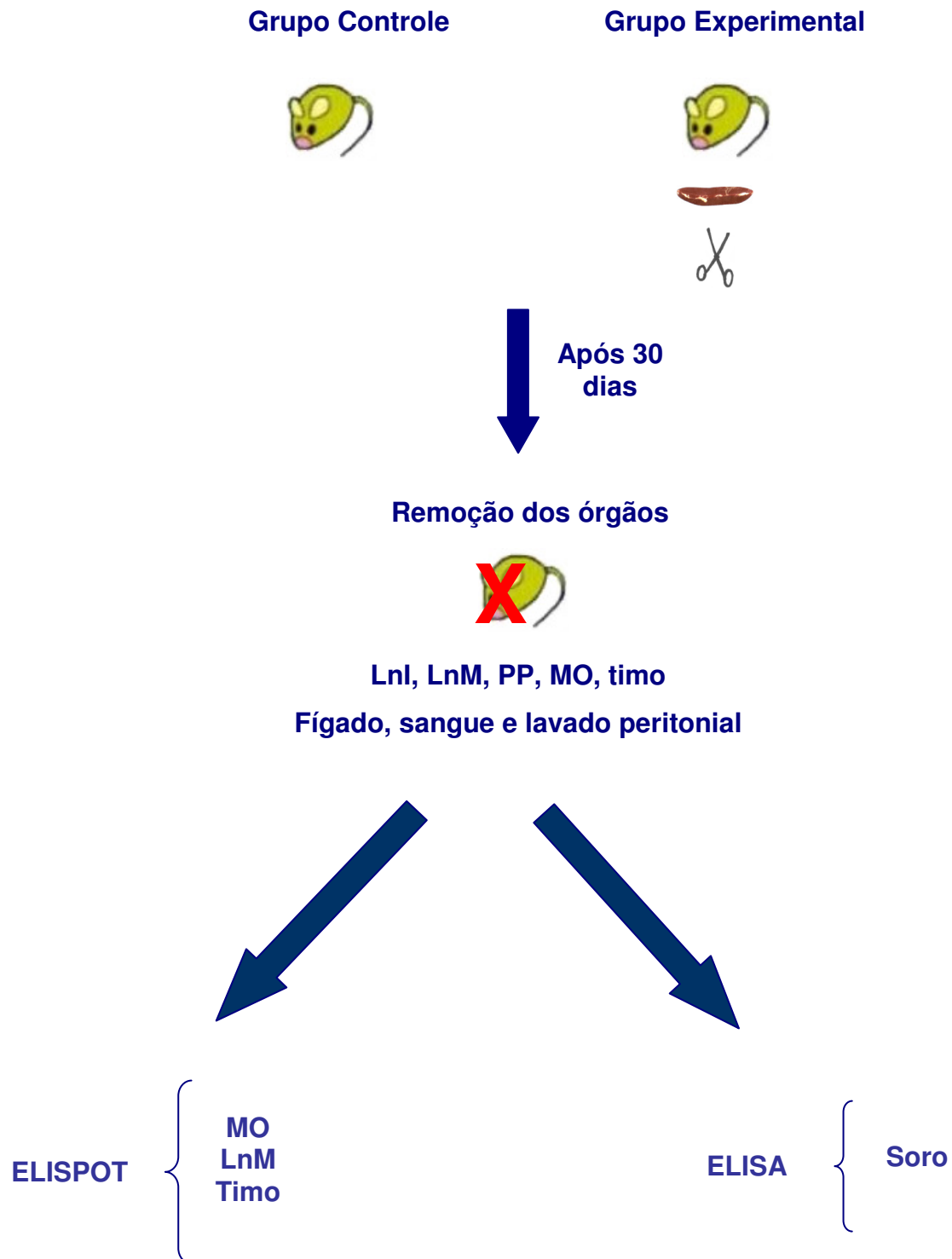


**3.17.3 Protocolo 3: Análise da expressão de moléculas de adesão e co-estimuladoras nos linfócitos B1a e B2.**



### 3.17.4 Protocolo 4: Avaliação da atividade local e sistêmica dos Linfócitos

B.

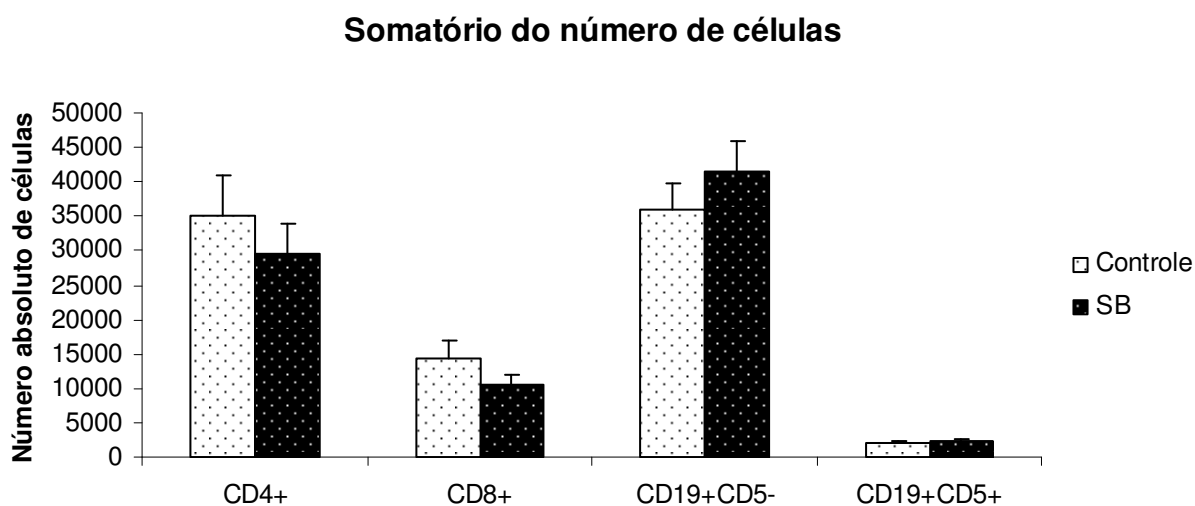




## 4. RESULTADOS

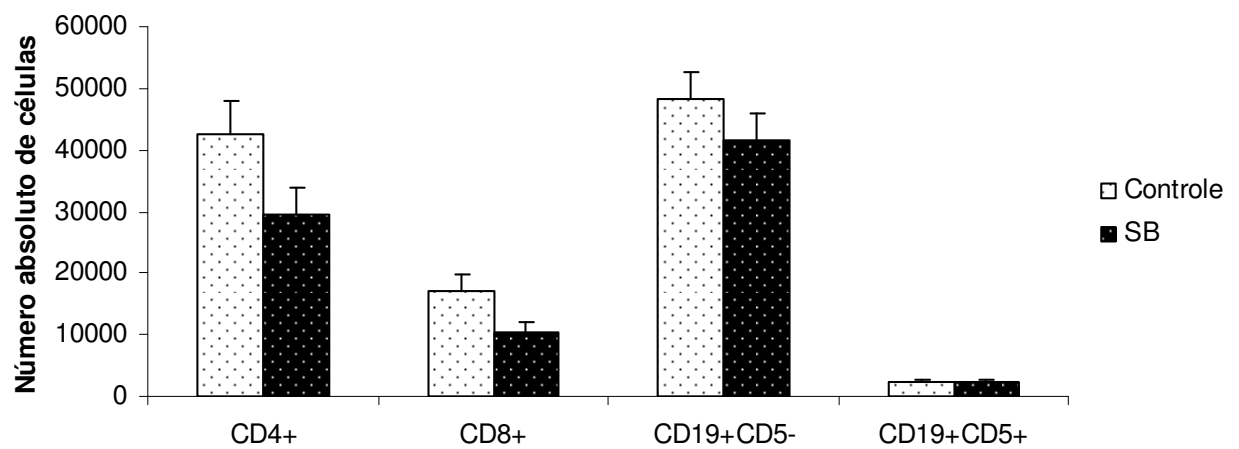
### 4.1 Após a esplenectomia, o sistema imune foi capaz de recompor a coleção de células linfóides.

Para verificarmos se o organismo, após a cirurgia de remoção do baço, era capaz de recompor em termos numéricos as populações linfóides, analisamos o número de células dessas principais populações - CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (LTCD4), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (LTCD8), CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (B1a) e CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> (B2) - em vários órgãos utilizando a técnica citometria de fluxo. A esplenectomia total foi feita e após 30 dias os animais foram sacrificados e a medula óssea (MO), timo, linfonodos mesentéricos (LnM), linfonodos inguinais (LnI), placas de Peyer (PP), fígado, sangue e lavado peritonial (LPe) foram retirados. Observamos que os animais esplenectomizados não apresentaram diferenças no número de células linfóides quando comparados com animais do grupo controle (Figura 4 e 5).



**Figura 4: Somatório do número absoluto de células linfóides da medula óssea, timo, LnM, LnI, PP, fígado, sangue e lavado peritonial.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e, após trinta dias, tiveram seus órgãos removidos. Células de ambos os grupos foram quantificadas através da citometria de fluxo. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo.

### Somatório do número de células com o baço



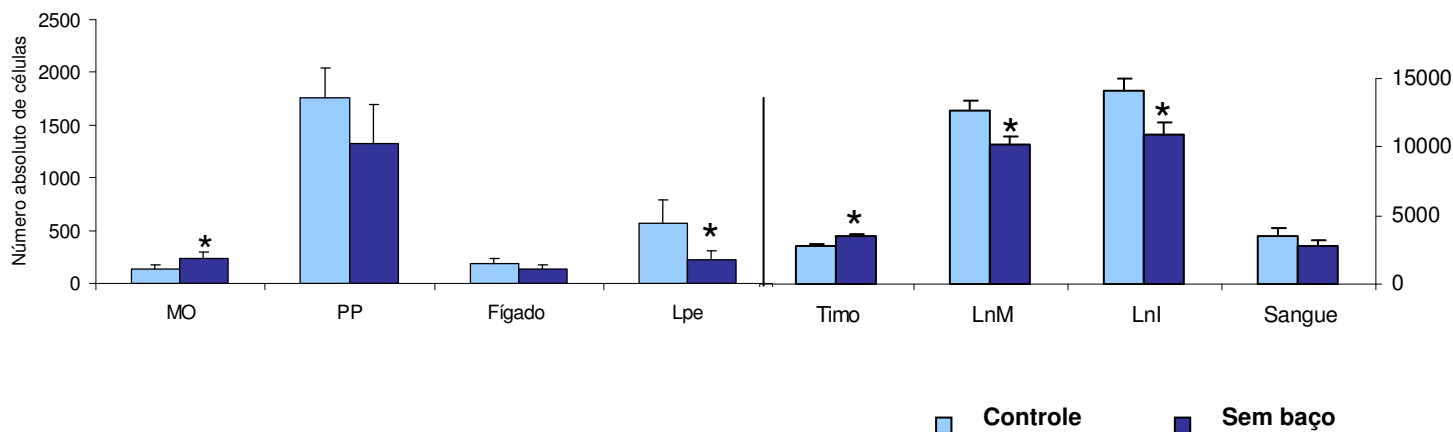
**Figura 5: Somatório do número absoluto de células linfóides do baço, medula óssea, timo, LnM, Lnl, PP, fígado, sangue e lavado peritonial.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e após trinta dias tiveram seu órgão removido. Células de ambos os grupos foram quantificadas através da citometria de fluxo. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo.

## 4.2 O número de linfócitos em cada órgão se alterou após a esplenectomia.

Através da citometria de fluxo, analisamos as populações celulares LTCD4, LTCD8, B1a e B2 da MO, timo, LnM, LnI, PP, fígado, lavado peritoneal, e sangue após esplenectomia. Observamos uma distribuição diferenciada das populações linfóides em cada órgão (Figuras 6, 7, 8 e 9).

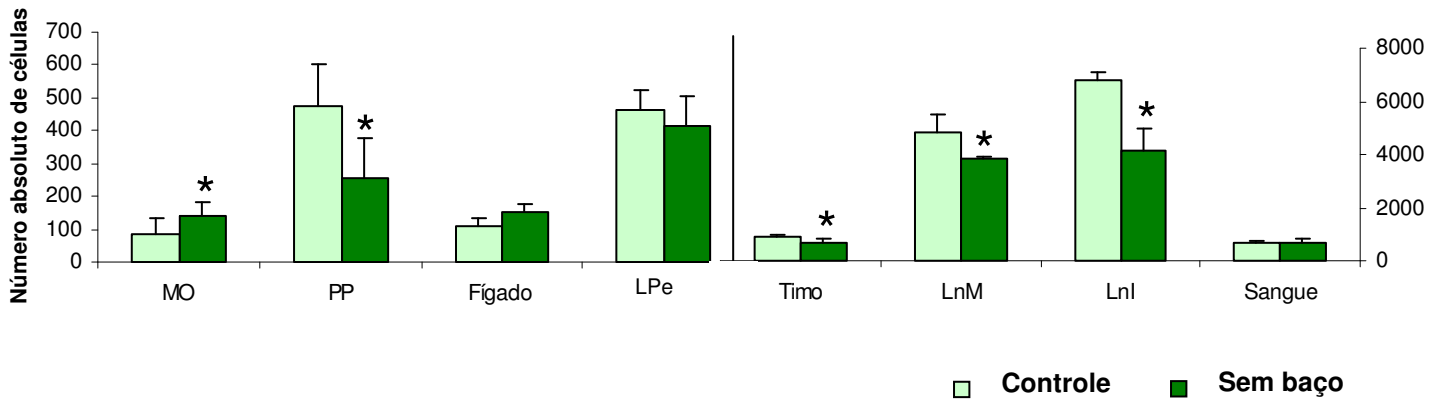
Em animais esplenectomizados, houve um aumento do número de células CD4<sup>+</sup> na MO e timo e uma redução no LPe, LnM e LnI (Figura 6). Quando avaliamos a população celular TCD8<sup>+</sup>, observamos um aumento dessas células na MO e uma diminuição no timo, LnM, LnI e PP (Figura 7).

### Células CD4<sup>+</sup> em diversos órgãos após esplenectomia



**Figura 6: Número absoluto de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> na MO, timo, LnM, LnI, PP, fígado, sangue e lavado peritoneal.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e após trinta dias tiveram seus órgãos removidos. Células de ambos os grupos foram fenotipadas através da citometria de fluxo. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \* p < 0,05.

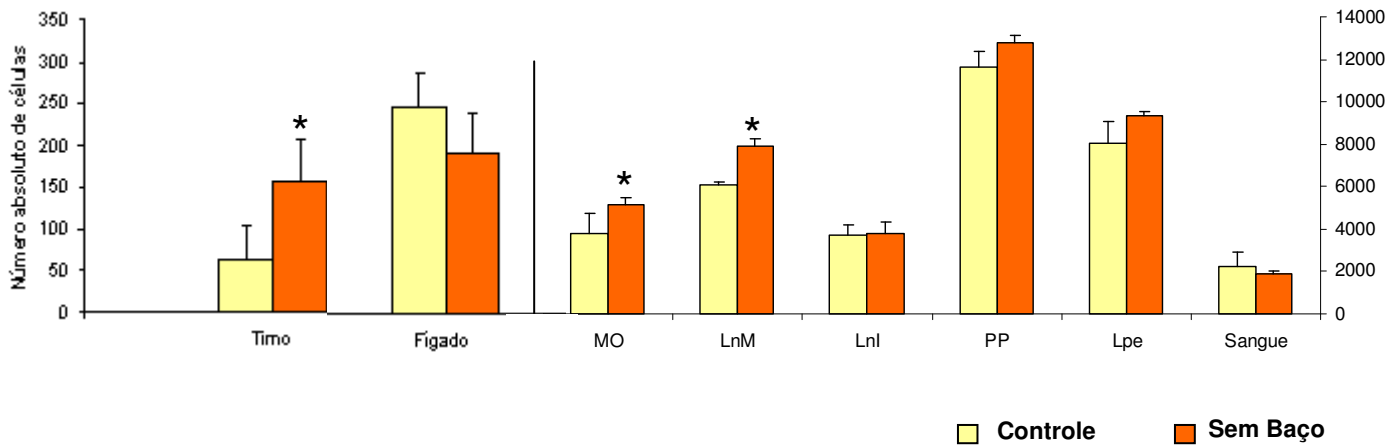
### Células CD8<sup>+</sup> em diversos órgãos após esplenectomia



**Figura 7: Número absoluto de células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> na MO, timo, LnM, LnI, PP, fígado, sangue e lavado peritoneal.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e após trinta dias tiveram seus órgãos removidos. Células de ambos os grupos foram quantificadas através da citometria de fluxo. As barras apresentam a média aritmética ± erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \* p < 0,05.

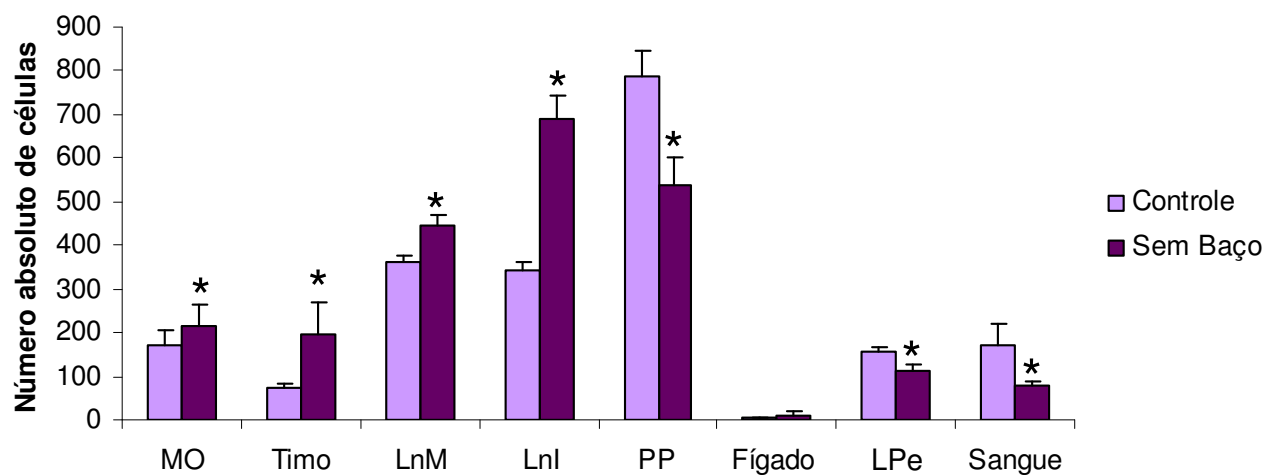
A análise da população B2 (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>) demonstrou um aumento no número desses linfócitos na MO, LnM e, inesperadamente, no timo (Figura 8). Em camundongos esplenectomizados, a população B1a (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) também aumentou na MO, timo, LnM além de Lnl, porém, sofreram uma redução nas PP, LPe e sangue (Figura 9).

### Células CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> em diversos órgãos após esplenectomia



**Figura 8: Número absoluto de células CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> na MO, timo, LnM, Lnl, PP, fígado, sangue e lavado peritoneal.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e após trinta dias tiveram seus órgãos removidos. Células de ambos os grupos foram quantificadas através da citometria de fluxo. As barras apresentam a média aritmética ± erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \* p < 0,05.

### Células CD19+CD5+ em diversos órgãos após esplenectomia



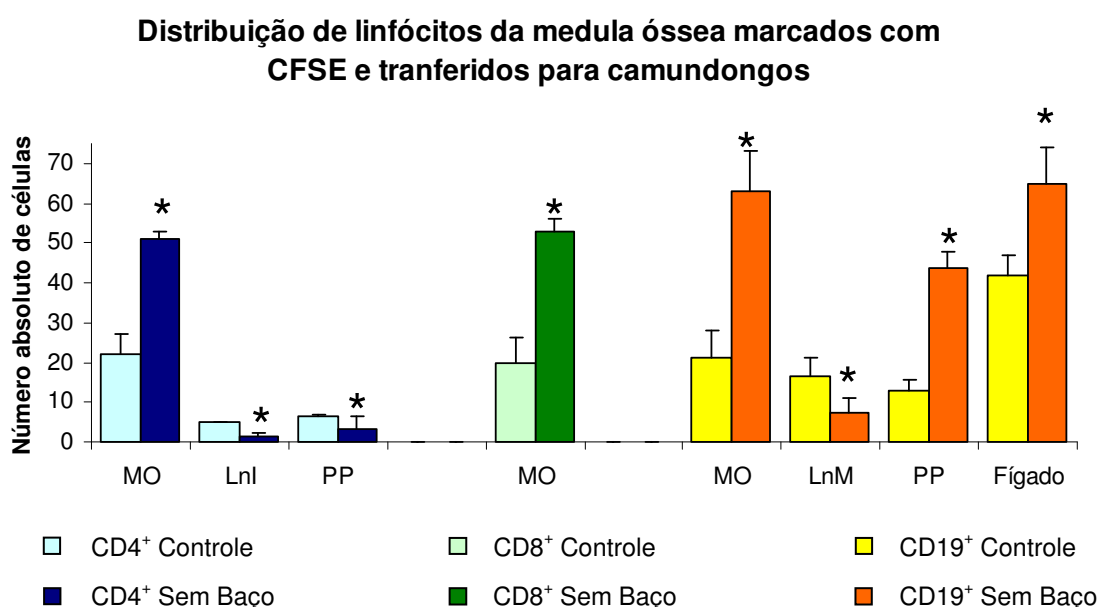
**Figura 9: Número absoluto de células CD19+CD5+ na MO, timo, LnM, LnI, PP, fígado, sangue e lavado peritoneal.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e após trinta dias tiveram seus órgãos removidos. Células de ambos os grupos foram quantificadas através da citometria de fluxo. As barras apresentam a média aritmética ± erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \* p < 0,05.

### 4.3 A distribuição dos linfócitos transferidos para animais esplenectomizados foi alterada.

Para investigar a dinâmica de distribuição dos linfócitos após a retirada do baço, células marcadas com CFSE, da medula óssea, do timo e do baço foram transferidas para camundongos do grupo controle e esplenectomizados. Após 12 horas, os órgãos foram removidos e a quantificação das células linfóides foi realizada por citometria de fluxo. Ressaltamos que foi utilizado esse prazo de 12 horas porque, durante a padronização dessa técnica, constatamos que nesse tempo as células marcadas com CFSE analisadas, eram as células transferidas, uma vez que não foi observada proliferação celular.

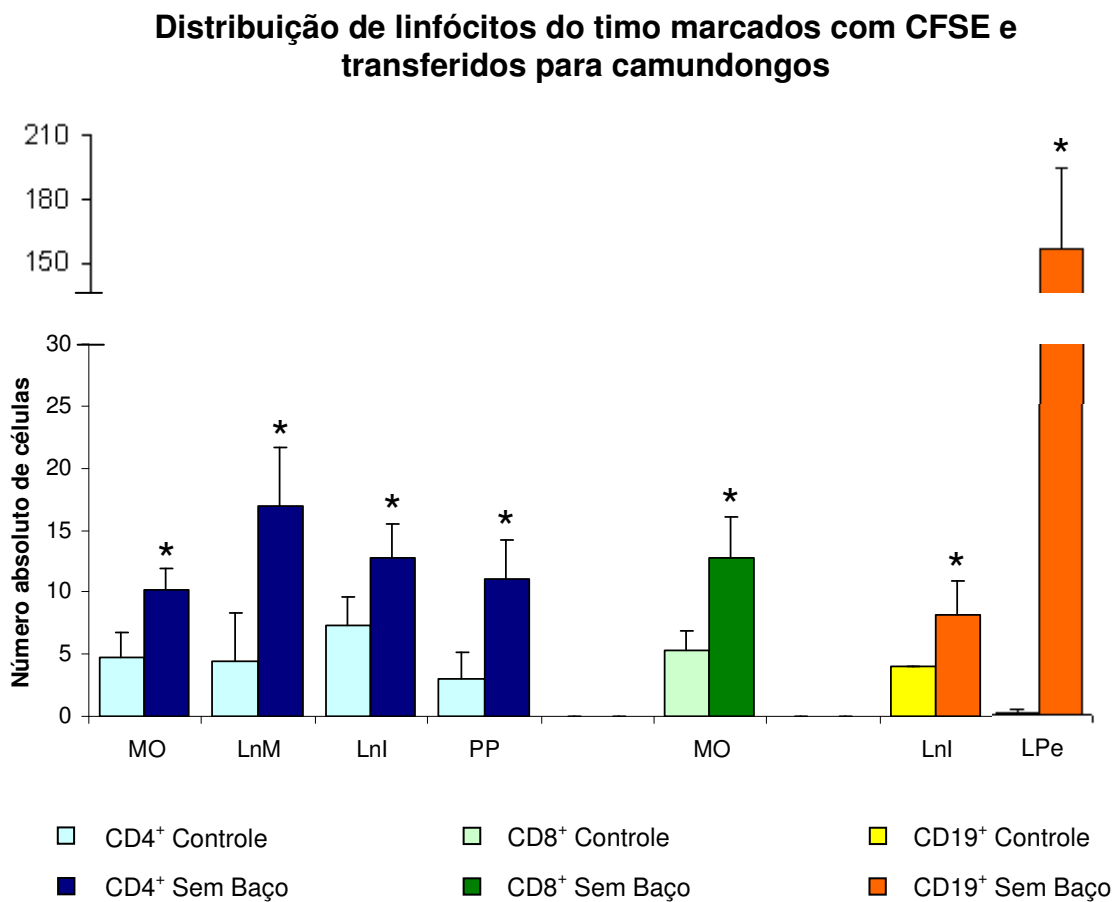
As figuras 10, 11 e 12 mostram uma distribuição alterada das populações linfóides no grupo esplenectomizado. Apenas os resultados significativos estão representados.

Quando transferimos células da medula óssea marcadas com CFSE, observamos que os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> migraram preferencialmente para a MO. Sendo notada uma redução do número de células CD4<sup>+</sup> nos LnI e PP. Os linfócitos B estavam em maior número na MO, fígado e nas PP e em menor número nos LnM (Figura 10).



**Figura 10: Número absoluto de linfócitos TCD4, TCD8 e B da medula óssea, marcados com CFSE, transferidos para animais dos grupos controle e esplenectomizado.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados. Após trinta dias, células da MO marcadas com CFSE foram transferidas. Após 12h tiveram seus órgãos removidos. As células de ambos os grupos foram quantificadas através da citometria de fluxo. Foram representados somente os órgãos que apresentaram diferença entre os grupos. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \* p < 0,05.

A análise da distribuição de células do timo marcadas com CFSE também revelou uma alteração em todas as populações nos animais esplenectomizados. O número de linfócitos TCD4<sup>+</sup> estava aumentado na MO, LnM, LnI e PP. As células CD8<sup>+</sup> do timo migraram preferencialmente para a MO. Curiosamente, observamos um aumento da população B, proveniente do timo, nos LnI e LPe (Figura 11). Apenas os resultados significativos estão representados.

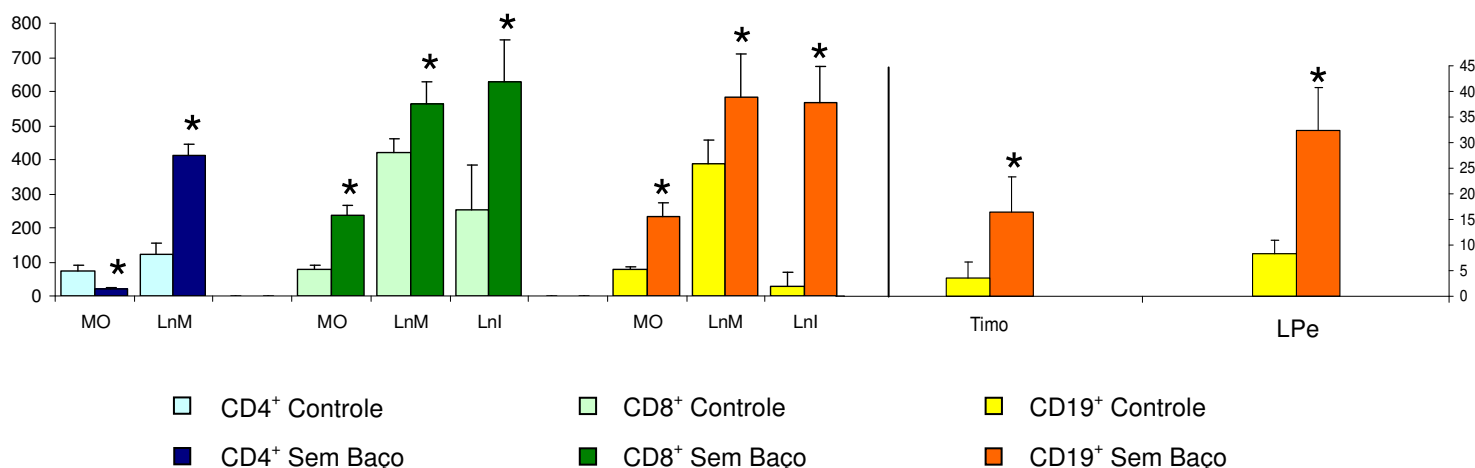


**Figura 11: Número absoluto de linfócitos TCD4, TCD8 e B do timo marcados com CFSE e transferidos para animais dos grupos controle e esplenectomizado.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados. Após trinta dias, células do timo marcadas com CFSE foram transferidas. Após 12h tiveram seu órgão removido. As células de ambos os grupos foram quantificadas através da citometria de fluxo. Foram representados somente os órgãos que apresentaram diferença entre os grupos. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \* p < 0.05.



Também avaliamos a distribuição de células do baço marcadas com CFSE e transferidas para camundongos do grupo controle e SB. Houve um aumento do número de células CD4<sup>+</sup> nos LnM e uma redução na MO de camundongos SB. As células CD8<sup>+</sup> do baço migraram para a MO, LnM e LnI. Linfócitos B no grupo SB se distribuíram mais amplamente, para a MO, timo LnM, LnI e LPe (Figura 12). Apenas os resultados significativos estão representados.

### Distribuição de linfócitos do baço marcados com CFSE e transferidos para camundongos

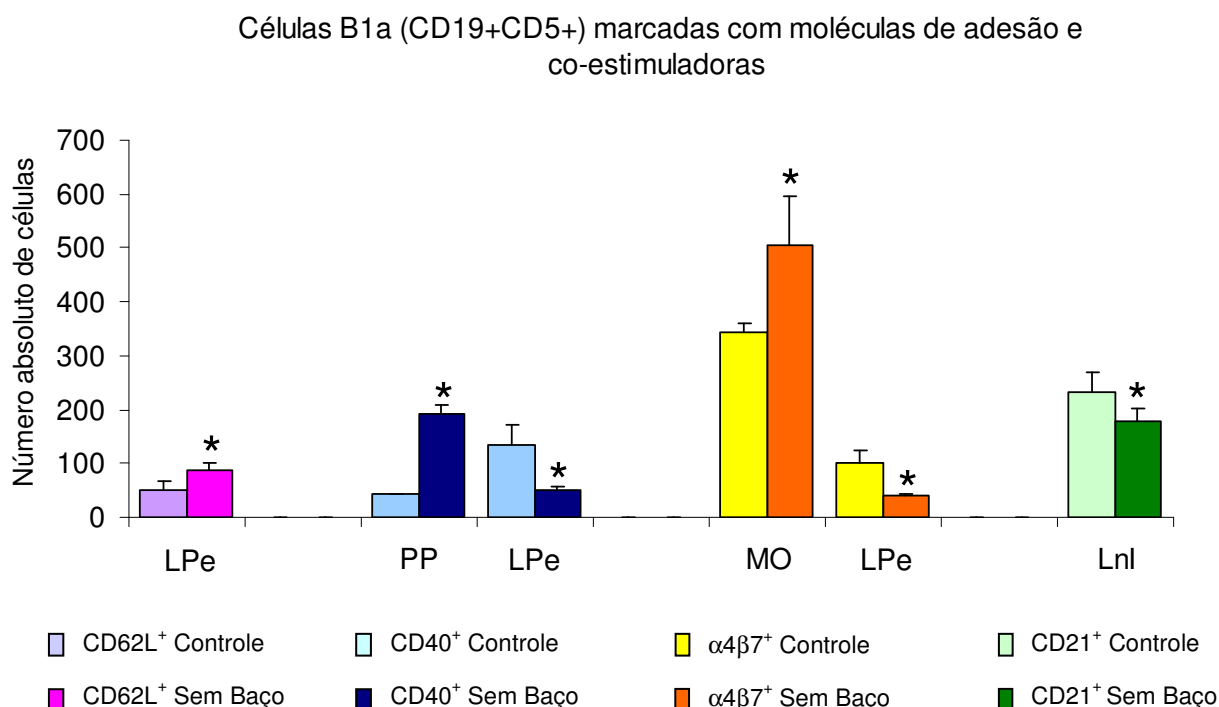


**Figura 12: Número absoluto de linfócitos TCD4, TCD8 e B do baço, marcados com CFSE, transferidos para animais dos grupos controle e esplenectomizado** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados. Após trinta dias, células do baço marcadas com CFSE foram transferidas. Após 12h tiveram seus órgão removidos. As células de ambos os grupos foram quantificadas através da citometria de fluxo. Foram representados somente os órgão que apresentaram diferença entre os grupos. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \* p < 0,05.

#### 4.4 A esplenectomia alterou o número de linfócitos B1a e B2 expressando moléculas de adesão e co-estimuladoras.

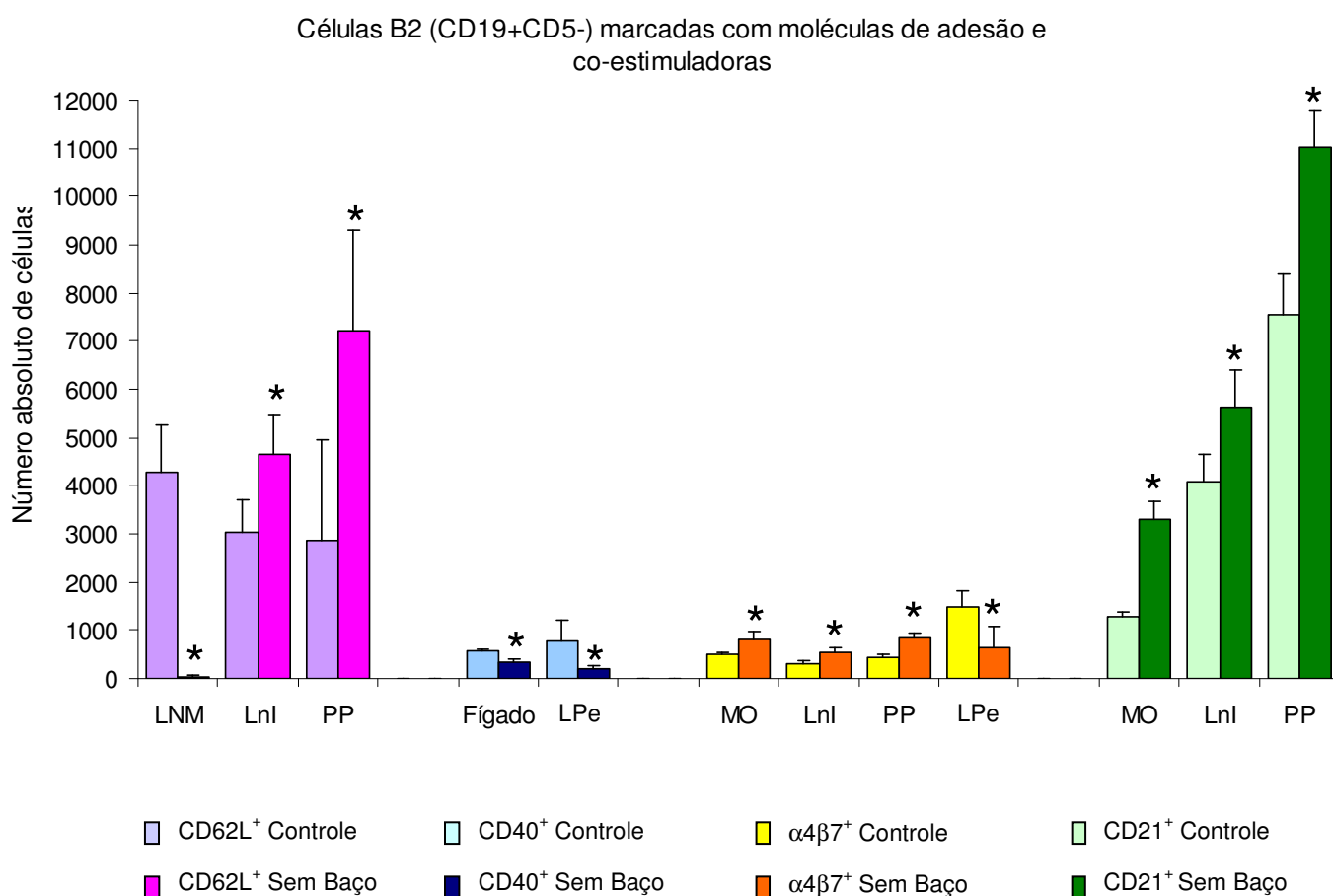
Para investigarmos o efeito da esplenectomia no perfil de ativação das populações linfóides B1a e B2, avaliamos a expressão das seguintes moléculas: CD62L,  $\alpha 4\beta 7$ , CD40 e CD21. Os órgãos foram removidos após 30 dias da cirurgia de retirada do baço e as populações celulares foram quantificadas. Apenas os resultados significativos estão representados.

O número de células B1a marcadas com CD62L no LPe estava aumentado e o número dessas células que expressavam CD40 e  $\alpha 4\beta 7$  estava diminuído, em camundongos SB. Nas PP e MO observamos um aumento de células expressando CD40 e  $\alpha 4\beta 7$  respectivamente. Nos Lnl houve uma diminuição do número de células marcadas com CD21 (Figura 13).



**Figura 13: Número absoluto de linfócitos B1a expressando moléculas de adesão CD62L,  $\alpha 4\beta 7$ , e co-estimuladoras CD40 e CD21.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e após trinta dias tiveram seus órgãos removidos. Células de ambos os grupos foram fenotipadas através da citometria de fluxo. Foram representados somente os órgãos que apresentaram diferença entre os grupos. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \* p < 0,05.

Quando analisamos os linfócitos B2 observamos que nos LnI e nas PP houve um aumento no número dessas células marcadas com CD62L,  $\alpha 4\beta 7$  e CD21. Nos LnM e no fígado houve uma diminuição do número de células marcadas com CD62L e CD40 respectivamente. Também observamos que no LPe o número de linfócitos B2 expressando as moléculas CD40 e  $\alpha 4\beta 7$  estava diminuído no grupo SB, Na MO observamos um aumento de células expressando  $\alpha 4\beta 7$  e CD21 (Figura 14). Esses resultados indicam que os órgãos, de camundongos SP, apresentam um perfil de ativação das células B1a e B2 alterado.

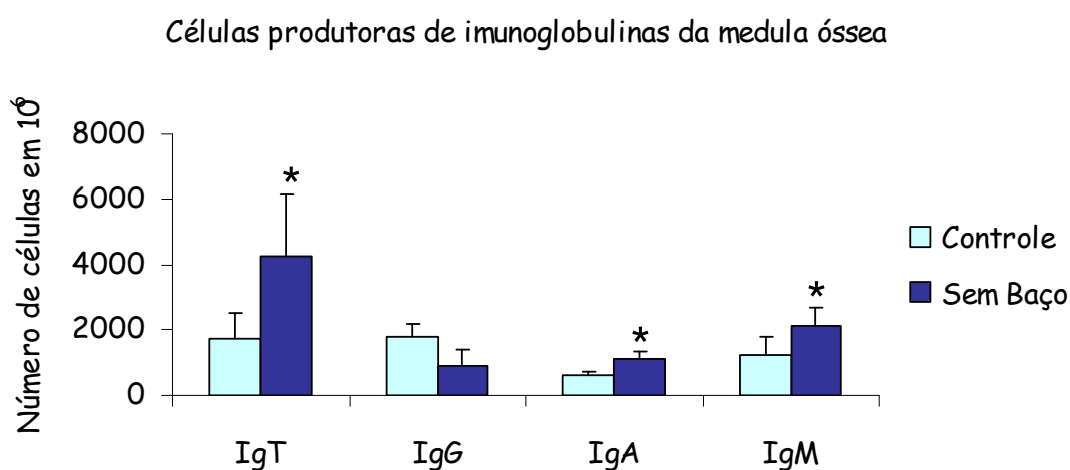


**Figura 14: Número absoluto de linfócitos B2 expressando moléculas de adesão CD62L,  $\alpha 4\beta 7$ , e co-estimuladoras CD40 e CD21.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e após trinta dias tiveram seus órgãos removidos. Células de ambos os grupos foram fenotipadas através da citometria de fluxo. Foram representados somente os órgãos que apresentaram diferença entre os grupos. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \* p < 0,05.

#### 4.5 A atividade local e sistêmica dos linfócitos B é afetada pela ausência do baço.

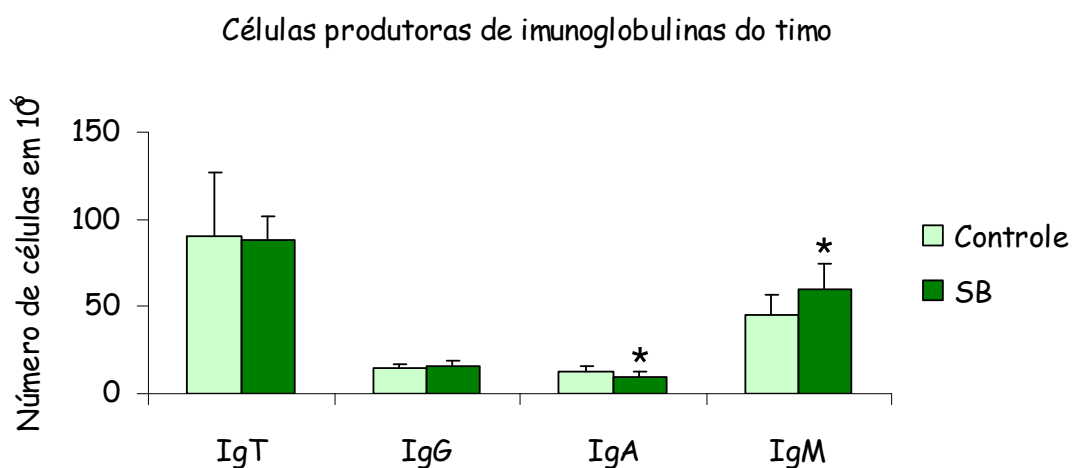
Uma vez que observamos alteração no perfil de ativação dos linfócitos B, resolvemos analisar a atividade dessas células. Para investigar a atividade local dos linfócitos B, analisamos o número de células produtoras de anticorpos, pela da técnica ELISPOT, na medula óssea, timo e linfonodos mesentéricos. Para analisarmos se a atividade sistêmica dessas células estava alterada avaliamos os níveis de imunoglobulinas do soro utilizando a técnica ELISA.

A Figura 15 mostra que na MO de camundongos SB houve um aumento do número de células produtoras de anticorpos IgA e IgM, refletindo no número total de células produtoras de Ig.



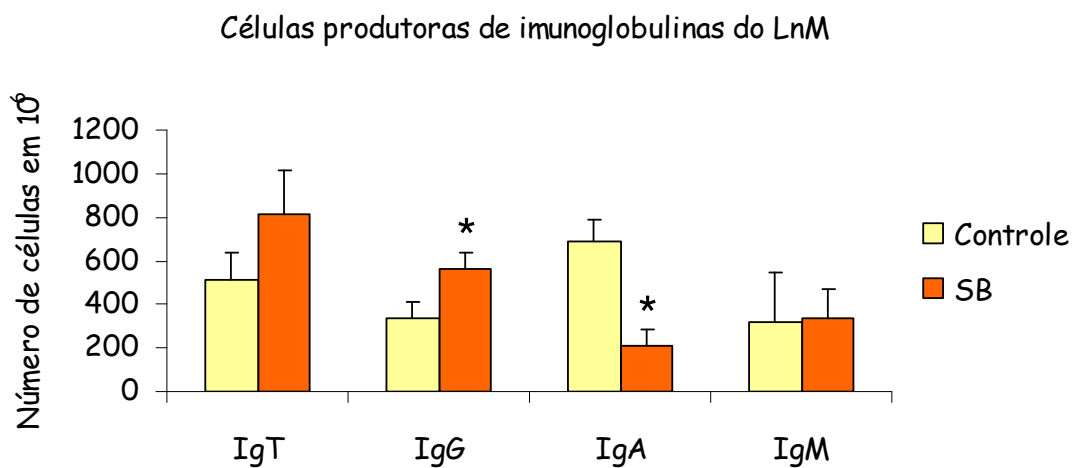
**Figura 15: Número de células produtoras de Ig, IgG, IgA e IgM na medula óssea.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados. Após trinta dias a MO foram removidos e as células produtoras de imunoglobulinas foram mensuradas por ELISPOT. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \*  $p < 0,05$ .

Quando avaliamos o timo, as células produtoras de IgM estavam em maior número, porém, as produtoras de IgA sofreram uma diminuição no grupo SB (Figura 16).



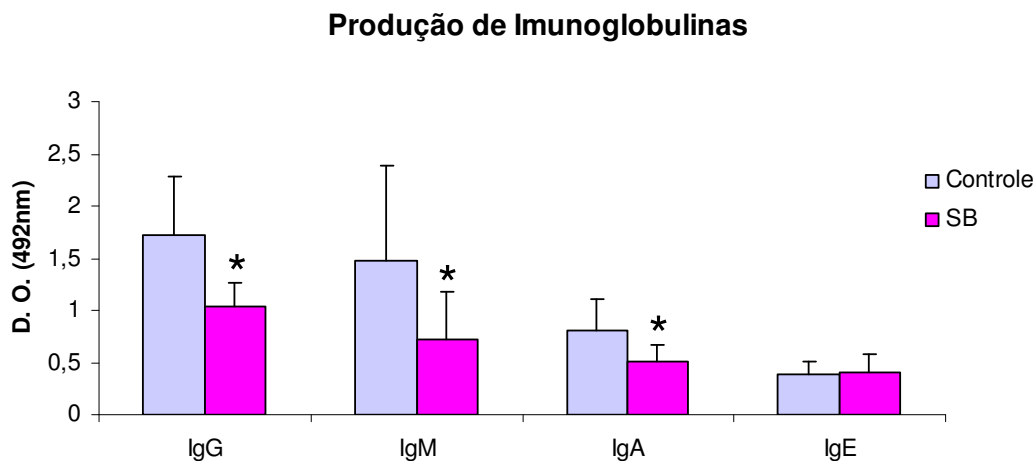
**Figura 16: Número de células produtoras de Ig, IgG, IgA e IgM no timo.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados. Após trinta dias os timos foram removidos e as células produtoras de imunoglobulinas foram mensuradas por ELISPOT. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \*  $p < 0,05$ .

Nos LnM também observamos uma redução no número de células produtoras de IgA, porém notamos um aumento no número de células produtoras de IgG em camundongos esplenectomizados (Figura 17).

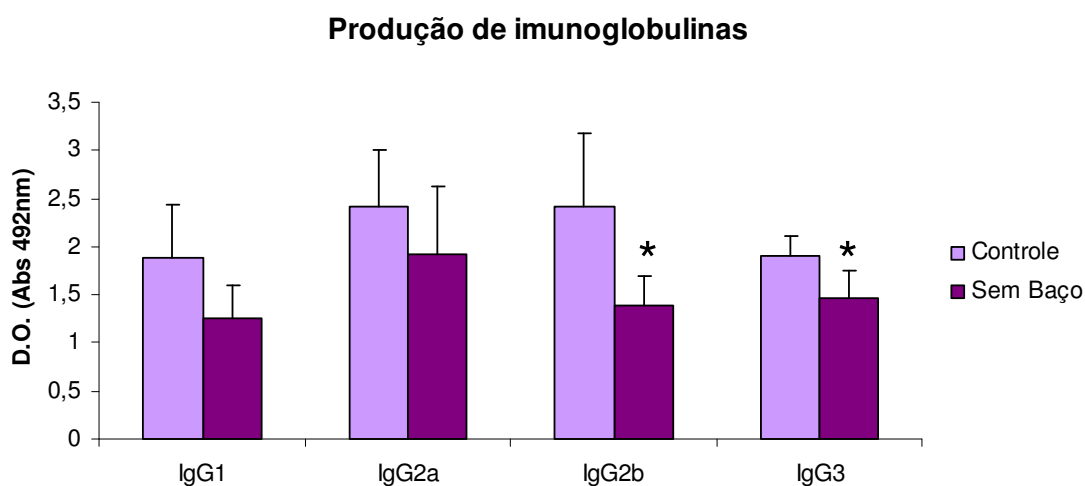


**Figura 17: Número de células produtoras de Ig, IgG, IgA e IgM nos LnM.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados. Após trinta dias os LnM foram removidos e as células produtoras de imunoglobulinas foram mensuradas por ELISPOT. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \*  $p < 0,05$ .

Observamos que a produção de imunoglobulinas séricas nos camundongos sem baço estava diminuída. Os níveis das imunoglobulinas IgA, IgM e IgG estavam reduzidos, sendo que nesta última, os subtipos alterados foram IgG2b e IgG3 (Figuras 18 e 19).



**Figura 18: Produção de IgG, IgM, IgA e IgE séricas totais.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e após trinta dias os soros de ambos os grupos foram coletados e dosados por ELISA. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \*  $p < 0,05$ .

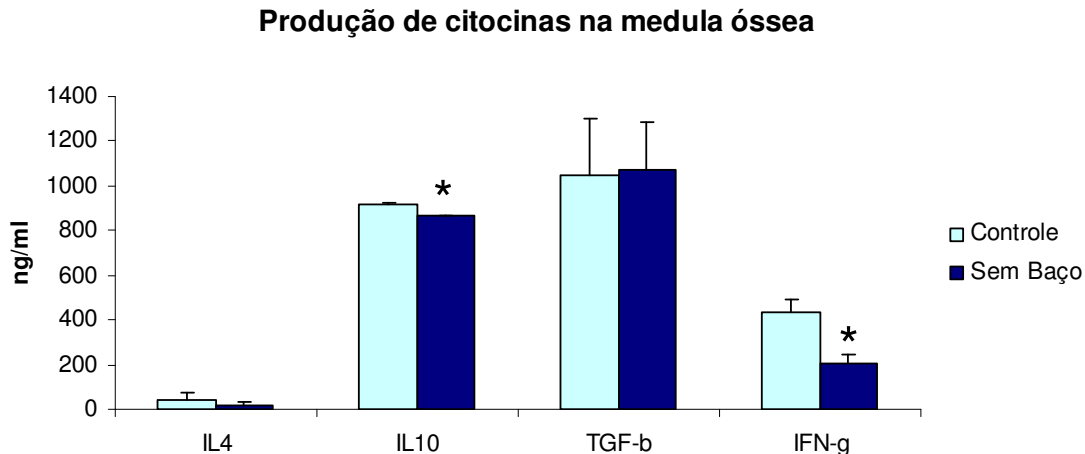


**Figura 19: Produção de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 séricas totais.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e após trinta dias os soros de ambos os grupos foram coletados e dosados por ELISA. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \*  $p < 0,05$ .

#### 4.6 A produção de citocinas em extratos de tecidos da medula óssea, timo, linfonodos mesentéricos está alterada em animais esplenectomizados.

As citocinas são importantes mediadores em vários eventos imunológicos. Para analisar o perfil de citocinas secretadas por células da MO, timo e LnM retiramos esses órgãos 30 dias após a esplenectomia. Um extrato desses tecidos foi produzido e os sobrenadantes foram coletados para posterior medida da concentração local de citocinas, por ELISA.

A Figura 20 mostra que células da MO de animais esplenectomizados produziram menores níveis de IL10 e IFN- $\gamma$ .

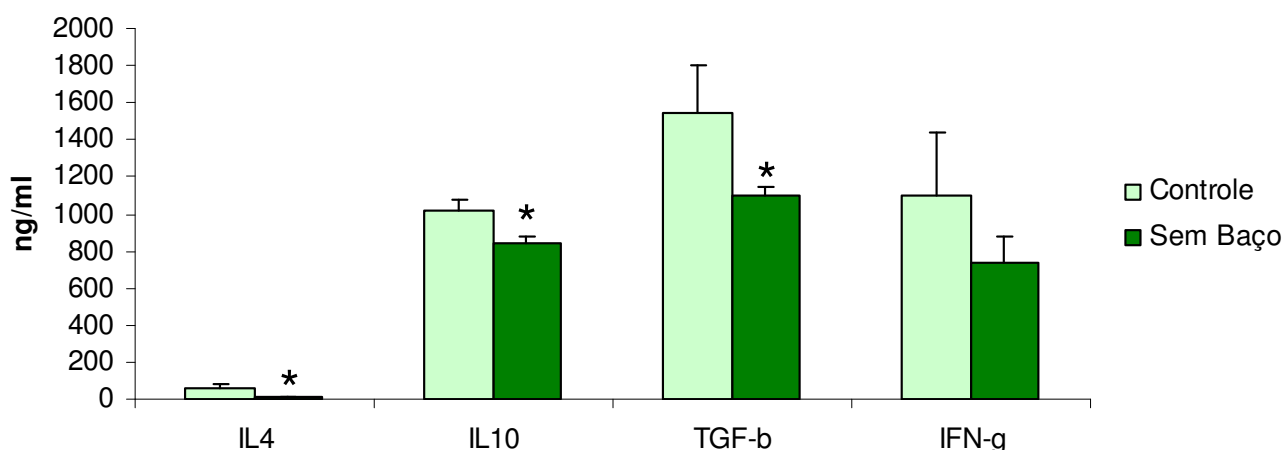


**Figura 20: Produção basal de IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  do extrato celular da medula óssea.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e após trinta dias os órgãos foram coletados e as citocinas dosadas por ELISA. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \* p < 0,05.



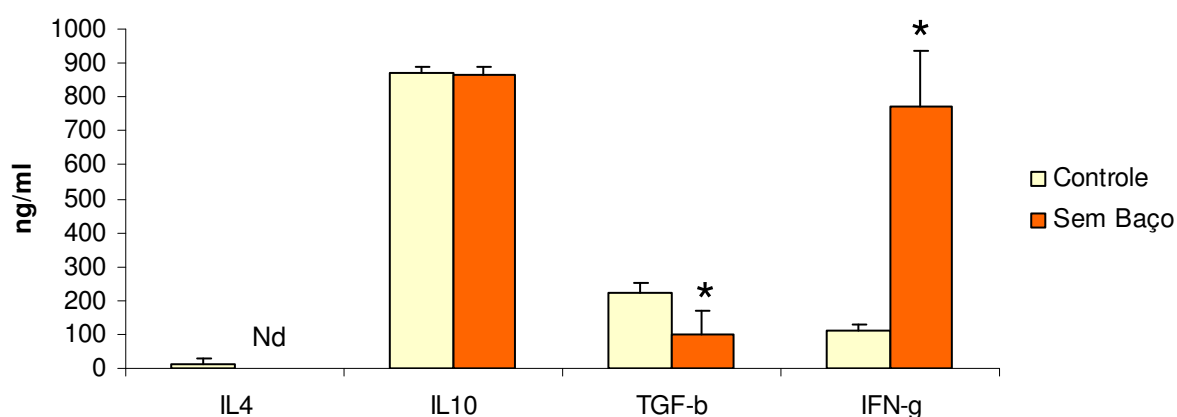
Uma diminuição nos níveis de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  foi observada, no timo de camundongos SB (Figura 21). Quando avaliamos a produção de citocinas nos LnM observamos um aumento nos níveis de IFN- $\gamma$  e uma diminuição na produção de TGF- $\beta$  (Figura 22).

### Produção de citocinas no timo



**Figura 21: Produção basal de IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  do extrato celular do timo.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e após trinta dias os órgãos foram coletados e as citocinas dosadas por ELISA. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \* p < 0,05.

### Produção de citocinas no LnM



**Figura 22: Produção basal de IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  do extrato celular dos LnM.** Camundongos BALB/c do grupo SB foram esplenectomizados e após trinta dias os órgãos foram coletados e as citocinas dosadas por ELISA. As barras apresentam a média aritmética  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada grupo (n=5). \* p < 0,05. Nd = não detectada. A produção de IL-4 pelo grupo SP não foi detectada.

## 5. DISCUSSÃO

Como o organismo é capaz de sobreviver após a remoção do baço, um órgão responsável por atividades de tamanha importância para a manutenção da vida? Para responder a essa pergunta, muitos estudos ainda deverão ser realizados. Mas talvez o passo mais importante para se chegar mais próximo da resposta, seria uma mudança na maneira de estudar o sistema imune. A grande maioria dos trabalhos procura explicar as relações desse sistema com os vírus, bactérias e parasitas. São poucos os estudos envolvendo apenas a fisiologia do sistema imune, sua imunobiologia.

O principal propósito deste trabalho foi o de descrever algumas das mudanças que acontecem no sistema imune, em sua fisiologia, na ausência do baço e, assim, entender um pouco melhor as adaptações realizadas pelo organismo na tentativa de restabelecer sua homeostase. Para tal, buscamos avaliar as alterações causadas pela retirada do baço através da análise das células linfóides em diferentes órgãos.

### **5.1 Os efeitos da esplenectomia no número total de células linfóides dos órgãos analisados.**

A nossa primeira questão era se o organismo, após a cirurgia de remoção do baço, era capaz de recompor em termos numéricos as populações linfóides. Estudos prévios demonstram que a esplenectomia resulta no aumento do número de células B no sangue em humanos, ovelhas e ratos (Düring, *et al.*, 1984; Westermann, *et al.*, 1990; Seabrook *et al.*, 2000)

Para investigarmos se o número de células linfóides, em camundongos BALB/c, estava alterado após a esplenectomia, utilizamos a citometria de fluxo para quantificar as principais populações linfóides: células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (TCD4), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (TCD8), CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (B1a) e CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> (B2). Os animais foram separados em dois grupos experimentais, o grupo controle (C), com camundongos com baço, e o grupo esplenectomizado (SB). Os experimentos foram realizados 30 dias após a cirurgia, como explicado nos Materiais e Métodos.

A maior parte dos linfócitos B encontrada nos órgãos linfóides de animais adultos é proveniente de precursores na medula óssea e são os chamados linfócitos B2. As células B1 são uma população menor de linfócitos B que apresentam origem, características fenotípicas, funcionais e distribuição anatômica diferentes das células B2 (Montecino-Rodriguez, 2006). Acredita-se que os linfócitos B1 constituem uma linhagem fetal, proveniente do fígado fetal, que se auto-renova persistindo assim durante toda a vida do animal. Fenotipicamente, as células B1 são subdivididas em B1a e B1b pela presença ou ausência da molécula de CD5 respectivamente (Herzenberg, 2006; Hardy, 2006). Em camundongos, elas são encontradas na cavidade peritoneal e pleural, baço, lâmina própria do intestino e, em menor quantidade, nos linfonodos. As subpopulações de B1 possuem funções diferentes, mas complementares. B1a é responsável pela secreção de anticorpos naturais, que se ligam a antígenos não protéicos, enquanto as imunoglobulinas produzidas por células B1b são induzidas após exposição antigênica (Montecino-Rodriguez, 2006).

No presente estudo, o exame do número de células das diversas populações linfóides em camundongos esplenectomizados não revelou diferenças quando comparados com animais do grupo controle. Ou seja, após 30 dias da retirada do baço, o organismo recompôs numericamente todas as populações linfóides analisadas.

Alguns trabalhos demonstraram que logo após a esplenectomia ocorre um aumento acentuado na contagem de leucócitos, principalmente linfócitos, no sangue (Bessler *et al.*, 2004; Seabrook, *et al.*, 2000). Supõe-se que esse aumento pode ocorrer tanto pela exacerbação da atividade da medula óssea quanto pela remoção de um sítio importante de alocação dessas células. Entretanto, no nosso estudo, não foi observado o aumento do número de linfócitos no sangue nem tampouco no somatório dos órgãos avaliados: medula óssea (MO), timo, linfonodos mesentéricos (LnM), linfonodos inguinais (LnI), placas de Peyer (PP), fígado, sangue e lavado peritoneal (LPe). Segundo Petroianu *et al.* (2003), na falta do baço, a função de controle do número de leucócitos está ausente e, por isso, em humanos, no pós-operatório imediato da esplenectomia, ocorre a leucocitose. Outro estudo cita que o aumento de linfócitos B no sangue pode estar relacionado a padrões alterados na migração ou a um aumento da proliferação dessas células causada por uma infecção latente (Milicevic *et al.*, 2001).

É provável que, em nosso estudo, o aumento de células linfóides não tenha sido observado porque o tempo de 30 dias após a cirurgia foi suficiente para que ocorresse a redistribuição dos linfócitos para outros órgãos, ou para que a atividade hematopoética da medula óssea se normalizasse.

## **5.2 Os efeitos da esplenectomia no número de linfócitos em cada órgão analisado.**

Como os resultados anteriores mostraram o restabelecimento do número total de células linfóides nos animais esplenectomizados, o próximo passo foi investigar como essa recomposição teria acontecido em cada órgão. Para isso, analisamos as os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, B1a e B2 dos seguintes órgãos: MO, timo, LnM, Lnl, PP, fígado, sangue e LPe.

O observado foi uma distribuição diferenciada das populações linfóides em cada órgão analisado, ou seja, após a esplenectomia o número de linfócitos estava alterado em cada órgão. Em animais esplenectomizados, houve um aumento do número de células TCD4<sup>+</sup> na MO e timo e uma redução no LPe, LnM e Lnl. Quando avaliamos a população celular TCD8<sup>+</sup> observamos um aumento numérico dessas células na MO e uma diminuição no timo, LnM, Lnl, e PP. A análise da população B2 demonstrou um aumento no número desses linfócitos na MO, LnM e, inesperadamente, no timo. Em camundongos esplenectomizados, as populações B1a também aumentaram na MO, timo, LnM e Lnl, porém, sofreram uma redução na PP, LPe e sangue.

De uma maneira geral, observamos um aumento do número de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>, B1a e B2 na medula óssea. Estudos sobre a circulação de linfócitos marcados com radioisótopos relatam uma tendência da medula óssea em abrigar uma proporção substancial dessas células (Rannie & Donald, 1977).

Também observamos uma distribuição ampla das células B1a inclusive para o timo, porém houve uma redução dessas células no LPe e sangue. Aparentemente as células B1a dependem da presença do baço, uma vez que a

esplenectomia acarreta em diminuição dessas células, não afetando, porém a população B1b (Kretschmer, *et al.*, 2004).

Nossos resultados mostram que a ausência do baço promove grandes alterações na distribuição dessas populações linfóides nos órgãos analisados. Alguns estudos anteriores também relatam que a dinâmica de migração dos linfócitos é alterada após a esplenectomia (Massaioli *et al.*, 1990; Karakantza *et al.*, 2004).

A maioria dos trabalhos, que avaliaram as conseqüências imunológicas da retirada do baço, analisou as populações linfóides no sangue. Alguns desses relatos mostraram: aumento do número absoluto de linfócitos totais no sangue (Petroianu *et al.*, 2003; Karakantza *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 1999), redução no percentual de células TCD4<sup>+</sup>, devido a um menor percentual da subpopulação de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> na circulação sanguínea (Karakantza *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 1999) e redução no percentual de linfócitos B1 circulantes em pacientes portadores de esquistossomose, submetidos à esplenectomia (Martins-Filho *et al.*, 1998). Em nosso trabalho, não observamos alterações no número absoluto de células linfóides no sangue, nem no somatório dos órgãos analisados nos camundongos SB. A única população linfóide circulante que apresentou diminuição foi a população de linfócitos B1a.

Outros estudos observaram que a perda do baço leva a uma diminuição na expressão de LFA-1 e ICAM pelas células B no sangue e linfonodos. Isso acelera a migração dessas células através dos linfonodos e vasos linfáticos de volta ao sangue, resultando em um maior número de células B encontradas no sangue. Como os linfonodos contêm cerca de 40% de todas as células B e o sangue cerca de 2%, pequenas mudanças no número de células B deixando

esses órgãos são suficientes para provocar grandes alterações no número dessas células no sangue (Milicevic *et al.*, 2001; Westermann *et al.*, 1990; Westermann *et al.*, 1992). Nossos resultados demonstraram diferenças numéricas das populações linfóides em cada órgão individualmente. É possível que o tempo de 30 dias tenha sido suficiente para que houvesse uma redistribuição ampla e o estabelecimento dos linfócitos em outros órgãos.

Um aspecto interessante da composição dos sítios linfóides examinados pós-esplenectomia é que, na maioria desses sítios, houve um aumento das duas populações de linfócitos B (B2 e B1a) acompanhado de redução das populações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>). O perfil desses sítios aparenta, então, um deslocamento compensatório de linfócitos T com recrutamento de linfócitos B. Como essas células (linfócitos B) são a grande população de linfócitos presentes no baço, parece plausível que qualquer mecanismo homeostático sistêmico implique no deslocamento de outros linfócitos para a realocação de células B. O único órgão que apresentou aumento de todas as populações linfóides (B e T) foi a medula óssea. É provável, então, que a medula óssea atue como ponto de fuga para linfócitos B, mas também para os linfócitos T nesse grande movimento de remodelamento dos tecidos linfóides. Seria interessante investigar em estudos futuros se outras populações da medula óssea foram afetadas com esse aporte de linfócitos.

### **5.3 Os efeitos da esplenectomia na dinâmica de distribuição de linfócitos transferidos.**

Os resultados anteriores demonstraram uma alteração no número de linfócitos na maioria dos órgãos analisados em camundongos esplenectomizados. Assim, resolvemos analisar a distribuição das células linfóides nesses animais na tentativa de entender o mecanismo dessa recomposição. Para tal, células da medula óssea, do timo e do baço, marcadas com CFSE, foram transferidas para camundongos do grupo controle e esplenectomizados. O resultado obtido demonstrou uma distribuição alterada das populações linfóides injetadas no grupo SB quando comparado com o grupo controle.

Quando transferimos células da medula óssea marcadas com CFSE, observamos que os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> migraram preferencialmente para a MO. Notamos também uma redução do número de células CD4<sup>+</sup> nos LnI e PP. Os linfócitos B2 estavam em maior número na MO, fígado e PP e em menor número nos LnM.

A análise da distribuição de células do timo marcadas com CFSE também revelou uma alteração na migração de todas as populações nos animais esplenectomizados. O número de linfócitos TCD4<sup>+</sup> estava aumentado na MO, LnM, LnI e PP. As células CD8<sup>+</sup> do timo migraram preferencialmente para a MO. De forma interessante, observamos um aumento da população B2, proveniente do timo, nos LnI e LPe.

Também avaliamos a distribuição de células do baço marcadas com CFSE e transferidas para camundongos do grupo controle e SB. Houve um aumento do número de células CD4<sup>+</sup> nos LnM e uma redução na MO de camundongos SB. As células CD8<sup>+</sup> do baço migraram para a MO, LnM e LnI.



Linfócitos B2 no grupo SB se distribuíram mais amplamente pela MO, LnM, Lnl, timo e LPe.

Os linfócitos se movem continuamente pela corrente sanguínea e pelos vasos linfáticos de um tecido linfóide periférico para outro e para locais onde ocorre inflamação. As células que ainda não foram ativadas recirculam através de órgãos linfóides periféricos e os linfócitos ativados migram para os tecidos periféricos nos locais de infecção e inflamação (Springer, 1995). A retirada do baço representa a perda de um sítio importante de alocação e controle dessas células linfóides interferindo na organização e circulação das mesmas (Petroianu *et al.*, 2003, Massaioli *et al.*, 1990; Karakantza *et al.*, 2004).

Em nossos resultados sobre a migração de linfócitos em camundongos esplenectomizados, observamos uma preferência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> pela MO, LnM, Lnl e PP e linfócitos TCD8<sup>+</sup> pelos LnM, Lnl, mas principalmente pela MO. Como esperado, os linfócitos B foram as células que mais apresentaram alteração na migração. Apesar de também migrarem para a medula óssea, os linfócitos B se distribuíram de uma maneira mais ampla pelos outros órgãos.

Em um estudo que investigou a influência do baço nos padrões de migração de linfócitos, os pesquisadores mostraram que células B e T migram preferencialmente para diferentes órgãos. Nesse estudo, a migração de linfócitos B e T foi alterada pela retirada do baço, uma vez que a porcentagem de linfócitos B aumentou e a de linfócitos T diminuiu em todos os órgãos investigados (MO, LnM, PP e sangue) (Westermann *et al.* 1989). Em nosso estudo, no entanto, observamos tanto um aumento do número de células B quanto de células T na MO de camundongos esplenectomizados. O trabalho de Westermann foi realizado com ratos, após 90 dias da cirurgia, e a migração foi

avaliada após 24 horas. No nosso estudo, os animais foram avaliados com 30 dias de esplenectomia e 12 horas após a transferência das células. É possível que, nesse tempo, vários processos de redistribuição de células já tenham sido restabelecidos mas que o organismo ainda esteja se reestruturando, se adaptando as mudanças geradas pela ausência do baço. Nossos resultados são semelhantes aos de outro estudo sobre a circulação de linfócitos, onde os pesquisadores observaram a distribuição de linfócitos, marcados com radioisótopos, do ducto torácico para órgãos não linfóides, medula óssea e timo. A distribuição dos radioisótopos nos tecidos foi medida após a transferência dos linfócitos. Nesse estudo a medula óssea foi capaz de abrigar temporariamente 25% dos linfócitos injetados (Rannie, & Donald, 1977).

É importante ressaltarmos o aumento de células B no LPe quando células do timo e do baço foram injetadas. Sabe-se que as células B1a podem ser encontradas no peritônio e no baço, apesar dessas populações diferirem em expressão gênica e função. De maneira interessante, células B1a parecem depender da presença do baço uma vez que a esplenectomia acarreta em diminuição dessa população, não afetando, porém as células B1b (Kretschmer, *et al.*, 2004). Sugerimos que a subpopulação B1a do baço seja a responsável pelo aumento de células B observado no LPe. É possível que a migração de células B para o LPe, em camundongos esplenectomizados, seja uma tentativa do organismo em compensar a diminuição de células B1a peritoneais observada anteriormente em nosso trabalho.

Curiosamente observamos um aumento da distribuição de células B para o timo, quando células do baço foram injetadas. Em resultado anterior

observamos que após a esplenectomia, houve um aumento de células B e B1a no timo.

#### **5.4 Efeitos da esplenectomia no número de células B1a e B2 expressando moléculas de adesão e co-estimuladoras nos órgãos analisados.**

Após a retirada do baço observamos que os padrões de migração dos linfócitos, principalmente nas células B, estavam alterados. Sabe-se que a recirculação e a migração de linfócitos para tecidos e órgãos são mediadas por moléculas de adesão (Bauer *et al.*, 2001). Por isso, resolvemos avaliar se o número de células B1a e B2, expressando essas moléculas, estava modificado nos órgãos analisados. Para tal, observamos a expressão das moléculas de adesão CD62L e  $\alpha 4\beta 7$ . Como os padrões de migração dos linfócitos diferem se estão ativados ou não, também optamos por investigar o número de células ativadas nesses órgãos (Springer, 1995). Para isso, observamos a expressão das moléculas co-estimuladoras CD40 e CD21.

A recirculação de linfócitos através dos diferentes órgãos é regulada por moléculas de adesão, que reconhecem adressinas tecido-específicas no endotélio vascular (Hamann *et al.*, 1994). A molécula CD62L (L-selectina) é um receptor, que pertence à família das selectinas, expresso na superfície de linfócitos inativos. As células B inativas migram para os linfonodos, mais especificamente para os folículos, utilizando CD62L e o receptor de quimiocina CXCR5 (Abbas & Lichtman, 2005). A molécula  $\alpha 4\beta 7$  é uma integrina que desempenha um papel importante na adesão e migração de linfócitos direcionando essas células para a mucosa e tecidos linfóides associados ao intestino (Reese *et al.*, 2005).

Analisando primeiramente o perfil de expressão das moléculas de adesão das células B1a observamos que no LPe houve um aumento no número de células expressando CD62L e uma diminuição de células expressando  $\alpha 4\beta 7$ , em camundongos SB. Na MO observamos um aumento de células expressando  $\alpha 4\beta 7$ . É possível que as células B1a estejam partindo da MO em direção aos tecidos linfóides da mucosa intestinal. Por outro lado as células B1a do LPe parecem estar se direcionando para outros órgãos.

Quando avaliamos o perfil de expressão das moléculas de adesão pelos linfócitos B2, observamos que o número desses linfócitos marcados com a molécula  $\alpha 4\beta 7$  no LPe estava diminuído no grupo SB. Nos Lnl e nas PP observamos um aumento no número de células B2 marcadas com CD62L e  $\alpha 4\beta 7$ . Nos LnM houve uma diminuição do número de células marcadas com CD62L. Na MO observamos um aumento de células expressando  $\alpha 4\beta 7$ . Esses dados indicam que as células B2 estão migrando da MO e Lnl principalmente para tecidos linfóides da mucosa intestinal.

A ativação de células B começa quando seu receptor de membrana se liga a antígenos. Esse sinal é suficiente para a ativação de células B estimuladas por antígenos não protéicos. Porém, para a maioria dos antígenos derivados de proteínas, são necessários sinais co-estimuladores fornecidos pelas células TCD4<sup>+</sup> para que aconteça a ativação adequada de células B antígeno-específicas. Nesse processo co-estimulador a interação entre a molécula CD40 (membro da família do receptor do fator de necrose tumoral) e seu ligante, CD40L (expresso em células T ativadas) tem sido considerado essencial. Em camundongos deficientes para as moléculas CD40 e CD40L a formação de centro germinativo e de respostas imune humorais contra

antígenos protéicos são danificadas (Merino *et al.*, 2003). Camundongos CD40 deficientes possuem células B periféricas maduras que respondem normalmente a antígenos não protéicos e a antígenos protéicos com produção de IgM mas não respondem com produção de IgG, IgA ou IgE e não desenvolvem centros germinativos (Oka *et al.*, 1996). Ou seja, a molécula CD40 é essencial para respostas imunes humorais eficientes. Nas células B, a ativação por CD40 leva a proliferação e na presença de IL-4 leva a mudança de classe de isotipo (Yasui *et al.*, 2002). A molécula CD21 (Receptor de complemento tipo 2) normalmente é detectável em células B maduras (Takahashi *et al.*, 1997; Tedder *et al.*, 1984). CD21 é um co-estimulador importante de linfócitos B, facilitando a ativação dessas células por antígenos protéicos através de mecanismos variados. Estudos demonstraram que camundongos CD21 deficientes possuem uma marcante diminuição da resposta imune humoral a antígenos protéicos, uma deficiente formação de centros germinativos e de células B de memória (Marchbank *et al.*, 2002). A molécula CD21 se liga com alta afinidade ao fragmento C3d (fragmento do componente C3 do sistema do complemento) que permanece covalentemente ligado a superfície antigênica (Twohig *et al.*, 2007).

Analisando a expressão de moléculas de ativação pelas células B1a observamos que no LPe houve uma diminuição no número de células marcadas com CD40, em camundongos SB. Nas PP observamos um aumento de células expressando CD40. Nos Lnl houve uma diminuição do número de células marcadas com CD21. Esses resultados demonstram uma diminuição no número de células B1a ativadas no LPe e Lnl e um aumento dessas células na PP em camundongos SB.

Quando avaliamos o perfil de ativação dos linfócitos B2 observamos que o número desses linfócitos no LPe e fígado marcados com CD40 estava diminuído no grupo SB. Na MO, Lnl e nas PP observamos um aumento no número de células B2 marcadas com CD21. Podemos inferir que as células B2 presentes na MO, Lnl e PP apresentaram um perfil ativado enquanto as células do fígado e LPe apresentaram um perfil inativado.

De uma maneira geral, ao investigarmos o efeito da esplenectomia no perfil de ativação das populações linfóides B1a e B2, observamos que o número dessas células marcadas com moléculas de adesão e co-estimuladoras estava alterado nos órgãos analisados.

Milicevic e colaboradores (2001) relatam em um estudo que após a retirada do baço houve a redução da expressão das moléculas LFA-1 e ICAM-1 em linfócitos B, do sangue e linfonodos. Nesse mesmo estudo, não foram encontradas diferenças de expressão das moléculas L-selectina e integrina  $\alpha$ -4 em células B, no sangue, após 3 meses da esplenectomia. Diferentemente, nossos resultados demonstram uma alteração no número de células B expressando essas moléculas em alguns órgãos. É importante ressaltarmos também a diferença no tempo em que os experimentos foram realizados e os órgãos estudados. O primeiro estudo foi feito com 90 dias de esplenectomia, enquanto o nosso foi realizado após 30 dias de cirurgia. Em outro estudo, que corrobora com nossos dados, é relatado que a ativação de linfócitos por estímulos fisiológicos reforçam a ligação dependente de L-selectina pelas vênulas altas do endotélio (Spertini, 1991). Ou seja, a ativação, mesmo que provocada por fatores fisiológicos, necessita de ligações que envolvam CD62L.

E para que isso ocorra, faz-se necessário, que células aumentem a expressão dessa molécula, ou que o número de células expressando CD62L aumente.

Em pacientes que sofrem esplenectomia de 2 a 20 anos atrás o número de células no sangue expressando a molécula CD21 estava diminuído (Demeter, 1991). Nós observamos apenas nos Lnl uma diminuição no número de células B1a marcadas com essa molécula, em camundongos SB. Enquanto que em linfócitos B2, na MO, Lnl e PP, observamos o contrário.

### **5.5 Os efeitos da esplenectomia no número de células produtoras de imunoglobulinas na MO, timo e LnM e nos níveis de imunoglobulinas IgG, IgA, IgM e IgE no soro.**

Uma vez que observamos diferenças no número de células B ativadas em alguns órgãos, resolvemos investigar se a atividade dessas células estaria mantida após esplenectomia. Para isso, analisamos o número de células produtoras de anticorpos, pela técnica de ELISPOT, na MO, timo e LnM. Escolhemos esses órgãos porque eles apresentaram alterações tanto no número absoluto de células B quanto no número de células B ativadas, em camundongos SB.

Observamos que na MO de camundongos SB houve um aumento do número de células produtoras de anticorpos IgA e IgM refletindo no número total de células produtoras de Ig. Quando avaliamos o timo desse mesmo grupo as células produtoras de IgM estavam em maior número porém as produtoras de IgA sofreram uma diminuição. Nos LnM também observamos uma redução no número de células produtoras de IgA porém notamos um aumento no número de células produtoras de IgG.

Em nosso estudo também analisamos a produção sistêmica de imunoglobulinas. No soro dos camundongos sem baço houve uma redução dos níveis de imunoglobulinas IgG, IgA e IgM sendo que, com relação a IgG, os subtipos alterados foram IgG2b e IgG3. Esses dados corroboram os da literatura que relatam, como alterações causadas pela ausência do baço, a diminuição da produção de subclasses de IgG e IgM (Brendolan *et al.*, 2007). De forma interessante, Martin & Kearney (2001) apontam a produção desses isotipos como característica funcional semelhante entre células B1 e células B da zona marginal do baço. É possível inferir que os níveis reduzidos de IgG3 e IgM estejam relacionados com alterações nas células B1, pois, apesar de não ter sido observada diminuição do número total dessa população, observamos uma redução no sangue de animais sem baço.

Analisando os resultados obtidos sobre a atividade local e sistêmica dos linfócitos B, é possível argumentar que o aumento do número de células produtoras de IgM e IgA observado na MO seja uma tentativa de compensar a diminuição do nível dessas imunoglobulinas no organismo. É pertinente lembrarmos que linfócitos B1a secretam anticorpos naturais IgM, IgA e IgG3, mas principalmente IgM, e que a retirada do baço causa uma diminuição dessas células e, conseqüentemente, reduz os níveis desses anticorpos no soro (Brendolan *et al.*, 2007; Fagarasan *et al.*, 2000). Observamos ainda um aumento de células produtoras de IgG nos LnM. É provável que este aumento também represente um mecanismo de compensação do organismo para elevar os níveis séricos de IgG, reduzidos após a esplenectomia.

## **5.6 Os efeitos da esplenectomia na produção de citocinas em extratos de tecidos da medula óssea, timo e linfonodos mesentéricos.**



Quando avaliamos a produção basal (não estimulada) de citocinas em extratos de tecidos da MO, timo e LnM observamos que essa produção está alterada de maneira diferente em cada órgão. As células da MO de animais SB produziram menores níveis de IL10 e IFN- $\gamma$ . Uma diminuição dos níveis de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  também foi observada no timo. Quando avaliamos a produção de citocinas nos LnM observamos um aumento nos níveis de IFN- $\gamma$  e uma diminuição na produção de TGF- $\beta$ .

É possível relacionar esses dados com alguns resultados anteriores. A interleucina IL-10 é uma citocina antiinflamatória que modula a imunidade inata e adaptativa (Samarasinghe, *et al.* 2006). Segundo Spencer e colaboradores (1996) as células B1 são as maiores produtoras dessa citocina. A sua diminuição na MO e timo poderia estar relacionada às alterações nas células B1a, causadas pela esplenectomia. Apesar de ter sido observado um aumento no número de células B1a, esses órgãos não demonstraram diferenças no perfil de ativação dessas células.

O interferon- $\gamma$  age nos linfócitos B promovendo a troca de isotipos para subclasses de IgG, especialmente IgG2a, em camundongos (Abbas & Lichtman, 2005; Kawano *et al.*, 1994). É interessante observarmos que nos LnM existe um aumento dos níveis IFN- $\gamma$  e um aumento do número de células produtoras de IgG em camundongos SB.

TGF- $\beta$  (fator de crescimento e transformação  $\beta$ ) estimula células B a fazerem a troca para o isotipo IgA. (Abbas & Lichtman, 2005; Kunimoto *et al.*, 1992). No timo e nos LnM encontramos diminuídos os níveis dessa citocina bem como o número de células produtoras de anticorpos IgA no grupo SB.

A interleucina-4 estimula a troca de isotipo para IgE e IgG1 (Tangye, *et al.*, 2002). Apesar dos níveis dessa citocina estarem reduzidos no timo não observamos alteração no número de células produtoras de IgG nesse órgão. Não foi possível analisar se os níveis diminuídos de IL-4 interferiram no número de células produtoras de IgE, uma vez que, não conseguimos realizar a técnica ELISPOT para essa imunoglobulina.

Seria interessante investigar mais detalhadamente as células que estariam envolvidas na produção dessas citocinas, nesses tecidos, e também investigar se a produção sistêmica de citocinas estaria alterada, após a retirada do baço, através da análise do soro.

Embora a ausência do baço seja acompanhada pelo aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas e por muitas alterações em órgãos linfóides, o resultado final é surpreendente (Amlot & Hayes, 1985). Os animais esplenectomizados se adaptam à ausência do baço já que eles sobrevivem e são capazes de produzir vários tipos de atividades imunológicas diferentes. Camundongos C57Bl/6 sem baço são resistentes à infecção por *Leishmania major* de maneira indistinguível dos camundongos controle (Maioli *et al.*, 2007) e são também capazes de desenvolver tolerância oral a ovalbumina ingerida (Barsante, 2001). Nossa hipótese é que muitas das alterações observadas nos sítios linfóides e na dinâmica de re-distribuição dos linfócitos nos animais esplenectomizados podem ser interpretadas como mecanismos compensatórios ou de adaptação às perturbações causadas pela ausência do baço.

## RESUMO DOS RESULTADOS

- Camundongos BALB/c esplenectomizados não apresentaram diferenças no número total de células linfóides dos órgãos analisados em conjunto, quando comparados com o grupo controle. Não foi observado aumento do número de linfócitos no sangue tampouco no somatório dos órgãos avaliados. Possivelmente, na ausência do baço, houve uma redistribuição dessas células para vários órgãos.
- Os órgãos de camundongos SB, quando analisados individualmente, apresentaram alterações no número de linfócitos. De uma maneira geral, observamos um aumento no número de linfócitos T na MO e uma diminuição nos LnM e LnI. As células B2 foram encontradas em maior número na MO, timo e LnM. Os linfócitos B1a apresentaram um aumento numérico na MO, timo, LnM e LnI e uma redução na PP, LPe e sangue.
- A dinâmica de distribuição dos linfócitos (marcados com CFSE) transferidos apresentou alteração após a esplenectomia. Em nossos resultados observamos a migração de linfócitos TCD4<sup>+</sup> para MO, LnM LnI e PP e de linfócitos TCD8<sup>+</sup> para LnM, LnI, mas principalmente para a MO. Os linfócitos B se distribuíram de uma maneira mais ampla pelos órgãos. Observamos um número elevado dessas células na MO, LnM, LnI, timo e LPe de camundongos SB.

- Após a esplenectomia, observamos alteração no número de células B1a e B2 expressando moléculas de adesão e co-estimulação. Nossos resultados analisados em conjunto indicam que, em camundongos do grupo SB:
  - a MO e as PP apresentaram um número maior de células B1a ativadas, enquanto que no LPe e LnI, o número de células ativadas estava reduzido;
  - a MO, as PP, os LnM e LnI apresentaram um número maior de células B2 ativadas, enquanto que no LPe o número de células ativadas estava diminuído.
  
- Camundongos SB apresentaram alterações no número de células produtoras de anticorpos na MO, timo e LnM. Na MO houve um aumento do número de células produtoras de anticorpos IgA e IgM. No timo, as células produtoras de IgM estavam em maior número, porém, as produtoras de IgA sofreram uma diminuição. Nos LnM observamos uma redução no número de células produtoras de IgA e um aumento no número de células produtoras de IgG.
  
- Camundongos sem baço apresentaram níveis reduzidos de imunoglobulinas IgA, IgM e IgG, sendo que, com relação a IgG, os subtipos alterados foram IgG2b e IgG3.
  
- Camundongos SB apresentaram níveis basais alterados de citocinas em extratos de tecidos da medula óssea, timo e linfonodo mesentérico.
  - As células da MO de camundongos esplenectomizados produziram níveis reduzidos de IL10 e IFN- $\gamma$ .

- As células do timo de camundongos SB apresentaram níveis de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  reduzidos;
- As células do LnM de camundongos SB apresentaram uma produção mais elevada de IFN- $\gamma$  e uma diminuição na produção de TGF- $\beta$ .

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a retirada do baço afeta o sistema imune de maneira global. A maioria dos órgãos investigados demonstrou diferenças numéricas celulares importantes, principalmente medula óssea, timo, linfonodos mesentéricos e lavado peritonial. Todas as populações linfóides analisadas apresentaram modificações em seus trajetos de distribuição quando injetadas em camundongos esplenectomizados. O número de células expressando moléculas de ativação também estava modificado nos órgãos. Além disso, a produção de imunoglobulinas no soro e de citocinas na medula óssea, timo e linfonodos mesentéricos estavam alteradas. Finalmente, ao investigarmos o número de células produtoras de anticorpos, nesses mesmos órgãos, também observamos modificações.

Apesar de terem sido constatadas diversas mudanças, algumas dessas alterações podem ser interpretadas como mecanismos de compensação do organismo para as perturbações causadas pela ausência de um órgão envolvido em funções imunológicas centrais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A. K. & LICHTMAN, A. H. 2005. *Imunologia celular e molecular*, 5 ed., Elsevier, São Paulo, SP.

AMLOT, P. L. & A. E. HAYES 1985. Impaired human antibody response to the thymus-independent antigen, DNP-Ficoll, after splenectomy. Implications for post-splenectomy infections. **Lancet** 1(8436): 1008-11.

ANSEL, K. M.; MCHEYZER-WILLIAMS, L. J.; Ngo V. N.; McHeyzer-Williams M. G.; CYSTER, J. G. 1999. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med* 190(8): 1123-34.

ATO, M.; STAGER, S.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. 2002. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. **Nat Immunol** 3(12): 1185-91.

ATTANAVANICH, K. & J. F. KEARNEY. 2004. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. **J Immunol** 172(2): 803-11.

BALAZS, M.; MARTIN, F.; ZHOU, T.; KEARNEY, J. 2002. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. **Immunity** 17(3): 341-52.

BALSALOBRE, B. & F. CARBONELL-TATAY. 1991. Cellular immunity in splenectomized patients. **J Investig Allergol Clin Immunol** 1(4): 235-8.

BARSANTE, M. M. 2001. O papel do baço e dos linfonodos mesentéricos na indução de tolerância oral. Dissertação de mestrado, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.

BAUER, M. E.; PERKS, P.; LIGHTMAN, S. L.; SHANKS, N. 2001. Are adhesion molecules involved in stress-induced changes in lymphocyte distribution? **Life Sci** 69(10): 1167-79.

BEER, E. 1928. Development and Progress of Surgery of the Spleen. **Ann Surg** 88(3): 335-46.

BESSLER, H.; BERGMAN, M.; SALMAN, H.; BEILIN, B.; DJALDETTI, M. 2004. The relationship between partial splenectomy and peripheral leukocyte count. **J Surg Res** 122(1): 49-53.

BRENDOLAN, A.; ROSADO, M. M.; CARSETTI, R.; SELLERI, L.; DEAR, T. N. 2007. Development and function of the mammalian spleen. **Bioessays** 29(2): 166-77.

CESTA, M. F. 2006. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicol Pathol** 34(5): 455-65.

COOPER, M. J. & R. C. WILLIAMSON. 1984. Splenectomy: indications, hazards and alternatives. **Br J Surg** 71(3): 173-80.

CROSBY, W. H. 1983. An historical sketch of splenic function and splenectomy. **Lymphology** 16(2): 52-5.

DEMETER, J.; MIHALIK, R.; BENCZUR, M.; LEHOCZKY, D.; PALOCZI, K. 1991. Peripheral blood leukocyte subpopulations a long time after posttraumatic splenectomy. **Haematologia (Budap)** 24(3): 139-44.

DREW, P. A.; KIROFF, G. K.; FERRANTE, A.; COHEN, R. C. 1984. Alterations in immunoglobulin synthesis by peripheral blood mononuclear cells from splenectomized patients with and without splenic regrowth. **J Immunol** 132(1): 191-6.

DURIG, M.; LANDMANN, R. M.; HARDER, F. 1984. Lymphocyte subsets in human peripheral blood after splenectomy and autotransplantation of splenic tissue. **J Lab Clin Med** 104(1): 110-5.

ELOMAA, O.; KANGAS, M.; SAHLBERG, C.; TUUKKANEN, J.; SORMUNEN, R.; LIAKKA, A.; THESLEFF, I.; KRAAL, G.; TRYGGVASON, K. 1995. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. **Cell** 80(4): 603-9.

FAGARASAN, S.; WATANABE, N.; HONJO, T. 2000. Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. **Immunol Rev** 176: 205-15.

FLO, T. H.; SMITH, K. D.; SATO, S.; RODRIGUEZ, D. J.; HOLMES, M. A.; STRONG, R. K.; AKIRA, S.; ADEREM, A. 2004. Lipocalin 2 mediates an innate

immune response to bacterial infection by sequestering iron. **Nature** 432(7019): 917-21.

GEIJTENBEEK, T. B.; GROOT, P. C.; NOLTE, M. A.; VAN VLIET, S. J.; GANGARAM-PANDAY, S. T.; VAN DUIJNHOFEN, G. C.; KRAAL, G.; VAN OOSTERHOUT, A. J.; VAN KOOYK, Y. 2002. Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. **Blood** 100(8): 2908-16.

GORDON, S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell** 111(7): 927-30.

HAMANN, A.; ANDREW, D. P.; JABLONSKI-WESTRICH, D.; HOLZMANN, B.; BUTCHER, E. C. 1994. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. **J Immunol** 152(7): 3282-93.

HARDY, R. R. 2006. B-1 B cells: development, selection, natural autoantibody and leukemia. **Curr Opin Immunol** 18(5): 547-55.

HECKSHER-SORENSEN, J.; WATSON, R. P.; LETTICE, L. A.; SERUP, P.; ELEY, L.; DE ANGELIS, C.; AHLGREN, U.; HILL, R. E. 2004. The splanchnic mesodermal plate directs spleen and pancreatic laterality, and is regulated by Bapx1/Nkx3.2. **Development** 131(19): 4665-75.

HERZENBERG, L. A. & TUNG, J. W. 2006. B cell lineages: documented at last! **Nat Immunol** 7(3): 225-6.

HORAN, M. & J. H. COLEBATCH. 1962. Relation between splenectomy and subsequent infection. A clinical study. **Arch Dis Child** 37: 398-414.

IKUTA, S.; ONO, S.; KINOSHITA, M.; SEKI, S.; HIRAIDE, H.; MOCHIZUKI, H. 2004. Enhanced interferon-gamma production and bacterial clearance in the liver of splenectomized mice in the models of Escherichia coli injection or intestinal obstruction. **Shock** 21(5): 452-7.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 10 ed. Editora Guanabara Koogan, 488p, 2004.

KANG, Y. S.; YAMAZAKI, S.; IYODA, T.; PACK, M.; BRUENING, S. A.; KIM, J. Y.; TAKAHARA, K.; INABA, K.; STEINMAN, R. M.; PARK, C. G. 2003. SIGN-



R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. **Int Immunol** 15(2): 177-86.

KARAKANTZA, M.; THEODOROU, G. L.; MOUZAKI, A.; THEODORI, E.; VAGIANOS, C.; MANIATIS, A. 2004. In vitro study of the long-term effects of post-traumatic splenectomy on cellular immunity. **Scand J Immunol** 59(2): 209-19.

KARLSSON, M. C.; GUINAMARD, R.; BOLLAND, S.; SANKALA, M.; STEINMAN, R. M.; RAVETCH, J. V. 2003. Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. **J Exp Med** 198(2): 333-40.

KAWANO, Y.; NOMA, T.; YATA, J. 1994. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. **J Immunol** 153(11): 4948-58.

KIMPEL, D.; DAYTON, T.; FUSELER, J.; GRAY, L.; KANNAN, K.; WOLF, R. E.; GRISHAM, M. 2003. Splenectomy attenuates streptococcal cell wall-induced arthritis and alters leukocyte activation. **Arthritis Rheum** 48(12): 3557-67.

KING, H. & H. B. SHUMACKER, JR. 1952. Splenic studies. I. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. **Ann Surg** 136(2): 239-42.

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

KRETSCHMER, K.; STOPKOWICZ, J.; SCHEFFER, S.; GRETEN, T. F.; WEISS, S. 2004. Maintenance of peritoneal B-1a lymphocytes in the absence of the spleen. **J Immunol** 173(1): 197-204.

KUNIMOTO, D. Y.; RITZEL, M.; TSANG, M. 1992. The roles of IL-4, TGF-beta and LPS in IgA switching. **Eur Cytokine Netw** 3(4): 407-15.

LANZAVECCHIA, A. & F. SALLUSTO 2001. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. **Nat Immunol** 2(6): 487-92.

LOPES-CARVALHO, T. & J. F. KEARNEY 2004. Development and selection of marginal zone B cells. **Immunol Rev** 197: 192-205.

MAIOLI, T. U.; CARNEIRO, C. M.; ASSIS, F. A.; FARIA, A.C.F. 2007. Splenectomy does not interfere in *Leishmania major* infection. **Cellular Immunology** 249: 1-7.

MAIOLI, T. U. 2008. Efeito da esplenectomia na reatividade imunológica associada as infecções por *L. major* e *T. cruzi* em camundongos. Tese de doutorado, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.

MARCHBANK, K. J.; KULIK, L.; GIPSON, M. G.; MORGAN, B. P.; HOLERS, V. M. 2002. Expression of human complement receptor type 2 (CD21) in mice during early B cell development results in a reduction in mature B cells and hypogammaglobulinemia. **J Immunol** 169(7): 3526-35.

MARTIN, F. & J. F. KEARNEY 2001. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. **Curr Opin Immunol** 13(2): 195-201.

MARTIN, F. & J. F. KEARNEY 2002. Marginal-zone B cells. **Nat Rev Immunol** 2(5): 323-35.

MARTINS FILHO, O. A.; MELLO, J. R.; CORREA-OLIVEIRA, R. 1998. The spleen is an important site of T cell activation during human hepatosplenic schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 93 Suppl 1: 159-64.

MAYO, W. J. 1928. A Review of 500 Splenectomies with Special Reference to Mortality and End Results. **Ann Surg** 88(3): 409-15. Mayo, 1928;

MASSAIOLI, N.; MAINARDI, S. M.; PARON, L.; REDIVO, L.; ROTA SCALABRINI, D.; POCCARDI, G. 1990. Phenotypical characterization of lymphocyte recirculating subsets in patients undergoing splenectomy for trauma. **Ann Ital Chir** 61(3): 273-5; discussion 275-6.

MCCLUSKY, D. A.; SKANDALAKIS, L. J.; COLBORN, G. L.; SKANDALAKIS, J. E. 1999. Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery--part 1. **World J Surg** 23(3): 311-25.

MCCLUSKY, D. A.; SKANDALAKIS, L. J.; COLBORN, G. L.; SKANDALAKIS, J. E. 1999. Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery--part 2. **World J Surg** 23(5): 514-26.

MEBIUS, R. E. & G. KRAAL 2005. Structure and function of the spleen. **Nat Rev Immunol** 5(8): 606-16.

MERINO, J.; DIEZ, M. A.; MUNIZ, M.; BUELTA, L.; NUNEZ, G.; LOPEZ-HOYOS, M.; MERINO, R. 2003. Inhibition of B-cell death does not restore T-cell-dependent immune responses in CD40-deficient mice. **Immunology** 109(4): 504-9.

MIKO, I.; BRATH, E.; FURKA, I.; KOVACS, J.; KELVIN, D.; ZHONG, R. 2001. Spleen autotransplantation in mice: a novel experimental model for immunology study. **Microsurgery** 21(4): 140-2.

MILICEVIC, N. M.; LUETTIG, B.; TRAUTWEIN, C.; WUSTEFELD, T.; MAHLER, M.; JECKER, P.; WONIGEIT, K.; WESTERMANN, J. 2001. Splenectomy of rats selectively reduces lymphocyte function-associated antigen 1 and intercellular adhesion molecule 1 expression on B-cell subsets in blood and lymph nodes. **Blood** 98(10): 3035-41.

MITCHELL, J. 1973. Lymphocyte circulation in the spleen. Marginal zone bridging channels and their possible role in cell traffic. **Immunology** 24(1): 93-107.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E. & DORSHKIND, K. 2006. New perspectives in B-1 B cell development and function. **Trends Immunol** 27(9): 428-33.

MORRIS, D. H. & F. D. BULLOCK 1919. The Importance of the Spleen in Resistance to Infection. **Ann Surg** 70(5): 513-21.

NOLTE, M. A.; HOEN, E. N.; VAN STIJN, A.; KRAAL, G.; MEBIUS, R. E. 2000. Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. **Eur J Immunol** 30(2): 626-34.

OKA, Y.; ROLINK, A. G.; ANDERSSON, J.; KAMANAKA, M.; UCHIDA, J.; YASUI, T.; KISHIMOTO, T.; KIKUTANI, H.; MELCHERS, F. 1996. Profound reduction of mature B cell numbers, reactivities and serum Ig levels in mice which simultaneously carry the XID and CD40 deficiency genes. **Int Immunol** 8(11): 1675-85.

PAPE, K. A.; KOUSKOFF, V.; NEMAZEE, D.; TANG, H. L.; CYSTER, J. G.; TZE, L. E.; HIPPEN, K. L.; BEHRENS, T. W.; JENKINS, M. K. 2003. Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response. **J Exp Med** 197(12): 1677-87.

PEITZMAN, A. B.; FORD, H. R.; HARBRECHT, B. G.; POTOKA, D. A.; TOWNSEND, R. N. 2001. Injury to the spleen. **Curr Probl Surg** 38(12): 932-1008.

PETROIANU, A. 2003. O baço. CLR Balieiro Editores Ltda.

RANNIE, G. H. & K. J. DONALD. 1977. Estimation of the migration of thoracic duct lymphocytes to non-lymphoid tissues. A comparison of the distribution of radioactivity at intervals following i.v. transfusion of cells labelled with  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{125}\text{I}$  and  $^{51}\text{Cr}$  in the rat. **Cell Tissue Kinet** 10(6): 523-41.

RATLEDGE, C. & L. G. DOVER. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annu Rev Microbiol** 54: 881-941.

REESE, S. R.; KUDSK, K. A.; GENTON, L.; IKEDA, S. 2005. I-selectin and alpha4beta7 integrin, but not ICAM-1, regulate lymphocyte distribution in gut-associated lymphoid tissue of mice. **Surgery** 137(2): 209-15.

REIF, K.; EKLAND, E. H.; OHL, L.; NAKANO, H.; LIPP, M.; FORSTER, R.; CYSTER, J. G. 2002. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. **Nature** 416(6876): 94-9.

SAMARASINGHE, R.; TAILOR, P.; TAMURA, T.; KAISHO, T.; AKIRA, S.; OZATO, K. 2006. Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling. **J Interferon Cytokine Res** 26(12): 893-900.

SEABROOK, T. J.; HEIN, W. R.; DUDLER, L.; YOUNG, A. J. 2000. Splenectomy selectively affects the distribution and mobility of the recirculating lymphocyte pool. **Blood** 96(3): 1180-3.

SHENNIB, H.; CHIU, R. C.; MULDER, D. S. 1983. The effects of splenectomy and splenic implantation on alveolar macrophage function. **J Trauma** 23(1): 7-12.

SHIH-CHING, K.; CHOUDHRY, M. A.; MATSUTANI, T.; SCHWACHA, M. G.; RUE, L. W.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. 2004. Splenectomy differentially influences immune responses in various tissue compartments of the body. **Cytokine** 28(3): 101-8.

SINGER, D. B. 1973. Postsplenectomy sepsis. **Perspect Pediatr Pathol** 1: 285-311.

SPENCER, N. F.; NORTON, S. D.; HARRISON, L. L.; LI, G. Z.; DAYNES, R. A. 1996. Dysregulation of IL-10 production with aging: possible linkage to the age-associated decline in DHEA and its sulfated derivative. **Exp Gerontol** 31(3): 393-408.

SPERTINI, O.; KANSAS, G. S.; MUNRO, J. M.; GRIFFIN, J. D.; TEDDER, T. F. 1991. Regulation of leukocyte migration by activation of the leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1) selectin. **Nature** 349(6311): 691-4.

SPIRER, Z.; ZAKUTH, V.; DIAMANT, S.; MONDORF, W.; STEFANESCU, T.; STABINSKY, Y.; FRIDKIN, M. 1977. Decreased tuftsin concentrations in patients who have undergone splenectomy. **Br Med J** 2(6102): 1574-6.

SPRINGER, T. A. 1995. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu Rev Physiol** 57: 827-72.

TAKAHASHI, K.; KOZONO, Y.; WALDSCHMIDT, T. J.; BERTHIAUME, D.; QUIGG, R. J.; BARON, A.; HOLERS, V. M. 1997. Mouse complement receptors type 1 (CR1;CD35) and type 2 (CR2;CD21): expression on normal B cell subpopulations and decreased levels during the development of autoimmunity in MRL/lpr mice. **J Immunol** 159(3): 1557-69.

TANGYE, S. G.; FERGUSON, A.; AVERY, D. T.; MA, C. S.; HODGKIN, P. D. 2002. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. **J Immunol** 169(8): 4298-306.  
Tedder *et al.*, 1984).

TEDDER, T. F.; CLEMENT, L. T.; COOPER, M. D. 1984. Expression of C3d receptors during human B cell differentiation: immunofluorescence analysis with the HB-5 monoclonal antibody. **J Immunol** 133(2): 678-83.

TISCHENDORF, F. 1985. On the evolution of the spleen. **Experientia** 41(2): 145-52.

TWOHIG, J.; KULIK, L.; HALUSZCZAK, C.; REUTER, J.; ROSSBACH, A.; BULL, M.; HOLERS, V. M.; MARCHBANK, K. J. 2007. Defective B cell ontogeny and immune response in human complement receptor 2 (CR2, CD21)

transgenic mice is partially recovered in the absence of C3. **Mol Immunol** 44(13): 3434-44.

VAN DEN DOBBELSTEEN, G. P., BRUNEKREEF, K.; KROES, H.; VAN ROOIJEN, N.; VAN REES, E. P. 1993. Enhanced triggering of mucosal immune responses by reducing splenic phagocytic functions. **Eur J Immunol** 23(7): 1488-93.

VAN DEN EERTWEGH, A. J.; LAMAN, J. D.; NOELLE, R. J.; BOERSMA, W. J.; CLAASSEN, E. 1994. In vivo T-B cell interactions and cytokine-production in the spleen. **Semin Immunol** 6(5): 327-36.

VAN EWYK, W. & P. NIEUWENHUIS. 1985. Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp. **Experientia** 41(2): 199-208.

VAZ, N.; FARIA, A. M.; VERDOLIN, B. A.; CARVALHO, C. R. 1997. Immaturity, ageing and oral tolerance. **Scand\_J Immunol** 46(3): 225-9.

WALLACE, D.; FROMM, D.; THOMAS, D. 1982. Accessory splenectomy for idiopathic thrombocytopenic purpura. **Surgery** 91(2): 134-6.

WESTERMANN, J.; WILLFUHR, K. U.; ROTHKOTTER, H. J.; FRITZ, F. J.; PABST, R. 1989. Migration pattern of lymphocyte subsets in the normal rat and the influence of splenic tissue. **Scand J Immunol** 29(2): 193-201.

WESTERMANN, J.; SCHWINZER, R.; JECKER, P.; PABST, R. 1990. Lymphocyte subsets in the blood. The influence of splenectomy, splenic autotransplantation, ageing, and the site of blood sampling on the number of B, T, CD4+, and CD8+ lymphocytes in the rat. **Scand J Immunol** 31(3): 327-34.

WESTERMANN, J. & R. PABST. 1992. Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. **Clin Investig** 70(7): 539-44.

WILKINS, B. S. 2002. The spleen. **Br J Haematol** 117(2): 265-74.

WOLF, H. M.; EIBL, M. M.; GEORGI, E.; SAMSTAG, A.; SPATZ, M.; URANUS, S.; PASSL, R. 1999. Long-term decrease of CD4+CD45RA+ T cells and impaired primary immune response after post-traumatic splenectomy. **Br J Haematol** 107(1): 55-68.

WOOD, P. R.; YOUNG, A. M.; MCKIMM-BRESCHKIN, J. L.; CHEERS, C. 1984. Effect of splenectomy on production of interferon and colony-stimulating factor in *Listeria monocytogenes*-infected mice. **Infect Immun** 46(3): 860-1.

YASUI, T.; MURAOKA, M.; TAKAOKA-SHICHIJO, Y.; ISHIDA, I.; TAKEGAHARA, N.; UCHIDA, J.; KUMANOGOH, A.; SUEMATSU, S.; SUZUKI, M.; KIKUTANI, H. 2002. Dissection of B cell differentiation during primary immune responses in mice with altered CD40 signals. **Int Immunol** 14(3): 319-29.