

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DHÉBORA MOZENA DALL'IGNA

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E PERFIL DE
CITOCINAS DE LINFÓCITOS SANGUÍNEOS E ESPLÊNICOS
DE RATOS SÉPTICOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO *IN*
VITRO COM TAURINA E CLORAMINA TAURINA**

**CRICIÚMA
2013**

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DHÉBORA MOZENA DALL'IGNA

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E PERFIL DE
CITOCINAS DE LINFÓCITOS SANGUÍNEOS E ESPLÊNICOS
DE RATOS SÉPTICOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO *IN*
VITRO COM TAURINA E CLORAMINA TAURINA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal-
Pizzol.

**CRICIÚMA
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

D147a Dall'Igna, Dhébora Mozena.

Avaliação da viabilidade celular e perfil de citocinas de linfócitos sanguíneos e esplênicos de ratos sépticos submetidos ao tratamento *in vitro* com taurina e cloramina taurina / Dhébora Mozena Dall'Igna ; orientador : Felipe Dal Pizzol. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2013.

72 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2013.

1. Sepse. 2. Septicemia. 3. Taurina. 4. Cloramina taurina.
5. Linfócitos. I. Título.

CDD. 22^a ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **Dhébora Mozena Dall'Igna** sob o título “**Avaliação da viabilidade celular e perfil de citocinas de linfócitos sanguíneos e esplênicos sépticos submetidos a tratamento *in vitro* com taurina e cloramina taurina**” para obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.


Criciúma, SC, 05 de agosto de 2013


Prof. Dra. Josiane Budni
Membro Relator


Prof. Dr. Nelo Eidy Zancui
Membro Interno


Prof. Dr. Fernando Spiller
Membro Externo


Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Orientador


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional conforme normas constantes na Resolução nº 02/2013, propostas pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Este trabalho foi realizado nas instalações dos Laboratórios de Fisiopatologia Experimental, Biologia Molecular e Microbiologia, todos vinculados ao Programa.

*À **Deus** que me permitiu com que
mais esse passo fosse dado, que me
dá a força diária para seguir em
frente.*

*Ao meu filho **Gabriel**, meu anjo,
companheiro, sempre
compreensivo e amado. Você é a
melhor parte de mim!*

*À minha mãe **Marinês**, por todo o
amor, apoio e cuidado, de quem
herdei muita força.*

*Ao meu pai **Valério**, por todo o
amor, cuidado e dedicação, de
quem herdei valores inestimáveis.*

*Como você faz falta!
Ao meu irmão **Douglas**, que espero
que se recupere o mais rápido
possível.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais. Sempre e para a vida toda.

Ao meu orientador Felipe Dal Pizzol, pessoa sábia, simples e competente, pela oportunidade de muito aprendizado, pela confiança em mim depositada, pela paciência e por toda a ajuda.

A todos os professores do Programa, desde o convívio breve em alguma disciplina a amizades e parcerias feitas ao longo deste tempo.

Aos professores de Graduação e Especialização com os quais me comunico até hoje. Obrigada pela parceria, amizade e exemplo.

À secretaria e coordenação do Programa.

À querida Camila Model, a quem muito admiro. Obrigada pela amizade e por ter estendido a mão no meu momento mais difícil.

À Cris Loira, pela amizade e pelas agradáveis e longas conversas.

À Fran Vuolo, pela amizade e pelas primeiras coordenadas no laboratório.

À Cinara e Gabriela pela amizade e companheirismo.

À Giselli, pela amizade, convívio, paciência e cuidado.

À Monique, pela amizade e por estar sempre disposta.

Ao André, pelo o que foi bom.

Às “pizzolotes” Letícia, Renata, Jaqueline, Natália, Tatiana e Carolini, agradáveis companhias.

Às pessoas cujo convívio foi muito especial: Mari, Gi Tezza, Bela, Fabrícia, Tamires, Larissa, Amandinha, Fran Mina, Bruna, Diogo, Will, Guta e Josi Budni.

Ao Guto e Tia Célia, por estarem cuidando da mãe por mim.

Aos funcionários do Biotério desta Instituição, pela disponibilidade de sempre, em especial ao Heron e Elige.

Aos animais que deram a vida sem direito de escolha.

Aos laboratórios, cujo espaço cedido possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao apoio financeiro de CAPES e UNESC.

A todos, muito obrigada!

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem a sua própria justificativa racional para existir... Não perca nunca essa sacrossanta curiosidade”.
Albert Einstein, 1879-1955.

“Nós estamos aqui para somar o que pudermos à vida, não para dela subtrair o que for possível”.
William Osler, 1849-1919.

RESUMO

Estudos estão buscando mecanismos de morte celular durante o curso da sepse, em que respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias estão envolvidas na sua complexa fisiopatologia. Taurina (Tau) é um aminoácido abundante em polimorfonucleares (PMNs) que reage com ácido hipocloroso para formar o oxidante cloramina taurina (TauCl) em condições inflamatórias. Neste contexto, foi investigado potenciais interações entre linfócitos e TauCl em ratos submetidos à ligação e perfuração cecal (CLP), por meio de análise de viabilidade celular e perfil de secreção de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17A, IL-23 e IL-10). Ratos adultos machos foram divididos em dois grupos (sham e CLP) e subsequentemente mortos 24 ou 120 horas após a indução da sepse para isolamento de linfócitos do sangue e do baço. Linfócitos (> 95,0% de pureza determinada por diferenciação com coloração de Giemsa) foram cultivados por 24 horas a uma concentração de 1×10^6 células/mL e ativadas com 2 $\mu\text{g/mL}$ de concanavalina A (ConA). Após 24 horas, Tau e TauCl foram adicionadas a concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 (mM) por uma hora. Após este tempo, as células foram incubadas com MTT (500 $\mu\text{g/mL}$) por 3 horas para avaliar viabilidade celular e os sobrenatantes foram usados para determinar os níveis de citocinas. Células incubadas com Tau exibiram maior viabilidade do que as células incubadas com TauCl, em ambos tempos e órgãos. TauCl, por meio de relação dose-dependente, diminuiu a secreção de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17A, IL-23 e IL-10) quando comparadas às células não incubadas. Estes achados mostram um possível comprometimento na função de linfócitos promovido pelo efeito de TauCl, correlacionado com a imunossupressão e morte celular características dos estágios de sepse.

Palavras-Chave: Linfócito. Sepse. Taurina. Cloramina taurina. Viabilidade.

ABSTRACT

Studies are researching immune cell death mechanisms during the course of sepsis in response to pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators that are involved in its pathophysiology. Taurine (Tau) is an abundant amino acid in polymorphonuclear leucocytes (PMN) that reacts with hypochlorous acid to form taurine chloramine (TauCl) under inflammatory conditions. In this context, we investigated potential interactions between lymphocytes and TauCl in rats submitted to cecal ligation and perforation (CLP), analyzing cell viability and cytokine secretion profile (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17A, IL-23 and IL-10). Adult male rats were divided in two groups (sham and CLP) and then were killed 24 or 120 hours after sepsis induction to isolate lymphocytes from blood and spleen. Lymphocytes (> 95,0% purity determined by differentiation with Giemsa staining) were cultured for 24 hours at a concentration of 1×10^6 cells/mL and activated by 2 μ g/mL concanavalin A (Con-A). After 24 hours, Tau and TauCl were added at concentrations of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 (mM) for 1 hour. After this time, cells were incubated with MTT (500 μ g/mL) for 3 hours to evaluate cell viability and supernatants were used to determine cytokines levels. Cells incubated with Tau exhibited better viability than those incubated with TauCl, in both time and organs. TauCl, in a time and dose-dependent ratio, decreased cytokines secretion (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17A, IL-23 and IL-10) when compared to untreated cells. These findings show a possible impairment in lymphocytes function promoted by TauCl, correlated with immunosuppression and cell death characteristic of the late stages of sepsis.

Keywords: Lymphocyte. Sepsis. Taurine. Taurine chloramine. Viability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1 – Viabilidade celular de linfócitos sanguíneos tratados <i>in vitro</i> com Tau e TauCl, 24 horas	37
Figura 2 – Viabilidade celular de linfócitos sanguíneos tratados <i>in vitro</i> com Tau e TauCl, 120 horas.....	38
Figura 3 – Viabilidade celular de linfócitos esplênicos tratados <i>in vitro</i> com Tau e TauCl, 24 horas.....	39
Figura 4 – Viabilidade celular de linfócitos esplênicos tratados <i>in vitro</i> com Tau e TauCl, 120 horas.....	40
Figura 5 – Níveis de IL-17A (pg/mL/células sanguíneas e esplênicas) em sobrenadante de cultura celular estimulada com Con-A e TauCl nas concentrações molares de 0,1 mM e 0,5 mM.....	41
Figura 6 – Níveis de IL-23 (pg/mL/células sanguíneas e esplênicas) em sobrenadante de cultura celular estimulada com Con-A e TauCl nas concentrações molares de 0,1 mM e 0,5 mM.....	42
Figura 7 – Níveis de IFN- γ (pg/mL/células sanguíneas e esplênicas) em sobrenadante de cultura celular estimulada com Con-A e TauCl nas concentrações molares de 0,1 mM e 0,5 mM.....	42
Figura 8 – Níveis de TNF- α (pg/mL/células sanguíneas e esplênicas) em sobrenadante de cultura celular estimulada com Con-A e TauCl nas concentrações molares de 0,1 mM e 0,5 mM.....	43
Figura 9 – Níveis de IL-6 (pg/mL/células sanguíneas e esplênicas) em sobrenadante de cultura celular estimulada com Con-A e TauCl nas concentrações molares de 0,1 mM e 0,5 mM.....	43
Figura 10 – Níveis de IL-10 (pg/mL/células sanguíneas e esplênicas) em sobrenadante de cultura celular estimulada com Con-A e TauCl nas concentrações molares de 0,1 mM e 0,5 mM.....	44
Tabela 1 – Quadro resumido e comparativo de Viabilidade celular de linfócitos tratados com Tau (taurina) e/ou TauCl (cloramina taurina)...	45
Tabela 2 – Quadro resumido e comparativo de secreção de citocinas por linfócitos não tratados e tratados com TauCl nas concentrações molares de 0,1 mM e 0,5 mM.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCP – *American College of Chest Physicians*
BSA – albumina bovina sérica (do inglês *bovine serum albumin*)
CASP - Peritonite por *stent* em cólon ascendente (do inglês *colon ascendens stent peritonitis*)
CID – coagulação intravascular disseminada
CLP – ligação e perfuração cecal (do inglês *cecal ligation puncture*)
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMSO – dimetilsulfóxido
EROs – espécies reativas de oxigênio
ICAMs - moléculas de adesão intracelular
IFN – *interferon*
IL- interleucina
iNOS – óxido nítrico sintase induzível (do inglês *inducible nitric oxide synthase*)
LPS – lipopolissacarídeo
MDP – muramildipeptídeo
MPO – do inglês *myeloperoxidase*
MTT – do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide*
NCT – *N-chlorotaurine* (denominação IUPAC)
NF-κB – fator nuclear *kappa B* (do inglês *nuclear factor kappa b*)
NK – do inglês *natural killer*
NLR - proteínas intracelulares do tipo NOD (NLR) (do inglês *NOD – like proteins*)
NO – óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)
PAMP – padrões moleculares associados à patógenos (do inglês *pathogen associated molecular patterns*)
PBS – tampão salina fosfato (do inglês *phosphate buffered saline*)
PMN – polimorfonucleares
PRR – receptor de reconhecimento de patógeno (do inglês *pattern recognition receptors*)
SBF – soro bovino fetal
SCCM – do inglês *Society of Critical Care Medicine*
SDMO – Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos
SOD – superóxido dismutase
SRAC- Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória
SRIS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SSC – *Surviving Sepsis Campaign*

TauBr – cloramina bromamina (do inglês *taurine bromamine*)
TauCl – cloramina taurina (do inglês *taurine chloramine*)
TGF- β – fator de crescimento transformador (do inglês *transforming growth factor β*)
T_H1 – Linfócitos T helper 1 (do inglês *T helper 1 lymphocytes*)
T_H2 – Linfócitos T helper 2 (do inglês *T helper 2 lymphocytes*)
T_H17 – Linfócitos T helper 17 (do inglês *T helper 17 lymphocytes*)
TLR – receptor do tipo *toll* (do inglês *toll like receptor*)
TMB – do inglês *3,3',5,5'-tetrametilbenzidina*
TNF – fator de necrose tumoral (do inglês *tumoral necrosis factor*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Histórico, definições e aspectos epidemiológicos da sepse.....	15
1.2 Fisiopatologia da sepse.....	17
1.3 Apoptose.....	19
1.4 Citocinas de alta relevância na sepse.....	21
1.5 Taurina (Tau) e Cloramina Taurina (TauCl).....	23
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Manejo e destino dos animais pós experimentação.....	27
3.3 Desenho Experimental.....	28
3.4 Justificativa do método e Indução de sepse experimental.....	28
3.5 Isolamento de linfócitos.....	29
3.5.1 Sangue.....	29
3.5.2 Baço.....	30
3.6 Determinação do número de células viáveis.....	30
3.7 Diferenciação celular.....	31
3.8 Cultura de células.....	31
3.9 Preparo de Tau e TauCl.....	31
3.9.1 TauCl.....	31
3.9.2 Tau.....	32
3.10 Ensaio de toxicidade com Tau e TauCl.....	32
3.11 Viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT.....	33
3.12 Quantificação de citocinas.....	34
3.13 Análises Estatísticas.....	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Padronização da técnica.....	36
4.2 Viabilidade celular.....	37
4.3 Perfis de citocinas.....	40
5 DISCUSSÃO.....	48
6 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO A	
Parecer da comissão de ética no uso de animais.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO, DEFINIÇÕES E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA SEPSE

Historicamente, a sepse é conhecida como uma condição em que sua identificação e diagnóstico são difíceis e é relatada desde o início dos tempos, sendo descrita por mais de 2000 anos, apesar de as definições clínicas serem recentes (Martin, 2012).

Em um esforço para entender clinicamente essa patologia, no último século, uma variedade de definições estão sendo desenvolvidas. Entre os conceitos mais recentes, está o de considerar a sepse como resposta sistêmica do hospedeiro à infecção (Riedemann et al., 2003). De fato, a sepse foi classicamente descrita pelo eminente médico canadense William Osler (1849–1919) em sua observação seminal que pacientes, exceto em alguns casos, pareciam morrer pela resposta corpórea à infecção do que pela infecção *per se*. Anos mais tarde, em 1972, este conceito foi reforçado em uma revisão médica a qual relata que “a resposta do hospedeiro é que faz a doença” (Thomas, 1972). Sepse já foi conceituada de um modo geral como uma forma de intoxicação, muitas vezes como envenenamento do sangue; de forma mais prática, um quadro que representa a presença de microrganismos patogênicos ou suas toxinas no sangue ou tecidos (Martin, 2012).

Com o objetivo de desenvolver uma padronização universal do conceito que complementasse as novas descobertas sobre a fisiopatologia da sepse, o *American College of Chest Physicians* (ACCP) e a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM), realizou em 1991, uma reunião de consenso para a criação de critérios de classificação da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), sepse, sepse severa e choque séptico. Esta síndrome é definida como a presença de dois ou mais dos seguintes quadros de inflamação sistêmica: (1) hipertermia ou hipotermia; (2) leucitose ou leucopenia; (3) taquicardia e (4) taquipneia ou hiperventilação (Bone et al., 1996).

Dez anos depois, tais conceitos foram revisados em uma nova conferência (Levy et al., 2003). Considerações importantes foram realizadas com o objetivo de expandir o conceito de SRIS com a inclusão de outros parâmetros relacionados ao quadro séptico, além da compreensão do processo de evolução da doença. Com infecção

documentada, sepse tem que abranger pelo menos 2 critérios de SRIS. Já a sepse severa é a sepse que evolui para disfunção orgânica ou também conhecida como síndrome de disfunção múltipla de órgãos (SDMO), quadro que inclui hipoperfusão e hipotensão. O choque séptico é a sepse com hipotensão refratária ou persistente e hipoperfusão tecidual, apesar de adequada reposição volêmica (Howell et al., 2011).

O termo *sepsis* implica em uma resposta clínica (SRIS) decorrente de uma infecção suspeita ou confirmada. Entretanto, resposta similar ou mesmo idêntica pode surgir na ausência de infecção documentada. Por esta razão, estabeleceu-se o uso do termo SRIS como o mais apropriado para a designação das patologias similares, pois ela pode ser causada por diversos outros insultos (Bone et al., 1992).

Todo este histórico de aprimoramento nos conceitos, bem como o estabelecimento de critérios diagnósticos que compõem as diretrizes da *Surviving Sepsis Campaign* (SSC), vem permitindo a execução de estudos epidemiológicos da sepse. Tais estudos têm mostrado a dimensão da doença, bem como a relevância de seu estudo (Dellinger et al., 2013).

Com base em dados obtidos de estudos realizados em vários países europeus desenvolvidos e em desenvolvimento, a sepse pode ocorrer entre 6% e 30% de todos os pacientes das UTI's (Unidades de Terapia Intensiva), variação esta devida à heterogeneidade das unidades (Vincent et al., 2006).

Um estudo estimou a incidência de sepse nos Estados Unidos em 751.000 casos por ano, relatando que a idade relaciona-se diretamente com a incidência e a mortalidade. A incidência aumentou mais de 100 vezes com a idade, sendo 0,2/1.000 em crianças e 26,2/1000 em pacientes acima de 85 anos. A mortalidade foi de 10% em crianças e 38% em pacientes com mais de 85 anos, sendo responsável por 9,3% de todos os óbitos nos Estados Unidos em 1995 e resultando em 215.000 mortes, número equivalente à mortalidade por infarto agudo do miocárdio. Adicionalmente, os custos em saúde associados ao tratamento de pacientes sépticos são extremamente altos, chegando a mais de 16 bilhões de dólares por ano (Angus et al., 2001).

Estudos prospectivos recentes usando os critérios de identificação de sepse definidos por ACCP/SCCM em pacientes de UTI's mostraram índices de incidência de 0,25/1000 na Espanha (Blanco et al., 2008); 0,38/1000 na Finlândia (Karlsson et al., 2007); 0,77/1000 na Austrália e Nova Zelândia (Finfer et al., 2004) e de

0,95/1000 na França (Brun-Buisson et al., 2004). Já na Islândia, Vesteynsdottir e colaboradores (2011) mostraram uma incidência de sepse severa e choque séptico de 0,48/1000 ao ano (dados representativos de 1000 habitantes). Segundo esta última pesquisa, a taxa de mortalidade de sepse em 28 dias foi de 24,6%.

Em um estudo de coorte multicêntrico internacional sobre sepse e infecção em pacientes de UTI's, obteve-se uma incidência bruta de infecções de 21,1%. Entre os 3.304 episódios infecciosos, 24% foram associados com sepse severa e 30% com choque séptico. A frequência do choque estava relacionada a cepas multirresistentes (Alberti et al., 2002). Annane et al. (2003) analisaram a epidemiologia do choque séptico de 100.554 admissões de UTI's e observaram um aumento na frequência de 7 entre 100 admissões para 9,7 entre 100 admissões no ano de 1000.

Já no Brasil, estudos epidemiológicos sobre sepse são escassos. O estudo BASES (Estudos Brasileiros Epidemiológicos em Sepse), desenvolvido em cinco UTI's dos estados de São Paulo e Santa Catarina, mostrou uma incidência de sepse, sepse grave e choque séptico de 46,9%, 27,3% e 23%, respectivamente. A mortalidade nestes pacientes foi 33,9%, 46,9% e 52,2%, respectivamente (Silva et al., 2004).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

A sepse é uma desregulação inflamatória severa que ocorre durante situações em que as infecções não estão apenas estabelecidas localmente e disseminam-se pela corrente sanguínea. A resposta inflamatória séptica compreende duas fases distintas: a SRIS, caracterizada pela produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios e a segunda fase conhecida como SRAC – Síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória. Tal fase está associada ao aumento da susceptibilidade às infecções secundárias e é caracterizada por um severo comprometimento das funções de células T imunes adaptativas em que posteriormente pode levar a uma inabilidade no controle de infecções virais e bacterianas, podendo, dependendo da gravidade da evolução do quadro, levar a falha orgânica múltipla através da imunoparalisia (Cohen, 2002; Hotchkiss e Karl, 2003; Hotchkiss et al., 2009).

Ashare et al. (2005) mostraram que a razão entre mediadores anti-inflamatórios/pró-inflamatórios é mais preditiva da gravidade da infecção séptica do que as medidas absolutas de qualquer mediador individual. Vários modelos pré-clínicos foram desenvolvidos com o objetivo de propiciar descobertas sobre mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela ocorrência de SRIS e SRAC. Dentre os métodos não cirúrgicos encontram-se os modelos de aplicação de endotoxina como o lipopolissacarídeo (LPS) e administração intravascular de patógenos como *E. coli*; dentre os métodos cirúrgicos encontram-se ligação e perfuração cecal (CLP) e Peritonite por *stent* em cólon ascendente (CASP). O procedimento de CLP é reconhecidamente um dos modelos que melhor mimetiza os parâmetros clínicos de sepse humana (Buras et al., 2005).

Pesquisas com tais modelos permitiram observar que as duas fases da sepse são iniciadas pela ativação exacerbada de células imunes inatas como consequência da sinalização através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Beutler, 2004; Kawai e Akira, 2010). A interação de componentes celulares como LPS, muramildipeptídeo (MDP), flagelina e DNA bacteriano com os PRRs como receptor do tipo *toll* (TLR), proteínas intracelulares do tipo NOD (NLR) e proteínas de reconhecimento de peptídeoglicano, leva à ativação de uma série de moléculas efetoras intracelulares e por fim fatores de transcrição nuclear como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a subsequente expressão de citocinas pró-inflamatórias (Rittirsch et al., 2008).

Enquanto que a SRIS está associada à maciça secreção de fator de diferenciação mielóide (MyD88) e citocinas pró-inflamatórias dependentes de domínio TIR contendo adaptador do indutor de interferon β (TRIF) como fator de necrose tumoral *alpha* (TNF- α), interferon gamma tipo II (IFN- γ), interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) (Weighardt et al., 2002; Weighardt e Holzmann, 2007), a SRAC está associada à produção de citocinas regulatórias como IL-10, que está envolvida nas respostas imunes inata e adaptativa (Volk et al., 2000; Cohen, 2002).

Concomitantemente ao processo inflamatório, ocorre um processo de coagulação intravascular disseminada (CID), que resulta de uma ativação irregular da coagulação sanguínea, com formação aumentada de trombos na microcirculação, consumo de plaquetas e fatores de coagulação (Tassin et al., 2013). Hayakawa e colaboradores

(2013) investigaram especificamente o efeito do fator tecidual (fator III) e descobriram que o mesmo é responsável pela indução de CID, sendo expresso em células mononucleares e endoteliais ativadas. Tais anormalidades coagulatórias clinicamente relevantes podem ocorrer em 50 a 70% dos pacientes com sepse (Wheeler e Bernard, 1999; Levi et al., 2003); a mortalidade de pacientes sépticos com CID pode chegar a 43% (Dhainau et al., 2004). A sepse é um evidente fator de risco para ocorrência de trombocitopenia em pacientes críticos e a severidade da mesma está correlacionada com a baixa contagem de plaquetas (Levi et al., 2005).

Muitas pesquisas estão sendo realizadas para avaliar potenciais intervenções terapêuticas para sepse, porém sem grande sucesso. Tais pesquisas concentram-se principalmente nos estudos de mecanismos fisiopatológicos. Ensaios clínicos destinados a bloquear a resposta inflamatória apresentaram falhas, estando provavelmente relacionadas com a natureza multifatorial da sepse, que inclui condições pré-existentes, o tipo de lesão ou infecção e o processo inflamatório desencadeado pelo insulto (Remick, 2003).

1.3 APOPTOSE

O aumento de morte celular pelo processo de apoptose é proposto como principal contribuinte à disfunção orgânica durante o choque (Hotchkiss e Nicholson, 2006). A apoptose é um “suicídio” celular programado, o qual regula uma forma não-necrótica de morte celular. As células que passam por este processo sofrem mudanças morfológicas e bioquímicas, incluindo deformação na membrana, encolhimento, condensação da cromatina e fragmentação de DNA (Cohen et al., 1992). Apesar de historicamente atribuir-se apenas à necrose a indução de inflamação, recentemente estudos mostram que células apoptóticas não fagocitadas liberam conteúdos intracelulares de característica antigênica e potencialmente citotóxica, podendo também promover maior inflamação (Mei et al., 2010).

Em pacientes com sepse há ocorrência de aumento da apoptose dos linfócitos circulantes e das células dendríticas esplênicas, principalmente durante o estágio de imunossupressão ou imunoparalisia. Se a apoptose é uma resposta adaptativa aos tecidos lesados, também pode contribuir para a disfunção orgânica e a imunossupressão na sepse,

contribuindo para a perpetuação da mesma, longo tempo de permanência na UTI e aumento na mortalidade (O'Brien et al., 2007).

Oberholzer et al. (2001) mostraram que linfócitos são os tipos celulares que sofrem grande apoptose. A morte celular está diretamente relacionada aos danos estruturais e funcionais das mitocôndrias que levam à falha energética (Rudiger et al., 2008).

Vias apoptóticas ocorrem através da ativação de membros da família de receptores de TNF- α ou pelo mecanismo intrínseco via caspases e Bcl-2. Achados em experimentação animal de Hotchkiss e Nicholson (2006) mostram a ocorrência de apoptose generalizada de células B, células T e células dendríticas na fase imunossupressora da sepse, corroborando com estudos clínicos *post mortem*. No entanto, estudos recentes mostraram que a apoptose de linfócitos T não seria somente um resultado da fase tardia da sepse como se era sabido. Ela aparece também na fase inicial da mesma (Kasten et al., 2010).

Tiesi e colaboradores (2013) relatam em um recente estudo em modelo animal de trauma hemorrágico, que camundongos com mutação no receptor TLR4 mostram resistência no processo apoptótico de células do baço e do timo, indicando que tal mecanismo de morte celular é dependente de TLR4.

A apoptose aumentada particularmente em tecidos linfóides e potencialmente aumentada em alguns tecidos parenquimais podem contribuir para a MODS associada à sepse e pode ser um alvo terapêutico potencial para intervenção (Oberholzer et al., 2001), além de intervenções já conhecidas como antibioticoterapia de amplo espectro de ação, ressuscitação fluídica intravenosa, ventilação mecânica, terapia com glicocorticóides e insulina (Matsuda et al., 2012). Em outubro de 2011, o medicamento antitrombótico Xigris[®] (drotrecogina alfa, proteína C ativada humana recombinante) foi retirada do mercado devido aos riscos serem superiores aos benefícios.

Guo et al. (2004) estudaram a hipótese de que um tratamento à base de inibição de caspases poderia proteger ratos de insuficiência renal aguda induzida por endotoxemia. Os resultados mostraram não somente prevenção de apoptose como inibição da inflamação.

Já Hotchkiss et al. (1999), mostraram que a superexpressão de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, em modelo de ratos transgênicos, fornece proteção celular na sepse contra morte de linfócitos, aumentando a sobrevida, que pode ser prejudicial por comprometer a defesa do hospedeiro.

1.4 CITOCINAS DE ALTA RELEVÂNCIA NA SEPSE

Apesar de a produção de citocinas pró-inflamatórias ser normalmente indispensável à proteção contra patógenos e ao reparo tecidual advindo da imunidade humoral, a produção desregulada e prolongada das mesmas pode levar a uma cascata inflamatória sistêmica mediada por quimiocinas, aminas vasoativas, sistema complemento e de coagulação, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, dentre outras (Matsuda et al., 2012). Levi e colaboradores (1997) atribuíram às citocinas, o papel de mediadores mais importantes no desequilíbrio do sistema coagulatório na sepse.

O papel primário da liberação de mediadores inflamatórios associados à sepse é o de aumentar a infiltração de leucócitos dentro de vasos sanguíneos no sítio de infecção. A partir do reconhecimento dos PAMPs, dá-se início a uma cascata de sinalização responsável pela transcrição de um grande número de genes de importantes de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Cauvi et al., 2012). Adicionalmente, tem-se uma produção de Interferons do tipo 1 (IFN), podendo resultar na ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células imunes e de tecido vascular, levando à produção de mais óxido nítrico (NO). O NO, por sua vez, participa do estresse oxidativo resultante de todo o processo inflamatório séptico, juntamente com outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Jimenez et al., 2005). O estresse oxidativo associado ao quadro séptico pode resultar em adaptação ou lesão celular (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Linfócitos T helper 1 (T_H1) produzem, dentre outras citocinas, IFN- γ e TNF- α , favorecendo a imunidade mediada por células. Porém os linfócitos T helper 2 (T_H2) secretam IL-6 e IL-10, dentre outras, favorecendo a imunidade humoral. Citocinas produzidas na sepse podem afetar a predominância de populações de linfócitos e consequentemente as respostas imunes (Ferguson et al., 1999).

TNF- α e IL-6 desempenham um papel regulador na promoção da depuração bacteriana sistêmica e juntamente com a IL-12 (produzida primariamente por monócitos e macrófagos), ativam diretamente a capacidade citolítica das células mononucleares e polimorfonucleares, aumentando a produção de NO e atividades microbicidas e indiretamente a produção de IFN- μ e TNF- α , que regulam a fagocitose bacteriana (Moreno et al., 2006).

Localmente, TNF- α e IL-1, principalmente do tipo IL-1 β ,

ativam o endotélio vascular, aumentando a expressão de moléculas de adesão como as moléculas de adesão intracelular (ICAMs), P-selectina e E-selectina (Ley et al., 2007). A vasodilatação exacerbada está associada a fugas de fluido vascular, o que leva à hipoperfusão tecidual, choque e falência de órgãos (Pathan et al., 2004).

Interleucina-6 (IL-6) é rapidamente induzida no contexto de sepse, tanto clínico quando experimentalmente em ratos. É uma citocina de alto pleiotropismo que desempenha diversas funções, incluindo efeitos na imunidade inata mediada por macrófagos e células dendríticas, na ativação e diferenciação de linfócitos B e T, assim como na indução de respostas por Linfócitos T helper (T_H17). É um importante marcador na sepse e no choque séptico: pacientes mostram altos níveis séricos de IL-6 e isso está correlacionado com o aumento de mortalidade, associada à disfunção orgânica (Pathan et al., 2004; Sutherland et al., 2005).

Interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que desempenha papel importante na fisiopatologia do paciente criticamente enfermo. Níveis plasmáticos de IL-10 em pacientes sépticos são correlacionados com a SRIS; tais níveis aumentados estão associados com a uma má recuperação dos mesmos (Marchant et al., 2005; Scumpia e Moldawer, 2005).

Linfócitos T *naïve* CD4⁺ se diferenciam em células T de memória produtoras de IL-17, conhecidos como linfócitos de fenótipo T_H17, que secretam não somente IL-17 (em particular IL-17A), mas também TNF- α , IL-2, IL-22, IL-23, dentre outras substâncias, dependendo da condição inflamatória da doença (Stockinger et al., 2011). Esta diferenciação e ativação ocorrem com a sinalização promovida pelos PRRs, por meio de estimulação macrófágica e dendrítica via sistema complemento (Hashimoto et al., 2010; Lajoie et al., 2010). IL-17A é uma potente citocina pró-inflamatória que atua no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os tecidos e induz a produção de peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais, podendo ter participação importante no desenvolvimento de doenças autoimunes (Hirota et al., 2012). IL-17 induz citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF e IL-1 β) (Yao et al., 1995) e quimiocinas (CXCL1, GCP-2, CXCL8 ou IL-8, CINC, MCP-1) (Fossiez et al., 1996).

Interleucina-23 (IL-23) parece ser uma citocina essencial no controle da patogenicidade, sendo os macrófagos e as células dendríticas as maiores fontes contribuintes para a rápida liberação desta citocina

durante a doença (Bosmann e Ward, 2012). IL-23 é um potente indutor de IL-17 (Murphy et al., 2003; Langrish et al., 2005). Bosmann e Ward (2012) demonstraram que o bloqueio de IL-23, assim como o de IL-17 melhora efetivamente a recuperação no choque endotóxico.

Interferon *gamma* (IFN- γ) é uma proteína homodimérica classicamente produzida por células *Natural killer* (NK) e linfócitos T, apesar de algumas linhagens de células monocíticas/macrofágicas também atuarem como fonte (Ogasawara et al., 1998; Feng et al., 2006; Robinson et al., 2009). IFN- γ é essencial para uma resposta efetiva do hospedeiro frente a uma variedade de patógenos (Hunter et al., 1995). O mesmo é necessário para a indução de alguns genes responsivos ao LPS como a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), o que facilita a produção de muitas citocinas e quimiocinas próinflamatórias (Heremans e Billiau, 1989; Heremans et al., 2000). A resposta sistêmica ao LPS e o desenvolvimento do choque séptico induzido pelo mesmo são facilitados pelo IFN- γ (Heremans et al., 1994).

1.5 TAURINA (TAU) E CLORAMINA TAURINA (TAUCL)

A formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é o primeiro passo para a ação microbicida de neutrófilos ativados. Por dismutação espontânea ou por ação catalítica, via superóxido dismutase (SOD) do $O_2^{\bullet-}$, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é gerado. Este último é o co-substrato da mieloperoxidase neutrofilica (MPO), que catalisa a oxidação de $O_2^{\bullet-}$ ao potente germicida, ácido hipocloroso (HOCl) (Winterbourn et al., 2000; Klebanoff, 1999). O HOCl é um potente oxidante produzido por neutrófilos e macrófagos, por meio de reação triplíce mieloperoxidase-hidroperóxido-cloro (MPO- H_2O_2 -Cl). É altamente reativo com moléculas biológicas, entre elas tióis e aminas. Em associação com as aminas, HOCl forma as cloraminas, cujo o poder oxidante é menor que o do HOCl (Peskin e Winterbourn, 2001). MPO é a única enzima que oxida Cl^- em HOCl (Gaut et al., 2001).

Estes agentes oxidantes são gerados com o propósito de eliminar os microrganismos invasores, mas também podem induzir danos a tecidos próximos (Evans et al., 1996; Marcinkiewicz et al., 1999; Babior, 2000). O aminoácido taurina (ácido 2-aminoetanossulfônico) é o mais abundante aminoácido intracelular em humanos, atingindo concentrações de 20-50 mM em leucócitos,

possuindo propriedades antimicrobianas e antioxidantes como aumentar a habilidade fagocítica de neutrófilos e o *burst* respiratório, este último caracterizado pelo intenso consumo de oxigênio (Egan et al., 2001). Diretamente, Tau pode agir como *scavenger* de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ou indiretamente prevenindo mudanças na permeabilidade de membrana. É importante enfatizar que altos níveis de Tau nos fagócitos e o acúmulo deste aminoácido nas lesões inflamatórias sugerem um papel na imunidade inata (Schuller-Levis e Park, 2004).

Neutrófilos estimulados liberam uma grande quantidade de Tau que é rapidamente clorada pela reação com HOCl, gerando a Cloramina Taurina (TauCl) – também podendo ser chamada de *N*-clorotaurina (NCT) -, mais estável e menos tóxica que o ácido mas ainda com potencial oxidativo (Grisham et al., 1984).

Cloraminas podem ser produzidas em quantidades substanciais por polimorfonucleares (PMNs) ativados, podendo modificar respostas celulares (Pero et al., 1996). TauCl é considerada um dos maiores produtos cloraminados formados durante processos inflamatórios, sendo que as várias cloraminas diferem entre si em permeabilidade de membrana e efeitos biológicos (Ogino et al., 2009). As cloraminas são formadas por reação não enzimática entre HOCl com muitas aminas endógenas como taurina, amônio, lisina, polipéptidos amino-terminais e halogênios como o bromo (Br), formando a cloramina bromamina (TauBr) (Thomas et al., 1986b).

TauCl é conhecida por ter um papel na modulação da resposta imune, promovendo o decréscimo na produção de múltiplos mediadores próinflamatórios por leucócitos aderentes ou não-aderentes (Schuller-Levis e Park, 2004; Kontny et al; 2006). Esta substância inibe a transcrição intracelular de NOS e a produção de NO e permite com que o processo de morte celular seja via apoptose (mais vantajoso) e não via necrose em uma variedade de células (Emerson et al., 2005). Tem sido demonstrado que TauCl induz apoptose em linfomas de células B humanas (Klamt e Shacter, 2005) e em pró-linfomas de célula B através de dano mitocondrial (Emerson et al., 2005).

Pilz e colaboradores (2012) mostraram que TauCl é capaz de induzir apoptose em linhas celulares humanas de osteosarcoma, indicando ser um agente promissor na terapia desta doença. Estudos conduzidos por Marcinkiewicz e colaboradores (1999), demonstraram que no sítio da inflamação, produtos do sistema de cloração produzido

por PMNs, HOCl e TauCl, afetam as funções de CD (células dendríticas), apresentadoras de antígenos.

Apesar de uma crescente compreensão da biologia associada à sepse e ao choque séptico, ainda não há indicadores atuais ou diagnósticos que possam antecipar com precisão o desenvolvimento das patologias. Para agravar o quadro, os tratamentos são puramente de suporte. Como os linfócitos também estão presentes no sítio de inflamação onde os mesmos têm contato com neutrófilos e macrófagos, pensou-se na hipótese de que TauCl, bem como Tau, pudessem influenciar na viabilidade de linfócitos, bem como regular funções de secreção de citocinas, fundamentais para complementação do processo inflamatório na sepse.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visou investigar o envolvimento de Taurina (Tau) e Cloramina Taurina (TauCl) em parâmetros *in vitro* de viabilidade celular e secreção de citocinas de linfócitos sanguíneos e esplênicos extraídos de ratos sépticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Padronizar protocolo experimental de extração e cultura de linfócitos sanguíneos e esplênicos de ratos submetidos à ligação e perfuração cecal após 24 e 120 horas da sepse;
- ✓ Avaliar *in vitro* a viabilidade celular de linfócitos extraídos de ratos submetidos à ligação e perfuração cecal após 24 e 120 horas da sepse por meio de ensaio de citotoxicidade utilizando Tau e TauCl em diferentes concentrações (0,1 mM à 0,5 mM);
- ✓ Determinar os níveis de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-23, IL-17A, IL-6, INF- γ) e da citocina anti-inflamatória (IL-10) em sobrenadante de cultura celular de linfócitos extraídos de ratos sépticos submetidos à ligação e perfuração cecal após 24 e 120 horas da sepse.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi do tipo experimental e executado nas dependências desta Instituição nos laboratórios de Fisiopatologia Experimental, Microbiologia e Biologia Molecular, dentro das normas estabelecidas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) para pesquisas utilizando animais. O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética antes de sua execução e aprovado sob protocolo número 89/2012. Além destas referências, todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram baseados nos fundamentos constantes no Guia americano para cuidado e uso de animais de laboratório do ano de 2011.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos, da linhagem *Wistar*, com peso variando entre 350-400 g, maiores que as fêmeas que pesavam entre 250-300 g, sendo assim possível a coleta de uma quantidade maior de material biológico (sangue). Foram utilizados ratos provenientes de lotes que apresentaram tamanho uniforme, produzidos em colônias fechadas, na tentativa de se obter melhores resultados para esta pesquisa mantendo o conforto dos mesmos.

Em cada caixa foram armazenados no máximo cinco animais com comida e água *ad libitum*, mantidos em ambiente com temperatura entre 18 e 22°C e umidade relativa entre 55 e 65%, em ciclo de 12 horas claro-escuro, sendo as luzes ligadas às 7 horas da manhã, conforme rotina de trabalho do Biotério desta Instituição.

3.2 MANEJO E DESTINO DOS ANIMAIS PÓS-EXPERIMENTAÇÃO

Durante os experimentos, os animais foram manipulados por pessoas qualificadas, garantindo assim o tratamento aos mesmos de forma humanitária evitando dores e estresse desnecessários. Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados sob estrita obediência às prescrições científicas. Após a morte dos animais, os mesmos foram acondicionados em sacos identificados como “lixo infectante” e levados ao freezer de resíduos localizado no Biotério da mesma Instituição.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram realizados pelo menos cinco experimentos, entre padronização da técnica e análises propriamente ditas, sendo utilizados 140 animais ao todo. Em cada experimento, foi induzido o modelo da doença (e controle da mesma) em 28 animais, sendo 16 CLP e 12 Sham, subdivididos em grupos de 24 horas e 120 horas de sepse. Este *n* refere-se ao número de animais vivos necessários ao estudo, já descontada a taxa de mortalidade. O número de animais utilizados foi alto porque o rendimento da técnica de extração de linfócitos no sangue é baixo: a cada 3 mL de sangue coletado por animal, era obtido 1 mL de concentrado celular a ser plaqueado. Cada 1 mL desse concentrado, em média, rendeu de 5 a 10 poços.

Em todos os experimentos, os materiais biológicos utilizados foram sangue e baço. Para cada material, foram utilizadas duas placas de 96 poços para cultura celular, sendo uma para linfócitos controle e outra para linfócitos extraídos de animais com sépticos. Cada placa de 96 poços (Sham e CLP) foi redividida entre grupo tratado com TauCl nas concentrações de 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM e 0,5 mM; grupo tratado apenas com Tau nas concentrações de 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM e 0,5 mM e grupo sem tratamento.

3.4 JUSTIFICATIVA DO MÉTODO E INDUÇÃO DE SEPSE ANIMAL

Os ratos descritos acima foram submetidos ao procedimento de indução de sepse intra-abdominal severa, usando a técnica de CLP, conforme já citada em literatura por vários autores e por Wichterman et al. (1980), sendo a técnica mais adequada na indução de sepse. O modelo foi selecionado dentre indução de sepse via endotoxemia por LPS e Peritonite polimicrobiana por ser um modelo que reproduz muitos marcadores clínicos da sepse que ocorrem em humanos (Deitch, 1998).

Segundo Cauvi et al. (2012), embora este modelo animal não se assemelhe totalmente à sepse humana, há importantes características clínicas (tais como a presença de um foco necrótico por meio da ligação cecal e a presença de uma fonte de infecção polimicrobiana com o extravasamento de bactérias intestinais para o peritônio) que podem ser correlacionadas. Tais características assemelham-se muito aos sintomas observados em pacientes graves dentro de uma UTI cirúrgica.

Além disso, o critério de escolha da técnica baseou-se em dados da literatura que indicam a alta prevalência de ocorrência de sepse abdominal, resultado de sepse por CLP, como Vincent e colaboradores (2006) apontaram como sendo a segunda causa mais comum de sepse em Unidades de Terapia Intensivas Europeias.

Os animais foram anestesiados com anestésico cloridrato de cetamina (Vetaset, Zoetis[®]) na dose de 80 mg/Kg e com relaxante muscular cloridrato de xilazina (Rompum, Bayer Healthcare[®]) na dose de 20 mg/Kg de peso por meio de injeção intraperitoneal, sendo submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal logo após efeito do anestésico. O ceco foi ligado logo abaixo da junção íleo-cecal com fio seda não absorvível 3-0, mantendo-se assim a continuidade intestinal. O ceco foi perfurado com uma agulha número 14 na sua face antimesentérica e foi levemente comprimido até a extrusão de conteúdo fecal. Os planos cirúrgicos foram fechados e a recuperação dos ratos foi observada por um período de no mínimo duas horas, atentando-se aos sinais primários da infecção (Wichterman et al., 1980).

O grupo Sham (controle do estudo) foi submetido à laparotomia, com manipulação do ceco, mas sem ligação ou perfuração. Todos os cuidados foram tomados para que não houvesse contaminação cruzada entre os grupos. Tanto o grupo Sham quanto o grupo CLP receberam reposição volêmica por meio de administração subcutânea de solução salina na concentração de 0,9% (p/v) na dose de 50 mL/kg de peso imediatamente, 12 horas e 24 horas após a cirurgia, bem como antibiótico Ceftriaxona (EMS[®]) na dose de 25 mg/kg de peso.

3.5 ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS

3.5.1 Sangue

Após os tempos de 24 e 120 horas de sepse, coletou-se sangue dos animais por meio de punção cardíaca, em tubos à vácuo com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminatetracético, Vacuplast[®]). Todos os procedimentos foram realizados de forma estéril, em capela de fluxo laminar.

Segundo metodologia descrita por Borges-Osório e Robinson (2002), com adaptações, preparou-se tubos falcon contendo 3 mL de Histopaque (Sigma[®]). Paralelamente, à 3 mL de sangue foram

adicionados 3 mL de tampão salina fostato (PBS) pH 7,4, misturados e vertidos delicadamente sobre o histopaque. Os tubos foram centrifugados a 18-20°C, por 30 minutos a 400 RCF. As células vermelhas do sangue e os granulócitos formam sedimento no fundo do tubo abaixo do Histopaque, e os linfócitos, juntamente com as células mononucleares, permanecem na interface do plasma com Histopaque.

Após a centrifugação, com o auxílio de uma pipeta pasteur, removeu-se o anel intermediário formado com transferência do conteúdo a um novo tubo falcon. A este anel, adicionou-se 10 mL de PBS e o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 250 RCF. Este último passo de lavagem das células foi repetido por mais duas vezes, até descarte final do sobrenadante e concentração do *pellet* sobrando pouco mais que 100 µL (este concentrado celular foi utilizado no plaqueamento posterior).

3.5.2 Baço

Logo após a punção cardíaca e coleta do sangue, os baços dos animais foram retirados e rapidamente imersos em gelo. Por meio de adaptações da técnica descrita por Mishell e Dutton (1967), os baços foram gentilmente homogeneizados em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma[®]) e armazenados no gelo por até 5 minutos para assentamento das partículas. O sobrenadante límpido foi adicionado a falcons contendo histopaque. Os tubos foram centrifugados a 4°C, por 10 minutos a 1000 rpm. O anel intermediário foi coletado e lavagens do *pellet* com PBS e centrifugações foram realizadas até obtenção do concentrado celular final.

3.6 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS

A uma alíquota de 10 µL das suspensões celulares obtida no passo acima, foram adicionados 90 µL de PBS e 10 µL de solução corante de Azul de trypan (Vetec[®]) à 0,4%. O número de células viáveis foi determinado através de contagem em microscópio óptico utilizando uma câmara de Neubauer. O corante cora células mortas e o percentual de viabilidade, segundo Phillips (1973), foi calculado: **% viabilidade = n° células viáveis/n° células totais X100**. O percentual mínimo de viabilidade aceito para os procedimentos foi de 90%.

3.7 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A uma alíquota de 10 μL das suspensões celulares, 10 μL do corante hematológico Giemsa (Doles[®]) foram adicionados em lâmina de esfregaço e a certificação do processo de extração celular foi determinada (95% ou mais de predominância de linfócitos). Os linfócitos foram identificados como células de núcleo azul violeta e grânulos citoplasmáticos azuis (Rodger, 1993).

3.8 CULTURA DE CÉLULAS

O concentrado celular (100 μL) foi enriquecido com 20% de soro bovino fetal (SBF, Gibco[®]) e antibióticos Penicilina (100UI/mL) e Estreptomicina (100 μg /mL) (ambos Sigma[®]) adicionados à quantidade suficiente para 1000 μL de meio de cultura RPMI 1640. Ao meio completo, foi adicionado mitógeno de linfócito Concanavalina-A (Sigma[®]), a uma concentração sub-ótima de 2 μg /mL (Fazzino et al., 2010).

Para a padronização dos experimentos, as células foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços a uma densidade de $0,5 \times 10^6$ células/poço e/ou 1×10^6 células/poço mantidas em estufa incubadora a 37°C, em ambiente de 5% CO_2 , por 24, 48 ou 72 horas, sendo as melhores condições verificadas por meio de testes de viabilidade.

3.9 PREPARO DE TAURINA E CLORAMINA TAURINA

Cloraminas são produtos de reação entre ácido hipocloroso (HOCl) ou outros agentes de cloração e aminas primárias e secundárias (Thomas et al., 1986a).

3.9.1 Cloramina Taurina

Uma solução estoque a 5 mM de TauCl foi preparada por meio da mistura entre 100 mM de Taurina (Tau, Sigma[®]) e 25 mM de NaOCl (hipoclorito de sódio, Sigma[®]) em tampão PBS (pH 7,4), sempre na proporção de 4:1, a fim de se evitar a formação de subprodutos. A

formação de TauCl foi confirmada pela determinação de absorvância característica (ϵ 252 nm = 429 M⁻¹cm⁻¹). À partir do valor da densidade óptica, a concentração molar da solução foi calculada conforme método adaptado de Thomas et al. (1986b).

Segundo Gottardi e Nagl (2010), o pH da solução preparada foi ajustado para 8,0, onde TauCl está presente isoladamente, sem subprodutos. Segundo estudos de estabilidade realizados por estes autores, em pH próximo ou igual a 7,0, encontrou-se 50% de monoclorotaurinas e 50% diclorotaurinas. Diclorotaurinas sofrem decomposição rápida em pH 7,0, à 37°C, que levam à redução do potencial de oxidação da substância.

As soluções de TauCl a 1 mM, 2 mM, 3 mM e 4 mM em tampão PBS foram preparadas a partir da solução-mãe. Soluções-reserva de TauCl foram acondicionadas em geladeira, onde permanecem estáveis por um período de 1 ano (Gottardi e Nagl, 2010). Apesar da estabilidade da solução, optou-se por preparar as soluções imediatamente antes do uso *in vitro*.

3.9.2 Taurina

Para o preparo de solução-mãe de Taurina, adicionou-se à mesma em tampão PBS (pH 7,4), para concentração final de 0,5 mM. Soluções a 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 mM foram preparadas a partir solução principal.

3.10 ENSAIO DE TOXICIDADE COM TAU E TAUCL

Após o tempo de cultura celular de 24, 48 ou 72 horas, o conteúdo dos poços foi transferido a *ependorfs* estéreis para centrifugação a 300 RCF por 10 minutos. Com o intuito de concentrar o *pellet* celular, já que linfócitos são células não aderentes. À este *pellet*, 200 μ L das soluções de Tau e 20 μ L das soluções de TauCl (misturadas a mais 180 μ L de PBS pH 7,4, totalizando 200 μ L) foram adicionados no *ependorf* para ressuspensão do mesmo e transferidos às placas nos seus poços correspondentes. Optou-se por concentrar a solução de TauCl e assim adicionando um volume menor ao poço para se evitar alterações no pH celular (pH 7,8 poderia ser prejudicial à manutenção da mesma no meio). A alguns poços foram adicionados somente PBS,

como controle do estudo.

As placas foram incubadas por 1 e/ou 4 horas, à 37°C, 5% CO₂. O tempo foi definido com base em revisões de literatura que utilizam tempos entre 1 e 6 horas para os ensaios de toxicidade (Klamt e Shacter, 2005; Ogino et al., 2009).

3.11 VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT

O ensaio de viabilidade celular foi realizado conforme protocolo padrão descrito por Mosmann (1983) e adaptado por Silva (2004), que usa a respiração celular como um indicador, por meio da redução do composto MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide*, Sigma[®]) a cristais de formazan, compostos insolúveis em água.

Os sais de tetrazólio atravessam a membrana e entram para a célula onde aceitam elétrons a partir de substratos oxidados ou de determinadas enzimas. Esta reação converte os sais de MTT de cor amarela em cristais de formazan de cor violeta que se acumulam em endossomas e são posteriormente transportados para a membrana mitocondrial através de um processo de exocitose. Os referidos cristais de formazan podem ser posteriormente dissolvidos em um solvente orgânico, que permita a sua quantificação por espectrofotometria.

Uma solução-estoque de MTT em tampão PBS foi preparada a uma concentração de 500 µg/mL (Marcinkiewicz et al., 1995). Segundo Gottardi e Nagl (2010) e Thomas et al. (1986b), TauCl é altamente reativa a outros compostos, o que implica na perda do poder oxidativo. Dentre estes compostos estão os grupos tióis, grupos aromáticos, aminoácidos e amidas. Avaliando a estrutura química de todos os compostos usados nos procedimentos de ensaios de cultura e toxicidade, os mesmos apresentam íons passíveis de reatividade com TauCl, portanto, não se misturou o agente oxidante em estudo com os demais meios e soluções usados previamente e posteriormente ao uso do mesmo.

Após 1 ou 4 horas de incubação das placas com Tau e TauCl, os conteúdos dos poços foram retirados e transferidos a *ependorfs* estéreis para centrifugação a 300 RCF por 10 minutos. O sobrenadante de cada *ependorf* foi retirado e armazenado a -80°C para posterior

quantificação de citocinas. Cem (100 μL) do MTT diluído foram adicionados para ressuspensão do *pellet* celular. Esta mistura foi transferida a cada poço correspondente das placas e as mesmas foram incubadas a 37°C em meio de 5% de CO_2 por um período de 3 a 4 horas.

No final da incubação, 200 μL de DMSO (Dimetilsulfóxido, Nuclear[®]) foram adicionados em cada poço da placa para dissolução dos cristais, seguido de incubação por 10 minutos a 37°C, com agitação de 200 RCF. Ao final do processo, as placas foram lidas em espectrofotômetro (SpectraMax M3, Molecular Devices[®]) nas faixas de absorvância de 560 nm e 630 nm.

O percentual de célula viável foi calculado pela subtração dos valores de DO (densidade óptica) lidos em 560 nm pelos valores lidos em 630 nm. Valores de DOs dos grupos Tau e TauCl foram relacionados com os valores de DOs do grupo controle, que é considerado como 100%. A relação é representada em percentual, indicando a viabilidade celular referente a cada tratamento.

3.12 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Níveis de citocinas foram mensurados com a utilização de kits comerciais (Peprotech[®] e Life Technologies[®]) por meio dos sobrenadantes de cultura celular coletados após o ensaio de citotoxicidade com TauCl. Considerando que era de grande interesse estudar particularmente o impacto de uma cloramina na viabilidade celular, optou-se por utilizar amostras de TauCl, na dose menor (0,1mM) e maior (0,5mM).

Placas de 96 poços (Corning[®]) foram sensibilizadas com 100 μL de anticorpo monoclonal anti-rato IL-17A, IL-23, IL-10, TNF- α , IL-6 e IFN- γ (anticorpos de captura) e incubadas *overnight* (a 4°C). Após este período, os poços foram lavados por 3 vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween 20 (Sigma[®]) em PBS pH 7,2). Posteriormente as placas foram bloqueadas com 200 μL de solução de bloqueio (1% de BSA (albumina sérica bovina, Sigma[®]) em PBS pH 7,2 e incubadas por 4 horas em temperatura ambiente, a fim de evitar ligações inespecíficas. Após o término da incubação, os poços foram novamente lavados conforme anteriormente descritos.

Após as lavagens, 100 μL de amostras e/ou padrões diluídos previamente em solução padrão de diluição (0,05% de Tween 20; 0,1%

de BSA em PBS pH 7,2) foram adicionados aos poços. As placas foram cobertas e novamente incubadas *overnight* (a 4°C). Após este período, os poços foram lavados e adicionados 100 µL dos anticorpos de detecção anti-rato biotinizados IL-17A, IL-23, IL-10, TNF- α , IL-6 e IFN- γ , previamente diluídos em solução padrão de diluição. As placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados e após o processo de lavagem, 100 µL do polímero esptreptavidina peroxidase (1:250, Sigma[®]) foram adicionados aos poços, sendo as placas cobertas por papel alumínio e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente.

Após a incubação, os poços foram lavados por 5 vezes com o tampão de lavagem e 100 µL da solução substrato TMB (3,3',5,5'-*tetrametilbenzidina*, Sigma[®]) foram adicionados, seguido de incubação por mais 30 minutos em temperatura ambiente, evitando contato direto com a luz. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de solução de ácido clorídrico 2N (HCl, Vetec[®]) sobre os poços, reação esta caracterizada por mudança de coloração azulada para amarelada. Imediatamente após, as placas foram lidas em espectrofotômetro utilizando filtro de 450 nm.

3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises de viabilidade celular (ensaio de MTT), os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e o $p < 0.05$ foi considerado significativo, submetidos à análise de ANOVA multifatorial (relacionando variável categórica (grupo) e variáveis quantitativas (tratamento *versus* dose *versus* tempo), para baço e sangue).

Os dados de quantificação de citocinas foram submetidos ao teste de ANOVA de duas vias, seguido de *post hoc* Tukey, para a múltipla comparação entre as médias dos grupos avaliados, sendo valor de $p < 0,05$ considerado significativo. Os *softwares* utilizados foram IBM SPSS Statistics 20 e GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

Quatro parâmetros foram avaliados nos testes de padronização. Os ensaios piloto realizados anteriormente aos procedimentos a que se chegaram os resultados finais tiveram como objetivo definir o melhor tempo de cultura para os linfócitos de sangue e de baço que foi o de 24 horas de incubação para ambos. Comparados aos testes com incubação de 48 horas e 72 horas das placas, os linfócitos de ratos sépticos, por estarem muito sensibilizados em decorrência do intenso processo inflamatório causado pela indução do modelo de CLP, tiveram viabilidade diminuída nestes 2 tempos (ensaio de MTT, dados não mostrados). Optou-se por 24 horas, pelo fato de se ter o cuidado de não inferir resultados na diminuição da viabilidade celular que não fosse somente pelo tratamento dos agentes estudados (Tau e TauCl).

O esgotamento de nutrientes do meio de cultura, bem como alterações do seu pH são itens críticos para a manutenção da viabilidade celular, podendo ser estes um dos motivos da diminuição da mesma nos tempos de 48 e 72 horas de incubação. Duas concentrações celulares de linfócitos foram testadas: $0,5 \times 10^6$ células/mL e 1×10^6 células/mL, baseadas em dados da literatura (Park et al., 2002). Optou-se pela escolha da segunda concentração celular para que o nível de citocinas secretadas no sobrenadante coletado fosse o suficientemente adequado para ser dosado pelos kits.

Quanto ao tempo do ensaio de citotoxicidade, optou-se por 1 hora como o mais adequado. Com o tempo de 4 horas, verificou-se que as células, por estarem em solução de Tau e TauCl diluídas em PBS, poderiam ter a sua viabilidade muito diminuída, influenciando assim nos resultados (dados não mostrados). Meio de cultura completo não foi utilizado no ensaio devido à alta capacidade reativa de TauCl frente à vários compostos, o que diminuiria seu poder oxidativo. Citam-se alguns destes compostos segundo Gottardi e Nagl (2010): grupos tióis, compostos aromáticos, aminoácidos, algumas amidas e álcoois. Ogino e colaboradores (2009), demonstraram em trabalho realizado com células Jurkat e tratamento com TauCl que a mesma possui um tempo de meia vida relativamente curto, de 75 minutos. Subprodutos de TauCl como as diclorotaurinas, formadas em solução de pH abaixo de 8,0 (Gottardi e Nagl, 2010) possuem um tempo de meia vida de 6 minutos (Ogino et al.,

2009). Diante disto, tomou-se o cuidado de preparar as soluções de estudo em pH adequado, como relatado na literatura. Por fim, o último parâmetro avaliado foi o tempo de ensaio com MTT. Optou-se pelo tempo de 3 horas, tempo suficiente para as células viáveis metabolizarem o composto a cristais de formazan, visíveis a olho nu.

4.2 VIABILIDADE CELULAR

Os dados tratados nas análises estatísticas referem-se ao percentual de viabilidade do grupo CLP em relação ao grupo Sham, já descontado o controle total (100%). Na Figura 1, é possível notar que a viabilidade de células sanguíneas no tempo de sepse de 24 horas foi menor no grupo CLP do que no grupo Sham, tanto no tratamento com Tau (exceto pelas concentrações de 0,1 mM e 0,4 mM) quanto no tratamento com TauCl (exceto pelas concentrações de 0,1 mM, 0,3 mM e 0,4 mM). Comparando o grupo CLP com o grupo Sham, no tratamento com Tau obteve-se diferença significativa em 3 doses: 0,2 mM ($p=0,006$), 0,3 mM ($p=0,028$) e 0,5mM ($p=0,0001$). Já com TauCl, obteve-se diferença significativa em duas delas: 0,2 mM ($p=0,029$) e 0,5 mM ($p=0,029$). Comparando a viabilidade dos dois tratamentos na dose máxima, tem-se 30,42% de viabilidade com Tau contra 22,20% .

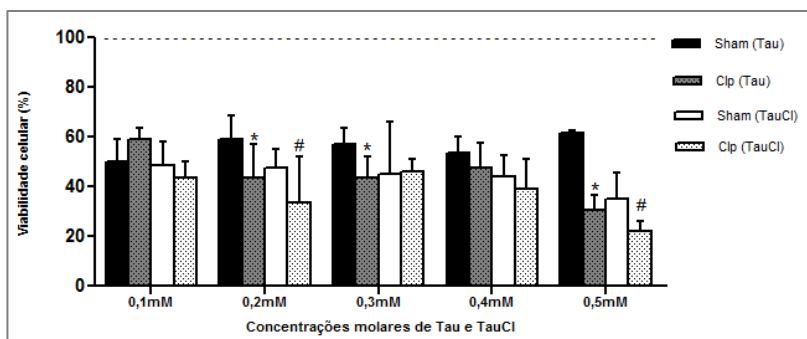


Figura 1 – Viabilidade celular de linfócitos sanguíneos tratados *in vitro* com Tau e TauCl em diferentes concentrações molares (0,1mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM e 0,5 mM). Animais foram submetidos a Sham e CLP e sangue coletado por punção cardíaca 24 horas após a indução. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$ por grupo). * diferente de Sham (Tau); # diferente de Sham (TauCl), todos com valor de $p<0,05$. Linha pontilhada refere-se ao controle (100%).

Já na Figura 2, que mostra a viabilidade celular no tempo de sepse de 120 horas, células sanguíneas do grupo CLP apresentaram viabilidade menor do que células do grupo Sham. Comparando o grupo CLP com o grupo Sham, no tratamento com Tau obteve-se diferença significativa em 2 doses: 0,1 mM ($p=0,019$) e 0,5mM ($p=0,002$). Com TauCl, obteve-se diferença significativa em quatro delas: 0,2 mM ($p=0,028$), 0,3 mM ($p=0,012$), 0,4 mM ($p=0,001$) e 0,5 mM ($p=0,0001$). No grupo CLP exposto à TauCl, percebe-se um comportamento bastante linear, mostrando que a sensibilidade da célula frente ao agente é proporcional ao aumento da concentração do mesmo. Comparando a viabilidade dos dois tratamentos na dose máxima, tem-se 38,25% de viabilidade com Tau contra 23,49% de viabilidade com TauCl, mostrando a sensibilidade celular de um linfócito séptico superior com a cloramina, mais evidente no tempo de 120 horas de sepse.

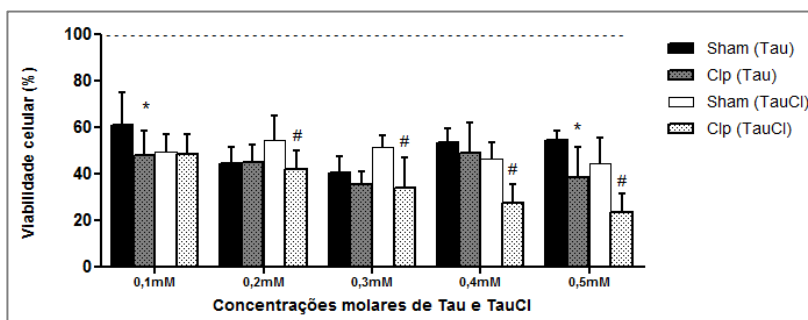


Figura 2 – Viabilidade celular de linfócitos sanguíneos tratados *in vitro* com Tau e TauCl em diferentes concentrações molares (0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM e 0,5 mM). Animais foram submetidos a Sham e CLP e sangue coletado por punção cardíaca 120 horas após a indução. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). * diferente de Sham (Tau); # diferente de Sham (TauCl), todos com valor de $p<0,05$. Linha pontilhada refere-se ao controle (100%).

Na Figura 3, é possível notar que a viabilidade de células esplênicas no tempo de sepse de 24 horas foi menor no grupo CLP do que no grupo Sham com maior destaque para o grupo tratado com TauCl (exceto pela concentração mais baixa). Já no tratamento com Tau, isso não aconteceu, exceto na dose de 0,5 mM, cuja diferença foi significativa ($p=0,002$). Comparativamente às células sanguíneas, uma

dose maior de Tau foi necessária para a diminuição da viabilidade celular no baço.

Já com TauCl, obteve-se diferença significativa na dose de 0,4 mM ($p=0,037$), sendo assim, células do grupo CLP mostraram-se mais sensíveis do que as células Sham. Em comparação às células sanguíneas no mesmo tempo de 24 horas de sepse, linfócitos de ratos sépicos (tanto os tratados com Tau quanto os tratados com TauCl), mostraram-se mais sensíveis no sangue do que no baço. Comparando a viabilidade dos dois tratamentos na dose máxima, tem-se 30,46% de viabilidade com Tau contra 29,45% de viabilidade com TauCl, mostrando que o comportamento de um linfócito esplênico frente aos dois agentes é bastante semelhante.

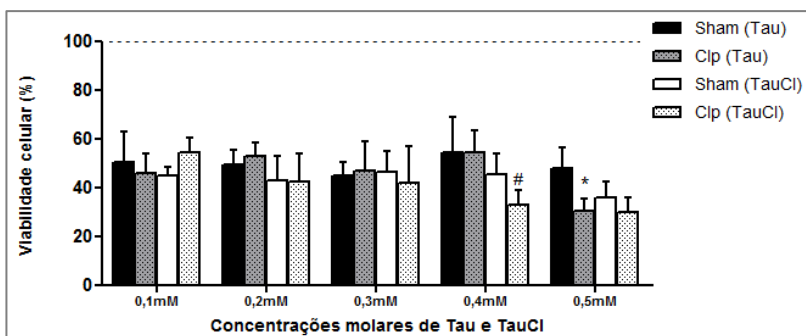


Figura 3 – Viabilidade celular de linfócitos esplênicos tratados *in vitro* com Tau e TauCl em diferentes concentrações molares (0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM e 0,5 mM). Animais foram submetidos a Sham e CLP e baço coletado 24 horas após a indução. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$ por grupo). * diferente de Sham (Tau); # diferente de Sham (TauCl), todos com valor de $p<0,05$. Linha pontilhada refere-se ao controle (100%).

Já na Figura 4, é possível observar uma diminuição na viabilidade celular no tempo de sepse de 120 horas, tanto quando tratados com Tau quando tratados com TauCl. Comparando o grupo CLP com o grupo Sham, no tratamento com Tau obteve-se diferença significativa apenas da dose de 0,3 mM ($p=0,010$). Com TauCl, obteve-se diferença em três delas: 0,2 mM ($p=0,001$), 0,3 mM ($p=0,047$) e 0,4 mM ($p=0,048$). Comparativamente ao tempo de 24 horas, a viabilidade de linfócitos esplênicos, de um modo geral, foi menor no tempo de 120

horas, principalmente os tratados com TauCl, que apresentaram este comportamento em todas as doses.

Confrontando a viabilidade dos dois tratamentos na dose máxima, tem-se 35,28% de viabilidade com Tau contra 26,85% de viabilidade com TauCl, mostrando a sensibilidade celular de um linfócito séptico esplênico superior com a cloramina, mais evidente no tempo de 120 horas de sepse, fato este que não aconteceu em 24 horas. Quando se compara baço e sangue no mesmo tempo de 120 horas, de um modo geral, as células apresentaram viabilidade menor no baço.

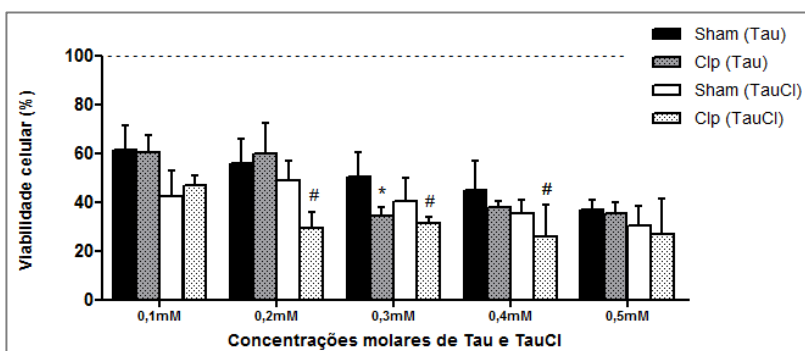


Figura 4 – Viabilidade celular de linfócitos esplênicos tratados *in vitro* com Tau e TauCl em diferentes concentrações molares (0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM e 0,5 mM). Animais foram submetidos a Sham e CLP e baço coletado 120 horas após a indução. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). * diferente de Sham (Tau); # diferente de Sham (TauCl), todos com valor de $p < 0,05$. Linha pontilhada refere-se ao controle (100%).

4.3 PERFIS DE CITOCINAS

Para as análises de quantificação de citocinas, em todas elas, optou-se por restringir as comparações somente entre as culturas de linfócitos de sangue e baço, em ambos os tempos (24 e 120 horas), incubadas com TauCl nas doses menor (0,1 mM) e maior (0,5 mM) e não incubadas (grupo controle). Não foi investigado o efeito de Tau, visto que na literatura já é bastante descrito que Tau não é capaz de influenciar a produção destes mediadores (Olszanecki e Marcinkiewicz, 2004; Marcinkiewicz et al., 2005).

Seis citocinas foram avaliadas: as secretadas por linfócitos T_{H17} (IL-17A e IL-23), as secretadas por linfócitos T_{H1} (INF- γ e TNF- α) e as secretadas por linfócitos T_{H2} (IL-6 e IL-10). Optou-se por estudar pelo menos duas citocinas de cada subpopulação de linfócito, na tentativa de se estabelecer um mecanismo entre a ação oxidativa da cloramina e o fenótipo de linfócito mais afetado.

Na figura 5A (grupo controle), não houve diferença significativa entre a secreção dos grupos CLP e Sham. Já em 120 horas, linfócitos de ratos sépticos (grupo controle) tem a tendência de secretar menos IL-17A quando comparado ao Sham, fase anti-inflamatória. Células sépticas incubadas com TauCl apresentaram secreção diminuída da interleucina quando comparadas ao grupo Sham correspondente, em um perfil dose-dependente.

Na figura 5B, linfócitos esplênicos sépticos não tratados em 24 horas apresentaram um pico de secreção significativo em relação ao Sham, o que era esperado; já a redução na secreção, aguardada em 120 horas não aconteceu. De modo semelhante ao sangue, a viabilidade frente ao tratamento com a cloramina foi dose-dependente.

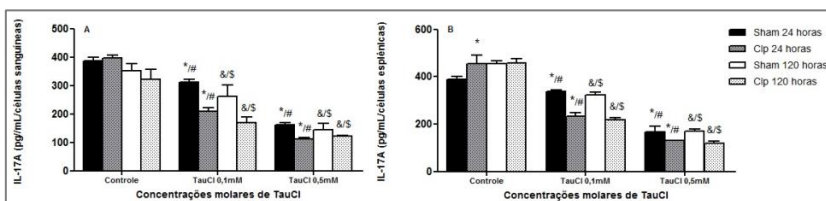


Figura 5 – Níveis de IL-17A pg/mL/células sanguíneas (A) e de IL-17A pg/mL/células esplênicas (B) em sobrenadante de cultura celular estimulada com Concanavalina-A e TauCl nas concentrações molares de 0,1mM e 0,5mM. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *diferente de Sham Controle 24 horas; # diferente de CLP Controle 24 horas; & diferente de Sham Controle 120 horas; \$ diferente de CLP Controle 120 horas; todos com valor de $p < 0,05$.

IL-23, uma citocina pró-inflamatória secretada por linfócitos T_{H17} , também apresentou sua secreção alterada pelo efeito de TauCl, quando comparada às células que não receberam tratamento, de maneira dose-dependente. Células sépticas controle (Figura 6A)

apresentaram maior secreção da interleucina em 24 horas do que 120 horas (Figura 6B) quando comparadas às células do grupo Sham.

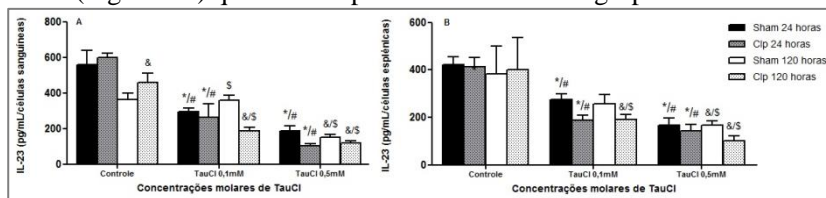


Figura 6 – Níveis de IL-23 pg/mL/células sanguíneas (A) e de IL-23 pg/mL/células esplênicas (B) em sobrenadante de cultura celular estimulada com Concanavalina-A e TauCl nas concentrações molares de 0,1mM e 0,5mM. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *diferente de Sham Controle 24 horas; # diferente de CLP Controle 24 horas; & diferente de Sham Controle 120 horas; \$ diferente de CLP Controle 120 horas; todos com valor de $p < 0,05$.

As citocinas de linfócitos T_H1 avaliadas apresentaram um perfil de secreção bastante semelhante ao perfil de secreção de citocinas de linfócitos T_H17 . Tanto IFN- γ (Figura 7A e B) quanto TNF- α (Figura 8A e B), também apresentaram secreção diminuída por linfócitos de ratos sépticos em relação aos linfócitos do grupo Sham quando tratados com TauCl, de maneira dose-dependente. A figura 7B mostra, em 24 horas, que linfócitos esplênicos de ratos sépticos apresentaram secreção reduzida de IFN- γ e de modo significativo.

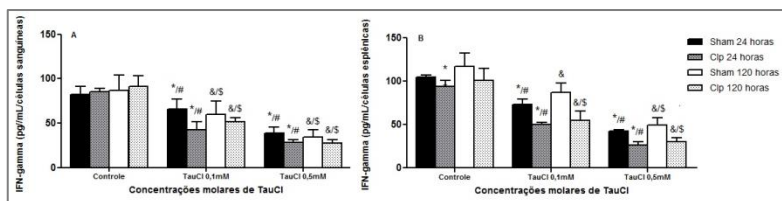


Figura 7 – Níveis de IFN- γ pg/mL/células sanguíneas (A) e de IFN- γ pg/mL/células esplênicas (B) em sobrenadante de cultura celular estimulada com Concanavalina-A e TauCl nas concentrações molares de 0,1mM e 0,5mM. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *diferente de Sham Controle 24 horas; # diferente de CLP Controle 24 horas; & diferente de Sham Controle 120 horas; \$ diferente de CLP Controle 120 horas; todos com valor de $p < 0,05$.

Como esperado (Figura 8A), linfócitos de ratos sépticos não tratados apresentaram um pico significativo de secreção de TNF- α em 24 horas quando comparados aos linfócitos do grupo Sham, evidenciando o papel desta interleucina na fase inflamatória da doença. Diferentemente, linfócitos esplênicos sépticos (Figura 8B), secretaram menores níveis da citocina tanto em 24 horas quanto em 120 horas, sem diferença estatística.

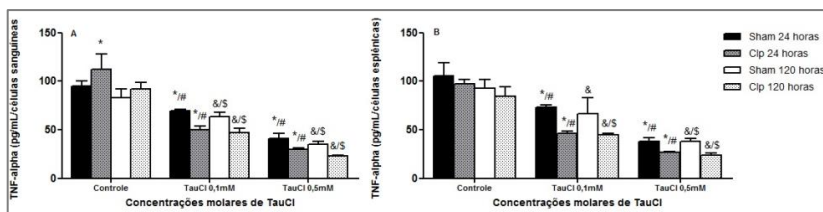


Figura 8 – Níveis de TNF- α pg/mL/células sanguíneas (A) e de TNF- α pg/mL/células esplênicas (B) em sobrenadante de cultura celular estimulada com Concanavalina-A e TauCl nas concentrações molares de 0,1mM e 0,5mM. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *diferente de Sham Controle 24 horas; # diferente de CLP Controle 24 horas; & diferente de Sham Controle 120 horas; \$ diferente de CLP Controle 120 horas; todos com valor de $p < 0,05$.

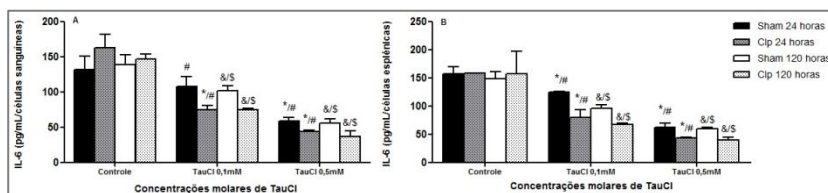


Figura 9 – Níveis de IL-6 pg/mL/células sanguíneas (A) e de IL-6 pg/mL/células esplênicas (B) em sobrenadante de cultura celular estimulada com Concanavalina-A e TauCl nas concentrações molares de 0,1mM e 0,5mM. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *diferente de Sham Controle 24 horas; # diferente de CLP Controle 24 horas; & diferente de Sham Controle 120 horas; \$ diferente de CLP Controle 120 horas; todos com valor de $p < 0,05$.

A resposta de linfócitos T_H2 frente ao agente TauCl foi avaliada por meio da determinação dos níveis de IL-6 e IL-10. Assim como TNF- α , IL-6 já é bastante descrita na literatura por ser fundamental no processo séptico, principalmente quando se observa na Figura 9A secreção aumentada em relação à Sham em 24 horas. De um modo geral, TauCl, de maneira dose-dependente age na função linfocitária por meio de decréscimo nos níveis deste mediador.

Por fim, avaliaram-se os níveis de IL-10, importante mediador anti-inflamatório envolvido na regulação do quadro de exacerbação inflamatória inicial da sepse. Observando a Figura 10A, IL-10 apresentou uma pequena tendência em 120 horas no grupo não tratado (não significativo), período este conhecido notadamente por ser fase anti-inflamatória. Intrigantemente, o mesmo não aconteceu com baço (Figura 10B), porém, de um modo geral, TauCl reduziu a secreção desta interleucina, de modo dose-dependente.

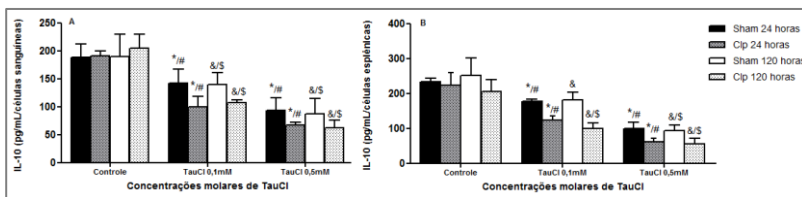


Figura 10 – Níveis de IL-10 pg/mL/células sanguíneas (A) e de IL-10 pg/mL/células esplênicas (B) em sobrenadante de cultura celular estimulada com Concanavalina-A e TauCl nas concentrações molares de 0,1mM e 0,5mM. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *diferente de Sham Controle 24 horas; # diferente de CLP Controle 24 horas; & diferente de Sham Controle 120 horas; \$ diferente de CLP Controle 120 horas; todos com valor de $p < 0,05$.

Resumidamente, tem-se:

Tabela 1 – Quadro resumido e comparativo de Viabilidade celular de linfócitos tratados com Tau (taurina) e/ou TauCl (cloramina taurina). ↓ viabilidade menor de linfócitos CLP do que linfócitos Sham; ↑ viabilidade maior de linfócitos CLP do que linfócitos Sham; = viabilidade igual entre CLP e Sham.

Viabilidade Celular	Tratamentos				
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5 mM
Baço 24 horas		mM	mM	mM	
Tau	=	=	=	=	↓
TauCl	=	=	=	↓	=
Baço 120 horas					
Tau	=	=	↓	=	=
TauCl	=	↓	↓	↓	=
Sangue 24 horas					
Tau	=	↓	↓	=	↓
TauCl	=	↓	=	=	↓
Sangue 120 horas					
Tau	↓	=	=	=	↓
TauCl	=	↓	↓	↓	↓

Tabela 2 – Quadro resumido e comparativo de secreção de citocinas por linfócitos não tratados e tratados com TauCl nas concentrações molares de 0,1 mM e 0,5 mM. ↓ secreção menor por linfócitos CLP do que por linfócitos Sham avaliados no mesmo tempo; ↑ secreção maior por linfócitos CLP do que por linfócitos Sham avaliados no mesmo tempo; = secreção igual entre CLP e Sham.

<u>TNF-α Sangue</u> <u>(T_H1)</u>	Controle	0,1 mM	0,5 mM
24 horas	↑	↓	↓
120 horas	=	↓	↓
<u>TNF-α Baço</u>			
24 horas	=	↓	↓
120 horas	=	↓	↓
<u>IFN-γ Sangue</u> <u>(T_H1)</u>			
24 horas	=	↓	↓
120 horas	=	↓	↓
<u>IFN-γ Baço</u>			
24 horas	↓	↓	↓
120 horas	=	↓	↓
<u>IL-6 Sangue (T_H2)</u>			
24 horas	=	↓	↓
120 horas	=	↓	↓
<u>IL-6 Baço</u>			
24 horas	=	↓	↓
120 horas	=	↓	↓
<u>IL-10 Sangue</u> <u>(T_H2)</u>			
24 horas	=	↓	↓
120 horas	=	↓	↓
<u>IL-10 Baço</u>			
24 horas	=	↓	↓
120 horas	=	↓	↓
<u>IL-17A Sangue</u> <u>(T_H17)</u>			

24 horas	=	↓	↓
120 horas	=	↓	↓
<u>IL-17A Baco</u>			
24 horas	↑	↓	↓
120 horas	=	↓	↓
<u>IL-23 Sanguie (T_H17)</u>			
24 horas	=	↓	↓
120 horas	↑	↓	↓
<u>IL-23 Baco</u>			
24 horas	=	↓	↓
120 horas	=	↓	↓

5 DISCUSSÃO

Com a liberação de um grande conteúdo de proteínas “agressoras” e a geração de metabólitos reativos, PMNs contribuem para a defesa do hospedeiro frente a patógenos, para a regulação do processo inflamatório e lesão tecidual, sendo a MPO uma destas principais proteínas (Klebanoff, 2005). Apesar de os PMNs estarem, sobretudo mais relacionados à imunidade inata devido à habilidade de os mesmos em fagocitar bactérias, eles também podem estar co-localizados com células T nos sítios de infecções persistentes, inflamações crônicas ou tumores. Há muitas evidências de mútuas interações entre neutrófilos e células T (Müller et al., 2009).

PMNs contribuem para o recrutamento e ativação celular, apresentação de antígenos e supressão de funções de células T (Wong e Pamer, 2003; Wagner et al., 2008). A formação de TauCl dentro de PMNs é possível após a permeabilização mediada por EROs de grânulos azurófilos para o citosol, podendo ocorrer durante a apoptose celular induzida por bactérias (Blomgran et al., 2007; Kanayama e Miyamoto, 2010). Durante a ativação de PMNs, uma parte substancial de MPO pode ser liberada para o meio extracelular e esta externalização da enzima é capaz de promover ligação a diferentes alvos, podendo afetar estes alvos com seus produtos de reação (Arnhold e Flemmig, 2010).

Diante disto, como os linfócitos também estão presentes no sítio de inflamação da sepse onde os mesmos têm contato com neutrófilos e macrófagos, pensou-se na hipótese de que TauCl, bem como Tau, pudessem influenciar na viabilidade deste tipo celular, bem como regular funções de secreção de citocinas, fundamentais para complementação do processo inflamatório.

Em linfomas de células B, TauCl é conhecida por induzir apoptose em altas concentrações exógenas, de 500 μM (Klamt e Shacter, 2005) e possuir baixa habilidade em penetrar membranas biológicas, por ser uma molécula hidrofílica (Grisham et al., 1984). Todavia, a desestabilização dos grânulos azurofílicos nos PMNs propicia condições para a geração intracelular deste oxidante (Kanayama e Miyamoto, 2010).

Nos resultados do presente trabalho em que se verificou a viabilidade celular de linfócitos sanguíneos e esplênicos frente à sensibilização com Tau e TauCl, pôde-se observar que ambos os agentes são capazes de sensibilizar as células sépticas em relação às células

controle (Sham). Taurina é descrita na literatura como sendo protetora (Schuller-Levis e Park, 2004). Porém, assim como em trabalho realizado por Erdamar e colaboradores (2007) que demonstrou que níveis de Tau estavam reduzidos após indução de endotoxemia em PMNs, os resultados deste presente estudo mostram que Tau não foi capaz de proteger células sépticas da viabilidade reduzida (em algumas doses), corroborando também com estudos de Gaut et al. (2002).

Muitos estudos demonstraram que Tau exógena possui propriedades anti-inflamatórias expressivas em vários modelos de inflamação *in vivo* e *in vitro* (Marcinkiewicz et al., 1999; Egan et al., 2001). Efeitos *in vitro* podem diferir dos efeitos *in vivo*, dependendo da dose (Erdamar et al., 2007). Além disso, Tau é utilizada apenas por células que contenham enzimas peroxidases, não sendo o caso de linfócitos, acreditando-se assim na influência deste fato na ausência de achado de um efeito protetor de Tau neste presente trabalho.

A homeostase intracelular de Tau aparenta ser mantida via ação de um transportador específico expresso na membrana plasmática de células (Rozen et al., 1979). Previamente, foi relatada que a capacidade de transporte de Tau é inversamente proporcional à sua administração (Tappaz, 2004), semelhante ao demonstrado por Tomi e colaboradores (2007), em que os níveis celulares de Tau decresceram após pré-tratamento com excesso do aminoácido sob condições hipertônicas. Recentemente, Koo et al. (2012) relataram em um estudo que o transportador de Tau sofre um comprometimento funcional por ativação de NO através da ação específica de íon superóxido. Isto suporta a ideia de que o processo de estresse oxidativo, exaustivamente relatado na literatura como componente da fisiopatologia da sepse, pode comprometer a ação protetora intracelular de Tau, aqui demonstrada pela mesma não ter sido capaz de aumentar a viabilidade celular quando comparada ao tratamento nas mesmas condições experimentais com TauCl, como era esperado.

Há uma série de evidências indicando o potencial oxidativo deste agente: em estudo de Klamt e Shacter (2005), células de linfoma de Burkitt foram expostas a TauCl por 6 horas, resultando em 50-60% de morte celular por apoptose. Outros resultados deste mesmo trabalho sugerem que a apoptose induzida pela cloramina é dependente de uma taxa de oxidação intracelular ativada por uma via de morte celular mitocondrial. Estudo conduzido por Emerson et al. (2005) mostrou que TauCl induz apoptose em células B por meio de caspase-9 e Bax. TauCl

é capaz de inibir a osteoclastogênese e a proliferação de linfócitos esplênicos em modelo animal de artrite induzida por colágeno, também de maneira dose-dependente, além de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios (Wang et al., 2011). Apesar de ser componente do sistema imune inato, TauCl exerce forte atividade microbicida mas em excesso produz dano tecidual (Thomas et al., 1995; Henderson et al., 2001).

No presente estudo, TauCl diminuiu a viabilidade de linfócitos de ratos sépticos, tanto de fonte sanguínea quanto de baço e de uma maneira dose-dependente (ficando isso bem claro no tempo de 120 horas). De um modo geral, relacionando todas as concentrações em tempos iguais, em 24 horas linfócitos esplênicos mostraram-se mais viáveis quando comparados aos sanguíneos; já em 120 horas, linfócitos esplênicos mostraram-se menos viáveis. Uma hipótese para a explicação do que aconteceu aos linfócitos esplênicos no tempo de 24 horas é o de envolvimento de vias colinérgicas no reestabelecimento da proteção esplênica, por meio de ação imunoprotetora de agonistas desta via (Peña et al., 2011).

A estimulação do nervo vago pode prevenir a inflamação sistêmica e proteger contra a sepse experimental (Borovikova et al., 2000; Tracey, 2010). O potencial anti-inflamatório do nervo vago é mediado por receptor nicotínico alfa-7 de acetilcolina, cujos agonistas incluem acetilcolina, nicotina ou colina, que inibem a produção de citocinas em esplenócitos via NF- κ B (Wang et al., 2004).

O baço está envolvido na regulação do volume de fluidos, resposta imune e hematopoiese e exibiu, em estudo conduzido por Semaeva e colaboradores (2010), uma microvasculatura permeável após a exposição ao LPS. Tem sido demonstrado que a linfa de ratos possui uma concentração proteica um pouco mais baixa que o plasma sanguíneo (Kaufman e Deng, 1993), suportando a ideia que vasos sanguíneos esplênicos são descontínuos e não seletivos às macromoléculas (Mebius e Kraal, 2005). O baço possui um papel na imunidade inata, assim como na adaptativa (Carsetti et al., 2004), ligado à células dendríticas que amadurecem e se diferenciam no microambiente esplênico (Tang et al., 2006; Tan e O'Neill, 2007).

Semaeva et al. (2010) postularam que seria possível desvendar mecanismos de sinalização intracelular que ocorrem no fluido que circula pelas células linfoides por meio de estudo da secreção de citocinas e quimiocinas na linfa e chegaram à conclusão de que é

significativo o efluxo de linfócitos na linfa e que o baço produz quantidades significativas de agente pró e anti-inflamatórios que são secretados em geral na circulação durante uma inflamação induzida por LPS, o que mostra a importância deste órgão na reação do sistema imune.

Para explicar a viabilidade menor no baço do que no sangue em 120 horas, a hipótese apresentada por Wherry (2011) em que as células T sofrem exaustão, mecanismo este mediado por citocinas imunoregulatórias solúveis como IL-10, proteínas de morte celular programada como PD-1 e células T regulatórias (T_{REG}) pode ser adequada. Concomitante a isso, também ocorre o decréscimo da expressão de receptor para IL-7, importante citocina que promove viabilidade, tráfico e funcionalidade às células T, auxiliando na sobrevivência na sepse (Unsinger et al., 2010). Mecanismos supressivos agem mais em baço que sangue (Schwandt et al., 2012). Cohen (2002), Hotchkiss e Karl (2003) e Hotchkiss et al. (2009) afirmam que o baço é um órgão fundamentalmente afetado durante a sepse bacteriana.

Estudos recentes têm sugerido que uma série de subpopulações linfocitárias como células T $CD4^+CD25^+$ regulatórias, NK e $CD8^+$ podem ter a habilidade de suprimir ativamente a resposta imune adaptativa e também pode ser um importante componente da disfunção imune no quadro séptico (Sonoda et al., 1999; Zedler et al., 1999; Shevach, 2002). O aumento na percentagem de células T_{REG} pode exercer um papel na resposta proliferativa diminuída em pacientes após choque séptico (Venet et al., 2009). Células T_{REG} têm demonstrado ser capazes de manter a tolerância imune periférica por meio de mecanismos para controlar a imunidade mediada por células e prevenir o desenvolvimento de dano tecidual induzido por excessiva resposta imune (Xu et al., 2008). Mecanismos estes como produção de IL-10 e fator de crescimento transformador β (TGF- β) (Weiner, 2001; Levings e Roncarolo, 2005); além disso, células T_{REG} podem suprimir a proliferação e função de células dendríticas e células B, atuando no controle de ambas as respostas inata e adaptativa (Jonuleit et al., 2001).

Villa e colaboradores (2002) mostraram previamente em seu estudo um decréscimo relevante nos níveis de defesas antioxidante como a glutatona (GSH) no quadro séptico, o que poderia suportar a ideia de que a viabilidade celular alterada na sepse é mediada por vários mecanismos.

Tipicamente, funções são perdidas, notadamente a habilidade em produzir TNF- α ou IFN- γ , além de beta-quimiocinas ou a capacidade de degranulação (Moskophidis et al., 1993). Em uma resposta de célula T frente a uma infecção, algumas se tornam terminalmente diferenciadas e perdem a capacidade proliferativa (Wherry, 2011).

Os linfócitos de pacientes no estágio de imunoparalisia da sepse, quando estimulados *in vitro* com LPS, expressam uma quantidade menor de citocinas pró-inflamatórias do que os linfócitos de indivíduos saudáveis (Russel, 2006), o que, de maneira geral, pôde-se observar nas citocinas aqui avaliadas. Além disso, Muenzer e colaboradores (2010), afirmaram que o estágio de imunoparalisia inicia aos 4 dias, seguido de uma reconstituição parcial do sistema imune após 7 dias de indução de sepse por CLP, o que corrobora com o presente estudo que indica que o tempo de 120 horas (equivalente a 5 dias) ainda é crítico na manutenção da viabilidade celular, por este tempo estar compreendido na fase imunoresponsiva.

TauCl, assim como TauBr, possuem um papel na regulação da inflamação (Gaut et al., 2001; Olszanecki e Marcinkiewicz, 2004; Marcinkiewicz et al., 2005; Tokunaga et al., 2007). Tanto Tau quanto as holoaminas, exercem propriedades anti-inflamatórias por supressão de mediadores como NO, prostaglandinas, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12 e quimiocinas, tanto em leucócitos humanos como de roedores (Park et al., 1997; Kontny et al., 2007). Chorazy e colaboradores (2002) também demonstraram que TauCl modula a produção de citocinas por células mononucleares periféricas sanguíneas humanas e que Tau não demonstrou possuir o mesmo efeito. Kim et al. (1996) também relatou que Tau não possui o mesmo efeito inibitório de TauCl.

TauCl suprimiu significativamente a proliferação de linfócitos e inibiu a produção de IL-6, IL-8 e IL-12 em leucócitos não-aderentes ativadas com fitohemaglutinina (PHA); já em leucócitos aderentes ativados com LPS, foi possível de observar que houve decréscimo na produção de IL-1 β , IL-6 e IL-8, demonstrando assim a habilidade de TauCl em modular a resposta imune (Park et al., 2002). Barua e colaboradores (2001) demonstraram em macrófagos alveolares de ratos que TauCl inibiu a produção de NO e TNF- α e a expressão de iNOs, mecanismos estes que, em parte, envolvem a inibição da ativação de NF- κ B.

A estimulação provocada pelo LPS resulta em secreção linfática específica de IL-6 que foi refletida nos níveis séricos sistêmicos,

enquanto que os níveis de IL-6 séricos foram fortemente atenuados em animais que sofreram esplenectomia (Semaeva et al., 2010). Comparativamente aos resultados deste estudo, os níveis de IL-6 no sangue no grupo sepse foram menores que os detectados no baço, principalmente quando as células foram incubadas com TauCl na maior dose. Isto poderia ser explicado, pelo menos em parte, pelo baço possuir um fluxo sanguíneo bastante alto (Kaufman e Deng, 1993; Chen e Kaufman, 1996) e o nível de citocinas detectado ser maior.

TNF- α e IL-1 β , citocinas proximais, aparentam mediar a maioria dos distúrbios fisiológicos que ocorrem na sepse. Já IL-6 e IL-8, intensificam e perpetuam a resposta inflamatória e podem ter um papel no reparo tecidual. IL-6 é um mediador pleiotrópico distal cujas ações incluem modulação na função de linfócitos, ativação da coagulação e indução na síntese de proteínas de fase aguda (Blackwell e Christman, 1996). Interessantemente, ainda segundo Blackwell e Christman (1996), IL-6 pode *down* regular a produção de TNF- α e IL-1 β , o que pode ser bastante importante na limitação da reação inflamatória. A inibição de TNF- α está usualmente associada com o aumento na susceptibilidade à infecção (Kee et al., 1997). O decréscimo dos níveis de IL-6 pela ação de TauCl pode comprometer o recrutamento celular para o foco infeccioso, diminuindo a resposta do hospedeiro.

In vitro, IL-10 pode inibir a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Marchant et al., 1994). A atividade anti-inflamatória de IL-10 conhecida como supressora de TNF é maior quando comparada à mesma atividade realizada por IL-6 (Riley et al., 1999; Martin et al., 2005). Um decréscimo nos níveis de TNF após 75 minutos da exposição ao LPS pode refletir em aumento de IL-6 e IL-10 (Semaeva et al., 2010). Como visto nos resultados deste estudo, TauCl age de modo inibitório na liberação de IL-10 por linfócitos T_{H2} tanto em células sanguíneas quanto esplênicas, fato este que pode estar envolvido em mecanismo inflamatórios incontrolados. Uma bacteremia persistente é o resultado da perda da capacidade de *clearance* de patógeno decorrente de processo apoptótico de linfócitos e macrófagos esplênicos e hepáticos (Tassiulas et al., 2007). A ausência de IL-10 leva à uma taxa de mortalidade mais rápida após CLP e uma precoce transição da fase reversível para a fase irreversível da sepse (Latifi et al., 2002).

Apesar da clara associação entre a imunoparalisia na sepse com IL-10, não se pode associar este fenômeno apenas a ela; diferentes fases de imunoparalisia existem pelos quais são “governadas” por diferentes

mecanismos moleculares: uma fase inicial que é regulada por IFN- γ , causando uma supressão reversível da imunidade adaptativa e fases tardias, que são caracterizadas pela perda de células imunes, mas totalmente irreversível em *interferon* do tipo 1 em células esplênicas e envolvendo IL-10 em algum momento (Cohen, 2002; Hotchkiss e Karl, 2003; Hotchkiss et al., 2009). Isto pode ser observado no perfil de secreção de IFN- γ no baço. Mecanismos de imunoparalisia induzidos por TLR4 também são relatados, podendo por meio de uma ativação acidental do mesmo (Cohen, 2002; Hotchkiss e Karl, 2003; Hotchkiss et al., 2009).

Leentjens e colaboradores (2012) demonstraram em estudo em humanos que IFN- γ reverte parcialmente a imunoparalisia, identificando o mesmo como uma potencial nova opção no tratamento para a sepse. Visto que TauCl diminui a secreção de IFN- γ , este efeito de reversão da imunoparalisia poderia estar comprometido.

Diferentemente do que o observado nos nossos resultados, Schwandt e colaboradores (2012) demonstraram que os níveis amplificados de *interferon* do tipo I no baço está diretamente correlacionado com a inibição da imunidade mediada por célula T, suportando a ideia de que durante a sepse, ambos macrófagos e células dendríticas contribuem para este aumento de expressão.

Muenzer e colaboradores (2010) demonstraram que, logo após o estágio de imunoparalisia, níveis de IFN- γ foram restaurados. Esta poderia ser uma explicação para o observado no presente experimento: IFN- γ apresentou uma tendência em possuir maiores níveis em 120 horas do que quando comparados aos de 24 horas. Isto evidencia que TauCl pode agir como uma alça de *feedback* negativo que inicia na fase aguda para controlar a hiperinflamação, porém como é um metabólito oxidativo estável, se mantém por mais tempo no meio celular e pode contribuir à imunossupressão. Vale reassaltar que o retorno à fase de superprodução de citocinas pode se tornar mais prejudicial do que a infecção original e causar dano tecidual, falha orgânica múltipla (Riedermann et al., 2003) e mortalidade (Nathan, 2002; Ulloa e Tracey, 2005; Ulloa et al., 2009).

Considerando os efeitos adversos da desregulação de IL-17A, o controle de células produtoras das imunidades inata e adaptativa de IL-17A pode ser um alvo terapêutico chave na prevenção da inflamação tecidual associada a esta interleucina (Hirota, 2012), que mostrou que o bloqueio da mesma é protetor após indução de CLP. Freitas et al. (2009)

associam os efeitos protetores do bloqueio de IL-17A com a redução do nível de bacteremia e níveis de mediadores inflamatórios IL-17A, entretanto, é secretada por várias células, o que torna seu alvo mais difícil: neutrófilos, monócitos, eosinófilos, células indutoras de tecidos linfoides, células NK, células de paneth, linfócitos CD₈ e linfócitos T $\gamma\delta$ (Flierl et al., 2008; Cua e Tato, 2010).

Ogiku e colaboradores (2012) demonstraram em camundongos *knockout* para IL-17A submetidos à modelo de sepse, um aumento na transmigração bacteriana para o sangue e uma forte resposta inflamatória sistêmica, o que causou um consequente aumento na taxa de mortalidade, sugerindo o papel central de IL-17A na defesa do organismo frente a uma peritonite.

No presente estudo, níveis de IL-17A, mostraram-se no geral, mais altos do que os níveis de IL-23, corroborando com Bosmann et al. (2012), que mostraram em camundongos C57BL/6, após uma injeção de LPS, níveis plasmáticos de IL-23 bastante aumentados, além de demonstrar *in vitro* por meio de ensaio com macrófagos ativados, uma cinética elevada semelhante. As vias de sinalização de IL-23 atuam como amplificadoras da diferenciação de células T_H17 (Hashimoto et al., 2010), diferenciação esta dependente de citocinas IL-6 e Il-1 β (Ghoreschi et al., 2010). Particularmente em 24 horas, o efeito supressor de TauCl sob a secreção de linfócitos T_H17 poderia comprometer defesas do hospedeiro importantes.

A hipótese inicial do trabalho foi a de que TauCl exerceria efeito sobre algum fenótipo específico de linfócito, por isso foram avaliadas citocinas de 3 subtipos. Como a cloramina exerce um efeito inibitório na secreção de todos os mediadores avaliados, a mesma age de modo inespecífico; porém claramente foi possível observar que em 120 horas as células ficam mais susceptíveis à ação da mesma, sugerindo assim que um dos mecanismos de morte celular que ocorrem na fase tardia podem ser mediado por TauCl.

6 CONCLUSÃO

TauCl diminui a viabilidade celular de linfócitos de sangue e de baço, em uma relação dose-dependente, mais claramente no tempo de 120 horas, fase hiporesponsiva/imunossupressora da sepse.

TauCl *down* regula a produção de citocinas secretadas por linfócitos T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}, por mecanismo inespecífico, podendo atuar de modo benéfico na fase hiporesponsiva da sepse e de modo maléfico na fase hiperresponsiva da doença.

Considerando que a fisiopatologia da sepse, principalmente no contexto de inflamação e sistema imune, é altamente complexa, por mais pesquisas que se façam na tentativa de elucidar mecanismos, ainda é grande a dificuldade em inferir uma possibilidade de intervenção terapêutica viável, visto que as fases da sepse são altamente interdependentes e relacionadas.

Diante deste quadro, mais estudos ainda são necessários a fim de investigar os efeitos de TauCl, bem como de outros inúmeros subprodutos reacionais oxidantes, sobre as funções celulares dentro do contexto da sepse, apesar de que esta cloramina parece estar muito relacionada neste cenário.

Perspectivas

Apesar do crescente estudo sobre mecanismos moleculares no entendimento da sepse, muito ainda permanece desconhecido. E diante do fato de que se trata de uma patologia em que a pesquisa é altamente relevante, devido taxas de incidência cada vez maiores, todo estudo é importante na elucidação desta doença.

Além destes resultados, pretende-se dar continuidade ao estudo por meio da avaliação de apoptose celular de linfócitos submetidos ao tratamento *in vitro* com TauCl, permitindo correlacionar o fenômeno de morte celular com o desfecho da sepse.

Além disso, é de interesse futuramente fazer uma correlação dos dados descritos neste trabalho com resultados a partir de pesquisa utilizando sangue de pacientes sépticos internados em UTI, na tentativa de complementar e enriquecer a hipótese que levou à pesquisa, para melhor compreensão da complexa fisiopatologia do sistema imune no quadro séptico.

REFERÊNCIAS

Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno S, Boulmé R, Lepage E, Le Gall R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med.* 2002; 28(2):108-21.

Angen MBB et al. Guide for the care and use of laboratory animals. The National Academies Press, Washington DC, 2011.

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.

Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B, CUB-Réa Network. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168(2):165-72.

Arnhold J, Flemmig J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Arch Biochem Biophys.* 2010; 500(1):92-106.

Ashare A, Powers LS, Butler NS, Doerschug KC, Monick MM, Hunninghake GW. Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005; 288(4):633-40.

Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 109(1):33-44.

Barua M, Liu Y, Quinn MR. Taurine Chloramine Inhibits Inducible Nitric Oxide Synthase and TNF Gene Expression in Activated Alveolar Macrophages: Decreased NF- κ B Activation and I κ B Kinase Activity. *J Immunol.* 2001; 167(4):2275-81.

Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature.* 2004; 430(6996):257-63.

Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth.* 1996; 77(1):110-7.

Blanco J, Muriel-Bombin A, Sagredo V, Taboada F, Gandia F, Tamayo L, Collado J, Garcia-Labattut A, Carriedo D, Valledor M, De Frutos M, Lopez MJ, Caballero A, Guerra J, Alvarez B, Mayo A, Villar J. Grupo de Estudios y Análisis en Cuidados Intensivos. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care.* 2008; 12(6):R158.

Blomgran R, Zheng L, Stendahl O. Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *J Leukoc Biol.* 2007; 81(5):1213-23.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 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.

Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 1996; 24(7):1125-28.

Borges-Osório MR, Robinson WM. *Genética Humana*. Editora Artmed, Porto Alegre, 2002.

Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 2000; 405(6785): 458-62.

Bosmann M, Sarma JV, Atefi G, Zetoune FS, Ward PA. Evidence for anti-inflammatory effects of C5a on the innate IL-17A/IL-23 axis. *FASEB J.* 2012; 26(4):1640-51.

Bosmann M, Ward PA. Therapeutic potential of targeting IL-17 and IL-23 in sepsis. *Clin Transl Med.* 2012; 1(1):4.

Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B, EPISEPSIS Study Group. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.* 2004; 30(4):580-8.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(10):854-65.

Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev.* 2004; 197: 179-91.

Cauvi DM, Song D, Vazquez DE, Hawisher D, Bermudez JA, Williams MR, Bickler S, Coimbra R, De Maio A. A Period of Irreversible Therapeutic Intervention during Sepsis Correlates with a Phase of Innate Immune Dysfunction. *J Biol Chem.* 2012; 287(24):19804-15.

Chen A, Kaufman S. Splenic blood flow and fluid efflux from the intravascular space in the rat. *J Physiol.* 1996; 490(2): 493-99.

Chorazy M, Kontny E, Marcinkiewicz J, Maśliński W. Taurine

chloramine modulates cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Amino Acids*. 2002; 23(4):407-13.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002; 420(6917):885–891.

Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol*. 1992; 10:267-93.

Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010, 10(7):479–89.

Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*. 1998; 9(1):1-11.

Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*. 2013; 39(2):165-228.

Dhainaut JF, Yan SB, Joyce DE, Pettilä V, Basson B, Brandt JT, Sundin DP, Levi M. Treatment effects of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis with or without overt disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost*. 2004; 2(11):1924–33.

Egan BM, Abdih H, Kelly CJ, Condrón C, Bouchier-Hayes DJ. Effect of intravenous taurine on endotoxin-induced acute lung injury in sheep. *Eur J Surg*. 2001; 167(8): 575-80.

Emerson DK, McCormick ML, Schmidt JA, Knudson CM. Taurine monochloramine activates a cell death pathway involving Bax and Caspase-9. *J Biol Chem*. 2005; 280(5):3233-41.

Erdamar H, Türközkan N, Ekremoğlu M, Kurt Y, Yaman H. The effect of taurine on polymorphonuclear leukocyte functions in endotoxemia. *Amino Acids*. 2007; 33(4):581-5.

Evans DJ, Lindsay MA, O'Connor BJ, Barnes PJ. Priming of circulating human eosinophils following late response to allergen challenge. *Eur Respir J*. 1996; 9(4):703-8.

Fazzino F, Obregón F, Lima L. Taurine and proliferation of lymphocytes in physically restrained rats. *J Biomed Sci*. 2010; 17(1):S24.

Feng CG, Kaviratne M, Rothfuchs AG, Cheever A, Hieny S, Young HA, Wynn TA, Sher A. NK cell-derived IFN-gamma

differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2006; 177(10):7086-93.

Ferguson NR, Galley HF, Webster NR. T helper cell subset ratios in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*. 1999; 25(1):106-9.

Finfer S, Bellomo R, Lipman J, French C, Dobb G, Myburgh J. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med*. 2004; 30(4):589-96.

Flierl MA, Rittirsch D, Gao H, Hoesel LM, Nadeau BA, Day DE, Zetoune FS, Sarma JV, Huber-Lang MS, Ferrara JL, Ward PA. Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. *FASEB J*. 2008; 22(7):2198-205.

Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*. 1996; 183(6):2593-603.

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

Gaut JP, Yeh GC, Tran HD, Byun J, Henderson JP, Richter GM, Brennan ML, Lulis AJ, Belaouaj A, Hotchkiss RS, Heinecke JW. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proc Natl Acad Sci*. 2001; 98(21):11961-6.

Gaut JP, Byun J, Tran HD, Lauber WM, Carroll JA, Hotchkiss RS, Belaouaj A, Heinecke JW. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J Clin Invest*. 2002; 109(10):1311-9.

Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkell JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, Grainger JR, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun HW, Eberl G, Shevach EM, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W, O'Shea JJ. Generation of pathogenic T_H17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*. 2010; 467(7318):967-71.

Gottardi W, Nagl M. N-chlorotaurine, a natural antiseptic with outstanding tolerability. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(3):399-409.

Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas EL.

Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils: Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. *J Biol Chem.* 1984; 259(16):10404-13.

Guo R, Wang Y, Minto AW, Quigg RJ, Cunningham PN. Acute renal failure in endotoxemia is dependant on caspase activation. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15(12):3093-102.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and medicine.* Oxford, USA, 1999.

Hashimoto M, Hirota K, Yoshitomi H, Maeda S, Teradaira S, Akizuki S, Prieto-Martin P, Nomura T, Sakaguchi N, Köhl J, Heyman B, Takahashi M, Fujita T, Mimori T, Sakaguchi S. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *J Exp Med.* 2010; 207(6):1135-43.

Hayakawa M, Gando S, Ieko M, Honma Y, Homma T, Yanagida Y, Kubota N, Uegaki S, Sawamura A, Asakura H. Massive amounts of tissue factor induce fibrinogenolysis without tissue hypoperfusion in rats. *Shock.* 2013; 39(6):514-9.

Henderson JP, Byun J, Williams MV, Mueller DM, McCormick ML, Heinecke JW. Production of brominating intermediates by myeloperoxidase. A transhalogenation pathway for generating mutagenic nucleobases during inflammation. *J Biol Chem.* 2001; 276(11):7867-75.

Heremans H, Billiau A. The potential role of interferons and interferon antagonists in inflammatory disease. *Drugs.* 1989; 38(6):957-72.

Heremans H, Dillen C, Groenen M, Matthys P, Billiau A. Role of interferon-gamma and nitric oxide in pulmonary edema and death induced by lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161(1):110-7.

Heremans H, Dillen C, van Damme J, Billiau A. Essential role for natural killer cells in the lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like reaction in mice. *Eur J Immunol.* 1994; 24(5):1155-60.

Hirota K, Ahlfors H, Duarte JH, Stockinger B. Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17-producing cells. *EMBO Rep.* 2012; 13(2):113-20.

Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med.* 2009; 15(5): 496-7.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003; 348(2):138-50.

Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(11): 813–22.

Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson M, Chang KC, Cobb JP, Osborne DF, Zollner KM, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE. Overexpression of Bcl-2 in Transgenic Mice Decreases Apoptosis and Improves Survival in Sepsis. *J Immunol*. 1999; 162(7):4148–56.

Howell MD, Talmor D, Schuetz P, Hunziker S, Jones AE, Shapiro NI. Proof of principle: the predisposition, infection, response, organ failure sepsis staging system. *Crit Care Med*. 2011; 39(2): 322–7.

Hunter CA, Chizzonite R, Remington JS. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *J Immunol*. 1995; 155(9):4347-54.

Jagodič KH, Jagodič K, Podbregar M. Long-term outcome and quality of life of patients treated in surgical intensive care: a comparison between sepsis and trauma. *Crit Care*. 2006; 10(5):R134.

Jimenez R, Belcher E, Sriskandan S, Lucas R, McMaster S, Vojnovic I, Warner TD, Mitchell JA. Role of Toll-like receptors 2 and 4 in the induction of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(12):4637-42.

Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol*. 2001; 22:394–400.

Kanayama A, Miyamoto Y. Apoptosis triggered by phagocytosis-related oxidative stress through FLIPS down-regulation and JNK activation. *J Leukoc Biol*. 2007; 82(5):1344-52.

Karlsson S, Varpula M, Ruokonen E, Pettilä V, Parviainen I, Ala-Kokko TI, Kolho E, Rintala EM. Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study. *Intensive Care Med*. 2007; 33(3):435–43.

Kasten KR, Tschöp J, Adediran SG, Hindleman DA, Caldwell CC. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis. *Shock*. 2010; 34(4):327-36.

Kaufman S, Deng Y. Splenic control of intravascular volume in the rat. *J Physiol*. 1993; 468: 557–65.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in

innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010; 11(5):373–84.

Keel M, Ungethum U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, Ertel W. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood.* 1997; 90(9):3356–63.

Kim C, Park E, Quinn MR, Schuller-Levis G. The production of superoxide anion and nitric oxide by cultured murine leukocytes and the accumulation of TNF-alpha in the conditioned media is inhibited by taurine chloramine. *Immunopharmacology.* 1996; 34(2-3):89-95.

Klamt F, Schacter E. Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage. *J Biol Chem.* 2005; 280(22):21346-52.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999; 111(5):383-9.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005; 77(5):598-625.

Kontny E, Chorazy-Massalska M, Rudnicka W, Marcinkiewicz J, Maśliński W. Comparison of taurine chloramine and taurine bromamine effects on rheumatoid arthritis synoviocytes. *Amino Acids.* 2007; 32:447-52.

Kontny E, Rudnicka W, Chorazy-Massalska M, Marcinkiewicz J, Maśliński W. Taurine chloramine inhibits proliferation of rheumatoid arthritis synoviocytes by triggering a p53-dependent pathway. *Inflamm Res.* 2006; 55(10):446–55.

Koo TS, Kwon HJ, Kim MH, Kim DD, Shim CK, Chung SJ, Chong S. Functional impairment of rat taurine transporter by activation of nitrogen oxide through superoxide. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012; 27(3):286-93.

Lajoie S, Lewkowich IP, Suzuki Y, Clark JR, Sproles AA, Dienger K, Budelsky AL, Wills-Karp M. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nat Immunol.* 2010; 11(10): 928–35.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J ExpMed.* 2005; 201(2):233–40.

Latifi SQ, O'Riordan MA, Levine AD: Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect Immun* 2002, 70(8):4441-6.

Leentjens J, Kox M, Koch RM, Preijers F, Joosten LA, van der Hoeven JG, Netea G, Pickkers P. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 186(9):838-45.

Levi M, de Jonge E, van der Poll T. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Thrombolysis*. 2003; 16(1-2):43-7.

Levi M, van der Poll T, ten Cate H, van Deventer SJ. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *Eur J Clin Invest*. 1997; 27(1):3-9.

Levi M. Platelets. *Crit Care Med*. 2005; 33(12):523-5.

Levings MK, Roncarolo MG. Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 293:303-26.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003; 31(4):1250-6.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(9):678-89.

Marchant A, Alegre ML, Hakim A, Piérard G, Marécaux G, Friedman G, De Groote D, Kahn RJ, Vincent JL, Goldman M. Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock. *J Clin Immunol*. 1995; 15(5):266-73.

Marchant A, Vincent JL, Goldman M. The Protective Role of Interleukin-10 in Sepsis. *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*. 1994; 42-47.

Marcinkiewicz J, Mak M, Bobek M, Biedroń R, Białecka A, Koproński M, Kontny E, Maśliński W. Is there a role of taurine bromamine in inflammation? Interactive effects with nitrite and hydrogen peroxide. *Inflamm Res*. 2005, 54(1):42-9.

Marcinkiewicz J, Nowak B, Grabowska A, Bobek M, Petrovska L, Chain B. Regulation of murine dendritic cell functions in vitro by taurine chloramine, a major product of the neutrophil myeloperoxidase-halide system. *Immunology*. 1999; 98(3): 371-8.

Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Stelmaszynska T. Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro

the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. *J Leukoc Biol.* 1995; 58(6):667-74.

Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012; 10(6):701-6.

Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol.* 2005; 6(8):777-84.

Matsuda A, Jacob A, Wu R, Aziz M, Yang WL, Matsutani T, Suzuki H, Furukawa K, Uchida E, Wang P. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. *J Nippon Med Sch.* 2012; 79(1):4-18.

Mebius RE., Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(8):606-16.

Mei SH, Haitzma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS, Liles WC, Stewart DJ. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182(8):1047-57.

Mishell RI, Dutton RW. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J Exp Med.* 1967; 126(3): 423-42.

Moreno SE, Alves-Filho JC, Alfaya TM, da Silva JS, Ferreira SH, Liew FY. IL-12, but not IL-18, is critical to neutrophil activation and resistance to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. *J Immunol.* 2006; 177(5):3218-24.

Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature.* 1993; 362(6422):758-61.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63.

Muenzer JT, Davis CG, Chang K, Schmidt RE, Dunne WM, Coopersmith CM, Hotchkiss RS. Characterization and Modulation of the Immunosuppressive Phase of Sepsis. *Infect Immun.* 2010; 78(4):1582-92.

Müller I, Munder M, Kropf P, Hänsch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol.* 2009; 30(11):522-30.

Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro-

and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2003; 198(12):1951-7.

Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002; 420(6917):846-52.

O'Brien JM Jr, Ali NA, Aberegg SK, Abraham E. Sepsis. *Am J Med*. 2007; 120(12):1012-22.

Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J*. 2001; 15(6):879-92.

Ogasawara K, Takeda K, Hashimoto W, Satoh M, Okuyama R, Yanai N, Obinata M, Kumagai K, Takada H, Hiraide H, Seki S. Involvement of NK1+ T cells and their IFN-gamma production in the generalized Shwartzman reaction. *J Immunol*. 1998; 160(7):3522-7.

Ogiku M, Kono H, Hara M, Tsuchiya M, Fujii H. Interleukin-17A Plays a Pivotal Role in Polymicrobial Sepsis According to Studies Using IL-17A Knockout Mice. *J Surg Res*. 2012; 174(1): 142-9.

Ogino T, Than TA, Hosako M, Ozaki M, Omori M, Okada S. Taurine chloramine: a possible oxidant reservoir. *Adv Exp Med Biol*. 2009; 643:451-61.

Olszanecki R, Marcinkiewicz J. Taurine chloramines and Taurine bromamine induce heme-oxygenase-1 in resting and LPS-stimulated J774.2 macrophages. *Amino Acids*. 2004; 27(1):29-35.

Park E, Schuller-Levis G, Jia JH, Quinn MR. Preactivation exposure of RAW 264.7 cells to taurine chloramines attenuates subsequent production of nitric oxide and expression of iNOS mRNA. *J Leukoc Biol*. 1997; 61(2):161-6.

Park E, Jia J, Quinn MR, Schuller-Levis G. Taurine chloramine inhibits lymphocyte proliferation and decreases cytokine production in activated human leukocytes. *Clin Immunol*. 2002; 102(2):179-84.

Pathan N, Hemingway CA, Alizadeh AA, Stephens AC, Boldrick JC, Oragui EE, McCabe C, Welch SB, Whitney A, O'Gara P, Nadel S, Relman DA, Harding SE, Levin M. Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet*. 2004; 363(9404): 203-9.

Peña G, Cai B, Ramos L, Vida G, Deitch EA, Ulloa L. Cholinergic Regulatory Lymphocytes Re-Establish Neuromodulation of Innate Immune Responses in Sepsis. *J Immunol*. 2011; 187(2):718-25.

Pero RW, Sheng Y, Olsson A, Bryngelsson C, Lund-Pero M.

Hypochlorous acid/N-chloramines are naturally produced DNA repair inhibitors. *Carcinogenesis*. 1996; 17(1):13-8.

Peskin AV, Winterbourn CC. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radic Biol Med*. 2001; 30(5):572-9.

Phillips HJ. Dye exclusion test for viability. *Tissue culture: methods and application*. Academic Press. New York, pp 406-408, 1973.

Pilz M, Holinka J, Vavken P, Marian B, Krepler P. Taurine chloramine induces apoptosis in human osteosarcoma cell lines. *J Orthop Res*. 2012; 30(12):2046-51.

Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*. 2007; 170(5): 1435-44.

Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest*. 2003; 112(4):460-7.

Riedemann, NC, Guo R-F, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*. 2003; 9: 517-24.

Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem*. 1999; 274(23):16513-21.

Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA: Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(10):776-87.

Tassin M, Llarena P, Laffaye F, Kaltenbach G. Protein C deficiency in patient with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation and deep vein thrombosis. *Arch Argent Pediatr*. 2013; 111(1):28-30.

Robinson RT, Wang J, Cripps JG, Milks MW, English KA, Pearson TA, Gorham JD. End-organ damage in a mouse model of fulminant liver inflammation requires CD4+ T cell production of IFN-gamma but is independent of Fas. *J Immunol*. 2009; 182(5):3278-84.

Rodger BL. *Hematology clinical and laboratory practice*, v. 01, p. 39-49, 1993.

Rozen R, Tenenhouse HS, Scriver CR. Taurine transport in renal brush-border-membrane vesicles. *Biochem J*. 1979; 180(1): 245-8.

Rudiger A, Stotz M, Singer M. Cellular processes in sepsis. *Swiss Med Wkly*. 2008; 38(43-44):629-34.

Russel JA. Management of sepsis. *N Engl J Med*. 2006; 355(16):1699-713.

Schuller-Levis GB, Park E. Taurine and its chloramine: modulators of immunity. *Neurochem Res.* 2004; 29(1):117-26.

Schwandt T, Schumak B, Gielen GH, Jüngerkes F, Schmidbauer P, Klocke K, Staratschek-Jox A, van Rooijen N, Kraal G, Ludwig-Portugall I, Franken L, Wehner S, Kalff JC, Weber O, Kirschning C, Coch C, Kalinke U, Wenzel J, Kurts C, Zawatzky R, Holzmann B, Layland L, Schultze JL, Burgdorf S, den Haan JM, Knolle PA, Limmer A. Expression of type I interferon by splenic macrophages suppresses adaptive immunity during sepsis. *EMBO J.* 2012; 31(1):201-13.

Scumpia PO, Moldawer LL. Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndromes. *Crit Care Med.* 2005; 33(12):468-71.

Semaeva E, Tenstad O, Skavland J, Enger M, Iversen PO, Gjertsen BT, Wiig H. Access to the Spleen Microenvironment through Lymph Shows Local Cytokine Production, Increased Cell Flux, and Altered Signaling of Immune Cells during Lipopolysaccharide-Induced Acute Inflammation. *J Immunol.* 2010; 184(8):4547-56.

Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(6):389-400.

Silva E, Pedro M de A, Sogayar ACB, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J; de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E, Brazilian Sepsis Epidemiological Study. *Crit Care.* 2004; 8(4): 251-60.

Silva JPMSC. Efeitos de novos compostos azotados com potencial farmacológico na protecção do stresse oxidativo [Dissertação de mestrado]. Programa de Pós Graduação em Biologia Funcional. Braga: Universidade do Minho; 2004.

Sonoda K, Exley M, Snapper S, Balk SP, Stein-Streilein J. CD-1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J Exp Med.* 1999; 190(9):1215-25.

Stockinger B, Hirota K, Duarte J, Veldhoen M. External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Semin Immunol.* 2011; 23(2): 99-105.

Sutherland AM, Valley KR, Manocha S, Russell JA. The association of interleukin 6 haplotype clades with mortality in critically ill adults. *Arch Intern Med.* 2005; 165(1):75-82.

Tan JK, O'Neill HC. Concise review: Dendritic cell development in the context of the spleen microenvironment. *Stem Cells*. 2007; 25(9): 2139–45.

Tang H, Guo Z, Zhang M, Wang J, Chen G, Cao X. Endothelial stroma programs hematopoietic stem cells to differentiate into regulatory dendritic cells through IL-10. *Blood*. 2006; 108(4):1189–97.

Tappaz ML. Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. *Neurochem Res*. 2004; 29(1):83–96.

Tassioulas I, Park-Min KH, Hu Y, Kellerman L, Mevorach D, Ivashkiv LB. Apoptotic cells inhibit LPS-induced cytokine and chemokine production and IFN responses in macrophages. *Hum Immunol* 2007, 68(3):156–64.

Thomas EL, Bozeman PM, Jefferson MM, King CC. Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines. *J Biol Chem*. 1995; 270(7):2906-13.

Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM. Cytotoxicity of Chloramines. *Methods Enzymol*. 1986(b); 132: 585-93.

Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM. Preparation and Characterization of Chloramines. *Methods Enzymol*. 1986(a); 132:569-85.

Thomas EL. Germs. *N Engl J Med*. 1972; 287(11):553-5.

Tiesi G, Reino D, Mason L, Palange D, Tomaiolo JN, Deitch EA. Early trauma hemorrhage-induced splenic and thymic apoptosis is gut-mediated and Toll-like receptor 4-dependent. *Shock*. 2013; 39(6):507-13.

Tokunaga S, Kanayama A, Miyamoto Y. Modification of I κ B α by taurine bromamine inhibits tumor necrosis factor α -induced NF- κ B activation. *Inflamm Res*. 2007; 56:479-86.

Tomi M, Terayama T, Isobe T, Egami F, Morito A, Kurachi M, Ohtsuki S, Kang YS, Terasaki T, Hosoya KI. Function and regulation of taurine transport at the inner blood-retinal barrier. *Microvasc Res*. 2007; 73(2):100–6.

Tracey KJ. Understanding immunity requires more than immunology. *Nat Immunol*. 2010; 11(7): 561–4.

Ulloa L, Brunner M, Ramos L, Deitch EA. Scientific and clinical challenges in sepsis. *Curr Pharm Des*. 2009; 15(16): 1918–35.

Ulloa, L, Tracey KJ. The “cytokine profile”: a code for sepsis. *Trends Mol Med*. 2005; 11(2):56–63.

Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, McDonough JS, Tschoep J, Ferguson TA, McDunn JE, Morre M, Hildeman DA, Caldwell CC, Hotchkiss RS. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *Immunol*. 2010; 84(7):3768-79.

Venet F, Chuang CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohé J, Lepape A, Ayala A, Monneret G. Increased circulating regulatory T cells (CD4+CD25+CD127-) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2009; 35(4):678–686.

Vesteinsdottir E, Karason S, Sigurdsson SE, Gottfredsson M, Sigurdsson GH. Severe sepsis and septic shock: a prospective population-based study in Icelandic intensive care units. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2011; 55(6):722-3.

Villa P, Sacconi A, Sica A, Ghezzi P. Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense. *J Infect Dis*. 2002; 185(8):1115-20.

Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D, Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006; 34(2): 344-53.

Volk HD, Reinke P, Döcke WD. Clinical aspects: from systemic inflammation to ‘immunoparalysis’. *Chem Immunol*. 2000; 74: 162–77.

Wagner C, Kotsougiani D, Pioch M, Prior B, Wentzensen A, Hänsch GM. T lymphocytes in acute bacterial infection: increased prevalence of CD11b(+) cells in the peripheral blood and recruitment to the infected site. *Immunology*. 2008; 125(4):503-9.

Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, Ulloa L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med*. 2004; 10(11):1216-21.

Wang Y, Cha YN, Kim KS, Kim C. Taurine chloramine inhibits osteoclastogenesis and splenic lymphocyte proliferation in mice with collagen-induced arthritis. *Eur J Pharmacol*. 2011; 668(1-2):325-30.

Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology*. 2007; 212(9-10):715–22.

Weighardt H, Kaiser-Moore S, Vabulas RM, Kirschning CJ, Wagner H, Holzmann B. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection. *J Immunol*. 2002; 169(6):2823–7.

Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta -secreting regulatory cells. *Microbes Infect*. 2001; 3:947–54.

Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med* 1999; 340(3):207–14.

Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011; 12(6):492-9.

Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*. 1980; 29(2):189-201.

Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol*. 2000; 7(1):53-8.

Wong P, Pamer EG. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:29-70.

Xu CT, Li WM, Yao YM. Regulation mechanism of regulatory T cells in immunoregulatory responses. *Int J Pathol Clin*. 2008; 28:199–204.

Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI, Spriggs MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*. 1995; 3(6):811–21.

Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med*. 1999; 27(1):66-72.

ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais sob o número 89/2012.



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecida pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 89/2012

Professor Responsável: Felipe Dal Pizzol

Equipe:

Título: "O PAPEL DE CLORAMINA TAURINA NA APOPTOSE DE LINFÓCITOS EM SEPSE".

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização 192 ratos machos, da espécie *Wistar*, com peso variando entre 350-400 g. Este projeto é valido até maio de 2012 até abril de 2013. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 89/2012

Principal Investigator: Felipe Dal Pizzol

Researchers:

Project title: "THE ROLE CHLORAMINE TAURINE IN LYMPHOCYTE APOPTOSIS IN SEPSIS"

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Cuiabá, 28 de agosto de 2012.

Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA