

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Victor Ugarte Bornstein*

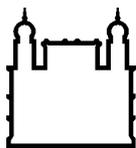
ESTUDO DOS LINFÓCITOS T  $\gamma\delta$  E  $\alpha\beta$  NA INFLAMAÇÃO PULMONAR NO MODELO  
EXPERIMENTAL DE SEPSE GRAVE

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientador (es):** Profa. Dra. Carmen Penido  
Profa. Dra. Maria das Graças Henriques

**RIO DE JANEIRO**

2010



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***Victor Ugarte Bornstein***

**ESTUDO DOS LINFÓCITOS T  $\gamma\delta$  E  $\alpha\beta$  NA INFLAMAÇÃO PULMONAR NO  
MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE GRAVE**

**ORIENTADOR (ES): Profa. Dra. Carmen Penido**  
**Profa. Dra. Maria das Graças Henriques**

**Aprovada em: 21/07/2010**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Andrea Henriques Pons - **Presidente**  
**Prof. Dr.** Rachel Novaes Gomes  
**Prof. Dr.** Rodrigo Tinoco Figueiredo  
**Prof. Dr.** Claudia Farias Benjamim  
**Prof. Dr.** Mariana Conceição de Souza

Rio de Janeiro, 21 de julho de 2010

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Farmacologia Aplicada do Instituto de Tecnologia e Fármacos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, chefiado pela Dra. Maria das Graças M. O. Henriques e na vigência de auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos,

À minha Mãe e ao meu Irmão, Camilo, novamente por tudo que já lhes agradei no passado e por eles serem grandes responsáveis pela pessoa que sou;

À Carmen Penido, que muito contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal, pela sua orientação, seu apoio e sua ajuda sempre que estes foram necessários, assim como pela confiança e preocupação;

À Cláudia F. Benjamim pela orientação, discussões científicas, pela influência que exerceu nas minhas escolhas acadêmicas, por disponibilizar de braços abertos seu laboratório e pela revisão crítica e construtiva da dissertação;

À Maria das Graças Henriques pela leitura atenciosa da dissertação, por todo o auxílio nesta e, novamente, pela importante oportunidade me juntar ao seu grupo de pesquisa e então aprender tudo o que tenho aprendido neste laboratório;

À Maria Fernanda pelas discussões e conversas, pela sua ajuda (as indispensáveis e as dispensáveis - mas mesmo assim presentes), pelas caronas, cervejas e companhia (fins de semanas, de noite no laboratório, no Chile)

À Triciana e à Catarina pela ajuda nas demoradas cirurgias, nos experimentos, companhias até tarde e pela amizade;

À equipe do laboratório: Alexandre, Antônio, Chuxu, Betinho, Dani, Elaine, Fátima, Felipe, Gizeli, Fausto, Fernando, Joana, Leandro, Márcia, Mariana, Morena, Octávio, Raquel, Simone, Soc e Tadeu pelas conversas, discussões, críticas, ajudas, cervejas e eventual companhia durante alagamentos;

Ao pessoal do laboratório de Inflamação, Estresse Oxidativo e Câncer (UFRJ) pela ajuda, conversas e pela simpatia;

Ao Raphael Molinaro por sua “prestatividade” ao ensinar e discutir protocolos, modelos experimentais e por eventuais ajudas nos experimentos;

À minha namorada, Clarissa Campbell, por sua paciência e disponibilidade para discutir experimentos, pelas opiniões na escrita da dissertação, pelas discussões científicas, apoio e incentivo em momentos quanto este era necessário, pela amizade, companheirismo e pelo carinho;

Ao Gustavo Masson pelas discussões científicas ou não científicas, apoio, cervejas e pela amizade;

Aos amigos;

Ao Milton Moraes pelas lições ensinadas e pelas boas e produtivas discussões tanto dentro quanto fora da sala de aula;

Ao pessoal da Pós-Graduação de Biologia Celular e Molecular, principalmente à Daniele;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro.

## Lista de abreviaturas

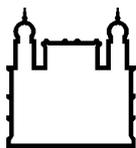
BSA	Albumina de soro bovino
CARS	Síndrome da Resposta Antiinflamatória Compensatória ( <i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i> )
CC	(quimiocina com) motivo C-C
CCL2	(quimiocina) ligante com motivo C-C 2 ( <i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i> )
CD	Grupamento de diferenciação ( <i>cluster of differentiation</i> )
CFDA-SE	succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína ( <i>carboxyfluorescein diacetate succinimidyl Ester</i> )
CFSE	succinimidil éster de carboxifluoresceína ( <i>carboxyfluorescein succinimidyl Ester</i> )
CLP	Ligação e perfuração do ceco ( <i>cecal ligation and puncture</i> )
CXC	(quimiocina com) motivo C-X-C
CXCR	Receptor de quimiocinas CXC
DC	Célula dendrítica ( <i>dendritic cell</i> )
EDTA	Ácido etileno diamino-tetra acético ( <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>fluorescein isothiocyanate</i> )
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IFN	Interferon
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intra-pleural
i.v.	Intravenosa
KO	(camundongo) nocaute ( <i>knock-out</i> )
LPS	Lipopolisacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos 1 ( <i>Monocyte chemotactic protein-1</i> )
MIF	Média da intensidade de fluorescência
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade ( <i>major histocompatibility complex</i> )
OPD	Dihidro-clorido ortofenilenodiamina ( <i>o-phenylenediamine dihydrochloride</i> )
PE	Ficoeritrina ( <i>phycoeritrin</i> )
PerCP	Clorofila peridina ( <i>peridinin chlorophyll protein</i> )
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-Azida	Solução de PBS contendo 0,1% de azida sódica
ROR $\gamma$ t	Ácido retinóico relacionado ao receptor órfão $\gamma$ t ( <i>retinoic acid-related orphan</i>

	<i>receptor <math>\gamma\delta</math></i> )
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SFB	Soro fetal bovino
T $\alpha\beta$	(linfócito) portando TCR composto pelo heterodímero $\alpha\beta$
T $\gamma\delta$	(linfócito) portando TCR composto pelo heterodímero $\gamma\delta$
T-bet	Gene T box expresso em linfócitos T ( <i>T-box gene expressed in T cells</i> )
TCR	Receptor de células T ( <i>T cell receptor</i> )
TGF	Fator de transformação do crescimento ( <i>transforming growth factor</i> )
Th1	(linfócitos com um perfil tipo / citocinas do perfil) T auxiliar 1
Th2	(linfócitos com um perfil tipo / citocinas do perfil) T auxiliar 2
TNF	Fator de necrose tumoral ( <i>tumor necrosis factor</i> )
Treg	(linfócito) T regulatório
WHO-IUIS	Organização Mundial da Saúde – União Internacional das Sociedades de Imunologia ( <i>World Health Organization -International union of immunological societies</i> )

# Índice

Resumo	ix
Abstract	x
1. Introdução	1
1.1. Terminologia	1
1.2. Epidemiologia	3
1.3. Fisiopatologia da sepse	3
1.3.1. Imunossupressão causada pelo evento séptico	5
1.4. Biologia dos linfócitos T $\gamma\delta$	7
1.4.1. Linfócitos T $\gamma\delta$ no pulmão e na sepse	11
2. Objetivos	12
3. Material e métodos	13
3.1. Animais	13
3.2. Anticorpos e reagentes	13
3.3. Indução de sepse grave	14
3.4. Obtenção das células do tecido pulmonar	14
3.5. Obtenção das células do baço	15
3.6. Obtenção das células do sangue periférico	15
3.7. Extrato de proteínas do tecido pulmonar	16
3.8. Pleurisia induzida por LPS	16
3.9. Transferência adotiva	16
3.10. Estímulo <i>in vitro</i> de linfócitos T com anticorpo anti-CD3 para análise da produção de citocinas	17
3.11. Imunofenotipagem e análise da expressão de moléculas de superfície	17
3.12. Ensaio de citocina intracelular	18

3.13.	Ensaio imuno-enzimático ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> , ELISA)	19
3.14.	Análise estatística	19
4.	Resultados	20
4.1.	Estudo de subtipos de linfócitos T durante a sepse grave	20
4.1.1.	Cinética de acúmulo de linfócitos T $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$ no pulmão e no baço após CLP	20
4.1.2.	Análise de morte celular dos subtipos de linfócitos T no pulmão 3 dias após CLP	21
4.1.3.	Expressão de CD25 e c-Fos por linfócitos T durante a sepse	25
4.1.4.	Produção de fatores quimiotáticos no pulmão de animais submetidos à CLP	29
4.2.	Avaliação dos linfócitos T durante a fase de imunossupressão pós-sepse grave	31
4.2.1.	Capacidade migratória de linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ do baço para sítio de inflamação após sepse grave	31
4.2.2.	Análise da produção intracelular de citocinas de linfócitos T $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$	33
5.	Discussão	36
6.	Conclusões	44
7.	Referências bibliográficas	46



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

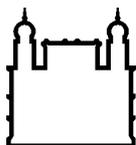
### **ESTUDO DOS LINFÓCITOS T $\gamma\delta$ E $\alpha\beta$ NA INFLAMAÇÃO PULMONAR NO MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE GRAVE**

#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Victor Ugarte Bornstein**

A sepsé é uma das principais doenças causadoras de óbitos em unidades de tratamento intensivo. Ademais, a forma grave dessa síndrome induz uma imunossupressão prolongada que causa diversas complicações, a maior parte dessas relacionadas a infecções pulmonares. O conhecimento atual sobre a imunossupressão induzida por sepsé grave é muito limitado; no entanto já foi demonstrado que esta condição induz disfunções em linfócitos T CD4 e células dendríticas devido a alterações epigenéticas. O objetivo do presente trabalho foi o de estudar os linfócitos T  $\gamma\delta$  no pulmão durante a sepsé grave assim como possíveis disfunções destas células durante a imunossupressão pós-sepsé. Para isso, a sepsé grave foi induzida em camundongos C57BL/6 através da ligação e perfuração do ceco (CLP; 9 perfurações com agulha de 21 gauge e tratamento com antibiótico por 3 dias), modelo experimental descrito por ser capaz de desencadear e manter um estado de imunossupressão. No primeiro dia após a CLP os números de linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  se encontram elevados no pulmão. No 3º dia, o número de linfócitos T  $\alpha\beta$  retornou a níveis basais, no entanto, os números de linfócitos T  $\gamma\delta$  continuaram elevados. A análise por citometria de fluxo da expressão de anexina V, CD25, e c-Fos, sugere que este número aumentado de linfócitos T  $\gamma\delta$  no 3º dia após CLP seja devido a uma rápida e duradoura proliferação destas células em órgãos linfóides secundários e não devido a uma diminuição da morte celular, evento característico da sepsé. De modo interessante, o aumento da expressão de CD25 por linfócitos T  $\gamma\delta$  foi observado tanto no pulmão (3º e 10º dia após CLP) quanto no baço (1º, 3º e 10º dia após CLP), em tempos anteriores aos observados para os linfócitos T  $\alpha\beta$ . No 10º dia após a CLP, os camundongos já se encontram recuperados da sepsé, contudo, os linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  apresentaram uma incapacidade de migrar em direção ao pulmão inflamado, como foi observado em ensaio de transferência adotiva. Em contrapartida, no 10º dia, um maior número de linfócitos T  $\gamma\delta$  (mas não  $\alpha\beta$ ) recuperados do pulmão de animais pós-sépticos estão produzindo IL-17, enquanto há um menor número de linfócitos T  $\gamma\delta$  IL-10<sup>+</sup> ou IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. Este aumento na produção de IL-17 foi acompanhado de um aumento do número de neutrófilos. Em síntese, esses dados sugerem que, diferente dos linfócitos T  $\alpha\beta$ , os linfócitos T  $\gamma\delta$  apresentam um perfil pró-inflamatório durante a imunossupressão pós-sepsé grave induzida por CLP.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **ESTUDO DOS LINFÓCITOS T $\gamma\delta$ E $\alpha\beta$ NA INFLAMAÇÃO PULMONAR NO MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE GRAVE**

#### **ABSTRACT**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Victor Ugarte Bornstein**

Sepsis is a major cause of death at intensive care units. Severe sepsis also leads to systemic long-term immunosuppression, which causes several complications, most of them related to lung infections. The current knowledge about sepsis-induced immunosuppression is poor; however it has been demonstrated that post-septic mice present dendritic and CD4 T cells dysfunction caused by epigenetic changes. In the present work, we aimed to investigate lung  $\gamma\delta$  T cells during severe sepsis and whether these cells were immunocompetent during immunosuppression post-sepsis. For that, severe sepsis was induced in C57BL/6 mice by cecal ligation and puncture (CLP; 9 punctures with 21 gauges needle and antibiotics treatment for 3 days), a model previously described as triggering and maintaining immunosuppression. One day after CLP, both  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T lymphocyte numbers were increased in lung tissue. At day 3,  $\alpha\beta$  counts return to basal levels due to a post-sepsis apoptotic event; however,  $\gamma\delta$  T cell numbers remained elevated. This phenomenon seems to be due to an early and long-lasting proliferation of  $\gamma\delta$  T cells (as compared to  $\alpha\beta$ ), instead of to decreased cell death rate, as assessed by flow cytometry using annexin V, CD25, and c-Fos staining. Interestingly, the increase in CD25 expression by  $\gamma\delta$  T cells was observed in lung (3<sup>rd</sup> and 10<sup>th</sup> days post-CLP) and spleen (1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> and 10<sup>th</sup> day post-CLP), at early time points than the ones observed for  $\alpha\beta$  T cells. At the 10<sup>th</sup> day after CLP, mice were recovered from sepsis, but splenic  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T cells showed a disability to migrate towards inflamed lung in a cell adoptive transfer assay. Nevertheless, during day 10<sup>th</sup>, lung  $\gamma\delta$  T cells (but not  $\alpha\beta$  T cells) recovered from post-septic mice produced increased IL-17 levels, whereas decreased the production of IFN- $\gamma$  and IL-10, showing a Th17-like response. The increased IL-17 production was accompanied by neutrophil infiltration in the lungs. In summary, these data suggest that, in contrast to other T lymphocytes,  $\gamma\delta$  T cells seem to maintain an effective immune-response in the lungs during severe sepsis-induced immunosuppression caused by CLP.

### 3. Introdução

#### 1.1. Terminologia

A palavra sepse é derivada da palavra grega “σηψις”, que significa decomposição de matéria orgânica animal ou vegetal. Há 2700 anos, esta palavra era utilizada no mesmo sentido que a utilizava Hipocrates, não tendo havido drásticas mudanças no seu significado até os dias de hoje (1). Apesar do tempo de existência da palavra, somente em 1914 que a conexão entre bactérias e os efeitos sistêmicos da doença foi feita por Schottmueller (2). A partir desse momento, a palavra sepse tornou-se praticamente sinônimo de infecção grave. Conforme o conhecimento a cerca do sistema imunológico e da sepse foi aumentando, percebeu-se que o que chamamos de sepse é um conjunto de sintomas desencadeados pela resposta a patógenos, atribuindo se então um papel mais passivo aos microorganismos. Em 1972, Lewis Thomas escreveu: “É a nossa resposta à presença [dos microorganismos] que faz a doença. O nosso arsenal para eliminar as bactérias é tão poderoso (...) que estamos em perigo maior por ele do que pelos invasores” (3). Nesta visão, a sepse é desencadeada por microorganismos, mas a resposta é mantida e perpetuada por uma complexa rede de mediadores inflamatórios e disfunções celulares (4).

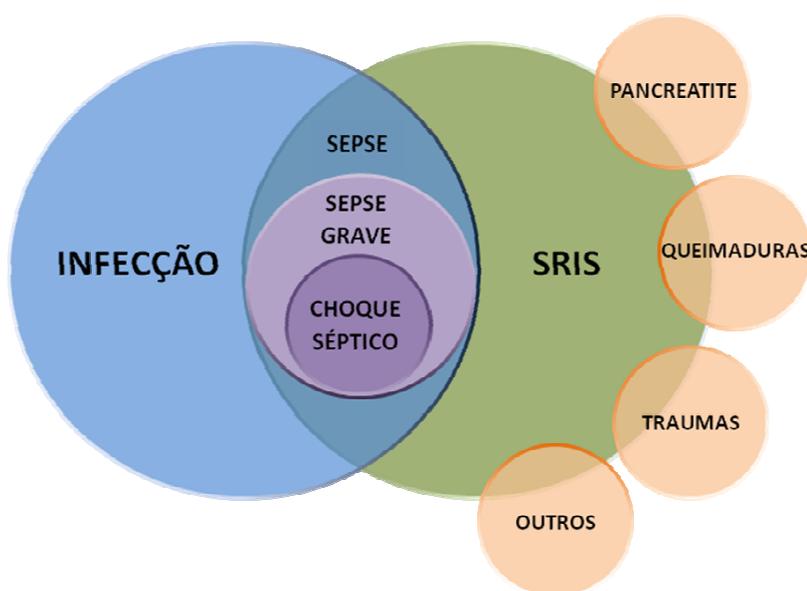
Tabela 1.1. Terminologia: SRIS, sepse, sepse grave e choque séptico.

Síndrome	Definição
Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS)	Dois ou mais dos seguintes critérios: Febre ou hipotermia (>38°C / <36°C) Taquicardia (>90 batimentos/min) Taquipnéia (frequência respiratória maior que 20 respirações/min ou PaCO <sub>2</sub> menor que 32 mmHg) Contagem de leucócitos maior que 12.000/mm <sup>3</sup> ou menor que 4.000/mm <sup>3</sup>
Sepse	SRIS devido a infecção confirmada ou suspeita
Sepse-grave	Sepse com disfunção de um ou mais órgãos, hipoperfusão e hipotensão
Choque séptico	Hipotensão induzida por sepse que se mantêm apesar da reposição volêmica intravenosa em conjunto com problemas de perfusão

Bone *et al.*, 1992

No ano de 1991 foi estabelecido mundialmente que um paciente com sepse é aquele que apresenta resposta inflamatória sistêmica (SRIS) associada a um quadro infeccioso (5), seja ele desencadeado por bactérias, fungos ou vírus (5, 6). Essa definição foi criada pela Conferência de Consenso realizada pelo *College of Chest Physicians and Society of Critical Medicine* (5) que também determinou o significado de SRIS, sepse grave e choque séptico (tabela 1.1). Além dos fatores infecciosos, outros, tais como pancreatite, queimaduras e traumas, também podem levar ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica; no entanto, nestes casos não se dá a esta condição o nome de sepse (figura 1.1). Existem duas visões diferentes a cerca da incidência de sepse nos últimos anos: (i) que esta vem aumentando, já que cada vez são detectados mais casos de sepse (7); ou (ii) que essa parece estar aumentando devido ao fato de que hoje em dia é mais fácil diagnosticar essa síndrome (6).

Hoje, a definição emergente de sepse volta a dar um papel mais ativo aos patógenos na morte dos pacientes, como pode ser observado na frase “uma corrida entre o sistema imunológico do hospedeiro e os patógenos para alcançar a morte do paciente” (8). Esta visão se deve ao fato de que hoje em dia percebe-se a grande importância que a imunossupressão tem na sobrevivência dos pacientes. Durante a fase pró-inflamatória da sepse, e mesmo após esta, ocorre uma forte resposta antiinflamatória. Por causa desta, se o paciente sobreviver à intensa resposta pró-inflamatória que seu organismo desenvolve, este, tem o risco de morte aumentado devido a infecções secundárias.



**Figura 1.1.** Inter relação entre SRIS, infecção e sepse. Adaptado de Bone RC *et al.*, 1992.

## **1.2. Epidemiologia**

Estudos desenvolvidos nos Estados Unidos da América (EUA) revelam que, em 1995, quase dez por cento do total de mortes do país ocorreram em pacientes com sepse: 215.000 mortes por ano, número equivalente ao de mortes por infarto agudo do miocárdio (9). Esta síndrome também é a principal causa de mortes não-coronárias em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) (10) e de pacientes criticamente enfermos (11). Silva e colaboradores (2004) fizeram um estudo epidemiológico da sepse no Brasil, no qual foi mostrado que esta síndrome teve uma incidência de 5,7 % dentre os pacientes totais de hospitais em 2001, em contraste com a de 2,3 % dos EUA (9). Ainda, o estudo brasileiro apresenta a sepse como o principal problema de saúde nas UTIs do país. Dentre estas, 8,5 % das internações correspondem a casos de infecção pulmonar que evolui a quadros de sepse (12). Estudos realizados na Alemanha, Canadá, Espanha, França, Israel, Itália, Portugal e Reino Unido também demonstraram a predominância de infecções pulmonares como desencadeadores da sepse, estando a peritonite na segunda posição (13, 14). Quando se analisa a gravidade da doença em relação ao foco da infecção, esta ordem é a inversa (13, 15-19).

Em 87,9 % dos casos de sepse, as infecções bacterianas são as responsáveis pela doença (6). Em segundo lugar estão os fungos, com apenas 4,6 % dos casos (6). Independente do patógeno, na maioria dos casos, a sepse se desenvolve a partir de uma infecção local que não é controlada. Conforme a doença progride da SRIS até o choque séptico, a mortalidade aumenta. Silva e colaboradores observaram na SRIS uma porcentagem de mortalidade de 24,2 % dos pacientes; 33,9 % na sepse; 46,9 % na sepse-grave e de 52,2 % no choque-séptico no Brasil em 2001 (12). Esses dados se assemelham a estudos internacionais nos quais é observado que pacientes apresentam uma mortalidade de 7-17 % com sepse; de 20-53 % com sepse grave e de 53-63 % com choque séptico (10). No entanto, estes estudos levam em conta somente as mortes causadas pela sepse na fase aguda da doença, desconsiderando mortes devido a sequelas desta síndrome.

## **1.3. Fisiopatologia da sepse**

O pulmão é o órgão clinicamente mais importante e mais sensível às alterações fisiológicas que ocorrem durante a sepse que se desenvolve a partir de infecções abdominais, sanguíneas (20, 21) e pulmonares (22). Como já discutido, esses são os sítios mais comuns de infecções que levam à sepse. Em períodos iniciais da sepse ocorre uma lesão pulmonar aguda

(LPA) (23) que se mantém apesar de cirurgias de intervenção, uso de antibióticos e terapias imunossupressoras (24). Essa síndrome se desenvolve quando não se consegue controlar uma infecção e essa se espalha pelo corpo. Quando há uma resposta imunológica adequada, geralmente, esta é capaz de eliminar o patógeno no foco de entrada: componentes bacterianos iniciam uma cascata de eventos através do estímulo de monócitos, neutrófilos, macrófagos e células endoteliais do hospedeiro, levando à produção e secreção de inúmeros mediadores inflamatórios endógenos (25). Posteriormente, outras populações celulares do sistema imunológico adaptativo são ativadas. De modo contrário, durante um evento séptico ocorre um desbalanço da resposta imunológica que leva às mudanças fisiológicas observadas na síndrome (26). Por sua vez, as alterações que essa síndrome causa dificultam ainda mais a eliminação do patógeno (26-28).

O desenvolvimento da LPA é caracterizado por um rápido e grande acúmulo de neutrófilos (22, 23, 29, 30) e uma grande produção de citocinas e quimiocinas no pulmão, mesmo quando este não é o foco primário da infecção (23, 31). Durante a fase inicial da sepse, sabe-se que há uma grande liberação de citocinas pelo hospedeiro; esse fenômeno é comumente chamado de “tempestade de citocinas”. Dentre as citocinas liberadas, as primeiras e mais bem descritas na sepse são o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina (IL)-1 $\beta$ , além do mediador lipídico fator de ativação plaquetária (PAF) (32-34), moléculas que nesse contexto são pró-inflamatórias. Estes mediadores são necessários para a eliminação de patógenos em infecções locais; no entanto, durante a sepse, eles podem contribuir para a morte do hospedeiro por causarem uma inflamação exacerbada (32). Em diversos trabalhos já foi demonstrado que a neutralização dessas citocinas melhora a porcentagem de sobrevivência de animais submetidos a sepse (35); porém, a eficácia desse tratamento quando aplicados à clínica é controversa (36, 37). Outra citocina já estudada durante essa fase hiper-inflamatória da sepse é a IL-17, no entanto a contribuição dessa citocina para a sobrevivência dos animais parece depender da gravidade da sepse induzida. A IL-17 parece contribuir para a sobrevivência em modelo de sepse branda (38), mas para a mortalidade em modelos de sepse grave (39, 40).

Logo após o início da inflamação, a expressão de moléculas de adesão, tais como selectinas e integrinas, se encontram aumentadas ou ativadas no endotélio vascular do pulmão (41), assim como nos leucócitos (42). Simultaneamente, ocorre a liberação de mediadores quimiotáticos no pulmão por células, tais como macrófagos alveolares e células endoteliais (23, 42). Em consequência destes fatos, ocorre a transmigração de células ativadas para o tecido pulmonar (43). A ativação e migração de células para o pulmão potencializam a inflamação, a LPA e a disfunção deste órgão em modelos de sepse experimental (22, 23).

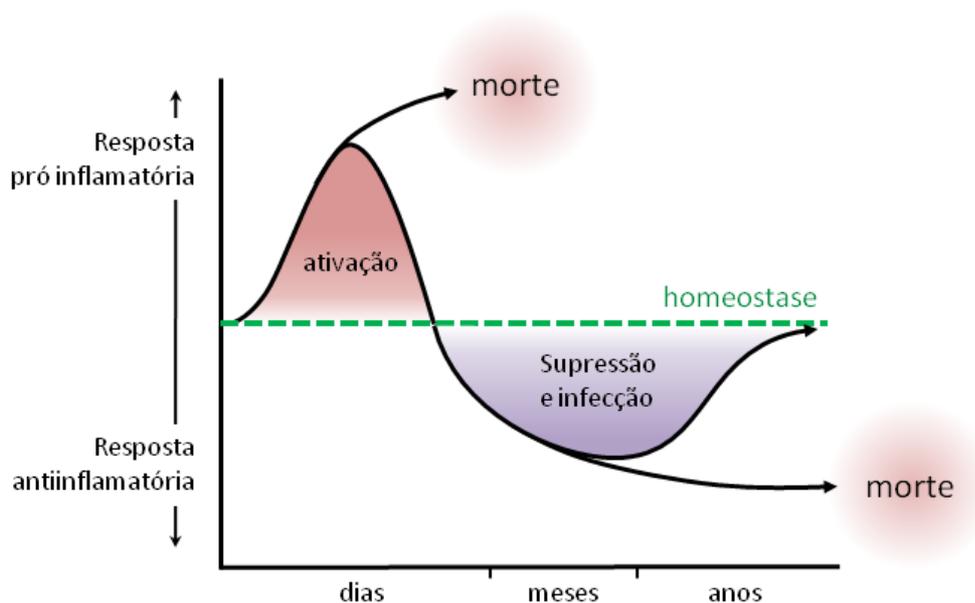
Como efeito, o pulmão inflamado continua a atrair leucócitos, que podem exacerbar ainda mais a resposta inflamatória.

### **1.3.1. Imunossupressão causada pelo evento séptico**

É bem demonstrado na literatura que durante a sepse também ocorre uma importante resposta antiinflamatória e que essa parece contribuir para o desenvolvimento da disfunção de múltiplos órgãos subsequente à sepse (11, 44). Tanto a resposta pró-inflamatória quanto a antiinflamatória ocorrem em momentos iniciais da sepse; no entanto, nos eventos iniciais a resposta pró-inflamatória é a predominante, enquanto que em tempos mais tardios a resposta antiinflamatória é a que predomina (8). Quando o paciente falece na fase inicial da síndrome, o falecimento costuma ser causado por uma disfunção devido ao excesso de mediadores pró-inflamatórios enquanto que em momentos mais tardios as mortes se dão por uma ineficiência no controle de infecções secundárias (figura 1.2) (8). A resposta antiinflamatória que ocorre na sepse também é considerada uma síndrome e a esta se dá o nome de Síndrome da Resposta Antiinflamatória Compensatória (CARS; *compensatory anti-inflammatory response syndrome*). A maior parte das terapias experimentais realizadas até o momento tentou atenuar a resposta inflamatória inicial, ignorando e, possivelmente, exacerbando o desenvolvimento progressivo da imunossupressão (11, 45, 46). Embora essas estratégias de intervenção tenham demonstrado modestos benefícios em grupos específicos de pacientes, a maioria das mortes ocorre em pacientes com sepse que estão imunossuprimidos (45, 46).

Dentre os fatores que contribuem para a CARS estão o aumento da apoptose, a liberação de citocinas antiinflamatórias e a imunoparalisia. Sabe-se que durante a fase aguda da sepse os linfócitos sofrem apoptose, sendo esse fato observado tanto na clínica (47, 48), quanto em modelos experimentais (49, 50). Este mecanismo contribui com a patogenia da doença e o faz por dois motivos: (i) apoptose das células do sistema imunológico inato e adaptativo que ajudariam a combater o patógeno (51); (ii) a retirada das células apoptóticas por fagócitos induz nestes um fenótipo antiinflamatório (52), além de os próprios linfócitos em apoptose produzirem fatores antiinflamatórios, tais como o fator de transformação do crescimento (TGF)- $\beta$  (53). Estudos indicam que a prevenção da apoptose induzida pela sepse diminui a imunossupressão durante essa síndrome (51). Outros eventos igualmente importantes para o desenvolvimento da CARS são: a diminuição da expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) classe II por monócitos e macrófagos do sangue; a liberação de mediadores, como por exemplo a IL-

10 e o TGF- $\beta$ , com atividade antiinflamatória e a liberação de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos (46); e a reprogramação celular que acompanha pacientes e animais com sepse grave (54).



**Figura 1.2.** Fases da sepse. Adaptada de Hotchkiss, 2009.

O fenômeno antiinflamatório pode ocorrer após, ou concomitante, à fase hiperinflamatória. Nesta fase são produzidos mediadores antiinflamatórios, tais como IL-4, IL-10, receptores solúveis de TNF e antagonistas de receptores de IL-1 (55). Ademais ocorre a liberação da IL-6, que facilita a liberação dos fatores antiinflamatórios descritos acima (56, 57). Nesse contexto também é dada uma grande importância à IL-10, já que essa é capaz de desativar monócitos (58) e macrófagos (59). Durante a sepse, essas células acabam diminuindo a produção de espécies reativas do oxigênio (60). A incapacidade de ativação observada nos monócitos e macrófagos também ocorre em outros leucócitos. Neutrófilos de pacientes com sepse grave apresentam uma menor capacidade fagocítica (61) e microbicida (62), assim como uma menor capacidade quimiotática (63). Esta se dá devido a uma menor expressão do receptor de quimiocina CXCR2 (64, 65). Em modelos experimentais de sepse foi observado que os linfócitos T  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  também se encontram comprometidos durante a sepse. Enquanto os linfócitos T  $\alpha\beta$  apresentam dificuldade em se comprometerem com a linhagem T auxiliar (Th)1, dando preferência a citocinas da linhagem Th2 (66); os linfócitos T  $\gamma\delta$  diminuem a atividade citotóxica (67), e ambos entram rapidamente em apoptose (47-49, 68, 69).

Está ficando cada vez mais evidente que a fase antiinflamatória da sepse pode durar além do período da sepse. Mesmo aparentando saudáveis e de volta à rotina habitual, pacientes que passaram por um quadro de sepse grave tem, durante 5 anos, um risco de morte aumentado em relação à população que nunca passou pelo quadro (70). A imunossupressão após a sepse grave é menos estudada que a resposta antiinflamatória que ocorre durante a sepse, no entanto, é responsável por uma elevada mortalidade, onde apenas 20% dos indivíduos que sobreviveram à sepse permanecem vivos em um período de 8 anos (70). Nesse contexto, as infecções pulmonares são as que mais acometem esses pacientes (71, 72).

A imunossupressão que se mantém após evento séptico foi reproduzida recentemente em um modelo animal (31). Nesse modelo, a sepse foi induzida por ligação e perfuração do ceco, um dos modelos experimentais de sepse mais bem aceitos por mimetizar as principais mudanças fisiológicas da sepse em humanos (73, 74). Assim como na clínica, neste modelo experimental os animais permanecem muito mais susceptíveis a infecções quando comparados aos animais controle, mesmo após já estarem curados da sepse (31, 75). Embora se saiba muito pouco a cerca da imunossupressão que permanece após a sepse, estudos foram realizados visando entender a participação de alguns leucócitos nesse fenômeno. Células dendríticas (DC) (28, 31, 76) e linfócitos T auxiliares são incapazes de produzir citocinas do tipo Th1 de maneira adequada devido a modificações epigenéticas (77). Pela mesma razão, os linfócitos T auxiliares também tem dificuldades de proliferar e não conseguem se comprometer de maneira adequada com a linhagem Th2 (77). A outra população celular estudada nessas condições foram os linfócitos T regularórios (Treg) (78). Novamente, devido a modificações epigenéticas, há um aumento no número e na atividade de linfócitos T regulatórios durante a imunossupressão pós-sepse grave. Estas, por sua vez, inibem populações celulares importantes como os linfócitos T citotóxicos (78). O conhecimento sobre os motivos e consequências da imunossupressão pós-sepse grave é limitado, porém crescente. Dentre as populações celulares ainda não estudadas nessas circunstâncias estão os linfócitos T  $\gamma\delta$ .

#### **1.4. Biologia dos linfócitos T $\gamma\delta$**

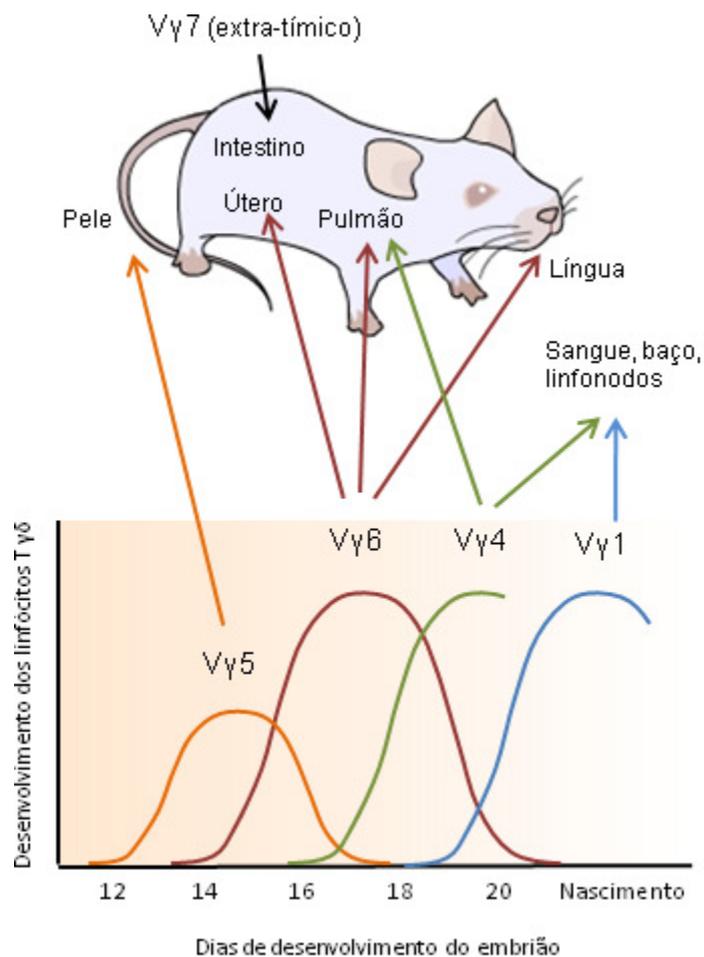
Desde o ano de 1984, quando Saito e colaboradores estudaram a genética dos receptores de células T (TCR) e descobriram a existência de três subunidades para esse receptor os linfócitos T puderam ser também classificados de acordo com seu TCR (posteriormente a existência da quarta subunidade foi descrita) (79, 80). O receptor de células

T é constituído de duas cadeias, uma  $\alpha$  (alfa) e outra  $\beta$  (beta) ou uma  $\gamma$  (gama) e outra  $\delta$  (delta). Os linfócitos T expressam o heterodímero  $\alpha\beta$  (linfócitos T  $\alpha\beta$ ) ou o  $\gamma\delta$  (linfócitos T  $\gamma\delta$ ), não sendo encontrados linfócitos que possuam os dois tipos do receptor. Apesar de os linfócitos T  $\gamma\delta$  representarem apenas 1 a 5% dos linfócitos T presentes nos linfonodos e sangue periférico (81), estas células são encontradas em, relativamente, grandes quantidades em tecidos, tais como no trato respiratório, pele, intestino e nas genitais (82). Esta distribuição tecidual favorece o contato destes linfócitos com antígenos, e devido a esta característica, Allison e Havran propuseram que estas células desempenham um papel importante na primeira linha de defesa contra patógenos (83). Esta teoria é fortalecida pelo fato dos linfócitos T  $\gamma\delta$  terem a capacidade de responder de forma independente da apresentação de antígenos via MHC (84-86) e de apresentarem uma resposta mais rápida a infecções virais e bacterianas (87, 88).

Durante o seu desenvolvimento, os linfócitos T sofrem um rearranjo gênico que permite a essas células formarem diferentes TCRs. O receptor  $\alpha\beta$  de célula T sofre um rearranjo gênico que lhe permite ter grande especificidade, ligando-se mais restritamente a um determinado complexo MHC-peptídeo. O TCR  $\gamma\delta$  não tem tal característica, pois este receptor apresenta uma menor especificidade a complexos MHC-peptídeo e existe em menor diversidade no organismo (89, 90). Além de os linfócitos T  $\gamma\delta$  reconhecerem antígenos pelo método clássico dos linfócitos T (através da apresentação de antígeno pelo MHC), estes reconhecem também antígenos independente da apresentação (de uma modo semelhante às imunoglobulinas), ou através das moléculas de apresentação MIC-A (gene A relacionado à cadeia do MHC de classe I. Do inglês, *MHC class I chain-related gene A*) e MIC-B (gene B relacionado à cadeia do MHC de classe I. Do inglês, *MHC class I chain-related gene B*) e através do CD1 (90). Além de antígenos de natureza protéica, tais como os reconhecidos por linfócitos T  $\alpha\beta$ , os linfócitos T  $\gamma\delta$  podem reconhecer antígenos de diversas naturezas, como peptídeos, aminas, pirofosfatos e fosfolipídios (91). Acredita-se que a capacidade do receptor  $\gamma\delta$  de reconhecer antígenos de diferentes naturezas está relacionada à sua homologia com as imunoglobulinas dos linfócitos B (92). Embora apareça em menor variedade que o TCR  $\alpha\beta$ , o TCR  $\gamma\delta$  apresenta grande variedade em um mesmo indivíduo.

Existem diversos subtipos de cadeias  $\gamma$  e de cadeias  $\delta$ , e os linfócitos T  $\gamma\delta$  podem ser classificados de acordo com os genes que utilizam para formar a cadeia  $\gamma$  e a cadeia  $\delta$  do TCR que expressam. Esta junção parece não ser aleatória, já que nos TCR estudados até o momento parece haver uma preferência de ligação de algumas das cadeias  $\gamma$  com algumas das cadeias  $\delta$  (92, 93). Além de influenciar na função dessas células, a escolha das cadeias  $\gamma$  e  $\delta$

pode influenciar também a localização destes linfócitos (92, 93). Dentre os subtipos mais bem estudados de linfócitos T  $\gamma\delta$  estão os linfócitos T  $V\gamma 4/\delta$  ( $V\gamma 4$ ), os linfócitos T  $\gamma/V\delta 4$  ( $V\delta 4$ ) e os linfócitos T  $\gamma/V\delta 6.3$  ( $V\delta 6.3$ ), nos quais V significa a região variável da cadeia  $\gamma$  ou  $\delta$  no rearranjo V(D)J (94, 95). Existem três diferentes sistemas de nomenclaturas para as cadeias de TCR murinas, a nomenclatura de Heilig e Tonegawa (96), a de Garman (97) e a da WHO-IUIS (98). Neste trabalho utilizamos a nomenclatura de Heilig e Tonegawa.



**Figura 1.3.** Desenvolvimento embrionário dos subtipos de linfócitos T  $\gamma\delta$ . Figura adaptada de Carding & Egan, 2002.

A localização, assim como o desenvolvimento, de alguns subtipos de linfócitos T  $\gamma\delta$  pode ser observada na figura 1.3. Os linfócitos T  $V\gamma 4$  são encontrados preferencialmente no pulmão e em órgãos linfóides (93). Estas células podem produzir grandes quantidades de IFN- $\gamma$ , além de exercerem efeito citotóxico sobre linfócitos Th2 (99, 100) e promoverem a

maturação de linfócitos T CD8 (101). Em alguns modelos de inflamação já foi observado que o principal produtor de IL-17, dentre os linfócitos T  $\gamma\delta$ , é o subtipo que porta a cadeia V $\gamma$ 4 (86, 102). Na literatura encontramos a cadeia V $\delta$ 6.3 formando o TCR com a cadeia V $\gamma$ 1, no entanto essa junção é um dos possíveis arranjos da cadeia V $\gamma$ 1 (92). Essa cadeia pode se juntar com outras cadeias  $\delta$  e exercer funções diferentes (103). Os linfócitos T V $\gamma$ 1/V $\delta$ 6.3 são encontrados preferencialmente no fígado e no baço e, quando são estimulados de modo não específico, liberam IL-4 (104). Um fato curioso é que essa população celular é capaz de produzir IL-4 e IFN- $\gamma$  simultaneamente (104). Os linfócitos T V $\delta$ 4 são encontrados principalmente no intestino e são considerados linfócitos intra-epiteliais (95). A cadeia V $\delta$ 4 é comumente associada à V $\gamma$ 1 (95) e pode também estar associada à V $\gamma$ 4 (102, 105). Embora a informação sobre os linfócitos T V $\delta$ 4 seja limitada, já foi descrito que os linfócitos T V $\gamma$ 4 IL-17<sup>+</sup> podem expressar a cadeia V $\delta$ 4 (102).

Trabalhos publicados recentemente tem feito a correlação entre a seleção positiva e negativa no timo e a secreção de IL-4, IFN- $\gamma$  ou IL-17 por linfócitos T  $\gamma\delta$ . Nesses trabalhos, foi demonstrado que quando linfócitos T  $\gamma\delta$  não encontram antígenos no timo, ao invés de entrarem em apoptose como ocorre com os linfócitos T  $\alpha\beta$ , se tornam produtores de IL-17 (106-109). De modo similar, os linfócitos T  $\gamma\delta$  que se ligam com muita avidéz na seleção tímica também não entram em apoptose, esses por sua vez secretam IL-4 (107, 110). Por sua vez os linfócitos T  $\gamma\delta$  que se ligam com força moderada aos antígenos no timo produziram principalmente IFN- $\gamma$  (106-108).

É crescente a quantidade de dados demonstrando a importância dos linfócitos T  $\gamma\delta$  em diversos processos inflamatórios (39, 40, 102, 111-113) durante os quais estas células podem migrar ao sítio de inflamação ou ainda proliferar localmente (114). Os linfócitos T  $\gamma\delta$  também são importantes produtores de citocinas, sendo, por exemplo, os principais produtores de IL-17 em alguns modelos inflamatórios (39, 40, 115-117). Os linfócitos T  $\gamma\delta$  apresentam papel indispensável no desenvolvimento e controle de diferentes processos inflamatórios associados à infecção; a infecção virais (118), bacterianas (39, 40, 119, 120), fúngicas (117, 121) ou ainda, durante respostas alérgicas (113, 122).

#### **1.4.1. Linfócitos T $\gamma\delta$ no pulmão e na sepse**

Apesar de representar uma pequena proporção da população de linfócitos T, os linfócitos T  $\gamma\delta$  tem uma grande importância na homeostasia e no combate a infecções. A

ausência de linfócitos T  $\gamma\delta$  faz com que infecções pulmonares induzidas por *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia asteroides*, *Cryptococcus neoformans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, vírus vaccínia entre outros patógenos se desenvolvam mais e mais rápido (117, 123-128). Em adição, em algumas destas infecções, a ausência de linfócitos T  $\gamma\delta$  aumenta a mortalidade de camundongos, conforme observado em animais *knockout* (KO) para estas células (127-129). No curso dessas infecções já foi observado que os números de linfócitos T  $\gamma\delta$  aumentam rapidamente e podem ter tanto um papel pró-inflamatório quando um papel anti-inflamatório (117, 118, 123, 124, 130). Entre outros fatores que influenciam nesse fenômeno está a natureza do patógeno. No entanto é interessante notar que Hirsh e colaboradores observaram que, durante um modelo de sepse branda, os linfócitos T  $\gamma\delta$  do pulmão sofrem uma supressão funcional (67).

Embora pouco estudados na sepse, alguns trabalhos abordam os linfócitos T  $\gamma\delta$  durante a fase aguda da sepse. A contribuição dessas células para a sobrevivência de animais com sepse parece unânime, no entanto, ambígua. Em modelos de sepse grave foi associado a estas células um papel prejudicial (39, 40): os animais KO para os linfócitos T  $\gamma\delta$  apresentam uma maior taxa de sobrevivência quando comparados a animais selvagens (39). Em contra ponto, em modelos de sepse branda os linfócitos T  $\gamma\delta$  contribuem para a sobrevivência dos animais (119, 120). Outros trabalhos já observaram a importância desta célula na produção de citocinas durante a sepse. Em modelos experimentais, durante os momentos iniciais da sepse, os linfócitos T  $\gamma\delta$  são a principal fonte de IL-17 (39, 40). Estas células também são capazes de produzir IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF (67), assim como de regular a produção de IL-6, IL-12 e TNF por outras células (119, 120). Contudo, a regulação de citocinas como a IL-6 também parece depender do modelo e gravidade da sepse, já que essa pode se encontrar aumentada (120) ou diminuída (119) no plasma de camundongos  $\gamma\delta$  KO. No sangue de pacientes sépticos, foi observada uma redução tanto nos números dos linfócitos T  $\gamma\delta$  quando dos linfócitos T  $\alpha\beta$  (68, 69), entretanto, a avaliação por um período de duas semanas revelou que enquanto os linfócitos T  $\gamma\delta$  se encontravam ativados no sangue destes pacientes, os linfócitos T  $\alpha\beta$  aparentemente não estavam ativados (68).

Os estudos desenvolvidos até o momento que abordam os linfócitos T  $\gamma\delta$  na sepse tiveram como foco a fase aguda da doença, mas não existem relatos sobre a fase de imunossupressão que acomete sobreviventes da sepse. Além disto, não existem relatos sobre os subtipos de linfócitos T  $\gamma\delta$  em ambas as fases da sepse.

## 2. Objetivos

Neste trabalho tivemos como objetivo estudar os linfócitos T  $\gamma\delta$  (incluindo os seus subtipos V $\gamma$ 4, V $\delta$ 4 e V $\delta$ 6.3) e os linfócitos T  $\alpha\beta$  no pulmão durante a fase aguda e durante a imunossupressão pós-sepse grave. Para tal pretendemos:

- Caracterizar a cinética de acúmulo de linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  no tecido pulmonar de camundongos durante a sepse grave e durante a imunossupressão pós-sepse;
- Caracterizar os linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  em um órgão linfóide secundário (baço) durante e após a sepse grave;
- Avaliar a ativação dos linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  através da expressão das moléculas CD25 e c-Fos no pulmão e no baço durante e após a sepse grave;
- Avaliar a capacidade migratória dos linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  na fase de imunossupressão pós-sepse grave através de experimentos de transferência adotiva;
- Caracterizar a produção de citocinas pelos linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  do pulmão durante a fase de imunossupressão.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos C57BL/6 de ambos os sexos, pesando entre 20 e 24 g com aproximadamente 7 semanas de vida, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em isoladores ventilados (Gabinete Biotério mod. EB-273, Insight, Brasil) no biotério do Laboratório de Farmacologia Aplicada até o momento do uso, com livre acesso a água e ração, sendo submetidos a um ciclo de 12 horas de claro/escuro. Os animais foram tratados com vermífugo (Mebendazol, 20 mg/l de água) durante 3 dias, e utilizados somente um mês após este tratamento. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA, FIOCRUZ), protocolo L-0004/08.

#### **3.2 Anticorpos e reagentes**

Os seguintes reagentes foram utilizados: Isoton (Coulter, EUA); Giemsa, May Grünwald (Merck, Alemanha); ácido etileno diamino-tetra acético (EDTA), solução antibiótica antimicótica, dihidro-clorido ortofenilenodiamina (OPD), salina tamponada com fosfato (PBS), tampão fosfato-citrato com perborato de sódio (tampão perborato), paraformaldeído, fucoidina, azida sódica, Histopaque 1083, RPMI 1640, saponina, tween 20, tampão de lise de hemácias, (Sigma Chemical Company, EUA); anticorpos monoclonais purificados e biotinizados anti-CCL2, anti-IL-1 $\beta$  e respectivas citocinas recombinantes (R&D Systems®, EUA); anticorpos monoclonais purificados e biotinizados anti-IL-23 e citocinas recombinantes (eBiosciences, EUA) IgG de hamster anti-CD3 murina purificada e conjugada com biotina, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e clorofila peridina (PerCP), IgG de hamster conjugada com PE e FITC anti-TCR $\gamma\delta$  murina, IgG de hamster conjugada com FITC anti-TCR V $\gamma$ 2, IgG de hamster conjugada com FITC anti-TCR V $\delta$ 4, IgG de hamster conjugada com PE anti-TCR V $\delta$ 6.3/2, IgG de coelho conjugada com PE e biotina anti-TCR $\beta$ , IgG de rato conjugada com FITC e PE anti-CD25, IgG de rato conjugada com PE anti-IL4, IgG de rato conjugada com PE anti-IL10, IgG de rato conjugada com PE anti-IL12, IgG de rato conjugada com PE anti-IL17, IgG de rato conjugada com PE anti-IFN $\gamma$ , IgG de rato conjugada com PE anti-TNF, IgG de coelho purificada anti-c-Fos, estreptoavidina conjugada a PerCP e Anexina V FITC (BD Pharmingen, EUA); succinimidil éster diacetato

de carboxifluoresceína (do inglês, *Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, CFDA-SE; Molecular Probes, EUA); colagenase do tipo IV e Brefeldina A (Invitrogen, EUA); IgG de rato conjugada a FITC, PE e PerCP (Santa Cruz, EUA); salina fisiológica estéril 0,9% (Fundação Atauilho de Paiva, RJ); Soro fetal bovino I (SFB) (Hyclone, EUA); Cetamina (Vetanarcol®, König, Argentina) e Xilazina (Anasedan®, Vetbrands, EUA).

### **3.3 Indução de sepse grave**

A sepse grave foi induzida através de uma cirurgia de ligação e perfuração do ceco (CLP) (descrita em Baker *et al.*, 1983 e adaptada por Benjamim *et al.*, 2003). Resumidamente, os animais foram previamente anestesiados com cetamina (112,5 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Foi feita uma incisão de 0,5 - 1 cm no abdômen, o ceco foi exposto e ligado (através de um nó com linha de algodão glacê) abaixo da válvula íleo-cecal sem obstrução total. Após a ligadura, o ceco foi perfurado 9 vezes com agulha 21 gauges e reintroduzido na cavidade abdominal. A incisão foi suturada com fio de poliamida 4-0 (Brasuture, Brasil) com auxílio de um porta-agulhas cirúrgico. Como controle negativo, os animais (denominados *sham*) foram submetidos à cirurgia, porém sem ligação e perfuração do ceco. Imediatamente após as cirurgias, todos os animais receberam 1 ml de solução salina estéril via subcutânea e uma gota da mesma em cada olho. Posteriormente, os animais foram tratados com o antibiótico ertapeném na dose de 75 mg/kg (Invanz®, Merck, Alemanha) diluído em 0,2 ml de solução salina/animal e administrado via i.p. com o auxílio de uma seringa de 1 ml e uma agulha de 27,5 gauges. A administração foi feita 6, 24 e 48 horas após a cirurgia. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>.

### **3.4 Obtenção das células do tecido pulmonar**

Para isolar as células do tecido pulmonar, após a eutanásia (1, 3 e 10 dias após a cirurgia), o pulmão foi removido e cortado em pequenos pedaços sobre os quais foi adicionado uma solução de RPMI 1640 contendo 250 UI/ml de colagenase tipo IV (Invitrogen, EUA). O pulmão foi submetido a duas incubações de 20 minutos a 37°C sob leve agitação e, entre essas, foi feita uma homogeneização do macerado com ajuda de uma seringa de 5 ml e agulha de 14 gauges. O tecido digerido pela colagenase do tipo IV foi filtrado com ajuda de uma rede de voil autoclavada (trama 4.0) e a suspensão celular foi centrifugada a 400 g por 10 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 2 ml de PBS contendo EDTA (10 mM; PBS-EDTA). As suspensões celulares foram mantidas a 4°C. Foi feito um gradiente de concentração com

histopaque 1083 (3 ml) para separação de células mononucleares (em 2 ml da suspensão celular) e centrifugados a 400 g por 30 minutos com aceleração e desaceleração mínimas. A banda de células mononucleares foi recolhida dos tubos e as células foram contadas no contador automático de partículas (Z2 coulter, Beckman Coulter, EUA) em isoton (Coulter Isoton II Diluent, Beckman Coulter, EUA) conforme explicado no manual do aparelho. As células foram ressuspensas para a concentração adequada para ensaios de citometria de fluxo e ensaios *in vitro*.

### **3.5 Obtenção das células do baço**

Os baços dos animais eutanasiados 1, 3 e 10 dias após a cirurgia foram retirados e macerados em PBS-EDTA, em meio asséptico. Para separar as partes de tecido não dissociadas das células em suspensão, o macerado foi centrifugado a 25 g por 1 minuto. O sobrenadante foi centrifugado a 400 g por 10 minutos. Para a separação das células mononucleares foi feito um gradiente de histopaque 1083 (2 ml da suspensão de células pipetados cuidadosamente sobre 3ml de histopaque 1083) e foi feita uma centrifugação a 400 g por 30 minutos com aceleração e desaceleração mínimas. As células mononucleares foram recolhidas e após nova centrifugação (400 g por 30 minutos), o *pellet* foi ressuspendido em PBS ou RPMI 1640 para concentração adequada de células para os ensaios posteriores.

### **3.6 Obtenção das células do sangue periférico**

Dez dias após a cirurgia (CLP ou *sham*), o sangue dos animais foi coletado após eutanásia através da veia cava inferior com auxílio de uma seringa heparinizada. O sangue coletado foi armazenado em um tubo contendo 100 UI de heparina. A contagem do número total de leucócitos foi feita no contador automático de partículas (Z2 coulter, Beckman Coulter, EUA) diluindo-os em isoton (Coulter Isoton II Diluent, Beckman Coulter, EUA). O volume do sangue recolhido foi diluído em uma solução PBS-EDTA até o volume de 2 ml. Para separar as células mononucleares das demais células sanguíneas foi feito um gradiente de densidade contendo 3 ml de Histopaque 1083 e 2 ml da amostra (400 g por 30 minutos com aceleração e desaceleração mínimas). A banda de leucócitos foi coletada, transferida para outro tubo contendo PBS-EDTA e lavados (a 400 g por 10 minutos). O *pellet* foi ressuspendido em um volume adequado para a marcação com anticorpos para análise por citometria de fluxo.

### **3.7 Extração de proteínas do tecido pulmonar**

A extração de proteínas do tecido pulmonar foi realizada com o propósito de se obter as citocinas e quimiocinas presentes neste órgão na forma solúvel. Para isso, 10 dias após a cirurgia (CLP ou *sham*) foi realizada a eutanásia dos animais, os pulmões foram retirados e mantidos no gelo até a retirada de todos os órgãos de interesse dos animais. Foram adicionados 2 ml de PBS/tampão de lise celular (Sigma Aldrich, EUA) com coquetel de inibidores de protease (1µl/ml, Sigma Chemical Company, EUA) nos pulmões e estes foram macerados com auxílio de um *potter* e pistilo acoplados a um rotor automático. Os pulmões macerados permaneceram no gelo por 30 minutos e em seguida foram centrifugados a 8400 g por 30 minutos a 4°C. Após esse processo, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados mais 2 ml da solução de PBS com inibidor de protease.

### **3.8 Pleurisia induzida por LPS**

O desafio foi realizado através de uma injeção intra-pleural (i.pl.) contendo 250 ng de LPS em 100 µl de solução salina estéril. Os animais controle receberam o mesmo volume do veículo. A injeção foi realizada com auxílio de uma agulha (27,5 gauges) adaptada para que apenas o trecho do bisel perfurasse a região intercostal do animal. Após 6 horas do estímulo foi realizada a transferência adotiva e 24 horas após o estímulo os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>.

Para a avaliação da pleurisia induzida por LPS, os animais tiveram suas cavidades pleurais expostas e lavadas com 500 µl com PBS-EDTA. A cavidade pleural dos animais foi lavada com auxílio de uma pipeta automática. Os lavados pleurais foram recolhidos em tubos de polipropileno com fundo cônico (Eppendorf, Alemanha) e centrifugados a 400 g durante 10 minutos. A contagem do número de leucócitos totais foi feita em câmara de Neubauer e a contagem diferencial de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos foi realizada em esfregaços (1 x 10<sup>5</sup> células, 38 g, 5 minutos) através da coloração pelo método de May-Grünwald-Giemsa. Foram contadas 200 células com o auxílio de microscópio óptico sob lente objetiva de imersão com aumento de 100x. Durante todo este processo os lavados e as suspensões celulares foram mantidas a 4°C.

### **3.9 Transferência adotiva**

Esplenócitos obtidos de animais *naives* ou animais que haviam sido submetidos há 10 dias à cirurgia (CLP ou *sham*) foram marcados com CFDA-SE (Invitrogen, EUA) na concentração

de 1  $\mu\text{M}$  com  $8 \times 10^6$  células/ml de RPMI 1640. As células mononucleares esplênicas foram incubadas sob agitação suave por 15 minutos à temperatura ambiente e logo em seguida foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos. O *pellet* foi ressuscitado e o processo de centrifugação foi repetido mais duas vezes para a completa retirada do CFDA-SE (ao entrar na célula é quebrado em CFSE, composto que emite fluorescência entre 492-517 nm e não é lipossolúvel). A contagem total dos leucócitos foi realizada e as células foram injetadas no animal receptor ( $4 \times 10^7$  células por animal em 200  $\mu\text{l}$  de solução salina estéril) por injeção intra-venosa (i.v.). As células dos animais doadores *naives* foram injetadas nos tempos de 3 e 8 dias após a cirurgia do animal receptor (CLP ou *sham*) e a migração foi analisada no 10º dia após a cirurgia do animal receptor. As células dos doadores submetidos à CLP ou *sham* foram retiradas 10 dias após a cirurgia destes e injetadas i.v. 6 horas após a injeção i.pl. nos animais receptores (pleurisia induzida por LPS). A migração para a cavidade pleural foi analisada 24 horas após a injeção i.v.. As células marcadas com CFSE foram recolhidas para análise por citometria de fluxo.

### **3.10 Estímulo *in vitro* de linfócitos T com anticorpo anti-CD3 para análise da produção de citocinas**

Antes da incubação das células 50  $\mu\text{l}$  de uma solução de RPMI 1640 contendo 50  $\mu\text{g/ml}$  de anticorpo anti-CD3 purificado foram adicionados às placas de 96 poços. A solução permaneceu na placa de 96 poços por um período de 4 horas a 37°C. Foram retirados 40  $\mu\text{l}$  de cada poço da placa e então adicionadas as células para a incubação. Os leucócitos mononucleares isolados do tecido pulmonar foram adicionados a uma placa de 96 poços de fundo chato (Nunc, Dinamarca),  $2 \times 10^6$  células por poço, e incubados por 4 horas a 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$  sobre o estímulo. Como controle negativo o mesmo processo foi realizado utilizando somente RPMI 1640. Após a primeira hora de incubação, foi adicionado brefeldina A (10  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma Aldrich, EUA) à solução contendo as células.

Após incubação, as células foram retiradas e analisadas em citometria de fluxo. Todo o processo foi realizado em ambiente estéril no fluxo laminar.

### **3.11 Imunofenotipagem e análise da expressão de moléculas de superfície**

As células recolhidas do pulmão, do baço e do sangue periférico foram plaqueadas ( $1 \times 10^6$  células/poço) em uma placa de 96 poços com fundo em “U” e centrifugadas por 3 minutos a 964 g. Os *pellets* foram ressuscitados em 100  $\mu\text{l}$  de uma solução de PBS contendo 0,1% de

azida sódica (PBS-Azida; PBS contendo 0,1% de azida sódica), 10% de soro de rato inativado e anti-CD16/anti-CD32 (FcBlock®, BD Pharmingen, EUA), e incubados por 30 minutos a 4°C para o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação às imunoglobulinas. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em uma solução de PBS-Azida contendo os anticorpos primários necessários (30 minutos, 4°C). Quando utilizado os anticorpos biotinilados as células foram centrifugadas novamente e ressuspensas em uma segunda solução contendo estreptoavidina conjugada com PerCP (30 minutos, 4°C). Como controle negativo da marcação específica foram utilizados isotipos de anticorpos IgG conjugados a FITC, PE, PerCP ou biotina sem especificidade às proteínas das células analisadas (Santa Cruz, EUA). A seguir, as células foram ressuspensas em PBS-azida e transferidas para tubos de citometria de fluxo (Falcon, EUA). Pelo menos  $10^5$  células foram adquiridas no citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson, EUA). A análise dos marcadores de superfície foi realizada utilizando o *software* Summit (Dako, EUA). Os dados foram coletados e expressos em uma escala log de intensidade de fluorescência e apresentados como histogramas. O percentual da subpopulação de linfócitos T  $\gamma\delta$  CD3<sup>+</sup> e  $\alpha\beta$  CD3<sup>+</sup> foi determinado em uma região física, de acordo com a granulidade e tamanho da célula (figura 4.1). Os números de linfócitos estão representados como número de células por ml (quando do sangue) ou por número total (quando do pulmão e do baço). Esses dados foram obtidos após a multiplicação do percentual da população estudada pelo número total de leucócitos. Ainda, os dados podem aparecer em percentagem de linfócitos positivos para CD25, anexina V e c-Fos, quando estes marcadores foram utilizados.

### **3.12 Ensaio de citocina intracelular**

Células recolhidas do tecido pulmonar e do baço foram incubadas com brefeldina A (10 µg/ml com  $5 \times 10^6$  células/ml) diluída em RPMI 1640 por 4 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi feita a imunofenotipagem com os anticorpos anti-TCR $\beta$  e anti-TCR $\gamma\delta$ . As células foram fixadas em paraformaldeído 2% (20 minutos, 4°C), lavadas com PBS-azida contendo 10% de soro fetal bovino (PBS-azida-SFB) e incubadas com PBS-azida-SFB contendo 0,1% de saponina para abertura de poros na membrana celular. Após a permeabilização, as células foram ressuspensas em uma solução de anticorpos contra a citocina em análise. Após lavagem com PBS-azida-SFB as células foram ressuspensas em PBS-azida e adquiridas por citometria de fluxo. A análise dos marcadores de superfície foi realizada utilizando o programa de computador Summit (Dako, EUA). Os dados foram coletados e expressos em uma escala log de intensidade de fluorescência e apresentados como histogramas. Para

determinar o percentual de linfócitos T  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$ , foi delimitada uma região física e em seguida foi delimitada uma região de células TCR $\alpha\beta^+$  e TCR $\gamma\delta^+$ . A percentagem de linfócitos positivos para as citocinas analisadas é feita dentro da região de linfócitos T  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ .

### **3.13 Ensaio imuno-enzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA*)**

Foram adicionados à placa de polipropileno de fundo chato com 96 poços (NUNC® modelo Maxisorp, EUA) anticorpos de captura diluídos em tampão de cobertura (8  $\mu\text{g/ml}$ ; BD Pharmingen, EUA). Após a incubação (18 horas a 4°C), os poços foram lavados com uma solução de tween 20 a 0,05% diluído em PBS (PBS Tween20). O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com 200  $\mu\text{l}$  de PBS – albumina de soro bovina (*Bovine Serum Albumine*, BSA; Sigma Chemical Company, EUA) 1% (1 hora, 20°C). Posteriormente, a placa foi lavada e incubada com 100  $\mu\text{l}$  das amostras e da curva padrão indicada pelo fabricante (18 horas, 4°C). Após nova lavagem a placa foi incubada com 100  $\mu\text{l}$  de anticorpos biotinizados diluídos em PBS BSA 1% (0,4  $\mu\text{g/ml}$ ; 1 hora, 20°C). A placa foi lavada e incubada (30 minutos, 20°C) com 50  $\mu\text{l}$  de estreptoavidina (Sigma Chemical Company, EUA), seguida de 100  $\mu\text{l}$  de tampão perborato adicionado de 0,5 mg/ml de OPD até a revelação. A reação foi bloqueada com 100  $\mu\text{l}$  de solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M e a leitura realizada por espectrofotometria a 490 nm.

### **3.14 Análise estatística**

Os resultados apresentados em gráficos de barras com dois ou mais grupos foram avaliados estatisticamente pela análise de variância seguida pelo teste Student-Newman-Keuls ou T-Student. Foram considerados significativos valores com  $P \leq 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1 Estudo de subtipos de linfócitos T durante a sepse grave

#### 4.1.1 Cinética de acúmulo de linfócitos T $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$ no pulmão e no baço após CLP

Ao analisarmos o acúmulo de subtipos de linfócitos T no pulmão de animais submetidos à CLP, observamos um aumento no número de todos os subtipos estudados (linfócitos T  $\alpha\beta$ , T  $\gamma\delta$  e seus subtipos: V $\gamma$ 4, V $\delta$ 4 e V $\delta$ 6.3) no tecido pulmonar de camundongos 24 horas após a cirurgia (figura 4.1). Nossos resultados mostram uma queda no número absoluto de linfócitos T do primeiro ao terceiro dia após CLP no pulmão (figura 4.1). Embora ambos os linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  tenham reduzido em número no 3º dia, esta queda ocorreu de maneira diferenciada nessas duas populações. Enquanto o número de linfócitos T  $\alpha\beta$  retornou a níveis basais no 3º dia, o número dos linfócitos T  $\gamma\delta$  continuaram elevados quando comparados ao grupo *sham* (figura 4.1B). A redução no número de células observada no 3º dia após a CLP também foi observada nos subtipos de linfócitos T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 4 e V $\delta$ 6.3 (figuras 4.1E e F). No entanto, é interessante notar que não houve redução dos linfócitos T V $\gamma$ 4; ao contrário, estas células aumentaram progressivamente até o 10º dia após CLP (figura 4.1D). Os números elevados de linfócitos T V $\gamma$ 4 no 3º dia após CLP observados no pulmão podem estar associados ao fato de este subtipo de linfócitos T  $\gamma\delta$  ser residente do pulmão (131).

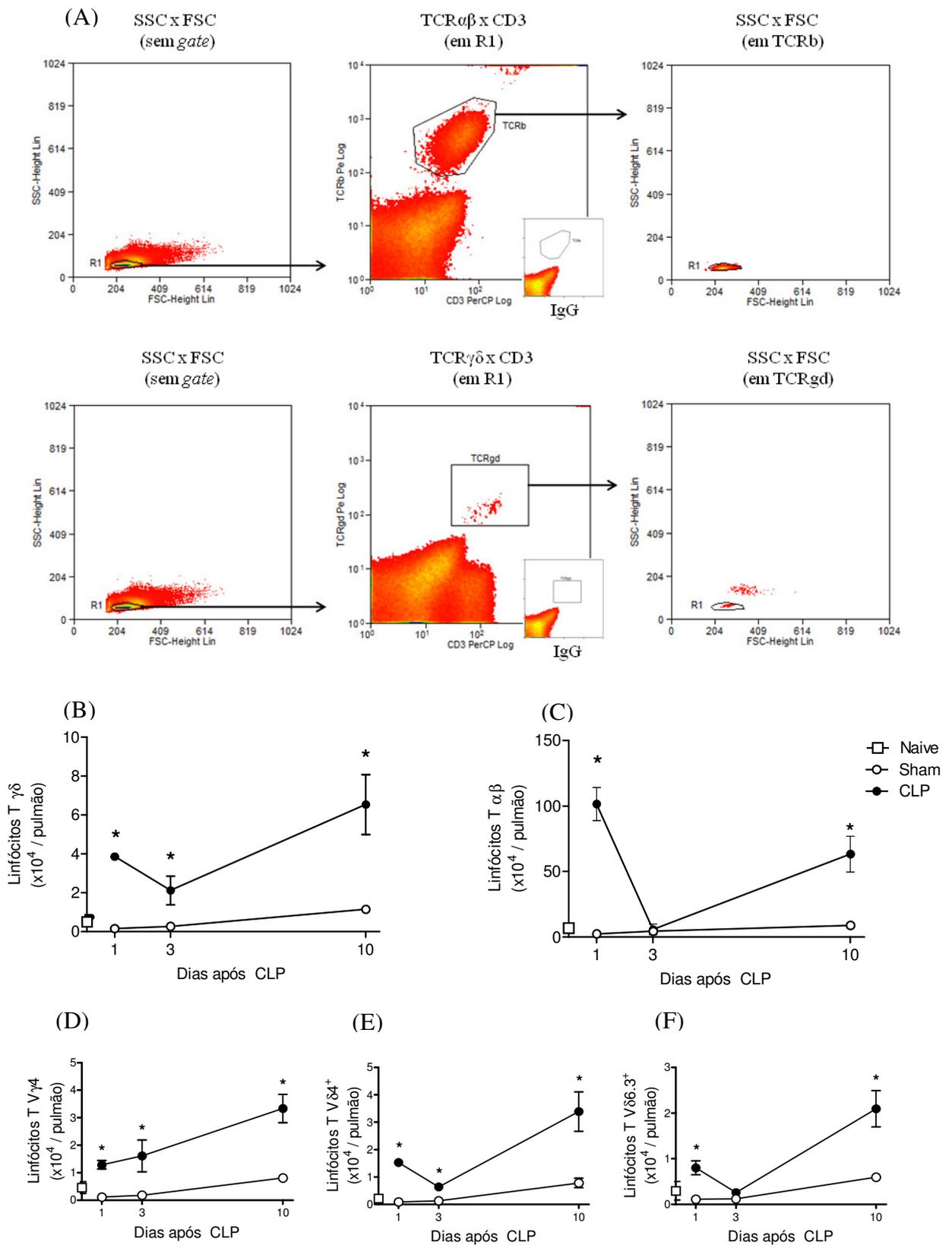
O 10º dia após CLP foi analisado como um ponto da cinética em que não há mais infecção, no intuito de avaliar os possíveis efeitos secundários que esta pode ter causado. Nesse momento observamos que o número de linfócitos T permaneceu elevado no pulmão (figura 4.1). No 10º dia após CLP os números de linfócitos T  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  no pulmão se encontraram aumentados em aproximadamente 6 vezes quando comparados ao grupo *sham*. Esse aumento no 10º dia também foi observado para os subtipos V $\gamma$ 4, V $\delta$ 4 e V $\delta$ 6.3.

Foi feita também uma análise da cinética de acúmulo dos linfócitos T no baço. Nesse órgão observamos uma redução no número de linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  já no 1º dia após CLP. Essa redução se manteve no 3º dia, porém no 10º dia o número dessas células havia retornado a níveis basais (figura 4.2). Analisando os subtipos de linfócito T  $\gamma\delta$ , observamos que o V $\gamma$ 4 apresentou este mesmo padrão, porém os subtipos V $\delta$ 4 e V $\delta$ 6.3 acumularam a níveis acima dos basais no baço a partir do 3º dia após CLP (figura 4.2). No baço dos animais do grupo *sham*, observamos uma redução nos números de linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  no 1º dia após a cirurgia, no 3º dia esse número retornou aos níveis basais (dos animais *naïves*). Embora isto não fosse esperado, trabalhos na literatura demonstram que somente a incisão abdominal estéril já é

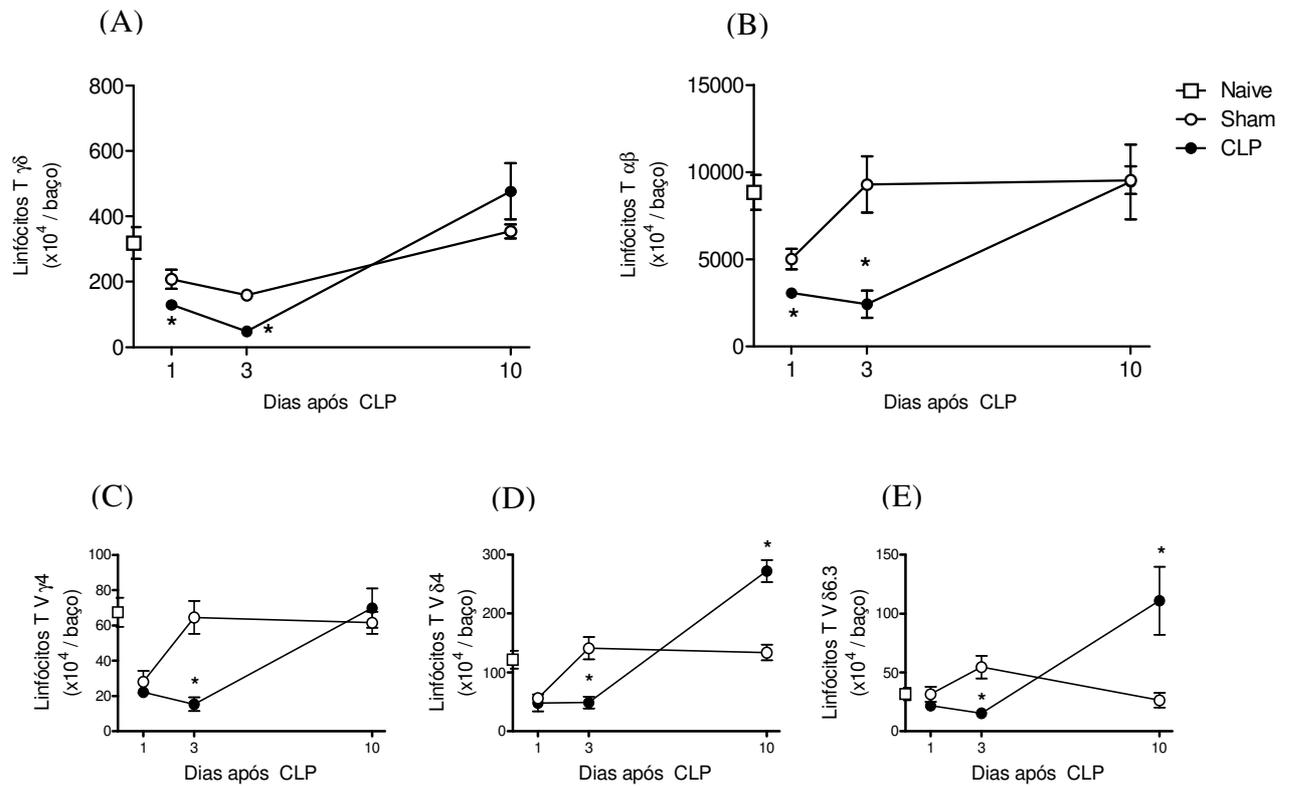
capaz de alterar a resposta imunológica no pulmão (132), sangue, fígado e baço (133, 134). Os valores de animais *naives* estão representados nos gráficos como controle. No sangue de animais submetidos à CLP vemos que há um aumento no número de linfócitos T no 3º dia após a cirurgia, e que no 10º dia também retornou a níveis basais (dados não mostrados). Esses dados sugerem que os linfócitos T encontrados no pulmão poderiam estar migrando a partir de órgãos linfóides secundários através do sangue para o tecido inflamado.

#### **4.1.2 Análise de morte celular dos subtipos de linfócitos T no pulmão 3 dias após CLP**

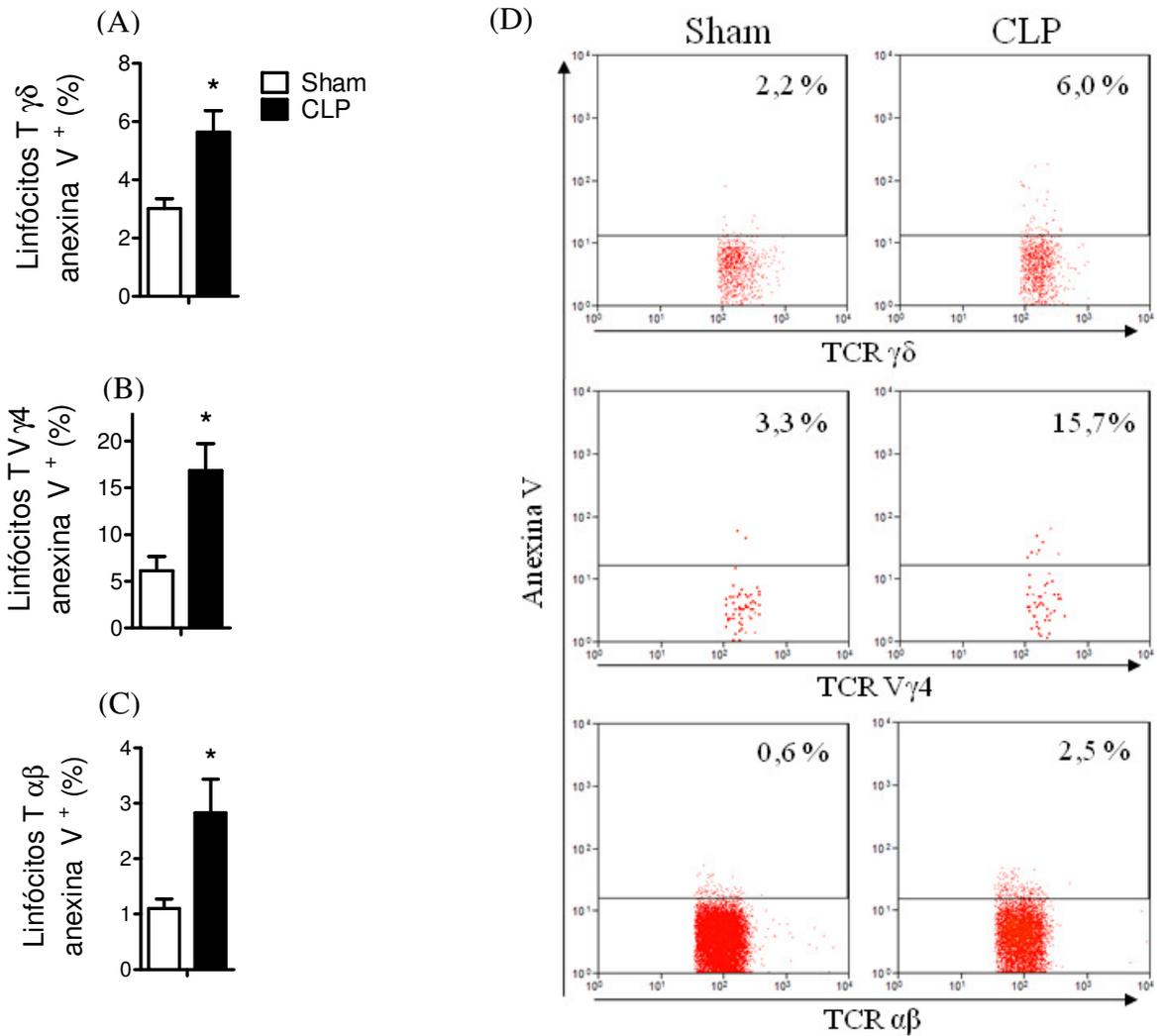
É bem descrito na literatura que, durante a sepse, os leucócitos sofrem apoptose generalizada, o que contribui para o estado de imunoparalisia (51, 135, 136). A análise de anexina V por citometria de fluxo é capaz de revelar os linfócitos T que estão em processo de apoptose, apoptose tardia e necrose (137). De acordo, ao realizar esta análise nos linfócitos do tecido pulmonar, observamos um aumento na porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$ ,  $\alpha\beta$  e  $V\gamma4$  anexina  $V^+$  3 dias após CLP (figura 4.3). No 2º dia após CLP não foi observado aumento de células anexina  $V^+$  nas populações totais de linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$ . No entanto, houve um aumento na quantidade de linfócitos T  $V\gamma4$  anexina  $V^+$  nesse tempo (*sham*:  $13,8 \pm 0,5$  % e CLP:  $17,1 \pm 0,4$  % de células anexina  $V^+$ ;  $p=0,004$ ). Observamos também uma tendência de aumento no número absoluto dos subtipos de linfócitos T analisados no 3º dia após a CLP (linfócitos T  $\gamma\delta$  anexina  $V^+$ : *sham*,  $0,5 \times 10^6$  células. CLP,  $1,2 \times 10^6$  células; linfócitos T  $V\gamma4$  anexina  $V^+$ : *sham*,  $1,6 \times 10^6$  células. CLP,  $2,9 \times 10^6$  células; linfócitos T  $\alpha\beta$  anexina  $V^+$ : *sham*,  $5,5 \times 10^6$  células. CLP,  $8,9 \times 10^6$  células). Desse modo é possível que a redução vista nos linfócitos T no 3º dia após CLP no pulmão se deva a um aumento na apoptose dessas células.



**Figura 4.1. Acúmulo de linfócitos T  $\alpha\beta$  (B),  $\gamma\delta$  (C), V $\gamma 4$  (D), V $\delta 4$  (E) e V $\delta 6.3$  (F) no pulmão 1, 3 e 10 dias após CLP.** Gráficos representativos de dois experimentos. A figura A mostra *dotplots* representativos do desenvolvimento dos *gates* e controle do isotipo de IgG para a obtenção dos dados neste experimento. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 4 animais por grupo experimental. Diferenças estatísticas entre o grupo CLP e o grupo *sham* do mesmo dia ( $P \leq 0,05$ ) estão indicadas por (\*).



**Figura 4.2. Acúmulo de linfócitos T  $\gamma\delta$  (A),  $\alpha\beta$  (B), V $\gamma$ 4 (C), V $\delta$ 4 (D) e V $\delta$ 6.3 (E) no baço 1, 3 e 10 dias após CLP.** Gráficos representativo de dois experimentos onde foram utilizados, no mínimo 4 animais por grupo. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 4 animais por grupo experimental. Diferenças estatísticas entre o grupo CLP e o grupo *sham* do mesmo dia ( $P \leq 0,05$ ) estão indicadas por (\*). Os *gates* foram estabelecidos a partir da marcação com o respectivo isotipo de IgG.



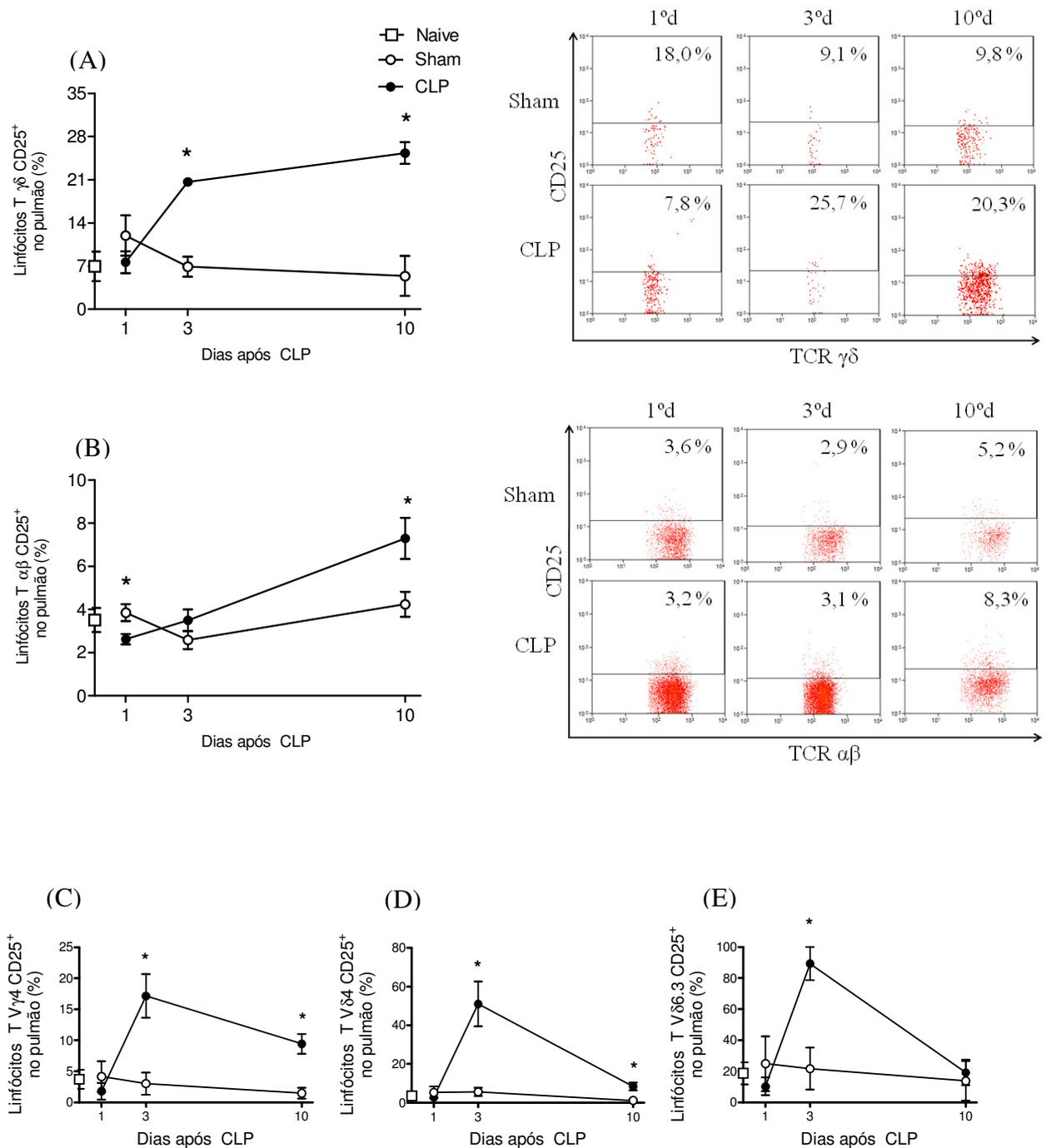
**Figura 4.3. Porcentagem de linfócitos T anexina V<sup>+</sup> dos subtipos  $\gamma\delta$  (A), V $\gamma$ 4 (B) e  $\alpha\beta$  (C) obtidos do pulmão no 3<sup>o</sup> dia após a cirurgia (*sham* ou CLP) e *dotplots* representativos (D). As porcentagens das células anexina V<sup>+</sup> foram feitas dentro do *gate* do subtipo de linfócitos T analisado. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 5 animais por grupo experimental. Diferenças estatísticas entre o grupo CLP e o grupo *sham* do mesmo dia ( $P \leq 0,05$ ) estão indicadas por (\*). Os *gates* foram estabelecidos a partir da marcação com o respectivo isotipo de IgG.**

### 4.1.3 Expressão de CD25 e c-Fos por linfócitos T durante a sepse

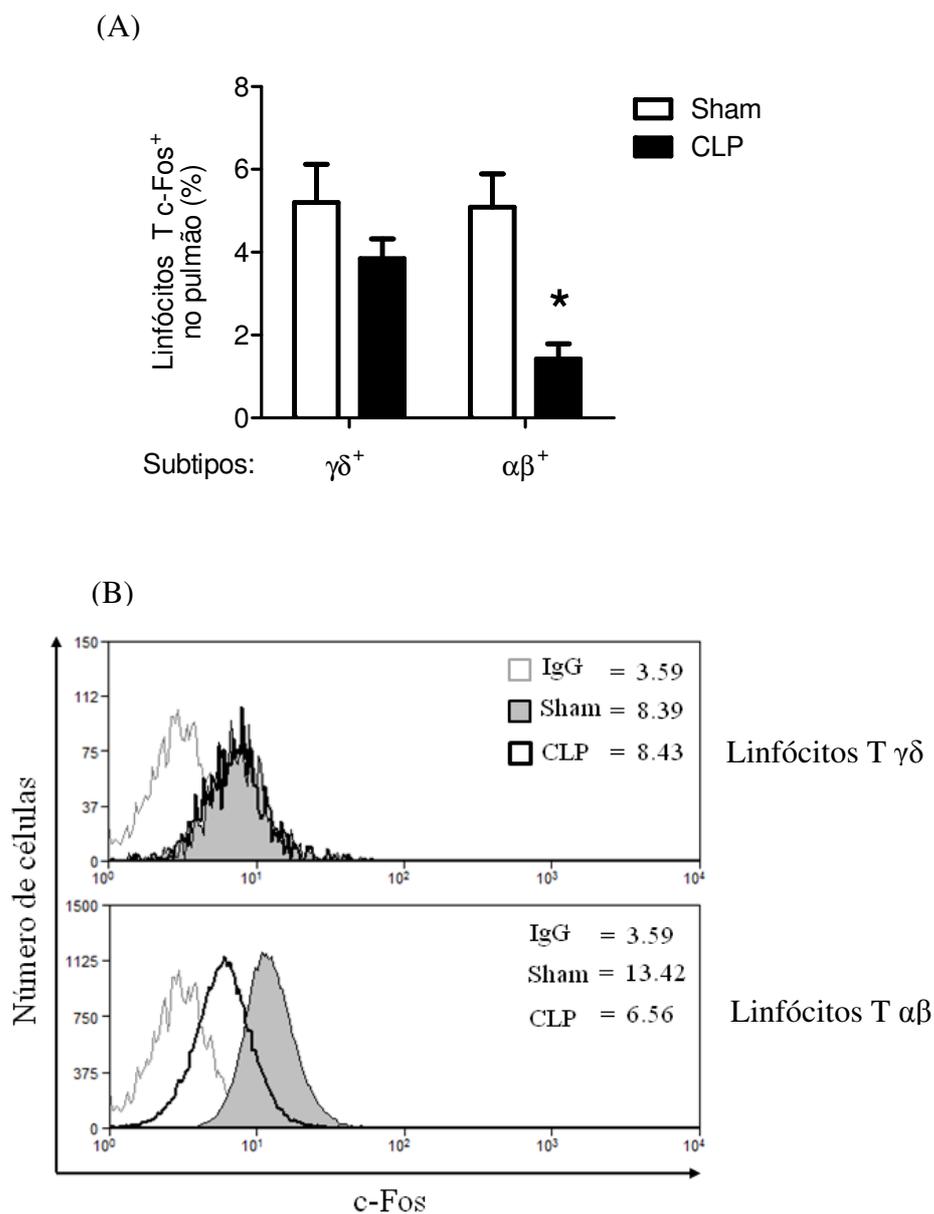
O CD25 é a cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2 (IL-2R) e o aumento na sua expressão está estritamente relacionada com a ativação de linfócitos T (138). Ao se ligar à IL-2, um sinal é gerado pelo IL-2R, este por sua vez, leva à proliferação celular (138). Tanto a proliferação aumentada quanto a proliferação precoce por linfócitos T  $\gamma\delta$  estão dentre os prováveis motivos pelos quais essas células não reduzem a níveis basais no pulmão no 3º dia após CLP. Analisando a cinética da expressão de CD25 pelos linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  do pulmão observamos uma ativação precoce dos linfócitos T  $\gamma\delta$  constatada por um aumento na porcentagem dessas células (e seus subtipos) expressando CD25, 3 dias após a CLP (figura 4.4A). De forma diferente, os linfócitos T  $\alpha\beta$  não apresentaram um aumento na porcentagem de células CD25<sup>+</sup> 3 dias após CLP (figura 4.4A e B). O aumento da expressão de CD25 por essas células foi observado somente no 10º dia após CLP, tempo em que observamos esse aumento em todos os subtipos analisados, com exceção do V $\delta$ 6.3.

O fator de transcrição c-Fos é um potente ativador do gene *IL2*, responsável pela transcrição do mRNA que traduz IL-2, sendo importante para a proliferação (139, 140). Apesar de uma maior porcentagem de células CD25<sup>+</sup>, os linfócitos T  $\gamma\delta$  no pulmão de animais submetido há 3 dias à CLP apresentaram proporções iguais aos controle quanto à expressão de c-Fos (Figura 4.5). O mesmo foi observado para os linfócitos T V $\gamma$ 4 (dados não mostrados). Sob as mesmas circunstâncias, no entanto, esses animais apresentaram menores proporções de linfócitos T  $\alpha\beta$  expressando c-Fos no pulmão (figura 4.5). Esses dados podem explicar o número reduzido de linfócitos T  $\alpha\beta$  no pulmão de animais no 3º dia após CLP, pois, apesar de apresentarem as mesmas taxas de morte celular que os linfócitos T  $\gamma\delta$ , os  $\alpha\beta$  parecem apresentar uma menor capacidade proliferativa, justificada pela menor expressão do fator regulador de IL-2, c-Fos, e de CD25.

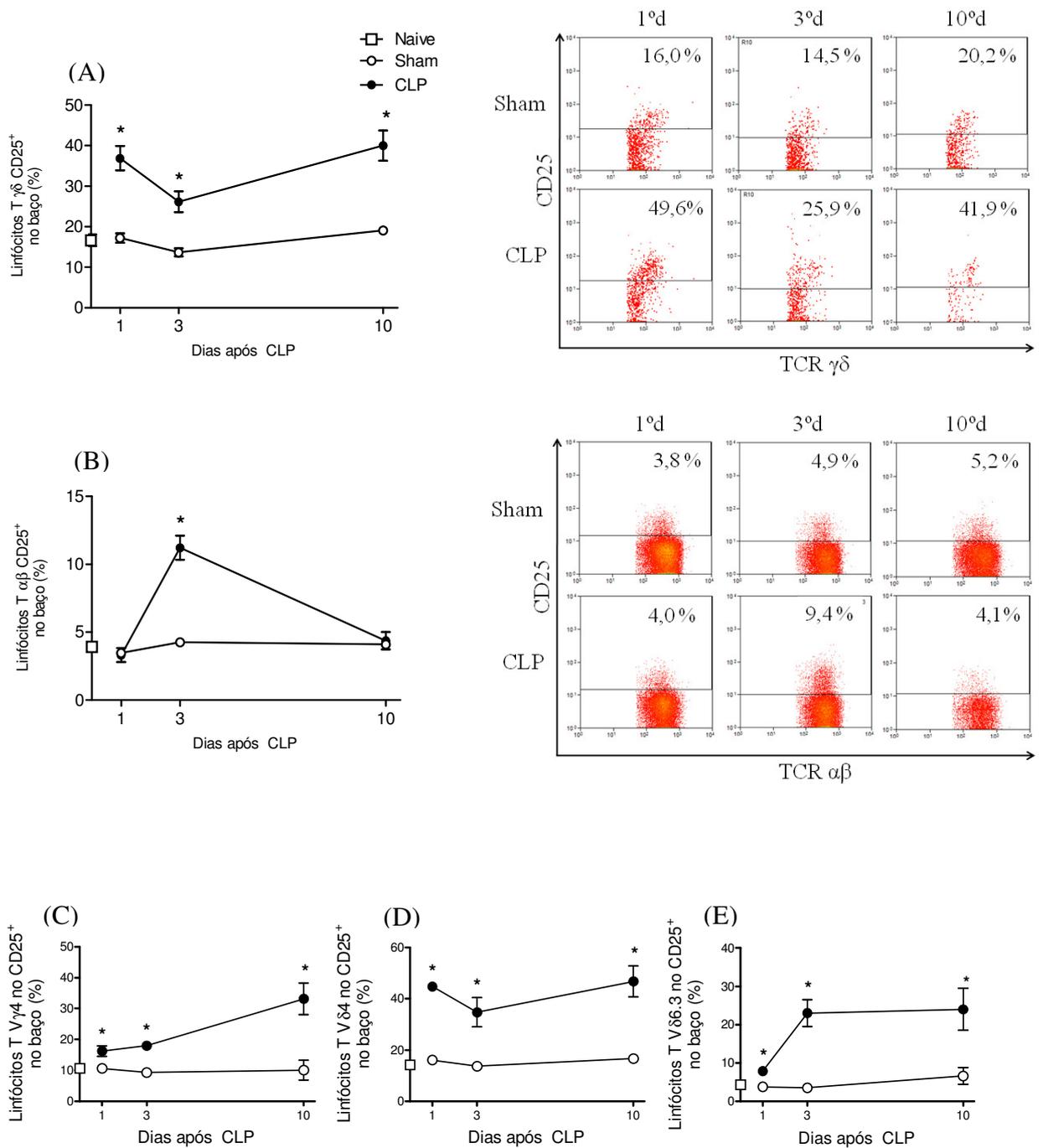
Ao estudarmos a expressão de CD25 nos linfócitos T do pulmão observamos características que podem ter sido adquiridas no pulmão, mas também em órgãos linfóides secundários, por células que migraram para o pulmão inflamado. Ao analisar o baço, observamos que os linfócitos T  $\gamma\delta$  (assim como seus subtipos analisados) também apresentaram uma ativação em tempos anteriores à observada para os linfócitos T  $\alpha\beta$ . Como podemos ver na figura 4.6, enquanto as porcentagens de linfócitos T  $\gamma\delta$  CD25<sup>+</sup> já estão aumentadas no 1º dias pós-CLP, somente no 3º dia após a CLP ocorreu um aumento na porcentagem de linfócitos T  $\alpha\beta$  expressando CD25. A porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$  expressando CD25 no baço permaneceu elevada no 10º dia quando comparada ao grupo *sham*, o que não foi visto para os linfócitos T  $\alpha\beta$ .



**Figura 4.4. Porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$  (A),  $\alpha\beta$  (B), V $\gamma$ 4 (C), V $\delta$ 4 (D) e V $\delta$ 6.3 (E) CD25<sup>+</sup> obtidos do pulmão 1, 3 e 10 dias após CLP e dotplots representativos do 3<sup>o</sup> dia. As porcentagens das células CD25<sup>+</sup> nos dotplots estão dentro do gate do subtipo de linfócitos T analisado. Foram utilizados, no mínimo 6 animais por grupo no ensaio. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais por grupo experimental. Diferenças estatísticas entre o grupo CLP e o grupo sham do mesmo dia ( $P \leq 0,05$ ) estão indicadas por (\*). Os gates foram estabelecidos a partir da marcação com o respectivo isotipo de IgG.**



**Figura 4.5. Porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$ , c-Fos<sup>+</sup> no pulmão retirado no 3º dia após a cirurgia sham ou CLP (A).** Os resultados em (A) estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 3 animais por grupo experimental. Diferenças estatísticas entre o grupo CLP e o grupo sham ( $P \leq 0,05$ ) estão indicadas por (\*). Em (B) os histogramas representativos demonstram os valores da média de intensidade de fluorescência (MIF). Os *gates* foram estabelecidos a partir da marcação com o respectivo isotipo de IgG.

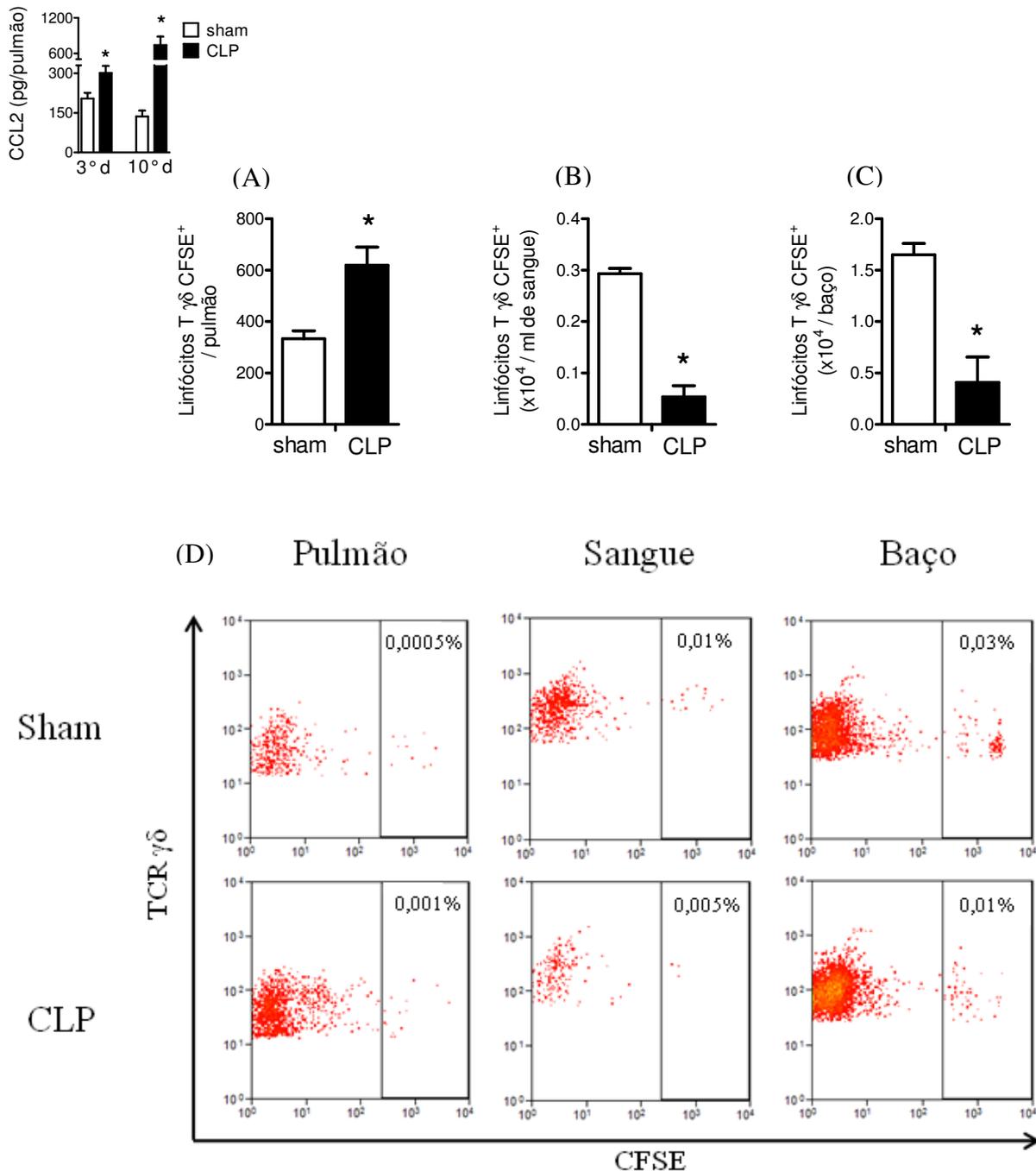


**Figura 4.6. Porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$  (A),  $\alpha\beta$  (B), V $\gamma$ 4 (C), V $\delta$ 4 (D) e V $\delta$ 6.3 (E) CD25<sup>+</sup> obtidos do baço 1, 3 e 10 dias após CLP. As porcentagens das células CD25<sup>+</sup> nos dotplots estão dentro do gate do subtipo de linfócitos T analisado. Foram utilizados, no mínimo 6 animais por grupo no ensaio. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais por grupo experimental. Diferenças estatísticas entre o grupo CLP e o grupo sham do mesmo dia ( $P \leq 0,05$ ) estão indicadas por (\*). Os gates foram estabelecidos a partir da marcação com o respectivo isotipo de IgG.**

#### 4.1.4 Produção de fatores quimiotáticos no pulmão de animais submetidos à CLP

É possível que no curso da sepse os linfócitos T  $\gamma\delta$  estejam proliferando em tempos anteriores no baço e migrando para o pulmão. Benjamim e colaboradores (2003) observaram que no 7º dia após CLP (no mesmo modelo utilizado neste trabalho) o tecido pulmonar só apresentou níveis elevados de IL-13, em um total de 10 citocinas e quimiocinas investigadas. Contudo, no presente trabalho observamos que o tecido pulmonar de animais submetidos à CLP apresentou níveis elevados de CCL2 após 3 e 10 dias da cirurgia (figura 4.7, *inset*). Já foi demonstrado que esta quimiocina é um mediador quimiotático importante para linfócitos T  $\gamma\delta$  em diversas respostas inflamatórias (112, 141, 142).

Em experimentos de transferência adotiva de esplenócitos de animais *naive* marcados por CSFE observamos que, de fato, linfócitos T  $\gamma\delta$  são capazes de migrar efetivamente para o pulmão de animais submetidos à CLP entre 3 e 10 dias após a cirurgia (figura 4.7A). Houve uma migração reduzida para o pulmão dos animais *sham*, nos quais as células transferidas tenderam a ficar no baço e no sangue até o 10º dia (figura 4.7).

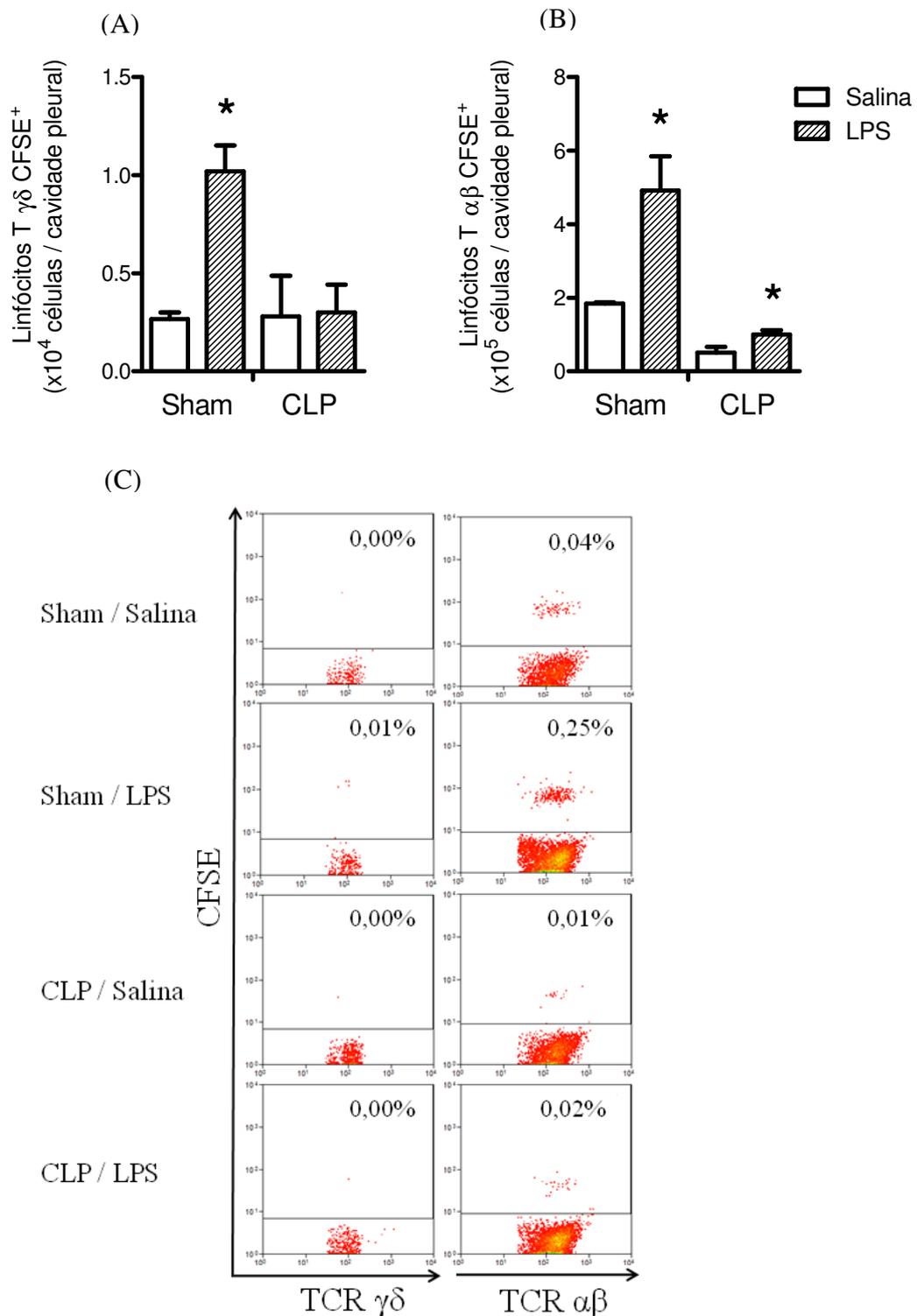


**Figura 4.7. Análise da migração de linfócitos T  $\gamma\delta$  de transferidos adotivamente para o pulmão de animais 10 dias após a cirurgia *sham* ou CLP.** Os esplenócitos obtidos de animais *naives* foram marcados com CFSE e transferidos para animais submetidos à cirurgia *sham* ou CLP 3 após da cirurgia. Os animais receptores foram eutanasiados 10 dias após a cirurgia e foi recolhido pulmão (A), sangue (B) e baço (C) para quantificação de linfócitos T  $\gamma\delta$  através de citometria de fluxo. Como *inset*, no canto superior direito estão os níveis de CCL2 presente nos pulmões de animais submetidos à cirurgia *sham* ou CLP 3 e 10 dias após a cirurgia. Na figura (D) estão *dotplots* representativos dos linfócitos T  $\gamma\delta$  CFSE<sup>+</sup> no pulmão, sangue e baço. As porcentagens das células CFSE<sup>+</sup> nos *dotplots* estão dentro do *gate* do subtipo de linfócitos T analisado. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 4 animais por grupo experimental. Diferenças estatísticas entre o grupo CLP e o grupo *sham* ( $P \leq 0,05$ ) estão indicadas por (\*). Os *gates* foram estabelecidos a partir da marcação com o respectivo isotipo de IgG.

## **4.2 Avaliação dos linfócitos T durante a fase de imunossupressão pós-sepse grave**

### **4.2.1 Capacidade migratória de linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ do baço para sítio de inflamação após sepse grave**

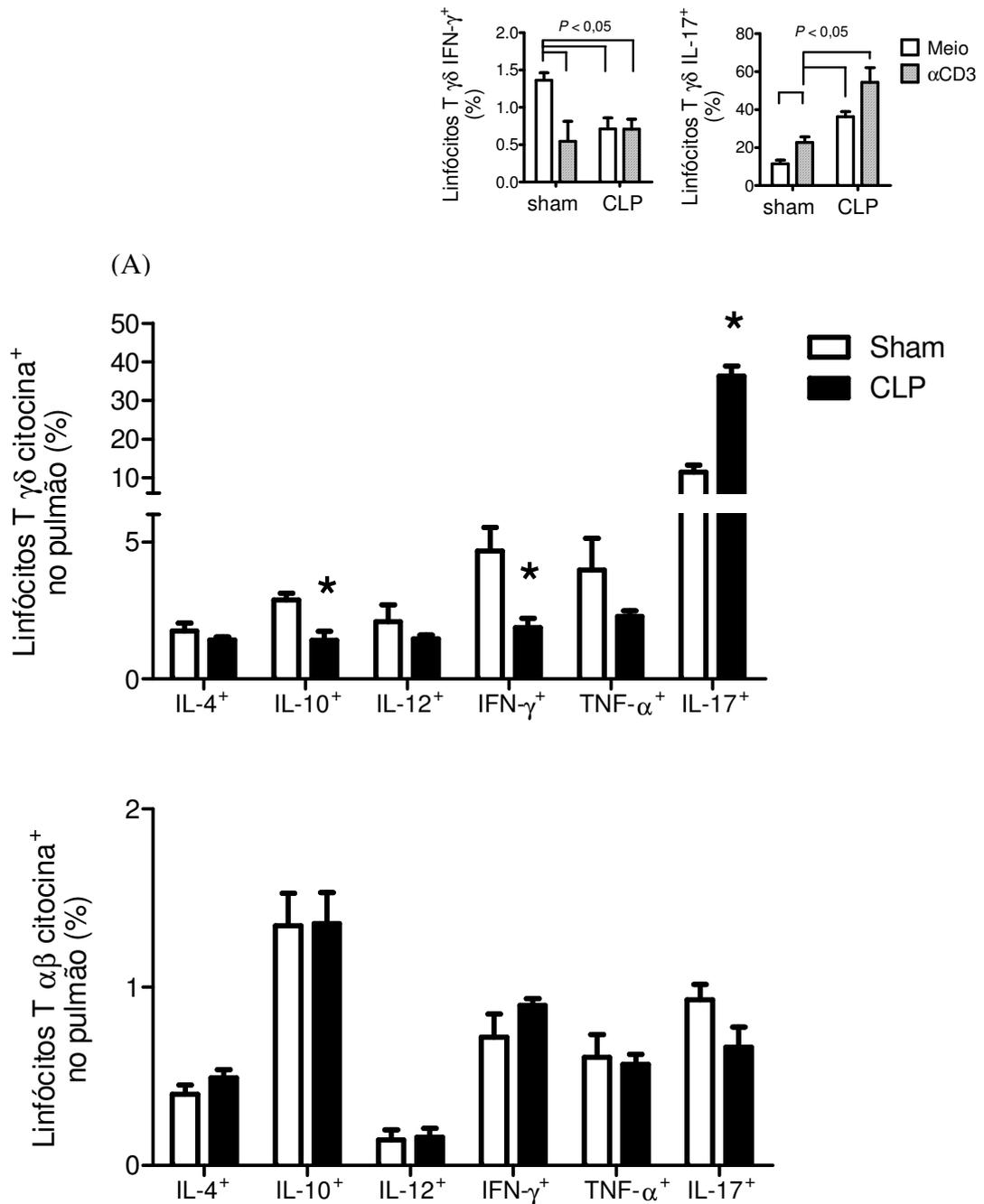
Na literatura são descritas disfunções em DC e linfócitos T CD4 que permanecem mesmo após a cura da sepse (28, 31, 76, 77). Analisamos, então, a capacidade migratória de linfócitos T do baço de animais que passaram por evento séptico a sítios inflamatórios. Esplenócitos CFSE<sup>+</sup> obtidos de animais 10 dias após serem submetidos à cirurgia (*sham* ou CLP) foram injetados (i.v.) em animais que foram submetidos à pleurisia causada por injeção (i.pl.) com LPS 6 horas antes da transferência. Percebemos que, 24 horas após o estímulo com LPS, os linfócitos T  $\gamma\delta$  e os  $\alpha\beta$  de animais *sham* migram para o sítio de inflamação (figura 4.8). De modo interessante, os linfócitos T  $\gamma\delta$  não foram capazes de migrar para o tecido inflamado (figura 4.8). Também observamos uma drástica redução na migração dos linfócitos T  $\alpha\beta$  advindos de animais CLP ao sítio de inflamação, no entanto, apesar de muito reduzida, houve diferença significativa quando comparamos o grupo salina ao grupo LPS (figura 4.8). Esta diferença observada na migração dos linfócitos T  $\alpha\beta$  de animais CLP não pode ser considerada uma migração “adequada” já que estas tiveram uma menor migração ao estímulo de LPS que os linfócitos T  $\alpha\beta$  de animais *sham* à salina ( $P=0,002$ ; figura 4.8B).



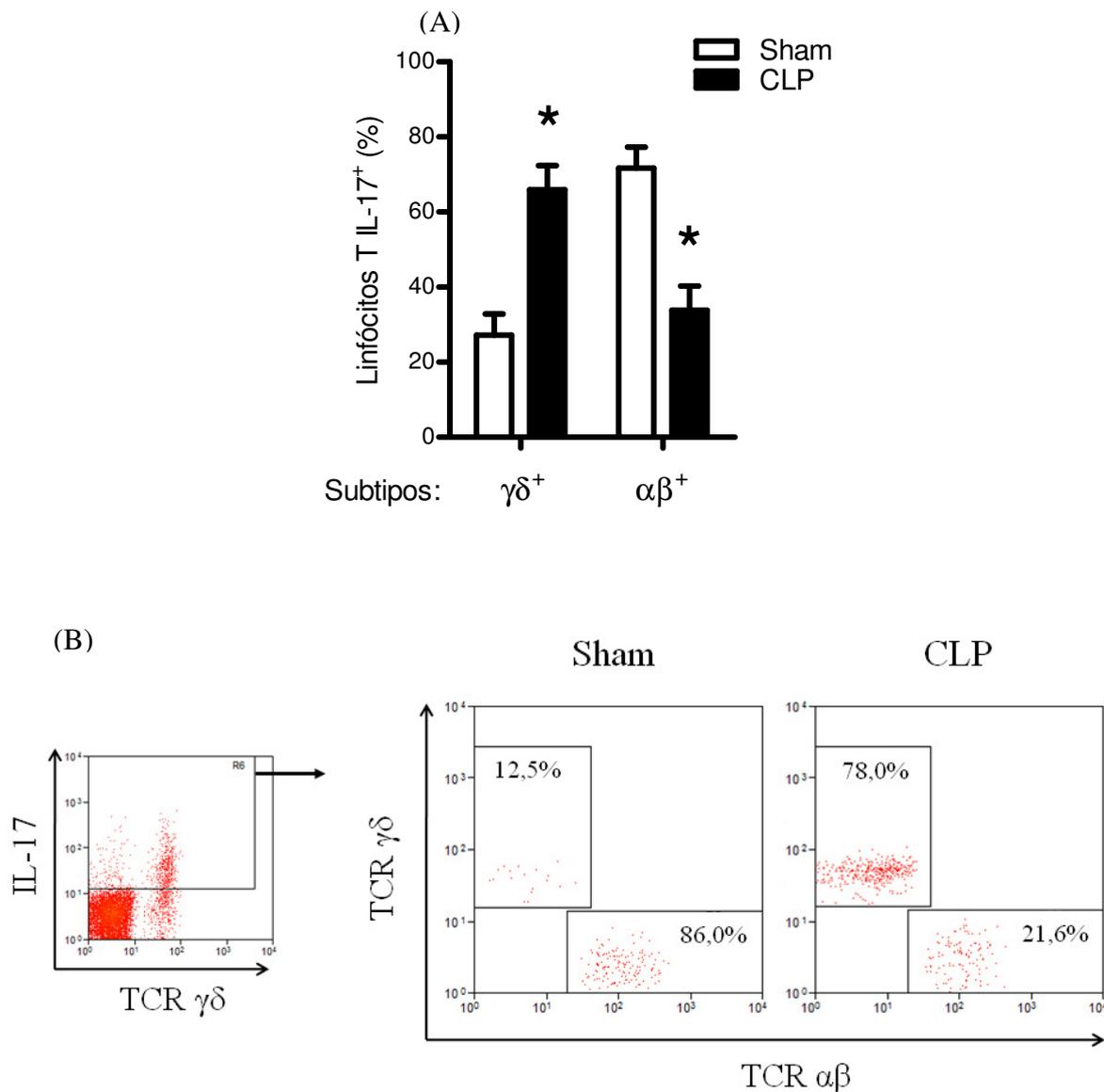
**Figura 4.8. Transferência adotiva de linfócitos T  $\gamma\delta$  (A) e  $\alpha\beta$  (B) do baço de animais que submetidos à cirurgia (*sham* ou CLP) a 10 dias para a cavidade pleural de animais estimulados com LPS (i.pl). Após 10 dias da cirurgia os esplenócitos foram marcados com CFSE e transferidos para os animais receptores (i.v.) 6 horas após injeção (i.t.) de LPS ( $4 \times 10^7$  células/animal). A migração foi analisada 24 horas após a injeção de LPS. Abaixo estão *dotplots* representativos dos linfócitos T  $\gamma\delta$  CFSE<sup>+</sup> na cavidade pleural (C). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupo experimental. Diferenças estatísticas entre o grupo CLP e o grupo *sham* ( $P \leq 0,05$ ) estão indicadas por (\*). Os *gates* foram estabelecidos a partir da marcação com o respectivo isotipo de IgG.**

#### 4.2.2 Análise da produção intracelular de citocinas de linfócitos T $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$

Durante a imunossupressão após a sepse grave, os linfócitos T CD4 perdem a capacidade de comprometer adequadamente tanto com a linhagem Th1 quanto com a linhagem Th2 devido a alterações epigenéticas (77). No experimento representado na figura 4.9 foram analisados os níveis basais da produção de IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-17 por linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  após estes aumentarem novamente em número no pulmão. Através de marcação intracelular e análise por citometria de fluxo, vemos que, dentre os linfócitos T  $\gamma\delta$ , houve uma menor porcentagem de células IL-10<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e uma maior porcentagem de IL-17<sup>+</sup>, mesmo na ausência de estímulo *in vitro* (figura 4.9A). De modo contrário, a porcentagem de linfócitos T  $\alpha\beta$  expressando as citocinas analisadas no pulmão 10 dias após CLP é igual à do controle (figura 4.9B). Houve um aumento na porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$  do pulmão de animais *sham* produzindo IL-17 e uma diminuição de linfócitos T  $\gamma\delta$  produzindo IFN- $\gamma$ , quando estimulados com anticorpo anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml). De modo interessante, observamos que esse estímulo não foi capaz de elevar ainda mais a porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$  IL-17<sup>+</sup> ou de diminuir a porcentagem de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> quando o ensaio foi realizado com as células dos animais CLP (*inset* da figura 4.9A). A IL-17 (IL-17A) tem, entre outras funções, a capacidade de atrair neutrófilos *in vivo* (143-145). É interessante notar que, de fato, no pulmão de animais CLP (10 dias após a cirurgia) observamos um acúmulo de neutrófilos, mesmo na ausência de estímulo secundário (*sham*:  $0,6 \pm 0,5 \times 10^6$  células/pulmão; CLP:  $8,6 \pm 1,4 \times 10^6$  células/pulmão;  $P < 0,002$ ). Ainda, os linfócitos T  $\gamma\delta$  representam a maioria dos linfócitos T expressando IL-17 no 10º dias após a CLP no pulmão (figura 4.10A). A IL-23 e a IL-1 $\beta$  são citocinas capazes de induzir a produção de IL-17 por linfócitos T  $\gamma\delta$ , no entanto, as elevadas porcentagens de linfócitos T  $\gamma\delta$  IL-17<sup>+</sup> no 10º dia após a CLP parecem não se dar pelo estímulo da IL-23 no pulmão, já que essa citocina se encontra em quantidade reduzida nessas circunstâncias (*sham*:  $3.290,0 \pm 282,0$  pg/pulmão; CLP:  $2.474,0 \pm 224,0$  pg/pulmão;  $P = 0,047$ ). Nestas circunstâncias observamos um aumento na quantidade de IL-1 $\beta$  no pulmão (*sham*:  $205,0 \pm 58,7$  pg/pulmão; CLP:  $512,8 \pm 112,2$  pg/pulmão;  $P = 0,035$ ), entretanto, a literatura mostra que essa citocinas só é capaz de estimular a produção de IL-17 em sinergismo com a IL-23 (86). Para melhor compreendermos os mecanismos da produção de IL-17 mais estudos deverão ser realizados.



**Figura 4.9. Porcentagem de células IL-4<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup>, IL-12<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF<sup>+</sup> e IL-17<sup>+</sup> dentre os linfócitos T  $\gamma\delta$  (A) e  $\alpha\beta$  (B) do pulmão de animais 10 dias após cirurgia (*sham* ou *CLP*). As células foram cultivadas por 4 horas com brefeldina A (10  $\mu$ g/ml), submetidas a marcação intracelular e analisadas por citometria de fluxo. No *inset* da figura A as células estavam na presença ou ausência de anticorpo anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 4 animais por grupo experimental. Diferenças estatísticas entre o grupo CLP e o grupo *sham* ( $P \leq 0,05$ ) estão indicadas por (\*). Os *gates* foram estabelecidos a partir da marcação com o respectivo isotipo de IgG.**



**Figura 4.10. Caracterização dos linfócitos T IL-17<sup>+</sup> 10 dias após CLP (A).** Células do pulmão de animais 10 dias após cirurgia (*sham* ou CLP) foram submetidas à marcação intracelular e analisadas por citometria de fluxo. *Dotplots* representativos das populações  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  dentro do *gate* de linfócitos T IL-17<sup>+</sup> (B). As células foram cultivadas por 4 horas com brefeldina A (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 4 animais por grupo experimental. Diferenças estatísticas entre o grupo CLP e o grupo *sham* ( $P \leq 0,05$ ) estão indicadas por (\*). Os *gates* foram estabelecidos a partir da marcação com o respectivo isotipo de IgG.

## 5. Discussão

Durante a sepse ocorre uma rápida e intensa produção de citocinas e quimiocinas no pulmão (23, 31) que, como consequência, leva a um acúmulo de leucócitos neste órgão (22, 23, 29, 30, 43). De acordo com a literatura, neste trabalho observamos um grande aumento no número de linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  e de seus subtipos V $\gamma$ 4, V $\delta$ 4 e V $\delta$ 6.3 no pulmão no 1º dia após a CLP. Este fenômeno também foi descrito por Hirsh e colaboradores em relação aos linfócitos T  $\gamma\delta$  (67). Em contraste, no 3º dia após a cirurgia, observamos uma redução a níveis basais no número de linfócitos T  $\alpha\beta$  no pulmão, o que parece se dar por um aumento na morte celular, fenômeno comum em linfócitos durante a sepse grave (47-50). Embora os linfócitos T  $\gamma\delta$  tenham proporções semelhantes de morte celular, é interessante notar que o número dessas células no pulmão permaneceu elevado, ocorrendo somente uma pequena redução, o que foi também observado para os subtipos V $\delta$ 4 e V $\delta$ 6.3, mas não para o V $\gamma$ 4 que permaneceu em constante aumento até o 10º dia. Apesar de não sofrerem redução no pulmão no 3º dia, os linfócitos T V $\gamma$ 4 também apresentaram um aumento na porcentagem de células mortas. É possível que haja um aumento na proliferação e/ou na migração destas células para o pulmão que compense a morte celular e faça com que seus números permaneçam elevados neste órgão. Ao observar a cinética do acúmulo de linfócitos T  $\gamma\delta$  no pulmão após a CLP, Hirsh e colaboradores (2004) também observam um aumento progressivo no número dessas células, no entanto, sem a redução que nós observamos no 3º dia. Possivelmente os autores não observaram redução nos números de linfócitos T no 3º dia devido a diferenças nos modelos experimentais, o que leva a diferentes níveis de gravidade da sepse. O modelo que os autores utilizaram é um modelo de sepse branda, que não foi capaz de induzir apoptose de linfócitos T  $\gamma\delta$ . Enquanto os autores fizeram uma única perfuração com agulha de 21 gauge, no nosso modelo são feitas 9 perfurações com o mesmo diâmetro de agulha. Como observamos um aumento semelhante na mortalidade celular tanto para os linfócitos T  $\alpha\beta$  quanto para os  $\gamma\delta$  e V $\gamma$ 4, nos coube avaliar outros possíveis motivos para as diferenças observadas entre estes subtipos no fenômeno descrito.

Ao ser ativado, o linfócito T aumenta a expressão de CD25 (cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2; IL-2R) e produz IL-2 (138). Esta citocina tem função autócrina e se liga ao IL-2R que, por sua vez, envia um sinal de proliferação à célula (138). Durante esse processo, um dos fatores de transcrição recrutados é o c-Fos, que se liga ao promotor da *IL-2* e aumenta a produção de IL-2 (139, 140). Ao analisarmos o pulmão de animais durante e após a sepse

grave, observamos que os linfócitos T  $\gamma\delta$  tem uma ativação precoce, quando comparados aos linfócitos T  $\alpha\beta$ , avaliada pela expressão de CD25. De modo interessante, notamos também que durante a sepse houve uma diminuição na proporção de linfócitos T  $\alpha\beta$  no pulmão expressando c-Fos, fenômeno que não ocorreu com os linfócitos T  $\gamma\delta$ . O fato dos linfócitos T  $\alpha\beta$  apresentarem um aumento na expressão de CD25 no 3º dia após CLP, mas não de c-Fos, pode estar ligado ao aumento de células Treg, tal como observado por Cavassani e colaboradores (2010) também no 3º dia após CLP no baço. Ainda, a análise da ativação (pela marcação de CD69) em linfócitos T  $\gamma\delta$  do sangue de pacientes com sepse revelou que estes linfócitos, mas não os  $\alpha\beta$ , estavam ativados durante a sepse (68), suportando essa hipótese. Esses dados sugerem que os linfócitos T  $\gamma\delta$  podem ter uma capacidade maior de proliferação que os linfócitos T  $\alpha\beta$  nessas circunstâncias. De acordo, foi observada uma incapacidade de proliferação dos linfócitos T (146) e linfócitos T CD4 (146, 147) 24 horas após a cirurgia de CLP. Carson e colaboradores observaram que os linfócitos T CD4 efetores permanecem incapazes de proliferar de maneira eficaz até 14 dias após CLP (77). Esses resultados sugerem que o motivo da redução do número de linfócitos T  $\alpha\beta$  no pulmão, não observada nos linfócitos T  $\gamma\delta$ , seja devido a diferenças na capacidade proliferativa destas células.

Ao analisarmos a cinética de acúmulo e a fenotipagem de linfócitos T no tecido pulmonar estamos provavelmente analisando células que proliferaram em órgãos linfóides secundários e migraram para o pulmão. No presente trabalho, observamos que logo no início da sepse ocorreu uma redução no número de linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  no baço, assim como nos dos subtipos de linfócitos T  $\gamma\delta$ , que retornam a níveis basais até o 10º dia. De acordo, Cavassani e colaboradores também observaram uma redução no número de esplenócitos durante a sepse que voltou a níveis basais após a síndrome (78). Observamos ainda um aumento na porcentagem de linfócitos T  $\alpha\beta$  expressando CD25 no 3º dia, que retorna a níveis basais uma vez passado o evento séptico. Fato este também observado ocorrer com os linfócitos T auxiliares (78). Em relação aos linfócitos T  $\gamma\delta$ , observamos que estas células (e seus subtipos) já apresentavam elevada expressão de CD25 no baço no primeiro dia após CLP, que perdurou até o 10º dia. A ativação dos linfócitos T  $\gamma\delta$  ou  $\alpha\beta$  ocorreu primeiro no baço, quando comparado ao pulmão. Este fato reforça a idéia de que estas células poderiam estar proliferando no baço e migrando para o pulmão. Em adição, na literatura existe um trabalho que descreve que os linfócitos T  $\gamma\delta$  são capazes de proliferar de forma independente de órgãos linfóides secundários (114), no entanto grande parte da literatura demonstra que o foco principal de proliferação destes linfócitos T  $\gamma\delta$  sejam os órgãos linfóides secundários (114, 141, 148). Ao analisarmos a capacidade quimiotática do pulmão após CLP (por transferência

adotiva de esplenócitos CFSE<sup>+</sup>) observamos um influxo aumentado de linfócitos T  $\gamma\delta$  para o órgão. Essa capacidade quimiotática do pulmão de animais submetidos à CLP pode ser justificada pela constante produção de CCL2 neste órgão. A importância da CCL2 para a migração de linfócitos T  $\gamma\delta$  é bem descrita (112, 141), assim como sua liberação em momentos iniciais da resposta séptica (31, 149) e 15 dias após CLP (28). Mais estudos serão necessários para avaliar as consequências deste “comportamento” diferenciado dos linfócitos T  $\gamma\delta$  em relação aos linfócitos T  $\alpha\beta$  na fase aguda da sepse, no entanto, já foi observado que em modelos de sepse grave os linfócitos T  $\gamma\delta$  contribuem para a mortalidade dos animais na fase inicial da síndrome (39, 40). Nesta fase, os linfócitos T  $\gamma\delta$  são as principais produtoras de IL-17 (39, 40), além de regularem a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (119, 120), o que pode contribuir para a chamada “tempestade de citocinas” e assim aumentar o índice de mortalidade. Considerando que o pulmão é um dos órgãos mais acometidos durante a sepse (20, 21), a redução dos linfócitos T  $\gamma\delta$  nos pulmões poderia contribuir para a melhoria da sobrevida nos pacientes.

No 10º dia após o início da sepse observamos no pulmão que houve um aumento no número de linfócitos T  $\gamma\delta$ , dos subtipos V $\delta$ 4, V $\delta$ 6.3 e V $\gamma$ 4 e de linfócitos T  $\alpha\beta$ . É importante notar que, após a sepse grave, apesar do aumento no influxo celular, pode ocorrer uma reprogramação funcional nos leucócitos (28, 31, 76-78). Estas reprogramações ocorrem de modo que deixam o hospedeiro imunossuprimido e, conseqüentemente mais susceptível a infecções secundárias (28, 31, 75) e ao crescimento tumoral (78). Esse é um fenômeno posterior, e possivelmente uma continuação, à síndrome da resposta antiinflamatória compensatória (CARS) observada durante o evento séptico (8, 78), que se inicia nos primeiros dias da sepse (28, 150). Um estudo com camundongos em um período de 2 meses após a sepse demonstrou que a imunossupressão permanecia (76, 78). Em humanos já foi observado que, mesmo após 5 anos do evento séptico, os indivíduos que passaram por esse quadro apresentam um risco de morte aumentado devido a infecções secundárias (70). Uma vez que o pulmão é um dos órgãos mais acometidos durante a sepse e que para ocorrer uma resposta inflamatória eficiente neste órgão é necessária uma migração de linfócitos T a este; investigamos a capacidade de migração dos linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  do baço de animais que haviam passado por um evento séptico grave a um sítio inflamatório. Ao realizar estes experimentos observamos que tanto linfócitos T  $\gamma\delta$  quanto  $\alpha\beta$  estavam com capacidade migratória prejudicada no 10º dia após a CLP. De acordo, Carson e colaboradores demonstraram que linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) permanecem com funções alteradas após o evento séptico (77), caracterizadas pela dificuldade de proliferar e de se comprometer com

uma linhagem de linfócitos T auxiliares. Apesar de os linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  do baço não migrarem no 10º dia após CLP, observamos um aumento no número destas células no pulmão neste tempo. Existe a possibilidade de que os linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  estejam migrando para o pulmão em dias anteriores ao 10º, em um momento em que estas células ainda estejam capazes de migrar frente a um estímulo inflamatório como, por exemplo, a CCL2, cuja produção se encontra aumentada no pulmão no 3º e 10º dia. Deste modo, é possível que a incapacidade migratória dos linfócitos T  $\gamma\delta$  seria adquirida somente dias após a resolução da resposta inflamatória da sepse. Outra possibilidade é que os linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  de outros órgãos linfóides, tais como do linfonodo torácico, não apresentem este comprometimento (como as células do baço) e migrem para o tecido pulmonar. Entretanto, para investigar estas hipóteses, mais experimentos serão necessários.

Existem muitos trabalhos na literatura que abordam a regulação entre a resposta Th1 e a resposta Th2 (151, 152). Essa regulação é feita pelos fatores de transcrição T-Bet e GATA-3, responsáveis por promoverem a resposta Th1 e Th2, respectivamente, e que inibem-se mutuamente (153). Há relativamente pouco tempo, um novo elemento foi adicionado ao paradigma Th1 *versus* Th2: a IL-17. Esta citocina (que em geral se refere ao membro IL-17A da família da IL-17) é uma citocina da família IL-17 regulada pelo fator de transcrição ROR $\gamma$ t e está associada a um perfil celular denominado Th17 (154). A IL-17 está relacionada à migração *in vivo* de neutrófilos e foi demonstrado que esta citocina também tem uma grande importância no *clearance* de bactérias (143, 145). Em paralelo, já foi observado que os linfócitos T  $\gamma\delta$  apresentam tanto funções regulatórias quando pró-inflamatórias, que podem ser mediadas por citocinas (93, 155). Durante o evento séptico já foi demonstrado que estas células representam a principal fonte da citocina IL-17, no entanto, uma vez passado o evento séptico, essa produção já não é mais observada (39, 40). Em outros modelos de infecção também foi observado que os linfócitos T  $\gamma\delta$  são uma importante fonte de IL-17 (115-117, 156-158), sendo uma das principais células a produzi-las no pulmão (159) e a principal em órgãos linfóides periféricos (160). No nosso trabalho observamos um aumento no número de linfócitos T  $\gamma\delta$  IL-17<sup>+</sup> no pulmão de animais 10 dias após a CLP e ao mesmo tempo houve uma redução dos linfócitos T  $\gamma\delta$  IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup>. O papel da IL-17 na resposta Th1 ou Th2 ainda não é completamente entendido (154, 161, 162). Em um modelo de infecção pulmonar por bactéria intracelular foi observado que a IL-17 está relacionada ao aumento da produção de IFN- $\gamma$ , mas também à diminuição de IL-4 e IL-10, aparentemente de forma dependente de DC (161). De modo diferente, e de acordo com os nossos resultados, foi demonstrado que linfócitos T  $\gamma\delta$  IL-17<sup>+</sup> não produzem IFN- $\gamma$  ou IL-4 (160, 163). Esse balanço na produção de

citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 parece depender dos subtipos de linfócitos T  $\gamma\delta$ : células V $\gamma$ 4/V $\delta$ 4 IL-17<sup>+</sup> não produzem IFN- $\gamma$ , no entanto já foi observado que os linfócitos T V $\gamma$ 6/V $\delta$ 1 podem produzir ambas simultaneamente (164). Nós observamos que além de estas células estarem produzindo IL-17 10 dias após a CLP, os linfócitos T  $\gamma\delta$  são a principal célula produzindo essa citocina dentre os linfócitos T. Nesse estágio, não observamos diferença na proporção de linfócitos T  $\alpha\beta$  expressando IL-17 ou qualquer uma das citocinas analisadas entre os animais submetidos à cirurgia *sham* e CLP. De fato, Carson e colaboradores demonstraram que linfócitos T auxiliares de animais pós-sépticos foram incapazes de se comprometer tanto com a linhagem Th1 quando com a Th2 (77). Nesse trabalho os autores ainda mostraram que os linfócitos T auxiliares aumentam a produção de IL-27, uma citocina que pode ser considerada como imunossupressora em certas condições (165-167). É interessante notar que existem trabalhos demonstrando que durante a fase aguda da sepse diversos genes pró-inflamatórios são silenciados no baço, mas não o são no pulmão (54). A reprogramação genética diferenciada entre leucócitos presentes no baço no e pulmão foi observada não só em camundongos, mas também em humanos (54). Porém, este fenômeno ainda não foi descrito durante a fase de imunossupressão pós-sepse. Neste trabalho nós observamos que é possível que este fenômeno também ocorra após a sepse grave.

O fato de que no 10º dia após CLP observa-se um número aumentado de linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  expressando CD25, poderia significar um aumento na ativação destas células. De fato, embora os linfócitos T  $\gamma\delta$  aparentem estejam ativados com um aumento na produção de IL-17, os linfócitos T  $\alpha\beta$  não se encontram produzindo nenhuma das citocinas do perfil Th1, Th2 ou Th17 analisadas. O fenômeno observado para os linfócitos T  $\alpha\beta$  poderia ser explicado por um aumento no número de linfócitos Treg no pulmão desses animais. Suportando esta hipótese, Cavassani e colaboradores observam que, de fato, durante a imunossupressão pós-sepse os linfócitos T adquirem um perfil de linfócitos Treg (78). Assim, embora os linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  não estejam com capacidade migratória “adequada” após evento séptico, os linfócitos T  $\gamma\delta$  do pulmão são capazes de produzir elevados níveis de IL-17, ao contrário dos linfócitos T  $\alpha\beta$ .

Na literatura, alguns artigos mostram que a IL-23 é necessária e suficiente para a produção de IL-17 por linfócitos T  $\gamma\delta$ , assim como para a proliferação e manutenção dos linfócitos T  $\gamma\delta$  IL-17<sup>+</sup> (158, 164, 168). Além disso, existe um consenso de que a IL-23 induz produção de IL-17 por linfócitos T  $\gamma\delta$  sem a necessidade de estímulo por TCR (169). Entretanto, há um trabalho que demonstra que embora seja pequena, a produção de IL-17 por linfócitos T  $\gamma\delta$  pode ser induzida por estímulo do TCR (115). A IL-1 $\beta$  é outra citocina

envolvida na produção de IL-17. Nós observamos que no 10º dia após a CLP, a IL-17 se encontra em quantidades elevadas no pulmão. A IL-1 $\beta$  é capaz de aumentar a produção de IL-17 na presença de IL-23, no entanto não é capaz de fazê-lo na sua ausência (86). Nossos resultados mostram que, embora haja uma grande quantidade de linfócitos T  $\gamma\delta$  produzindo IL-17 no pulmão, a quantidade de IL-23 neste órgão está diminuída no 10º dia após CLP. Além da redução de IL-23 no pulmão, é provável que os níveis desta citocina também estejam diminuídos em outros órgãos. Sabe-se que as células dendríticas (DC) são uma fonte importante de liberação de IL-23 (164, 170) e que, estas se tornam incapazes de produzir IL-12 após a sepse grave devido a modificações epigenéticas, i.e. metilações de determinadas histonas (76). Estas metilações já foram encontradas nos genes que sintetizam as proteínas IL-12p35 e IL-12p40, constituintes da IL-12 (76). De maneira diferente, a IL-12p40 em conjunto com outra proteína, a IL-23p19, forma a IL-23 (170). Como as DCs apresentam a produção da proteína IL-12p40 prejudicada sistemicamente, inclusive nas suas progenitoras na medula óssea, é provável que a diminuição de IL-23 observada no nosso modelo não ocorra somente no pulmão. Neste caso, não existiria possibilidade de que o aumento da produção de IL-17 por linfócitos T  $\gamma\delta$  fosse uma consequência do aumento da sinalização através da IL-23. Em outras palavras, os linfócitos T  $\gamma\delta$  não estariam recebendo este sinal no pulmão ou em outros órgãos, no entanto aumentam a produção de IL-17. Uma possível justificativa para o aumento de linfócitos T  $\gamma\delta$  IL-17<sup>+</sup> após a sepse está relacionado à liberação de TGF- $\beta$ . A liberação desta citocina durante (171) e após (28) choque séptico é confirmada na literatura. Ainda, Do e colaboradores (2010) demonstraram que durante a fase de desenvolvimento dos linfócitos T  $\gamma\delta$  no timo a TGF- $\beta$ 1 está envolvida com o direcionamento dos linfócitos T  $\gamma\delta$  para a produção de IL-17 (160). O aumento na liberação de TGF- $\beta$ 1 poderia estar relacionado ao aumento de linfócitos T  $\gamma\delta$  IL-17<sup>+</sup> no pulmão pós-sepse por uma estimulação da produção dessas células, no entanto para fazer tal afirmação, mais experimentos são necessários.

Acredita-se que no modelo de artrite induzida por colágeno os linfócitos T V $\gamma$ 4 (mas não outros subtipos) produzam IL-17 sem a necessidade da IL-23, somente com estímulo do TCR (102, 164). Além do mais, neste modelo os linfócitos T V $\gamma$ 4 são as principais produtoras de IL-17 (102). É interessante notar que no 10º dia após a CLP podemos observar que metade dos linfócitos T  $\gamma\delta$  do pulmão são V $\gamma$ 4<sup>+</sup> (fig. 4.1). É possível que estas células sejam as principais produtoras de IL-17 neste modelo e que o estejam fazendo em resposta à ativação através do TCR, com uma possível contribuição da IL-1 $\beta$ , que se encontra aumentada no pulmão no 10º dia após CLP. Outra possibilidade é dos linfócitos T  $\gamma\delta$  estarem sofrendo uma reprogramação, como a que é vista em outras células durante a imunossupressão pós-sepse,

talvez nesta hipótese estas estariam produzindo IL-17 independente do sinal da IL-23 ou do TCR.

Outra possível explicação para o aumento na produção de IL-17 por linfócitos T  $\gamma\delta$  leva em conta a seleção intra-tímica. Após evento séptico ocorre uma re-população de linfócitos devido à grande perda ocorrida no evento apoptótico (46). Ademais, estudos recentes mostram que quando linfócitos T  $\gamma\delta$  não reconhecem nenhum antígeno durante a seleção positiva ou negativa no timo, ao invés de entrarem em apoptose como o fariam os linfócitos T  $\alpha\beta$ , estes se tornam produtores de IL-17 (106, 107). Em paralelo: (i) durante o evento séptico é observado uma disfunção, assim como uma diminuição do timo (172); (ii) também é observada uma depleção em todo o corpo de DCs (76, 173), células que contribuem para a seleção positiva e negativa no timo (174); (iii) diferente da maioria dos subtipos de linfócitos T  $\gamma\delta$ , o subtipo V $\gamma$ 4 continuam a ser produzidos no timo de camundongos adultos (164); (iv) mesmo após a sepse o pulmão continua a produzir CCL2, citocina quimiotática para linfócitos T  $\gamma\delta$ . Ainda, Do e colaboradores observaram que até os 2 meses de idade os camundongos mantêm uma liberação de timócitos T  $\gamma\delta$  IL-17<sup>+</sup> mesmo em camundongos *naives* (160). Como consequência, se a disfunção que ocorre no timo comprometer a seleção positiva, pela ausência das DCs que fariam a seleção, os linfócitos T  $\alpha\beta$  entraria em apoptose por não encontrarem um antígeno no timo que fizesse a seleção positiva e assim diminuiriam em número na periferia. De modo diferente, os linfócitos T  $\gamma\delta$  não só não estariam com níveis aumentados de apoptose no timo, como se tornariam produtores de IL-17 por não sofrerem seleção positiva e poderiam migrar para o tecido pulmonar. De fato, esses fenômenos são observados nos nossos resultados, entretanto para confirmar tal hipótese são necessários mais experimentos.

Em um modelo de sepse branda foi observado que há um aumento no número de linfócitos T  $\gamma\delta$  IL-10<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e TNF<sup>+</sup> no pulmão após a sepse, nesse trabalho foi proposto que a liberação de IL-10 tem um papel regulador sobre neutrófilos neste modelo (67). Ao contrário, no nosso trabalho as três citocinas em questão se encontravam em baixos níveis e a IL-17 aumentada, citocina que, ao contrário da IL-10, estimula a migração *in vivo* de neutrófilos. Essa observação mostra diferentes consequências da sepse nos linfócitos T  $\gamma\delta$  dependendo da gravidade da síndrome. De fato, de um modo geral, os linfócitos T  $\gamma\delta$  são capazes de apresentar diferentes papéis em diferentes estágios da resposta inflamatória a infecções, contribuindo tanto para o desenvolvimento, quanto para o controle da resposta. Em algumas infecções os linfócitos T  $\gamma\delta$  apresentam um papel pró-inflamatório na fase inicial, caracterizado pela produção de mediadores como o interferon (INF)- $\gamma$ , modulando células da

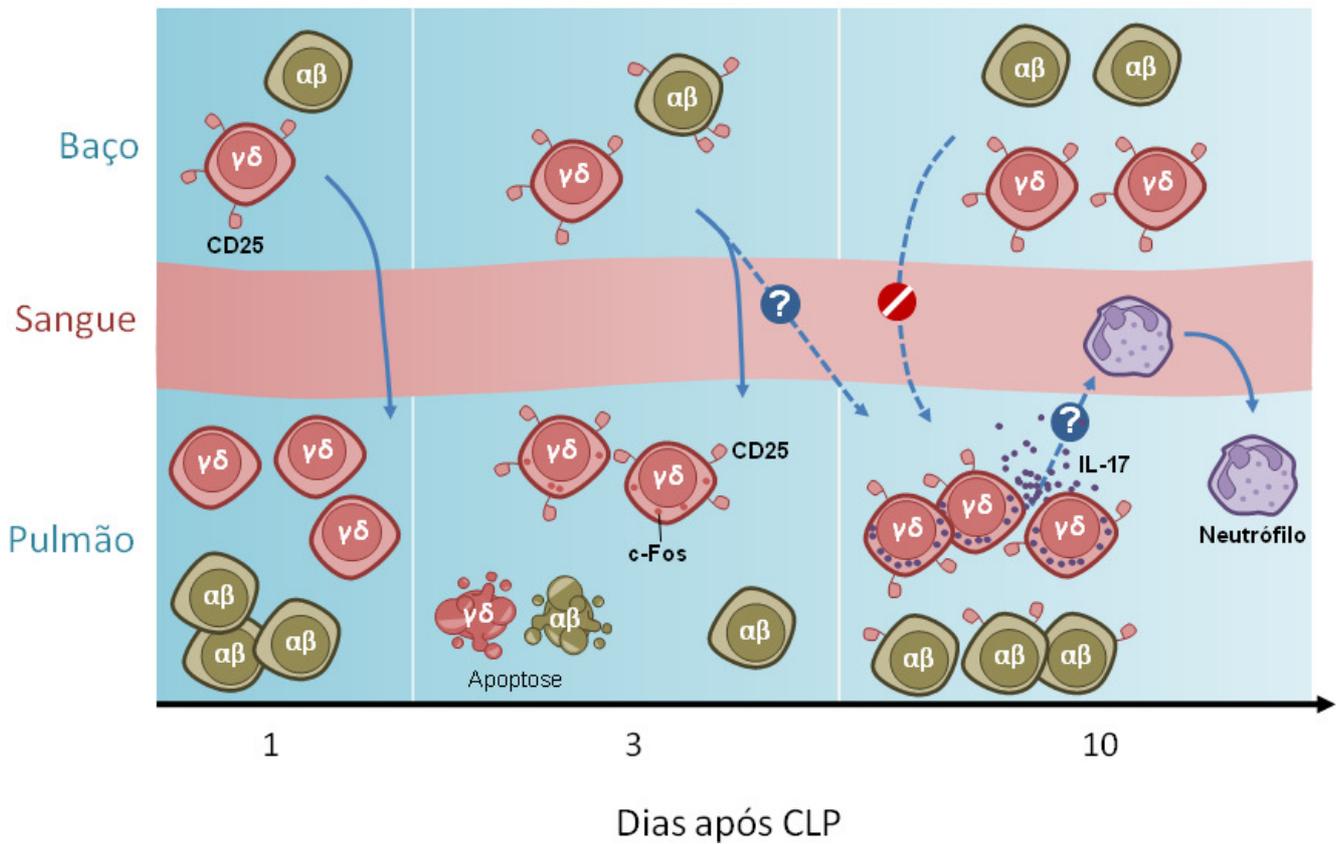
resposta inata (*natural killer* e macrófagos) e adquirida (linfócitos T  $\alpha\beta$ ). Numa fase mais tardia, estes linfócitos passam a apresentar um perfil antiinflamatório, produzindo mediadores tais como IL-10, mediando apoptose de macrófagos ativados, modulando negativamente os linfócitos T  $\alpha\beta$  e participando do reparo tecidual (93).

Dentre as prováveis consequências da produção exacerbada de IL-17 está a possibilidade de que esta facilite uma inflamação crônica já que esta citocina pode aumentar o número de neutrófilos e outros mediadores inflamatórios no pulmão. No entanto, embora todas as células estudadas até o momento estejam contribuindo para a imunossupressão é provável que a produção de IL-17 no pulmão pelos linfócitos T  $\gamma\delta$  contribua para o aumento na quantidade de neutrófilos neste órgão. Este fato poderia contribuir para a diminuição do quadro de imunossupressão. Confirmada essa possibilidade, a não redução dos linfócitos T  $\gamma\delta$  em um momento inicial no pulmão (3º dia após CLP), embora possa piorar o quadro durante a sepse aumentando a inflamação, poderia ser benéfica após a sepse. Fazem-se necessários, então, estudos posteriores para avaliar a importância dos linfócitos T  $\gamma\delta$  durante a sepse e também durante a fase de imunossupressão.

Em síntese, nosso trabalho demonstra que os linfócitos T  $\gamma\delta$  tem um comportamento diferenciado dos linfócitos T  $\alpha\beta$  durante e após a sepse. Durante a sepse, estas células parecem estar ativadas e, embora apresentem uma dificuldade na migração para o tecido inflamado, estas células são capazes de produzir IL-17, sendo as principais produtoras desta citocina no pulmão.

## 6. Conclusões

- A CLP induz uma inflamação pulmonar caracterizada pelo acúmulo de linfócitos T  $\gamma\delta$ , (de seus subtipos V $\gamma$ 4, V $\delta$ 4 e V $\delta$ 6.3) e de linfócitos T  $\alpha\beta$  neste órgão. Após um acúmulo inicial durante a sepse grave, os linfócitos T  $\alpha\beta$  retornam a níveis basais (provavelmente devido a apoptose) o que não ocorre com os linfócitos T  $\gamma\delta$ ;
- Os linfócitos T  $\gamma\delta$  (e os seus subtipos V $\gamma$ 4, V $\delta$ 4 e V $\delta$ 6.3), assim como os linfócitos T  $\alpha\beta$  diminuem em número no baço durante a sepse grave e retornam a níveis basais após esta, sugerindo que estes estejam migrando para o pulmão inflamado;
- Os linfócitos T  $\gamma\delta$  aparentam estar proliferando em momentos anteriores aos linfócitos T  $\alpha\beta$ , de acordo com a expressão de CD25 nestas células obtidas do pulmão e do baço;
- Após a sepse, os linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  do baço foram incapazes de migrar para o pulmão inflamado, apesar do aumento na produção de CCL2 neste órgão;
- Na fase de imunossupressão pós-sepse os linfócitos T  $\gamma\delta$  são o principal subtipo a produzir IL-17 no pulmão. Estes linfócitos apresentam também diminuição na produção de IL-10 e de IFN- $\gamma$ . Ao contrário, não foi observada nenhuma alteração nas citocinas analisadas nos linfócitos T  $\alpha\beta$ .



**Figura 6.1. Linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  no baço e no pulmão durante e após a sepse grave.** Durante a fase aguda da sepse grave os linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  acumulam no pulmão. Os linfócitos T  $\gamma\delta$  parecem ser ativados em momentos anteriores aos linfócitos T  $\alpha\beta$  (tanto no baço quanto no pulmão), assim como se mantêm em números elevados no pulmão durante toda a resposta. Na fase de imunossupressão, os linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  do baço mostram uma capacidade migratória diminuída. Nesta fase, os linfócitos T  $\gamma\delta$  do pulmão são os principais linfócitos produtores de IL-17.

## Referências bibliográficas

1. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med.* 2006; 32(12):2077.
2. Vincent JL, Abraham E. The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 1;173(3):256-63.
3. Thomas L. Germs. *N Engl J Med.* 1972; 14;287(11):553-5.
4. Vincent JL, Martinez EO, Silva E. Evolving concepts in sepsis definitions. *Crit Care Clin.* 2009;25(4):665-75, vii.
5. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992;101(6):1644-55.
6. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003; 17;348(16):1546-54.
7. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1990/01/19 ed1990. p. 31-4.
8. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med.* 2009;15(5):496-7.
9. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001 ; 29(7):1303-10.
10. Balk RA. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin.* 2000;16(2):179-92.
11. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003; 9 348(2):138-50.
12. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care.* 2004; 8(4):R251-60.
13. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med.* 2002; 28(2):108-21.
14. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA.* 1995; 274(8):639-44.
15. Guidet B, Aegerter P, Gauzit R, Meshaka P, Dreyfuss D. Incidence and impact of organ dysfunctions associated with sepsis. *Chest.* 2005;127(3):942-51.

16. Valles J, Rello J, Ochagavia A, Garnacho J, Alcala MA. Community-acquired bloodstream infection in critically ill adult patients: impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest*. 2003;123(5):1615-24.
17. Weiss G, Steffanie W, Lippert H. [Peritonitis: main reason of severe sepsis in surgical intensive care]. *Zentralbl Chir*. 2007;132(2):130-7.
18. Barie PS, Hydo LJ, Eachempati SR. Longitudinal outcomes of intra-abdominal infection complicated by critical illness. *Surg Infect (Larchmt)*. 2004;5(4):365-73.
19. De Waele JJ, Hoste EA, Blot SI. Blood stream infections of abdominal origin in the intensive care unit: characteristics and determinants of death. *Surg Infect (Larchmt)*. 2008;9(2):171-7.
20. Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg*. 2001;88(1):22-30.
21. Babayigit H, Kucuk C, Sozuer E, Yazici C, Kose K, Akgun H. Protective effect of beta-glucan on lung injury after cecal ligation and puncture in rats. *Intensive Care Med*. 2005;31(6):865-70.
22. Reutershan J, Basit A, Galkina EV, Ley K. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289(5):L807-15.
23. Czermak BJ, Breckwoldt M, Ravage ZB, Huber-Lang M, Schmal H, Bless NM, et al. Mechanisms of enhanced lung injury during sepsis. *Am J Pathol*. 1999;154(4):1057-65.
24. Yano K, Liaw PC, Mullington JM, Shih SC, Okada H, Bodyak N, et al. Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. *J Exp Med*. 2006;203(6):1447-58.
25. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*. 2000;173:89-97.
26. Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*. 2007;170(5):1435-44.
27. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*. 1991;88(5):1747-54.
28. Benjamim CF, Lundy SK, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood*. 2005;105(9):3588-95.
29. Issekutz AC, Issekutz TB. The contribution of LFA-1 (CD11a/CD18) and MAC-1 (CD11b/CD18) to the in vivo migration of polymorphonuclear leucocytes to inflammatory reactions in the rat. *Immunology*. 1992;76(4):655-61.
30. Basit A, Reutershan J, Morris MA, Solga M, Rose CE, Jr., Ley K. ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(2):L200-7.
31. Benjamim CF, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL. Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol*. 2003;163(6):2605-17.
32. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis*. 2003; 35(9):535-44.
33. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth*. 1996; 77(1):110-7.

34. Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*. 2007;11(2):R49.
35. Villa P, Sartor G, Angelini M, Sironi M, Conni M, Gnocchi P, et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995; 2(5):549-53.
36. Deans KJ, Haley M, Natanson C, Eichacker PQ, Minneci PC. Novel therapies for sepsis: a review. *J Trauma*. 2005; Apr;58(4):867-74.
37. Minneci PC, Deans KJ, Banks SM, Eichacker PQ, Natanson C. Should we continue to target the platelet-activating factor pathway in septic patients? *Crit Care Med*. 2004; Feb;32(2):585-8.
38. Freitas A, Alves-Filho JC, Victoni T, Secher T, Lemos HP, Sonogo F, et al. IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. *J Immunol*. 2009; Jun 15;182(12):7846-54.
39. Flierl MA, Rittirsch D, Gao H, Hoesel LM, Nadeau BA, Day DE, et al. Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. *FASEB J*. 2008; Jul;22(7):2198-205.
40. Xu R, Wang R, Han G, Wang J, Chen G, Wang L, et al. Complement C5a regulates IL-17 by affecting the crosstalk between DC and gammadelta T cells in CLP-induced sepsis. *Eur J Immunol*. 2010; Apr;40(4):1079-88.
41. He M, Horuk R, Mochhala SM, Bhatia M. Treatment with BX471, a CC chemokine receptor 1 antagonist, attenuates systemic inflammatory response during sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; Apr;292(4):G1173-80.
42. Asaduzzaman M, Zhang S, Lavasani S, Wang Y, Thorlacius H. LFA-1 and MAC-1 mediate pulmonary recruitment of neutrophils and tissue damage in abdominal sepsis. *Shock*. 2008; Sep;30(3):254-9.
43. Guo RF, Riedemann NC, Sun L, Gao H, Shi KX, Reuben JS, et al. Divergent signaling pathways in phagocytic cells during sepsis. *J Immunol*. 2006; Jul 15;177(2):1306-13.
44. Wang TS, Deng JC. Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression. *J Mol Med*. 2008; 86(5):495-506.
45. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol*. 2006;177(3):1967-74.
46. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost*. 2009;101(1):36-47.
47. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock*. 2002;18(6):487-94.
48. Krabbe KS, Bruunsgaard H, Qvist J, Fonsmark L, Moller K, Hansen CM, et al. Activated T lymphocytes disappear from circulation during endotoxemia in humans. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(3):731-5.
49. Ayala A, Chung CS, Xu YX, Evans TA, Redmond KM, Chaudry IH. Increased inducible apoptosis in CD4+ T lymphocytes during polymicrobial sepsis is mediated by Fas ligand and not endotoxin. *Immunology*. 1999;97(1):45-55.

50. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol.* 1994;152(10):5014-21.
51. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2006; (11):813-22.
52. Griffith TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity.* 1996;5(1):7-16.
53. Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity.* 2001;14(6):715-25.
54. McCall CE, Yoza BK. Gene silencing in severe systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 5(8):763-7.
55. von Knethen A, Soller M, Brune B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and sepsis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007;55(1):19-25.
56. Steeber DA, Tang ML, Green NE, Zhang XQ, Sloane JE, Tedder TF. Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interactions between the L-selectin and ICAM-1 pathways. *J Immunol.* 1999;163(4):2176-86.
57. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood.* 1994;83(1):113-8.
58. Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebo R, Joo GB, Westvik AB, Kierulf P. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J Exp Med.* 1996;184(1):51-60.
59. Reddy RC, Chen GH, Newstead MW, Moore T, Zeng X, Tateda K, et al. Alveolar macrophage deactivation in murine septic peritonitis: role of interleukin 10. *Infect Immun.* 2001;69(3):1394-401.
60. Muthu K, He LK, Melstrom K, Szilagyi A, Gamelli RL, Shankar R. Perturbed bone marrow monocyte development following burn injury and sepsis promote hyporesponsive monocytes. *J Burn Care Res.* 2008;29(1):12-21.
61. Taneja R, Sharma AP, Hallett MB, Findlay GP, Morris MR. Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock.* 2008;30(6):618-22.
62. Stephan F, Yang K, Tankovic J, Soussy CJ, Dhonneur G, Duvaldestin P, et al. Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2002;30(2):315-22.
63. Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun.* 2002;70(7):3602-10.
64. Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, et al. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol.* 1999;162(4):2341-6.

65. Rios-Santos F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CM, et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(5):490-7.
66. Ayala A, Deol ZK, Lehman DL, Herdon CD, Chaudry IH. Polymicrobial sepsis but not low-dose endotoxin infusion causes decreased splenocyte IL-2/IFN-gamma release while increasing IL-4/IL-10 production. *J Surg Res*. 1994;56(6):579-85.
67. Hirsh M, Dyugovskaya L, Kaplan V, Krausz MM. Response of lung gammadelta T cells to experimental sepsis in mice. *Immunology*. 2004;112(1):153-60.
68. Matsushima A, Ogura H, Fujita K, Koh T, Tanaka H, Sumi Y, et al. Early activation of gammadelta T lymphocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *Shock*. 2004;22(1):11-5.
69. Venet F, Bohe J, Debard AL, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G. Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit Care Med*. 2005;33(12):2836-40.
70. Quartin AA, Schein RM, Kett DH, Peduzzi PN. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA*. 1997;277(13):1058-63.
71. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA*. 1995;274(12):968-74.
72. Young LS, Stevens P, Kaijser B. Gram-negative pathogens in septicaemic infections. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1982;31:78-94.
73. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):137-43.
74. Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery*. 1983;94(2):331-5.
75. Pene F, Zuber B, Courtine E, Rousseau C, Ouaz F, Toubiana J, et al. Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. *J Immunol*. 2008;181(12):8513-20.
76. Wen H, Dou Y, Hogaboam CM, Kunkel SL. Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. *Blood*. 2008;111(4):1797-804.
77. Carson WFt, Cavassani KA, Ito T, Schaller M, Ishii M, Dou Y, et al. Impaired CD4+ T-cell proliferation and effector function correlates with repressive histone methylation events in a mouse model of severe sepsis. *Eur J Immunol*. 2010;40(4):998-1010.
78. Cavassani KA, Carson Wt, Moreira AP, Wen H, Schaller MA, Ishii M, et al. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells creates an environment to potentiate tumor growth. *Blood*. (*no prelo*)
79. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature*. 1984;09(5971):757-62.

80. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 1984;312(5989):36-40.
81. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, et al. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med*. 1989;169(4):1277-94.
82. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:637-85.
83. Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:679-705.
84. Born WK, O'Brien RL. Antigen-restricted gammadelta T-cell receptors? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009;57(2):129-35.
85. Chien YH, Jores R, Crowley MP. Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:511-32.
86. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 2009;31(2):331-41.
87. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature*. 1995;373(6511):255-7.
88. Ohga S, Yoshikai Y, Takeda Y, Hiromatsu K, Nomoto K. Sequential appearance of gamma/delta- and alpha/beta-bearing T cells in the peritoneal cavity during an i.p. infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur J Immunol*. 1990;20(3):533-8.
89. Rock EP, Sibbald PR, Davis MM, Chien YH. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J Exp Med*. 1994;179(1):323-8.
90. Villarrubia N, Leon F, Bootello A. [T gamma-delta lymphocytes and their role in hypersensitivity processes in the digestive and respiratory mucosa]. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2002;30(5):273-82.
91. Hayday AC. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:975-1026.
92. O'Brien RL, Roark CL, Jin N, Aydintug MK, French JD, Chain JL, et al. gammadelta T-cell receptors: functional correlations. *Immunol Rev*. 2007;215:77-88.
93. Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):336-45.
94. Chien YH, Konigshofer Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev*. 2007;215:46-58.
95. Grigoriadou K, Boucontet L, Pereira P. T cell receptor-gamma allele-specific selection of V gamma 1/V delta 4 cells in the intestinal epithelium. *J Immunol*. 2002;169(7):3736-43.
96. Heilig JS, Tonegawa S. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature*. 1986;322(6082):836-40.
97. Garman RD, Doherty PJ, Raulet DH. Diversity, rearrangement, and expression of murine T cell gamma genes. *Cell*. 1986;45(5):733-42.

98. WHO-IUIS. Nomenclature for T-cell receptor (TCR) gene segments of the immune system. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation. *Immunogenetics*. 1995;42(6):451-3.
99. Huber SA, Born W, O'Brien R. Dual functions of murine gammadelta cells in inflammation and autoimmunity in coxsackievirus B3-induced myocarditis: role of Vgamma1+ and Vgamma4+ cells. *Microbes Infect*. 2005;7(3):537-43.
100. Huber S, Sartini D, Exley M. Role of CD1d in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Immunol*. 2003;170(6):3147-53.
101. Huber SA, Sartini D, Exley M. Vgamma4(+) T cells promote autoimmune CD8(+) cytolytic T-lymphocyte activation in coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice: role for CD4(+) Th1 cells. *J Virol*. 2002;76(21):10785-90.
102. Roark CL, French JD, Taylor MA, Bendele AM, Born WK, O'Brien RL. Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells. *J Immunol*. 2007;179(8):5576-83.
103. Jin N, Roark CL, Miyahara N, Taube C, Aydintug MK, Wands JM, et al. Allergic airway hyperresponsiveness-enhancing gammadelta T cells develop in normal untreated mice and fail to produce IL-4/13, unlike Th2 and NKT cells. *J Immunol*. 2009;182(4):2002-10.
104. Gerber DJ, Azuara V, Levraud JP, Huang SY, Lembezat MP, Pereira P. IL-4-producing gamma delta T cells that express a very restricted TCR repertoire are preferentially localized in liver and spleen. *J Immunol*. 1999;163(6):3076-82.
105. Jin N, Taube C, Sharp L, Hahn YS, Yin X, Wands JM, et al. Mismatched antigen prepares gamma delta T cells for suppression of airway hyperresponsiveness. *J Immunol*. 2005;174(5):2671-9.
106. Jensen KD, Su X, Shin S, Li L, Youssef S, Yamasaki S, et al. Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity*. 2008;29(1):90-100.
107. Meyer C, Zeng X, Chien YH. Ligand recognition during thymic development and gammadelta T cell function specification. *Semin Immunol*. 2010/05/01 ed2010. (*no prelo*)
108. Wong GW, Zuniga-Pflucker JC. gammadelta and alphabeta T cell lineage choice: Resolution by a stronger sense of being. *Semin Immunol*. 2010/05/15 ed2010. (*no prelo*)
109. Kreslavsky T, Garbe AI, Krueger A, von Boehmer H. T cell receptor-instructed alphabeta versus gammadelta lineage commitment revealed by single-cell analysis. *J Exp Med*. 2008;205(5):1173-86.
110. Nunez-Cruz S, Aguado E, Richelme S, Chetaille B, Mura AM, Richelme M, et al. LAT regulates gammadelta T cell homeostasis and differentiation. *Nat Immunol*. 2003;4(10):999-1008.
111. Penido C, Castro-Faria-Neto HC, Larangeira AP, Rosas EC, Ribeiro-dos-Santos R, Bozza PT, et al. The role of gammadelta T lymphocytes in lipopolysaccharide-induced eosinophil accumulation into the mouse pleural cavity. *J Immunol*. 1997;159(2):853-60.
112. Penido C, Vieira-de-Abreu A, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Role of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin. *J Immunol*. 2003;171(12):6788-94.

113. Costa MF, Nihei J, Mengel J, Henriques MG, Penido C. Requirement of L-selectin for gammadelta T lymphocyte activation and migration during allergic pleurisy: co-relation with eosinophil accumulation. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(3):303-12.
114. Shen Y, Zhou D, Qiu L, Lai X, Simon M, Shen L, et al. Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science*. 2002;295(5563):2255-8.
115. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2006;177(7):4662-9.
116. Romani L, Fallarino F, De Luca A, Montagnoli C, D'Angelo C, Zelante T, et al. Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature*. 2008; 51(7175):211-5.
117. Uezu K, Kawakami K, Miyagi K, Kinjo Y, Kinjo T, Ishikawa H, et al. Accumulation of gammadelta T cells in the lungs and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*. 2004;172(12):7629-34.
118. Carding SR. A role for gamma/delta T cells in the primary immune response to influenza virus. *Res Immunol*. 1990;141(7):603-6.
119. Chung CS, Watkins L, Funches A, Lomas-Neira J, Cioffi WG, Ayala A. Deficiency of gammadelta T lymphocytes contributes to mortality and immunosuppression in sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291(5):R1338-43.
120. Tschop J, Martignoni A, Goetzman HS, Choi LG, Wang Q, Noel JG, et al. Gammadelta T cells mitigate the organ injury and mortality of sepsis. *J Leukoc Biol*. 2008;83(3):581-8.
121. Steele C, Zheng M, Young E, Marrero L, Shellito JE, Kolls JK. Increased host resistance against *Pneumocystis carinii* pneumonia in gammadelta T-cell-deficient mice: protective role of gamma interferon and CD8(+) T cells. *Infect Immun*. 2002;70(9):5208-15.
122. Zuany-Amorim C, Ruffie C, Haile S, Vargaftig BB, Pereira P, Pretolani M. Requirement for gammadelta T cells in allergic airway inflammation. *Science*. 1998;280(5367):1265-7.
123. Tam S, King DP, Beaman BL. Increase of gammadelta T lymphocytes in murine lungs occurs during recovery from pulmonary infection by *Nocardia asteroides*. *Infect Immun*. 2001; 69(10):6165-71.
124. Saunders BM, Frank AA, Cooper AM, Orme IM. Role of gamma delta T cells in immunopathology of pulmonary *Mycobacterium avium* infection in mice. *Infect Immun*. 1998; 66(11):5508-14.
125. Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, et al. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol*. 2010;184(8):4414-22.
126. Nakasone C, Yamamoto N, Nakamatsu M, Kinjo T, Miyagi K, Uezu K, et al. Accumulation of gamma/delta T cells in the lungs and their roles in neutrophil-mediated host defense against pneumococcal infection. *Microbes Infect*. 2007;9(3):251-8.
127. Moore TA, Moore BB, Newstead MW, Standiford TJ. Gamma delta-T cells are critical for survival and early proinflammatory cytokine gene expression during murine *Klebsiella pneumoniae*. *J Immunol*. 2000;165(5):2643-50.

128. Selin LK, Santolucito PA, Pinto AK, Szomolanyi-Tsuda E, Welsh RM. Innate immunity to viruses: control of vaccinia virus infection by gamma delta T cells. *J Immunol.* 2001;166(11):6784-94.
129. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(3):233-42.
130. D'Souza CD, Cooper AM, Frank AA, Mazzaccaro RJ, Bloom BR, Orme IM. An anti-inflammatory role for gamma delta T lymphocytes in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1997;158(3):1217-21.
131. Born WK, Lahn M, Takeda K, Kanehiro A, O'Brien RL, Gelfand EW. Role of gammadelta T cells in protecting normal airway function. *Respir Res.* 2000;1(3):151-8.
132. Olszewski MA, Falkowski NR, Surana R, Sonstein J, Hartman A, Moore BB, et al. Effect of laparotomy on clearance and cytokine induction in *Staphylococcus aureus* infected lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(9):921-9.
133. Nakamoto T, Yoshimura H, Honda T, Nakata K, Taniguchi Y, Yoshida A, et al. Treatments for the activating macrophages that reduces surgical stress and postoperative mortalities from bacterial infections and tumor metastases. *In Vivo.* 2007;21(2):357-64.
134. Zellweger R, Ayala A, Zhu XL, Morrison MH, Chaudry IH. Effect of surgical trauma on splenocyte and peritoneal macrophage immune function. *J Trauma.* 1995;39(4):645-50.
135. Wesche-Soldato DE, Chung CS, Gregory SH, Salazar-Mather TP, Ayala CA, Ayala A. CD8+ T cells promote inflammation and apoptosis in the liver after sepsis: role of Fas-FasL. *Am J Pathol.* 2007;171(1):87-96.
136. Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets.* 2007;8(4):493-500.
137. Herculat O, Colombat P, Domenech J, Degenne M, Bremond JL, Sensebe L, et al. A rapid single-laser flow cytometric method for discrimination of early apoptotic cells in a heterogenous cell population. *Br J Haematol.* 1999;104(3):530-7.
138. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:245-68.
139. Ochi Y, Koizumi T, Kobayashi S, Phuchareon J, Hatano M, Takada M, et al. Analysis of IL-2 gene regulation in c-fos transgenic mice. Evidence for an enhancement of IL-2 expression in splenic T cells stimulated via TCR/CD3 complex. *J Immunol.* 1994;153(8):3485-90.
140. Martins GA, Cimmino L, Liao J, Magnusdottir E, Calame K. Blimp-1 directly represses Il2 and the Il2 activator Fos, attenuating T cell proliferation and survival. *J Exp Med.* 2008;205(9):1959-65.
141. Penido C, Costa MF, Souza MC, Costa KA, Candea AL, Benjamim CF, et al. Involvement of CC chemokines in gammadelta T lymphocyte trafficking during allergic inflammation: the role of CCL2/CCR2 pathway. *Int Immunol.* 2008;20(1):129-39.
142. Costa MF, de Souza-Martins R, de Souza MC, Benjamim CF, Piva B, Diaz BL, et al. Leukotriene B4 mediates gammadelta T lymphocyte migration in response to diverse stimuli. *J Leukoc Biol.* 2010;87(2):323-32.
143. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol.* 1999;162(4):2347-52.

144. Hoshino H, Laan M, Sjostrand M, Lotvall J, Skoogh BE, Linden A. Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(1 Pt 1):143-9.
145. Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torres RM, Chu HW. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect*. 2007;9(1):78-86.
146. Napolitano LM, Campbell C. Polymicrobial sepsis following trauma inhibits interleukin-10 secretion and lymphocyte proliferation. *J Trauma*. 1995;39(1):104-10; discussion 10-1.
147. Scumpia PO, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Weinstein JS, Wynn JL, Winfield RD, et al. Treatment with GITR agonistic antibody corrects adaptive immune dysfunction in sepsis. *Blood*. 2007;110(10):3673-81.
148. Baccala R, Witherden D, Gonzalez-Quintal R, Dummer W, Surh CD, Havran WL, et al. Gamma delta T cell homeostasis is controlled by IL-7 and IL-15 together with subset-specific factors. *J Immunol*. 2005;174(8):4606-12.
149. Gomes RN, Figueiredo RT, Bozza FA, Pacheco P, Amancio RT, Laranjeira AP, et al. Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/cc chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock*. 2006;26(5):457-63.
150. Benjamim CF, Hogaboam CM, Kunkel SL. The chronic consequences of severe sepsis. *J Leukoc Biol*. 2004;75(3):408-12.
151. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
152. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136(7):2348-57.
153. Hegazy AN, Peine M, Helmstetter C, Panse I, Frohlich A, Bergthaler A, et al. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity*. 2010;32(1):116-28.
154. O'Connor W, Jr., Zenewicz LA, Flavell RA. The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function. *Nat Immunol*. 2010;11(6):471-6.
155. Born W, Cady C, Jones-Carson J, Mukasa A, Lahn M, O'Brien R. Immunoregulatory functions of gamma delta T cells. *Adv Immunol*. 1999;71:77-144.
156. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol*. 2007;178(6):3786-96.
157. Shibata K, Yamada H, Hara H, Kishihara K, Yoshikai Y. Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *J Immunol*. 2007;178(7):4466-72.
158. Siegemund S, Schutze N, Schulz S, Wolk K, Nasilowska K, Straubinger RK, et al. Differential IL-23 requirement for IL-22 and IL-17A production during innate immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int Immunol*. 2009;21(5):555-65.

159. Lochner M, Peduto L, Cherrier M, Sawa S, Langa F, Varona R, et al. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *J Exp Med*. 2008;205(6):1381-93.
160. Do JS, Fink PJ, Li L, Spolski R, Robinson J, Leonard WJ, et al. Cutting edge: spontaneous development of IL-17-producing gamma delta T cells in the thymus occurs via a TGF-beta 1-dependent mechanism. *J Immunol*. 2010;184(4):1675-9.
161. Bai H, Cheng J, Gao X, Joyee AG, Fan Y, Wang S, et al. IL-17/Th17 promotes type 1 T cell immunity against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function. *J Immunol*. 2009;183(9):5886-95.
162. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1183:211-21.
163. Shibata K, Yamada H, Nakamura R, Sun X, Itsumi M, Yoshikai Y. Identification of CD25+ gamma delta T cells as fetal thymus-derived naturally occurring IL-17 producers. *J Immunol*. 2008;181(9):5940-7.
164. O'Brien RL, Roark CL, Born WK. IL-17-producing gammadelta T cells. *Eur J Immunol*. 2009;39(3):662-6.
165. Stumhofer JS, Hunter CA. Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27. *Immunol Lett*. 2008;117(2):123-30.
166. Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjyo I, Ishibashi T, et al. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol*. 2006;177(8):5377-85.
167. Villarino AV, Stumhofer JS, Saris CJ, Kastelein RA, de Sauvage FJ, Hunter CA. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J Immunol*. 2006;176(1):237-47.
168. Riol-Blanco L, Lazarevic V, Awasthi A, Mitsdoerffer M, Wilson BS, Croxford A, et al. IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections. *J Immunol*. 2010;184(4):1710-20.
169. Nakamura R, Shibata K, Yamada H, Shimoda K, Nakayama K, Yoshikai Y. Tyk2-signaling plays an important role in host defense against *Escherichia coli* through IL-23-induced IL-17 production by gammadelta T cells. *J Immunol*. 2008;181(3):2071-5.
170. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000;13(5):715-25.
171. Garcia-Lazaro JF, Thieringer F, Luth S, Czochra P, Meyer E, Renteria IB, et al. Hepatic over-expression of TGF-beta1 promotes LPS-induced inflammatory cytokine secretion by liver cells and endotoxemic shock. *Immunol Lett*. 2005;101(2):217-22.
172. Barke RA, Roy S, Chapin RB, Charboneau R. The role of programmed cell death (apoptosis) in thymic involution following sepsis. *Arch Surg*. 1994;129(12):1256-61; discussion 61-2.
173. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol*. 2002;168(5):2493-500.
174. Ardavin C. Thymic dendritic cells. *Immunol Today*. 1997;18(7):350-61.