

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

AMANDA CURTO TAVARES

**O PAPEL DAS CÉLULAS T GAMA DELTA NA SEPSE AGUDA**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022

AMANDA CURTO TAVARES

**O PAPEL DAS CÉLULAS T GAMA DELTA NA SEPSE AGUDA**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Curso de Ciências  
Biomédicas, Ênfase em Ciências  
Básicas da Saúde, da Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto.

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Coorientador: Me. Guilherme Cesar Martelossi Cebinelli

Ribeirão Preto - SP

2022

**Dedico esse trabalho à memória da  
minha avó, Lúcia, por tanto carinho e  
amor.**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, aos meus pais, Cris e Augusto, por todo o apoio, incentivo e por estarem sempre ao meu lado. Obrigada por tudo que abriram mão para me dar o melhor. Um obrigada especial ao meu porto seguro, minha mãe, que é minha calmaria quando tudo parece estar dando errado. Agradeço também à minha irmã Thaise por tanta parceria e por todos nossos momentos de desabafos juntas. Às minhas avós, Lena e Lúcia, e aos meus avôs, Heraldo, Theo e Altino, por terem tanta esperança em mim e nunca duvidarem da minha capacidade. Ao meu namorado, Arthur, por toda paciência, compreensão, carinho e ajuda nos momentos mais difíceis. À todos meus familiares, obrigada por todo amor que sempre recebi.

Às minhas melhores amigas Jessyka, Naomi e Mariana que sempre estiveram do meu lado me apoiando. Aos meus amigos da graduação, Lara, Matheus, Mariana e Rafaela, obrigada por tornarem minha vida mais leve em Ribeirão Preto.

Às minhas irmãs de coração da República Naja, obrigada por todas as trocas, risadas, conselhos, filmes e jantinhas. Vocês se tornarem minha família em outra cidade. Agradeço especialmente à Nícia que embarcou comigo em todas as aventuras durante esses 4 anos juntas.

Aos meus amigos da Sirius Biotecnologia Jr. pela experiência única de muito aprendizado, desafios e por me mostrarem que juntos brilhamos mais forte.

Aos meus colegas do Laboratório de Inflamação e Dor e ao meu co-orientador Guilherme pelos ensinamentos e aprendizados, muito obrigado por todo esse tempo de dedicação e ajuda. Um agradecimento especial ao Anderson, por me ajudar muito em tudo que precisei e pelo incrível senso de humor durante dias difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Cunha, por me aceitar e proporcionar a oportunidade de trabalhar no seu laboratório. Obrigada por fazer questão de me orientar com muita atenção e por todos os conselhos dados, ajudando a ampliar meus conhecimentos científicos.

Aos professores Thiago Mattar Cunha e José Carlos Alves-Filho, aos alunos e aos técnicos do Laboratório de Inflamação e Dor.

Aos professores, Dr. Paulo Louzada Junior, Dra. Larissa Dias da Cunha e Dra. Vanessa Carregaro Pereira, pela disponibilidade de participar da banca examinadora deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à todos seus funcionários que são essenciais para a manutenção desse lugar. Ao corpo docente e à coordenação do curso de Ciências Biomédicas por toda assistência e auxílio em meu desenvolvimento.

Às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID) pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste trabalho.

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 63<sup>a</sup> Sessão Ordinária, realizada em 31/10/2022.

## RESUMO

A sepse é caracterizada como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção. Anualmente, ocorrem 48,9 milhões de casos de sepse no mundo, ocasionando 11 milhões de mortes. Devido ao elevado índice de mortalidade, a Organização Mundial da Saúde reconheceu a sepse como um problema de saúde pública mundial. Na sepse, a resposta imune hiper-inflamatória ocorre concomitantemente com uma resposta anti-inflamatória e resulta em disfunção de múltiplos órgãos. Durante uma infecção, os linfócitos T são importantes mediadores da imunidade adaptativa e podem ser classificados pela expressão de receptores para antígenos em sua superfície, como o TCR (T-cell receptor). No humano, cerca de 5% das células T totais não expressam o TCR convencional composto por cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , mas expressam o TCR composto por cadeias gama e delta ( $\gamma\delta$ ). Essas células são denominadas como T  $\gamma\delta$ , estão, principalmente, residindo em tecidos epiteliais e não dependem do reconhecimento de antígenos apresentados pelo MHC para se tornarem ativas. Desta forma, elas são ativadas rapidamente por diferentes ligantes como proteínas solúveis e pequenos peptídeos. Quando ativadas, estas células podem produzir IL-17 que favorece o controle da infecção por promover o recrutamento de neutrófilos. Contudo, a ativação de células T  $\gamma\delta$  em órgãos não acometidos pela infecção pode resultar em recrutamento de leucócitos e lesão tecidual. O papel das células T  $\gamma\delta$  na sepse ainda não está bem estabelecido. Desta forma, o objetivo deste trabalho é determinar o papel de células T  $\gamma\delta$  na patogênese da sepse. Para isso, foram utilizados camundongos C57BL/6J WT e camundongos deficientes de células T  $\gamma\delta$  (TCR $\delta^{-/-}$ ) para indução de sepse grave pelo método de CLP (*Cecal Ligation and Puncture*). Foi observada uma melhora na taxa de sobrevida em camundongos TCR $\delta^{-/-}$  em relação aos camundongos WT. Além disso, foi observado que camundongos TCR $\delta^{-/-}$  apresentaram menor inflamação sistêmica, avaliada pela produção de IL-6 e menor presença de lesão de órgãos. Também foi avaliada a migração de neutrófilos para o tecido pulmonar e para o foco infeccioso utilizando a técnica de citometria de fluxo. Observamos aumento no número de neutrófilos no foco infeccioso de camundongos TCR $\delta^{-/-}$  em relação aos camundongos WT. Contudo, foi observado um menor recrutamento dessas células para o pulmão de camundongos TCR $\delta^{-/-}$ , correlacionando com uma menor lesão tecidual confirmada

pelas análises histológicas do órgão. Desta forma, os resultados demonstram que as células T  $\gamma\delta$  participam ativamente da patogênese da sepse, contribuindo com a resposta inflamatória que resulta em lesões teciduais e, consequentemente, diminuição da sobrevida.

**Palavras-chave:** sepse; células T gama delta; inflamação; IL-17; neutrófilos.

## ABSTRACT

Sepsis is characterized as a potentially fatal organ dysfunction caused by an unregulated immune response to an infection. Annually, there are 48.9 million cases of sepsis in the world, causing 11 million deaths. Due to the high mortality rate, the World Health Organization has recognized sepsis as a worldwide public health problem. In sepsis, the hyper-inflammatory immune response occurs concomitantly with an anti-inflammatory response and results in multi-organ dysfunction. During an infection, T lymphocytes are important mediators of adaptive immunity and can be classified by the expression of receptors for antigens on their surface, such as the TCR (T-cell receptor). In humans, about 5% of total T cells do not express the conventional TCR composed of  $\alpha$  and  $\beta$  chains, but express the TCR composed of gamma and delta ( $\gamma\delta$ ) chains. These cells are termed as T  $\gamma\delta$ , are mainly residing in epithelial tissues and do not depend on the recognition of antigens presented by the MHC to become active. In this way, they are activated quickly by different ligands such as soluble proteins and small peptides. When activated, these cells can produce IL-17 that favors the control of the infection by promoting the recruitment of neutrophils. However, the activation of T $\gamma\delta$  cells in organs not affected by the infection can result in leukocyte recruitment and tissue damage. The role of T $\gamma\delta$  cells in sepsis is not yet well established. Thus, the objective of this work is to determine the role of  $\gamma\delta$  T cells in the pathogenesis of sepsis. For this, C57BL/6J WT mice and mice deficient in T $\gamma\delta$  cells (TCRd $^{-/-}$ ) were used to induce severe sepsis by the CLP (Cecal Ligation and Puncture) method. An improvement in the survival rate was observed in TCRd $^{-/-}$  mice compared to WT mice. Furthermore, it was observed that TCRd $^{-/-}$  mice had less systemic inflammation, as assessed by IL-6 production and less organ damage. The migration of neutrophils to the lung tissue and to the infectious focus was also evaluated using the flow cytometry technique. We observed an increase in the number of neutrophils in the infectious focus of TCRd $^{-/-}$  mice compared to WT mice. However, a lower recruitment of these cells to the lung of TCRd $^{-/-}$  mice was observed, correlating with a lower tissue lesion confirmed by histological analysis of the organ. Thus, the results demonstrate that  $\gamma\delta$  T cells actively participate in the pathogenesis of sepsis, contributing to the inflammatory response that results in tissue damage and, consequently, reduced survival.

**Keyword:** sepsis; gamma delta T cells; inflammation; IL-17; neutrophils.

## LISTA DE SIGLAS

SIRS - Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica, “*Systemic Inflammatory Response Syndrome*”

SOFA - *Sequential Organ Failure Assessment*

ILAS - Instituto Latino Americano de Sepse

CARS - Síndrome da Resposta Anti-Inflamatória Compensatória, “*Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*”

PAMP - Padrões Moleculares Associados a Patógenos, “*Pathogen-Associated Molecular Patterns*”

PRR - Receptores de Reconhecimento de Padrões, “*Pattern Recognition Receptors*”

TLR - Receptores do tipo Toll, “*Toll-like receptors*”

TNF - Fator de Necrose Tumoral

IFN – Interferon

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

TCR - Receptor de Células T, “*T-cell receptor*”

Linfócitos T  $\alpha\beta$  - Linfócitos Alfa Beta

Linfócitos T  $\gamma\delta$  - Linfócitos T Gama Delta

Células NK - Células Natural Killer

Camundongos Deficientes de Células T  $\gamma\delta$  - TCRd-KO ou TCRd<sup>-/-</sup>

CLP – Ligadura do ceco e perfuração, “*Cecal ligature and puncture*”

LPS – Lipopolissacarídeo

PBS - Tampão fosfato-salino, “*Phosphate Buffered Saline*”

ELISA – Ensaio imunoenzimático, “*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*”

H&E - Coloração Hematoxilina Eosina

IL - Interleucina

UFC - Unidades Formadoras de Bactérias

ALT - Alanina Aminotransferase

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Os camundongos TCRd-KO utilizados nos experimentos não possuem a presença de células T gama delta no organismo

**Figura 2.** Cinética do número de células T gama delta em camundongos WT na cavidade peritoneal após a CLP.

**Figura 3.** Camundongos WT apresentam um aumento na produção de IL-17 pelas células T gama delta na cavidade peritoneal após a indução de sepse.

**Figura 4.** Camundongos WT apresentam uma menor quantidade de células T gama delta no pulmão após a CLP.

**Figura 5.** Camundongos sépticos WT apresentam aumento da produção de IL-17 pelas células T gama delta no pulmão.

**Figura 6.** Camundongos deficientes de células T gama delta são mais resistentes à sepse quando comparados aos camundongos WT no modelo de CLP.

**Figura 7.** Camundongos WT e deficientes de células T gama delta apresentam a mesma carga bacteriana no lavado peritoneal e no sangue.

**Figura 8.** Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam menores níveis bioquímicos de lesão tecidual.

**Figura 9.** Camundongos deficientes de células T gama delta são mais resistentes à sepse quando comparados aos camundongos WT no modelo de endotoxemia com LPS.

**Figura 10.** Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam menor quantidade de marcador bioquímico de lesão renal.

**Figura 11.** Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam um menor nível sistêmico de inflamação quando submetidos à sepse grave.

**Figura 12.** Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam maior expressão de CXCR2 nos neutrófilos quando submetidos à sepse grave.

**Figura 13.** Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam menores níveis de IL-17 e IFN-gama no foco da infecção após indução de sepse.

**Figura 14.** Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam um maior infiltrado de neutrófilos no foco da infecção.

**Figura 15.** Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam um infiltrado de macrófagos no foco da infecção.

**Figura 16.** Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam um menor infiltrado de neutrófilos no pulmão.

**Figura 17.** Fotomicrografias de secções de tecido pulmonar com coloração de hematoxilina e eosina de camundongos saudáveis (controle), camundongos sépticos WT e camundongos sépticos deficientes de células T  $\gamma\delta$  (TCR $\delta^{-/-}$ ).

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1. Contexto histórico e definição de sepse	14
1.2. Incidência e causas	14
1.3. Fisiopatologia da sepse	16
1.4. Células T $\gamma\delta$	19
1.4.1. Células T $\gamma\delta$ durante uma infecção	20
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>22</b>
3.1. Animais	22
3.2. Indução de sepse polimicrobiana experimental	24
3.3. Indução de sepse por injeção de lipopolissacárido (LPS)	24
3.4. Coleta do lavado peritoneal	25
3.5. Coleta de células do sangue e plasma	25
3.6. Coleta de órgãos	25
3.7. Análise Histológica	26
3.7.1. Preparação das lâminas para análise histológica	26
3.7.2. Coloração Hematoxilina Eosina (H&E)	27
3.7.3. Fotomicrografias e análises histológicas	28
3.8. Ensaio de ELISA	28
3.9. Quantificação de bactérias	29
3.10. Marcadores de lesão de órgãos	29
3.11. Citometria de fluxo	29
3.12. Análise estatística e repetição experimental	30
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
4.1. Camundongos sépticos apresentam aumento da produção de IL-17 pelas células T $\gamma\delta$ no foco infeccioso e no pulmão	30

4.2. Camundongos deficientes em células T gama delta são mais resistentes à sepse induzida por CLP	34
4.3. A ausência de células T $\gamma\delta$ no organismo resulta em menor lesão de órgãos	35
4.4. Camundongos deficientes de células T gama delta são mais resistentes à endotoxemia por LPS	36
4.5. Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam menor inflamação sistêmica	38
4.6. Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam menores níveis de IL-17 no foco da infecção	40
4.7. Camundongos deficientes de células T $\gamma\delta$ apresentam maior quantidade de neutrófilos e macrófagos no foco da infecção	41
4.8. Camundongos deficientes de células T $\gamma\delta$ apresentam menor infiltrado de neutrófilos nos pulmões e lesão tecidual reduzida	44
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>52</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Contexto histórico e definição de sepse

A palavra sepse se originou da palavra grega “σήψις” que se refere a “decomposição de matéria orgânica na presença de bactérias”. O mesmo termo foi encontrado nas escritas de Hippocrates, há cerca de 400 anos A.C., visto como uma decadência biológica perigosa e odorífera (GEROULANOS; DOUKA, 2006; MAJNO, 1991). Com a evolução da Teoria dos Germes, cientistas como Pasteur propuseram a sepse como uma infecção sistêmica na qual organismos patogênicos se espalham pela corrente sanguínea do hospedeiro (FUNK; PARRILLO; KUMAR, 2009). Contudo, muitos pacientes com sepse morriam apesar da eliminação do patógeno e controle da infecção. Assim, estudos sugeriram que a resposta do hospedeiro também participa da patogênese da sepse e não somente fatores relacionados ao patógeno (CERRA, 1985).

A primeira definição internacional para a Sepse foi proposta em 1991 na Conferência de Consenso em Sepse e Disfunção de Órgãos, como sendo uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) desencadeada por infecção suspeita ou confirmada. Nessa primeira abordagem, também foram definidos outros conceitos como de infecção, SIRS, sepse grave e choque séptico. Assim, definiu-se sepse grave como caracterizada como sepse associada a sinais de hipoperfusão tecidual ou disfunção orgânica. Já o conceito de choque séptico se estabelecia como um estado de falência circulatória aguda causado pela sepse com persistência de hipotensão arterial, sendo necessário o uso de agentes vasopressores (BONE; SIBBALD; SPRUNG, 1992). Uma segunda conferência internacional foi realizada em 2001 e endossou a maioria dos conceitos definidos anteriormente. No entanto, ressaltaram que os indícios de uma resposta inflamatória sistêmica, como o aumento no número de leucócitos e taquicardia, ocorrem tanto em condições infecciosas quanto em não infecciosas, portanto não seriam parâmetros específicos para o diagnóstico da sepse (LEVY; FINK, 2003).

Em 2016, foi realizado o Terceiro Consenso Internacional de Definições de Sepse e Choque Séptico (Sepsis-3). A definição de sepse foi atualizada para uma “disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção” e o choque séptico como “sepse acompanhada por

profundas anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas que são capazes de aumentar consideravelmente o risco de morte do paciente" (SINGER et al., 2016). A grande diferença deste novo consenso foi a exclusão do termo sepse grave e o abandono dos critérios da SIRS, com a adoção do escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) para diagnósticos clínicos (VINCENT et al., 1996). O SOFA é um sistema de pontuação que avalia o desempenho de diversos sistemas do organismo, como o sistema respiratório, cardiovascular, hepático, renal, neurológico e de coagulação. Assim, os critérios utilizados para identificar a sepse em um paciente seriam de uma infecção suspeita ou confirmada em conjunto com um índice igual ou maior que 2 no SOFA.

## **1.2. Incidência e causas**

Apesar do grande avanço da medicina, o diagnóstico e a obtenção de um tratamento adequado ainda é um desafio na sepse. O estudo mais recente incluindo dados de mais de 195 países revela uma estimativa de 48,9 milhões de casos de sepse anual, com 11 milhões de mortes relacionadas à doença (RUDD et al., 2020). Segundo o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), a sepse é uma das principais causas de mortalidade hospitalar no Brasil, superando o infarto do miocárdio e o câncer. No país, é estimada uma incidência de aproximadamente 420 mil casos ao ano, dos quais 230 mil pacientes morrem. Assim, a sepse é responsável por um terço dos leitos ocupados nas UTIs do país, com uma taxa de mortalidade acima de 55% e com um elevado custo do tratamento da doença (MACHADO et al., 2017; SOGAYAR et al., 2008). Na maioria dos casos, a sepse não é o motivo primário da internação do paciente. A doença pode ocorrer devido ao elevado tempo de internação e a utilização de procedimentos invasivos como a ventilação mecânica, cateteres e uso de sondas que favorecem infecções nosocomiais. Também, pacientes com o sistema imunológico enfraquecido apresentam mais risco de contrair infecções secundárias, que podem resultar em sepse. Entretanto, não é somente em ambientes hospitalares que a doença pode ocorrer. Segundo o ILAS, apenas de 30% a 40% dos casos são oriundos de hospitalares, sendo assim, a grande maioria dos casos ocorrem fora deste ambiente. Além disso, existem fatores de risco relacionados ao hospedeiro que aumentam as chances de desenvolvimento da sepse. Esses fatores estão relacionados principalmente com o comprometimento do sistema imunológico do paciente, como

em portadores de doenças crônicas, idosos, crianças que ainda estão desenvolvendo o sistema imunológico e usuários de agentes imunossupressores. Sabendo desses dados alarmantes, em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma resolução na qual reconheceu a sepse como um problema de saúde pública mundial. Na resolução, a OMS reconhece que a maioria dos casos de sepse é evitável por meio da educação e da formação profissional. Também determina que os países adotem iniciativas voltadas à prevenção, diagnóstico e tratamento da sepse (SINGER et al., 2017).

O trato respiratório é o principal foco inicial de infecção observado em mais de metade dos casos de sepse, sendo a pneumonia a causa mais comum. Em seguida, a segunda causa de incidência de sepse são infecções intra-abdominais. (ANGUS et al., 2001; SILVA et al., 2004; ESTEBAN et al., 2007). As infecções bacterianas mais comuns que progridem a sepse são causadas por bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* ou por bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Em menor frequência, as infecções fúngicas e virais, também podem causar sepse (MARTIN et al., 2003; VINCENT, 2006).

O principal tratamento para a doença é o uso de antibióticos intravenosos, com recomendação de uso o quanto antes, assim que diagnosticada a sepse ou choque séptico (RHODES et al., 2017). Por isso, há uma grande preocupação acerca do aumento de bactérias multirresistentes que põe em risco a eficácia desse tratamento.

### **1.3. Fisiopatologia da sepse**

Em 1904, William Osler já havia observado que “o paciente parece morrer pela resposta do hospedeiro à infecção e não pela própria infecção”. À medida que a teoria da participação do hospedeiro na sepse foi sendo aceita, adotou-se o termo SIRS como definição de sepse, sugerindo que a patogênese da doença é resultado de uma resposta inflamatória exacerbada (BONE; SIBBALD; SPRUNG, 1992). Alguns anos depois, observou-se que a resposta inflamatória intensa ocorre concomitantemente com uma resposta anti-inflamatória compensatória, chamada de CARS (*Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome*) (BONE; GRODZIN; BALK, 1997). Desde então, o conhecimento sobre mecanismos de resposta do

hospedeiro aos patógenos melhoraram drasticamente. Se tornou evidente que a patogênese da sepse é complexa e envolve diversos aspectos da interação patógeno-hospedeiro, nos quais a inflamação exacerbada e a resposta anti-inflamatória podem contribuir tanto para o combate à infecção e regeneração do tecido, quanto favorecer a lesão de órgãos e infecções secundárias, dificultando o retorno à homeostase (VAN DER POLL et al., 2017).

A sepse se inicia com uma infecção em qualquer local do corpo do hospedeiro incluindo a pele, o trato urinário, o trato respiratório, a cavidade peritoneal e outros. Após a infecção, o patógeno é reconhecido através de seus padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) por uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, *pattern recognition receptors*) encontrados em células do sistema imune como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, ativando a resposta do hospedeiro. Dentre os PRRs mais importantes estão os receptores do tipo Toll (TLRs, *Toll-like receptors*) capazes de reconhecer diferentes toxinas de bactérias gram-positivas como peptidoglicano (PGN) e o ácido lipoteicóico (LTA), de bactérias gram-negativas como o lipopolissacarídeo (LPS) e também componentes da parede celular de fungos e ácidos nucleicos virais (BARTON; MEDZHITOV, 2002). Durante a sepse, há liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*) por células lesionadas, as quais os PRRs também são capazes de reconhecer (CHAN et al., 2012). Na maioria dos casos, a resposta do sistema imune inato é capaz de eliminar o patógeno e controlar a infecção. Entretanto, há situações em que o patógeno não consegue ser eficientemente eliminado, resultando em uma excessiva e persistente ativação do sistema imune e promoção de lesões teciduais, levando ao quadro de sepse. (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; VAN DER POLL et al., 2017).

Após o reconhecimento do patógeno, se inicia um processo de transdução de sinal por diferentes vias através da fosforilação e sinalização intracelular, as quais culminam na ativação de proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPKs), Janus kinases (JAKs), STATs (*signal transducers and activators of transcription*) ou que levam a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B por translocação nuclear. Assim, ocorre a transcrição e produção de mediadores inflamatórios por células do sistema imune inato. Nesse contexto, são liberadas citocinas como fator de necrose tumoral

alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 8 (IL-8) e outras que apresentam efeito nas células endoteliais e resultam na ativação de cascatas de coagulação e do sistema complemento, em vasodilatação, em rolamento e extravasamento de neutrófilos e a liberação de outros mediadores inflamatórios (HOTCHKISS; KARL, 2003; ZIMMERMAN et al., 2002; VAN DER POLL et al., 2017). Os mediadores intermediários induzem a produção e liberação de outras citocinas e quimiocinas inflamatórias, tais como IL-6, IFN- $\gamma$ , quimiocina ligante CC 2 (CCL2), CCL3 e quimiocina ligante CXC 1, 2 e 10 (CXCL1, CXCL2 e CXCL10) (HOTCHKISS et al., 2016). As citocinas são essenciais para a resposta inflamatória para combate à infecção e resolução da lesão tecidual. Entretanto, quando há a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias em órgãos não infectados, resulta em lesão tecidual e consequente disfunção de órgãos. Além da produção de citocinas, outro fator que resulta em lesão tecidual e disfunção de órgãos causadas pela inflamação durante a sepse é o infiltrado de leucócitos no tecido. Outra consequência dessas citocinas circulantes em excesso durante a sepse é a disfunção endotelial. Essa disfunção do endotélio pode levar à geração de microtrombos e hipotensão, o que afeta a microcirculação dos órgãos e promove o desenvolvimento de disfunção orgânica, observados durante a sepse (AMARAL; OPAL; VINCENT, 2004).

O profundo estado pró-inflamatório do sistema imune é rapidamente contrabalanceado por uma resposta anti-inflamatória na sepse, a CARS, a fim de retornar a homeostase. A resposta anti-inflamatória é caracterizada pela produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias, como Fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ , *Transforming growth factor beta*), interleucina 4, 10 e 13 (IL-4, IL-10 e IL-13) e de inibidores de citocinas, como antagonistas do receptor de IL-1 PAULUS; JENNEWINE; ZACHAROWSKI, 2011). Nos últimos anos, surgiram estudos que sugerem que as fases pró-inflamatória e imunossupressora podem ocorrer de maneira simultânea e no início da doença, entretanto, tipicamente o estado de hiperinflamação se manifesta primeiro e predominantemente. A intensidade dos dois processos depende de fatores do hospedeiro, como genética e nutrição, e do patógeno, tais como virulência e carga (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013). Sendo que em alguns casos, a resposta anti-inflamatória pode ser tão acentuada quanto a resposta pró-inflamatória, o que resulta em uma situação de

imunossupressão do paciente com propensão a desenvolver infecções secundárias (BONE, 1996).

Infecções oportunistas podem indicar que o paciente séptico apresenta uma falha na imunidade mediada por células T, as quais são divididas em sub-populações CD4 e CD8, e exercem importantes funções imunorreguladoras e efetoras durante a infecção. Os linfócitos T são mediadores da imunidade adaptativa que, para exercer suas funções durante a infecção, dependem do reconhecimento de抗ígenos peptídicos apresentados por células apresentadoras de抗ígenos (APCs, *Antigen Presenting Cells*), processo altamente coordenado e específico, que leva em média 7 dias para ocorrer (HEIT et al., 2002). Os principais tipos de APCs são células dendríticas, macrófagos e células B. Após a captura e processamento de抗ígenos, as APCs o apresentam às células T *naive* por meio das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e em adição de sinais co-estimulatórios e a influência de citocinas, ocorre a ativação dos linfócitos T (DANAHY et al., 2016).

#### 1.4. Células T $\gamma\delta$

Os linfócitos T se caracterizam por expressarem receptores para抗ígenos em sua superfície, chamado de receptor de células T (TCR, *T-cell receptor*). No humano, cerca de 5% das células T totais não expressam o TCR convencional estabelecido por cadeias alfa e beta ( $\alpha\beta$ ), mas expressam as cadeias gama e delta ( $\gamma\delta$ ) e apresentam algumas características funcionais semelhantes a células do sistema imune inato (BONNEVILLE; O'BRIEN; BORN, 2010; BENDELAC; BONNEVILLE; KEARNEY, 2001). Os TCRs  $\gamma\delta$  são codificados através da expressão de dois genes distintos,  $\gamma$  e  $\delta$ , que se reestruturam como os genes de imunoglobulinas para gerar diversas moléculas de proteína TCR (HAAS; PEREIRA; TONEGAWA, 1993). Apesar da menor expressão de cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  quando comparados às cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , as possibilidades de recombinação para gerar os receptores TCR  $\gamma\delta$  são altamente diversas. Mesmo a possibilidade de uma alta diversidade, os receptores TCR  $\gamma\delta$  são praticamente invariantes, apresentando semelhança de função em relação aos receptores de reconhecimento de padrão inato (DAVIS; BJORKMAN, 1988; ASARNOW et al., 1988).

Apesar dos receptores TCR $\alpha\beta$  e TCR $\gamma\delta$  compartilharem as subunidades do complexo CD3 e algumas semelhanças entre suas estruturas, eles se diferem em aspectos moleculares de organização e conformação do TCR. Essas diferenças resultam em diferentes mecanismos de ativação e função em cada tipo de receptor (MORATH; SCHAMEL, 2020). Nos linfócitos convencionais, o CD4 se liga ao MHC classe II e o CD8 ao MHC classe I complexados ao peptídeo do antígeno. Por outro lado, a maioria dos linfócitos T  $\gamma\delta$  não expressam CD4 e CD8 portanto, não dependem do reconhecimento de moléculas do MHC. Os receptores TCR  $\gamma\delta$  são capazes de se ligar a diferentes ligantes, como moléculas de MHC, embora as afinidades de ligação sejam baixas, também se ligam a moléculas de superfície celular, proteínas solúveis e pequenos peptídeos (BORN; KEMAL AYDINTUG; O'BRIEN, 2013; VANTOUROUT; HAYDAY, 2013).

Durante a ontogenia do timo, as células T  $\gamma\delta$  surgem antes das células T  $\alpha\beta$  e são predominantes nas fases iniciais do desenvolvimento fetal. No início de seu desenvolvimento, as células T  $\gamma\delta$  adquirem um fenótipo pré-ativado devido a expressão de marcadores de memória, no qual, isso confere a essas células uma rápida ativação e indução de funções efetoras após detecção de estresse tecidual. Após o nascimento, constituem uma fração menor de timócitos e células T no baço, linfonodos e no sangue periférico de humanos e roedores. As células T $\gamma\delta$  apresentam tropismo para tecidos epiteliais, como a epiderme, mucosas dos órgãos respiratórios, digestivos e reprodutivos para onde migram no início de seu desenvolvimento e permanecem como células residentes em abundância. Como mencionado, os receptores TCR  $\gamma\delta$  são invariantes, porém distintos de um tecido para o outro. Desta forma, existe um tropismo de migração de células T  $\gamma\delta$  para tecidos e isso é dependente da expressão de cadeias de receptores TCR  $\gamma\delta$  específicas (BONNEVILLE; O'BRIEN; BORN, 2010).

#### **1.4.1. Células T $\gamma\delta$ durante uma infecção**

As células T  $\gamma\delta$  são importantes para a resposta imune contra patógenos devido sua localização que permite atuar como primeira linha de defesa e são capazes de expandir atingindo até 50% do total de células T circulantes durante uma infecção microbiana (WESCH et al., 2011). Uma importante característica dessas células é a sua propriedade de responder à抗ígenos de patógenos e

também marcadores de estresse celular. Assim, elas podem reconhecer um amplo espectro de抗ígenos endógenos e exógenos como bactérias, protozoários e células hospedeiras infectadas ou transformadas (HAYDAY, 2000). Além disso, as células T  $\gamma\delta$  apresentam uma capacidade inata de responderem rapidamente a citocinas pró-inflamatórias na ausência de outros抗ígenos, como a IL-1, IL-15 e IL-23 (BONNEVILLE; O'BRIEN; BORN, 2010; VANTOUROUT; HAYDAY, 2013). Assim, os linfócitos T  $\gamma\delta$  atuam nas fases iniciais da resposta imune, simultaneamente com as células imunes inatas. Nesse sentido, agem como sensores de estresse participando do processo de ativação da resposta imune inata e consequentemente ativação da resposta imune adaptativa. Desta forma, enquanto as células T CD4 $^+$   $\alpha\beta$  necessitam de células apresentadoras de抗ígenos para serem ativadas e expandidas, as células T  $\gamma\delta$  já estão presentes em tecidos e são rapidamente ativadas (HAYDAY, 2009).

Após sua ativação, as células T  $\gamma\delta$  podem matar diretamente células infectadas, através da liberação de grânulos citotóxicos e moléculas bacteriostáticas ou bacteriolíticas como granzimas, perforinas e defensinas. Além disso, apresentam ação indireta na eliminação de microrganismos patogênicos pela produção de citocinas pró-inflamatórias que aumentam as atividades bactericidas de células imunes e ativam outras células, como células epiteliais que produzem mediadores quimioatraentes. Desta forma, células T  $\gamma\delta$  também promovem o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e células NK e induzem a formação de granulomas em algumas patologias (DIELI et al., 2001; ZACHARIADIS et al., 2006; WESCH et al., 2011). As células T  $\gamma\delta$  podem apresentar dois principais subconjuntos funcionais distintos em resposta a patógenos, dependendo da expressão de diferentes marcadores de superfície e da presença de ligantes durante o seu desenvolvimento no timo. No timo e no tecido linfóide periférico, as células T  $\gamma\delta$  CD27 $^+$  produzem IFN- $\gamma$  e as células T  $\gamma\delta$  CD27 $^-$  produzem quantidades significativas de IL-17. Enquanto as células T  $\gamma\delta$  CD25 $^+$  atuam como células progenitoras para as células TT  $\gamma\delta$  CD27 $^+$  e CD27 $^-$  podem produzir as duas citocinas, IL-17 e IFN- $\gamma$  (PAUL et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que diversas citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-6, IL-18, TGF- $\beta$ ), TLRs (TLR1 e TLR2) e dectina-1 são capazes de induzir a produção de IL-17A pelas células T  $\gamma\delta$  (LALOR et al., 2011).

No contexto da sepse, papel das células T $\gamma\delta$  se demonstrou essencial para a proteção do hospedeiro frente a infecção em modelos experimentais de sepse utilizando camundongos (CHUNG et al., 2006). Entretanto, ainda há contradição no seu papel durante a doença, indicando que a produção de IL-17 pelas células T $\gamma\delta$  promove altos níveis de mediadores pró-inflamatórios, resultando em maior letalidade (FLIERL et al., 2008). Apesar de descrita na fisiopatologia da sepse, a função das células T $\gamma\delta$  ainda não é muito bem compreendida. Por um lado, se encontra um papel protetor dessas células na doença, já que participam do controle da infecção, mas por outro, é visto um papel prejudicial, na qual podem contribuir com aumento da inflamação sistêmica e promoção de lesões de órgãos. Diante dessa dicotomia, é importante entender de que forma as células T $\gamma\delta$  atuam na fisiopatologia da sepse sendo relevante para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a doença.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar a participação das células T gama delta na sepse experimental grave na fase aguda.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- 2.2.1. Compreender o processo de ativação de células T gama delta durante a sepse experimental grave em camundongos WT;
- 2.2.2. Avaliar a suscetibilidade de camundongos deficientes de células T gama delta e camundongos WT em relação a sepse;
- 2.2.3. Analisar alterações de migração celular de neutrófilos e macrófagos para o foco infeccioso em camundongos deficientes de células T gama delta e WT durante a sepse experimental grave;
- 2.2.4. Avaliar a produção de mediadores inflamatórios e marcadores bioquímicos de lesões de órgãos em camundongos deficientes de células T gama delta e WT durante a sepse;

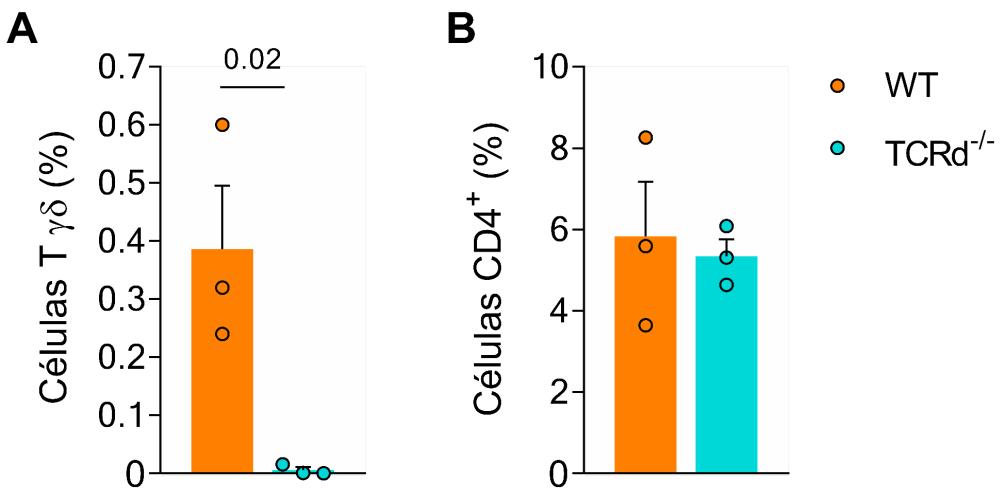
2.2.5. Avaliar o efeito da sepse nos pulmões de camundongos deficientes de células T gama delta e WT.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL6J da linhagem Wild Type (WT), provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo (USP) - Campus de Ribeirão Preto, além de camundongos TCRd-KO provenientes da *The Jackson Laboratory* (Califórnia, EUA). Os camundongos utilizados tinham de 6 a 7 semanas e pesavam entre 20 e 22 gramas, os quais foram mantidos no biotério de experimentação do departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), sob condições controladas de ciclo claro/escuro, umidade, temperatura e alimentação ad libitum. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA-FMRP), sob o protocolo 080/2018.

O fenótipo dos camundongos deficientes em as células T  $\gamma\delta$  (TCRd-KO ou TCRd $^{-/-}$ ) utilizados foram confirmados através da citometria de fluxo (figura 1). O baço dos camundongos WT e KO foi coletado e marcado para a citometria de fluxo (descritos a seguir nos itens 4.4 e 4.10). Foi possível confirmar a ausência de células T  $\gamma\delta$  no organismo dos camundongos TCRd-KO (figura 1A) e se certificar de que a deficiência dessas células no camundongo não prejudica a presença de outras células, como os linfócitos CD4 $^{+}$  (figura 1B).



**Figura 1: Os camundongos TCRd-KO utilizados nos experimentos não possuem a presença de células T gama delta no organismo.** Gráfico da frequência de células T gama delta (A) e da frequência de células CD4<sup>+</sup> (B) em camundongos WT e KO saudáveis. O experimento foi realizado com 3 camundongos por grupo e estão expressos como média ± erro padrão da média (Teste T de Student, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

Em todos os experimentos em que houve comparação entre os camundongos Wild Type (WT) e deficientes de células T gama delta (TCRd<sup>-/-</sup>), os camundongos foram mantidos em *cohousing* por pelo menos três semanas para pareamento da microbiota.

### 3.2. Indução de sepse polimicrobiana experimental

O modelo de CLP (ligação e perfuração do ceco) foi utilizado para a indução de sepse grave em camundongos. Após os camundongos serem anestesiados com a inalação de isoflurano, foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm no abdômen para exposição do ceco. Abaixo da junção íleo-cecal foi feita uma ligadura com linha de algodão para impedir o fluxo retrógrado do conteúdo cecal e em seguida, duas perfurações com uma agulha 18G foram realizadas no ceco dos camundongos para liberação do conteúdo cecal, promovendo a indução de sepse. Em seguida, o ceco foi pressionado gentilmente para saída das fezes pelas perfurações e colocado de volta no interior da cavidade abdominal, realizando a sutura da incisão para finalizar o procedimento. Após a sutura, foi administrado com 1 mL de solução salina por via subcutânea nos camundongos para hidratação e foram deixados sob exposição de luz incandescente até a total recuperação da anestesia. Camundongos pertencentes ao grupo *naive* ou controles foram

submetidos a uma falsa cirurgia, na qual o mesmo procedimento cirúrgico foi realizado, porém não houve perfuração no ceco, apenas ligadura e reintrodução na cavidade abdominal. Os camundongos submetidos a CLP foram tratados com antibiótico (Ertapenem sódico 30 mg/kg) via intraperitoneal diluído em um volume de 200ml de salina. A antibioticoterapia foi realizada 6h após a cirurgia, seguido de aplicações com intervalos de 12h durante três dias. Após a finalização de todos os procedimentos descritos, os camundongos foram novamente acondicionados no biotério departamental da Farmacologia e a mortalidade registrada a cada 12h, durante 7 dias para a avaliação da sobrevida.

### **3.3. Indução de sepse por injeção de lipopolissacarídeo (LPS)**

O modelo de endotoxemia por LPS também foi realizado em camundongos C57/bl6. Após os camundongos serem anestesiados com a inalação de isoflurano, foi feita uma administração intravascular de LPS (3 mg/kg) pelo plexo retro-orbital. No grupo controle foi injetado o volume correspondente de solução salina estéril. Para avaliação da sobrevida após a administração da endotoxina, os camundongos foram novamente acondicionados no biotério departamental da Farmacologia e a mortalidade registrada a cada 12h, durante 7 dias.

### **3.4. Coleta do lavado peritoneal**

Os camundongos utilizados foram eutanasiados pela administração intravenosa de Ketamina ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) e Xilasina ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), através do plexo orbital. Após certificação de que o camundongo havia morrido, foi introduzido 1,5mL de PBS 1x estéril na cavidade peritoneal do animal. Foi realizada a homogeneização do conteúdo dentro da cavidade e posteriormente, um volume de 1mL foi recuperado. O lavado peritoneal foi centrifugado (450g, 5 minutos, 4°C), coletado o sobrenadante e condicionado à -70°C até sua utilização para quantificar quimiocinas e citocinas. As células restantes foram ressuspensas em solução de Cloreto de amônio, para promover a lise de hemárias e centrifugado (450g, 5 minutos, 4°C). Após a retirada do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio RPMI complementado com 10% de Soro Fetal Bovino, L-glutamina, penicilina, estreptomicina, bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e HEPES para serem posteriormente utilizadas para a citometria de fluxo e contagem do número total com uso da câmara de Neubauer.

### **3.5. Coleta de células do sangue e plasma**

Após a eutanásia dos camundongos, o sangue foi coletado. A coleta foi realizada através da punção do plexo orbital utilizando capilar com 20uL de heparina, para evitar a coagulação sanguínea. O plasma foi separado dos outros hemocomponentes através de centrifugação (450g, 5 minutos, 4°C), coletado e condicionado à -70°C até sua utilização para as análises bioquímicas. As células que restaram após a coleta do plasma foram ressuspensas em solução de Tris-Cloreto de amônio (Hudson et al, 1989) a fim de lisar as hemácias, seguido da centrifugação (450g, 5 minutos, 4°C), retirada do sobrenadante e ressuspensão das células em meio RPMI completo. Logo em seguida, as células foram utilizadas para a citometria de fluxo e contagem total utilizando a câmara de Neubauer.

### **3.6. Coleta de órgãos**

Após a eutanásia dos camundongos, foi realizado a perfusão de 20ml de PBS-heparina (2ul de heparina para cada 1mL de solução PBS 1x) através da injeção da solução pelo ventrículo esquerdo e incisão do átrio direito, para saída do sangue e fluído perfundido. Em seguida, os pulmões foram coletados para as análises de quantificação de citocinas, de citometria de fluxo e análise histológica. De modo que o lóbulo esquerdo do pulmão foi utilizado para citometria, o lóbulo inferior direito foi utilizado para histologia e os dois lóbulos superiores direitos foram destinados para o ensaio de ELISA.

Os pulmões coletados para a citometria foram submetidos à digestão enzimática contendo 1 mg/mL de colagenase do tipo II em 1mL de meio RPMI incompleto por 40 minutos a 37°C em agitação leve. A digestão foi cessada com 1mL de meio RPMI completo, o tecido digerido foi filtrado utilizando o *cell strainer* de 100uM (Falcon – USA). As hemácias foram lisadas e a suspensão de células únicas restante foi utilizada para a citometria e contagem total. Para o procedimento de ELISA e quantificação de proteínas, os órgãos coletados foram congelados a -70°C em 200uL de solução PBS e inibidor de protease 1x até sua utilização nos experimentos. Para o processamento das amostras, foi utilizado o equipamento de maceração automático *TissueLyser II* (QIAGEN). Após o rompimento do tecido, as amostras foram centrifugadas (1300g por 10 minutos a 4°C) a fim de recuperar o sobrenadante para a realização do ELISA e da quantificação de proteínas.

### **3.7. Análise Histológica**

#### **3.7.1. Preparação das lâminas para análise histológica**

Inicialmente, cada órgão foi inserido em um cassete devidamente identificado para facilitar o manuseio durante o processo evitando possíveis trocas. O material coletado foi rapidamente submerso em paraformaldeído 4% por 24 horas, a fim de fixar as moléculas constituintes das células e dos tecidos. Então foi desidratado por imersões sucessivas de 1 hora numa série crescente de álcool etílico a 70, 80, 90 e 100%. A etapa de desidratação evita a retração do tecido e, consequentemente, as lesões estruturais da célula de caráter irreversível. Em seguida, foi realizada a diafanização, utilizando o xilol para remover o álcool e preparar o tecido para a penetração da parafina. Nessa etapa o material foi imerso duas vezes em xilol com duração de 1 hora cada imersão. Após os procedimentos de fixação e de desidratação, foi realizada a inclusão do material em parafina, assim o tecido é endurecido, o que facilita o corte em finas camadas. Na impregnação, as amostras foram submetidas a dois banhos sucessivos em parafina, cada banho com duração de 1 h. Deste modo, são formados blocos de parafina com cada material histológico e deixamos à temperatura ambiente para solidificação da parafina. Os blocos formados foram retirados das formas e, em seguida, foram realizados os cortes histológicos no micrótomo.

Os cortes histológicos foram realizados com espessura de 5 µm e os cortes de parafina foram colocados em banho-maria (40 °C). Os cortes do tecido foram dispostos em lâminas de vidro e foram reservados para secagem do material. Tendo em vista que os cortes do material biológico apresentam-se transparentes, não é possível identificar as estruturas que o compõem ao microscópio, portanto foram realizadas colorações para possibilitar a análise.

#### **3.7.2. Coloração Hematoxilina Eosina (H&E)**

Com os cortes aderidos às lâminas, foi realizada a coloração hematoxilina eosina (H&E) para visualização de estruturas celulares e análise geral do corte histológico. Para isso, a parafina presente nas lâminas foi removida por duas imersões subsequentes em xilol durante 10 minutos. Depois, os tecidos das lâminas foram hidratados em álcool com concentrações decrescentes até o álcool 70°.

Então, as lâminas foram imersas na hematoxilina de Harris por 30 segundos e mergulhadas rapidamente em água destilada até a observação do tom azul nos cortes, corando os ácidos nucleicos dos núcleos. Em seguida, as lâminas foram imersas no corante eosina por 5 minutos para corar os componentes básicos presentes no citoplasma das células. Após o processo de coloração, as lâminas foram desidratadas com álcool a 80, 90 e 95% com duração de 2 minutos cada imersão e dispostas na estufa por 5 minutos para secagem. Para fixação do corante e conservação do material, as lâminas são submersas em xanol duas vezes durante 10 minutos cada imersão.

Por fim, para a montagem das lâminas com a lamínula, o bálsamo do Canadá foi aplicado sobre o corte e coberto por uma lamínula. Com auxílio de uma pinça, o corte foi pressionado levemente para retirar bolhas entre lâmina e lamínula e para o espalhamento do selante. As lâminas foram deixadas para secar em temperatura ambiente para acabamento e finalização do preparo das lâminas.

### **3.7.3. Fotomicrografias e análises histológicas**

As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticam 5.0 MP acoplada ao microscópio óptico calibradas em definições específicas conforme a objetiva utilizada: 4x (A.T. 40 x), 10x (A.T. 100 x), 20x (A.T. 200 x) ou 40x (A.T. 400 x). A análise histológica foi realizada por um operador capacitado, o qual analisou qualitativamente os parâmetros histológicos. Além disso, todas as análises histológicas foram realizadas às cegas no intuito de evitar qualquer viés na obtenção dos resultados.

### **3.8. Ensaio de ELISA**

Após a coleta do lavado peritoneal, do plasma e de homogenato de órgãos, as concentrações de CXCL2, Interleucina-6, Interleucina-17 e Interferon- $\gamma$  foram determinadas através do ensaio imunoenzimático (ELISA), seguindo o protocolo do fabricante R&D. Em resumo, o protocolo foi iniciado pela realização do *coating* em placa de 96 poços durante 16 horas utilizando anticorpos que se ligam especificamente nas citocinas de interesse. Ao final de todas as etapas descritas a seguir, foi feita a lavagem das placas em PBS-*Tween* e secagem manual. Após a lavagem para retirada do excesso de anticorpos que não se ligaram à placa, as

ligações inespecíficas foram bloqueadas pela incubação de PBS-BSA a 1% durante um período de 2 horas na temperatura ambiente. Após a lavagem e secagem, foi realizada a curva de calibração em diluição seriada com o último poço da linha incluindo apenas PBS-BSA 1% adotado com o branco, nos demais poços foram adicionadas às amostras, que ficaram em incubação por 24 horas. Posteriormente, o anticorpo de detecção foi adicionado à placa e após 2 horas, foi removido e em seguida adicionado à placa uma solução 1x de Estreptavidina com tempo de incubação de 30 minutos. Após estes procedimentos, o substrato colorimétrico Tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado na placa e quando atingiu a coloração azul desejada, a reação foi cessada com ácido sulfúrico 5M tornando a coloração amarela. A leitura foi realizada a 450 nm no equipamento Spectra Max-250 (*Molecular Devices*). As concentrações das quimiocinas e citocinas foram expressas em picogramas por mL (pg/mL). Com o intuito de padronizar as condições do ELISA para todas as amostras, foi realizada a quantificação de proteínas totais pelo método do ácido bicinconílico (BCA) e quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda de 562 nm (Spectra Max-250, *Molecular Devices*). O método consiste na formação de um complexo colorido com BCA, pela redução do Cu<sup>+2</sup>, através de ligações peptídicas com o Cobre em meio alcalino (Smith et al., 1985).

### **3.9. Quantificação de bactérias**

As amostras de sangue e lavado peritoneal foram coletadas após o CLP e diluídas para quantificação de bactérias viáveis. Após as devidas diluições, 10 uL das amostras foram adicionadas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Mueller Hinton (MH) e mantidas à 37°C por 24 horas. A contagem das unidades formadoras de bactérias (UFC) foi feita de forma manual e consideradas correspondentes ao número de bactérias viáveis nas amostras. Os resultados foram expressos em Log de UFC por mL (UFC/mL).

### **3.10. Marcadores de lesão de órgãos**

Para identificação de marcadores de lesão de órgãos após o CLP, foram utilizados marcadores plasmáticos de lesões de órgãos como a uréia e alanina aminotransferase (ALT) determinados através de kits laboratoriais (BioClin). Os resultados foram expressos de acordo com o protocolo específico de cada teste.

### 3.11. Citometria de fluxo

As amostras de sangue, lavado peritoneal e órgãos foram coletadas e processadas para obter-se uma suspensão de células únicas, como descrito anteriormente. Primeiramente, as células foram incubadas em solução de bloqueio de receptores Fc utilizando o FcBlock por 10 minutos a temperatura ambiente e foram marcadas com anticorpos específicos para identificar subpopulações de interesse. Em casos necessários, as células foram fixadas e permeabilizadas para permitir a marcação de moléculas intracelulares. Além disso, para avaliar a produção de citocinas, as células foram estimuladas com PMA (50mg/mL) e Ionomicina (500mg/mL) em conjunto com monensina, um inibidor da exportação de proteínas pelo Complexo de Golgi. O painel contou com viabilidade celular (APC-Cy7), CD45 (APC), CD3e (PE-Cy7), CD4 (FITC), TCRd (BV421), IL-17 (PE) e IFNy (BV510). Os dados foram adquiridos no BD FACSVerse (BD, Califórnia, EUA) e posteriormente analisados utilizando o software FlowJo (BD, Califórnia, EUA).

### 3.12. Análise estatística e repetição experimental

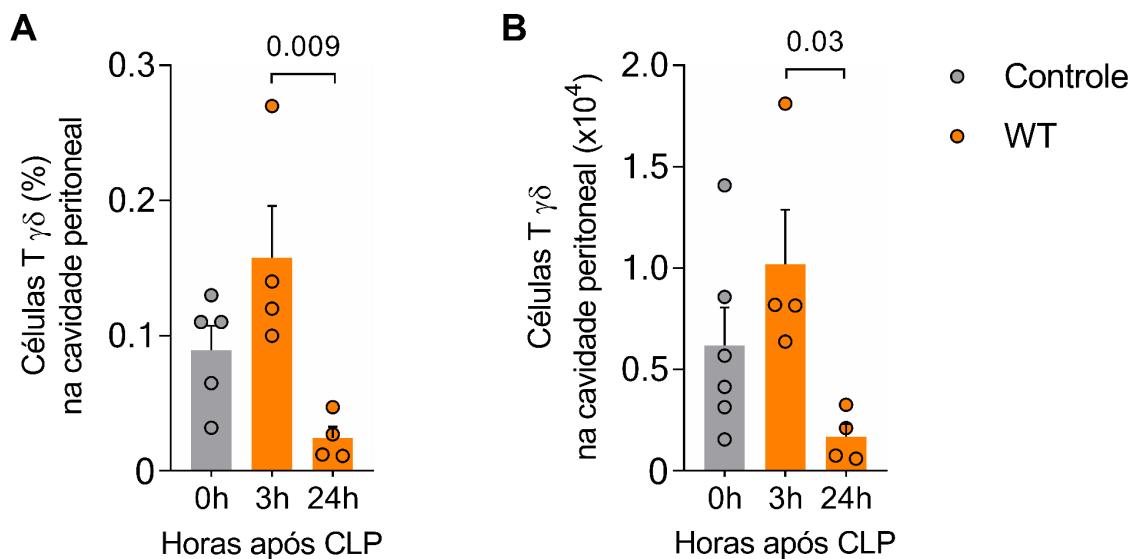
A análise da curva de sobrevida de animais submetidos à sepse foi analisada utilizando o teste Mantel-Cox logrank. Os demais resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de correção Bonferroni. Ou, por teste de distribuição t de Student. Em todas as análises foi adotado o nível de significância de  $p<0,05$ , e foram realizados no software GraphPad Prism7 (La Jolla, Califórnia, USA). Todos os experimentos foram repetidos de 2 a 3 vezes para avaliar a sua reproduzibilidade.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Camundongos sépticos apresentam aumento da produção de IL-17 pelas células T γδ no foco infeccioso e no pulmão

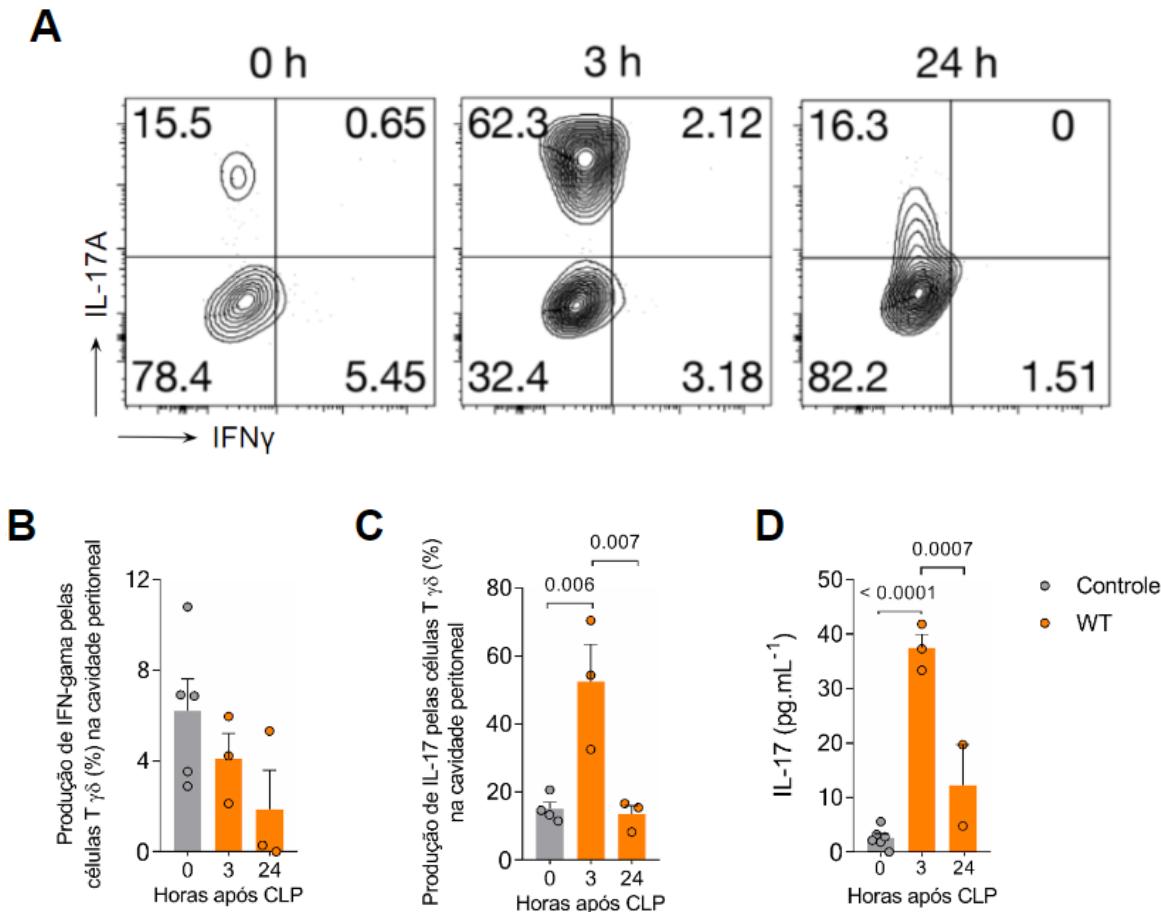
Para compreender o papel de células T  $\gamma\delta$  na patogênese da sepse, inicialmente avaliamos a cinética do número de células T  $\gamma\delta$  no foco infeccioso e no pulmão após a indução de sepse grave pelo modelo de CLP em camundongos WT. Na cavidade peritoneal, não observamos alteração no número de células T  $\gamma\delta$  após 3 e 24 horas da indução de sepse em relação ao tempo de 0 horas, que se refere a camundongos *naive*. No entanto, observamos redução da frequência e no número

destas células após 24 horas da indução de sepse quando comparados ao tempo de 3 horas (figura 2A e B).



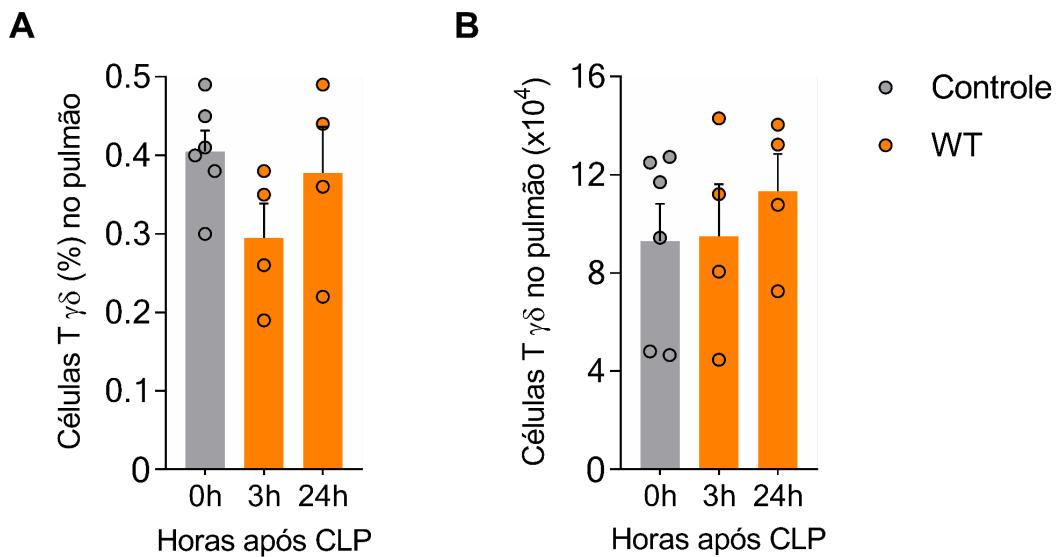
**Figura 2: Cinética do número de células T gama delta em camundongos WT na cavidade peritoneal após a CLP.** Frequência (A) e quantidade (B) de células T gama delta na cavidade peritoneal avaliada nos tempos 0, 3 e 24 horas após a indução de sepse grave por CLP. O experimento foi realizado com três camundongos em cada grupo, com exceção do grupo controle com seis camundongos. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

Também analisamos a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 pelas células T  $\gamma\delta$  durante o mesmo período de tempo no foco da infecção utilizando citometria de fluxo. Não observamos alterações significativas na produção de IFN- $\gamma$  por células T  $\gamma\delta$  na cavidade peritoneal (figura 3A). Contudo, foi observado um aumento na produção de IL-17 por estas células após 3 horas da indução de sepse em relação ao tempo de 0 horas, seguida de uma redução da produção desta citocina após 24 horas da CLP, se assemelhando aos níveis observados nos camundongos controle (figura 3B). Além da análise por citometria, também dosamos a quantidade de IL-17 na cavidade peritoneal e verificamos o aumento nos níveis de IL-17 após 3 horas da indução de sepse em relação ao tempo de 0 horas por ensaio de ELISA. Em 24 horas após a CLP, também observamos uma redução de IL-17 no foco infeccioso, mas, neste caso, as concentrações ainda foram maiores quando comparados aos camundongos controle (figura 3C).



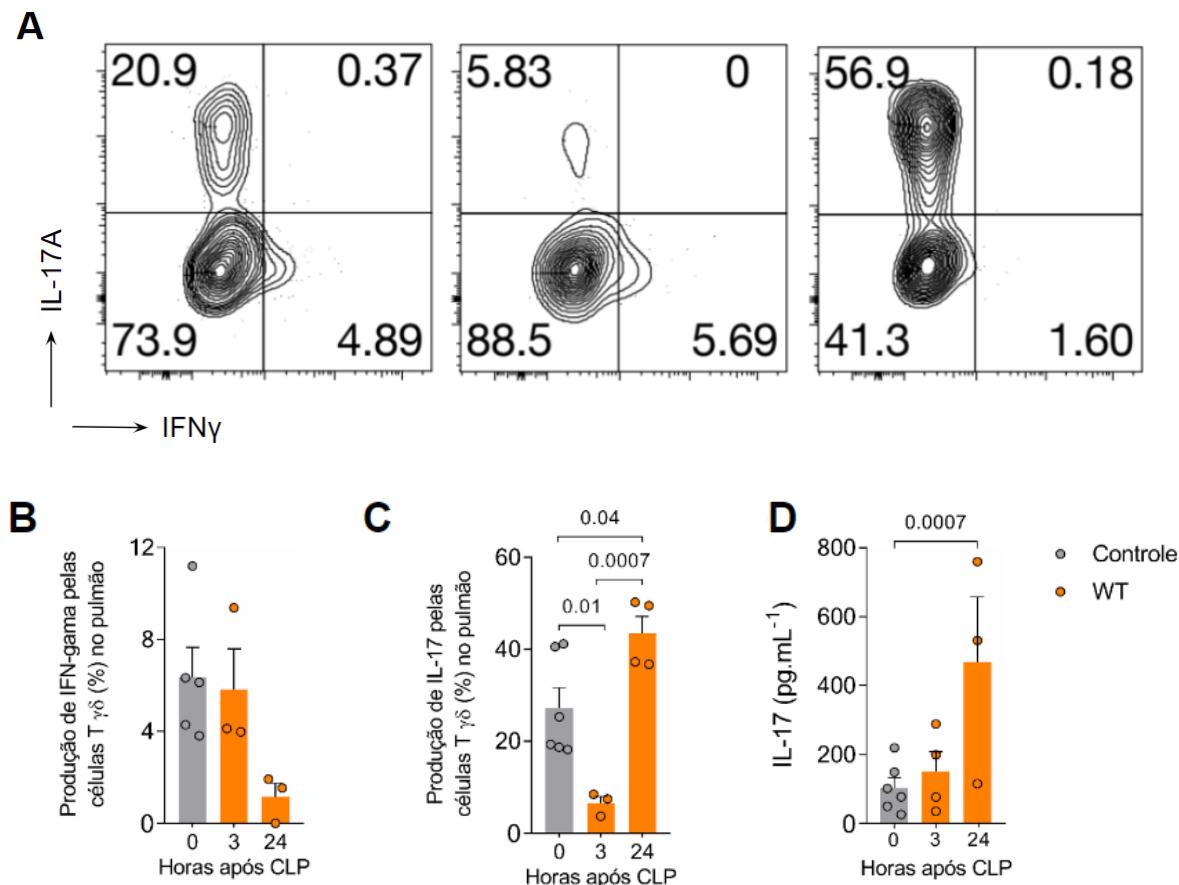
**Figura 3: Camundongos WT apresentam um aumento na produção de IL-17 pelas células T gama delta na cavidade peritoneal após a indução de sepse.** Dotplot representativo (A). Avaliação da produção de IFN-gama (B) e IL-17A (C) por células T gama delta por citometria e dosagem da concentração total de IL-17A (D) através do teste de ELISA na cavidade peritoneal em camundongos controles ou camundongos WT submetidos à sepse experimental. O experimento foi realizado com três camundongos em cada grupo, com exceção do grupo controle com seis camundongos. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

O pulmão é um dos órgãos mais afetados durante a sepse, assim, também analisamos a quantidade e perfil de ativação das células T  $\gamma\delta$  ao decorrer da doença no tecido pulmonar. Na figura 4 observamos que a frequência e o número de células T  $\gamma\delta$  não se alteram após a indução de sepse nos tempos 3 e 24 horas em comparação ao tempo 0 horas.



**Figura 4: Camundongos WT não apresentam alteração na quantidade de células T gama delta no pulmão após a CLP.** Frequência (A) e quantidade (B) de células T gama delta no pulmão avaliada nos tempos 0, 3 e 24 horas após a indução de sepse grave por CLP. O experimento foi realizado com três camundongos em cada grupo, com exceção do grupo controle com seis camundongos. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

Para avaliar a produção de citocinas pelas células T  $\gamma\delta$  no tecido pulmonar séptico, investigamos os níveis de IL-17 e IFN- $\gamma$  utilizando citometria de fluxo. Assim como na cavidade peritoneal, a produção de IFN- $\gamma$  não apresenta alterações significativas no pulmão (figura 5A). A produção de IL-17 pelas células T  $\gamma\delta$  apresentou uma redução inicial em 3 horas após a indução de sepse em relação ao tempo 0 hora. No entanto, houve um aumento na produção de IL-17 em 24 horas após a CLP em relação aos tempos anteriores analisados (figura 5B). Utilizando o ensaio de ELISA, verificamos o mesmo aumento nos níveis de IL-17 em 24 horas após a indução de sepse no tecido pulmonar dos camundongos WT (figura 5C).

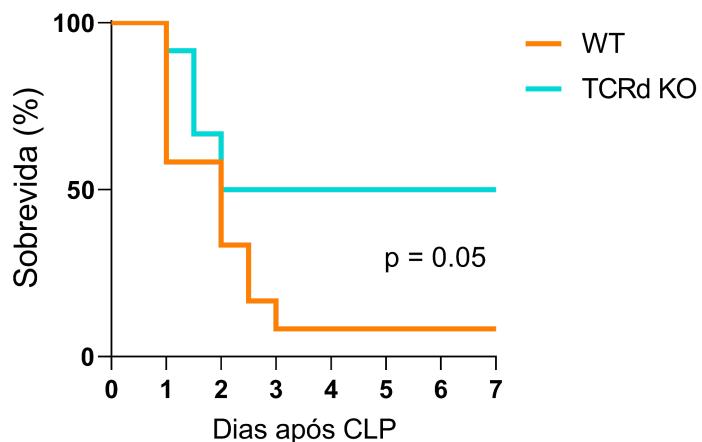


**Figura 5: Camundongos sépticos WT apresentam aumento da produção de IL-17 pelas células T gama delta no pulmão.** Dotplot representativo (A). Avaliação da produção de IFN-gama (B) e IL-17A (C) por células T gama delta por citometria e dosagem da concentração total de IL-17A (D) através do teste de ELISA no pulmão em camundongos controles ou camundongos WT submetidos à sepse experimental. O experimento foi realizado com três camundongos em cada grupo, com exceção do grupo controle com seis camundongos. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Camundongos deficientes em células T gama delta são mais resistentes à sepse induzida por CLP

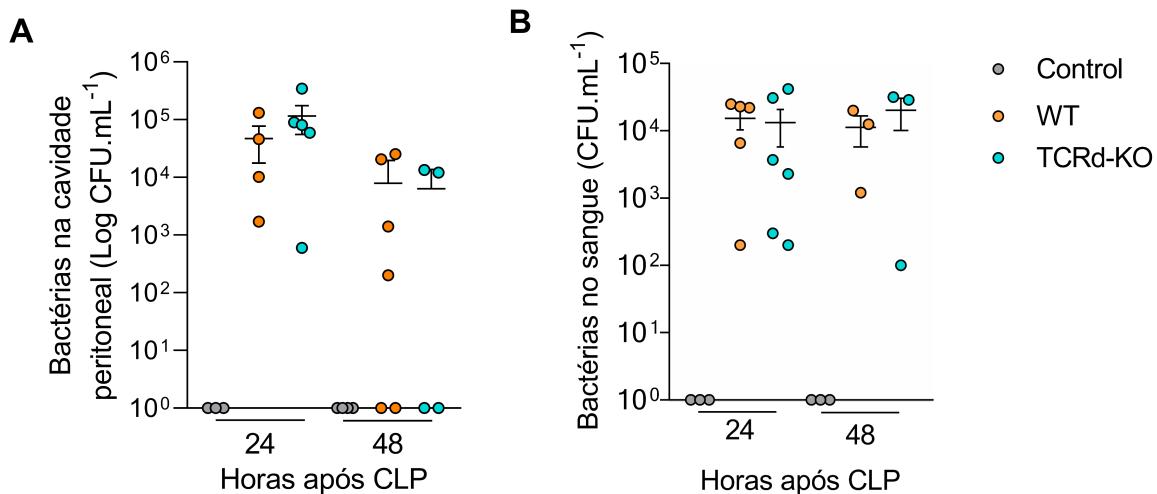
Camundongos alojados juntos desenvolvem uniformidade da microbiota intestinal ao longo do tempo, com consequências significativas para a competência imunológica (Hilbert, T. et al, 2017). Assim, os camundongos WT e TCRd $^{-/-}$  foram mantidos na mesma caixa por três semanas, com objetivo de igualar a microbiota entérica. Com seis semanas de vida, os camundongos foram submetidos ao CLP, em seguida, à antibioticoterapia e então, a sobrevida foi acompanhada por 7 dias. Na figura 6 é possível observar que os camundongos TCRd $^{-/-}$  submetidos a CLP

apresentaram uma sobrevida de 50%, enquanto os camundongos WT obtiveram uma menor taxa de sobrevivência de 10% dentro de 3 dias.



**Figura 6: Camundongos deficientes de células T gama delta são mais resistentes à sepse quando comparados aos camundongos WT no modelo de CLP.** Gráfico de sobrevida de camundongos WT e TCRd-KO após indução de sepse polimicrobiana experimental por CLP de intensidade letal combinado com o tratamento de antibiótico (Ertapenem sódico 30 mg/kg). Os resultados são representativos de dois experimentos realizados independentemente com seis camundongos por grupo. A avaliação da diferença na curva de sobrevida foi analisada utilizando o teste Mantel-Cox logrank.

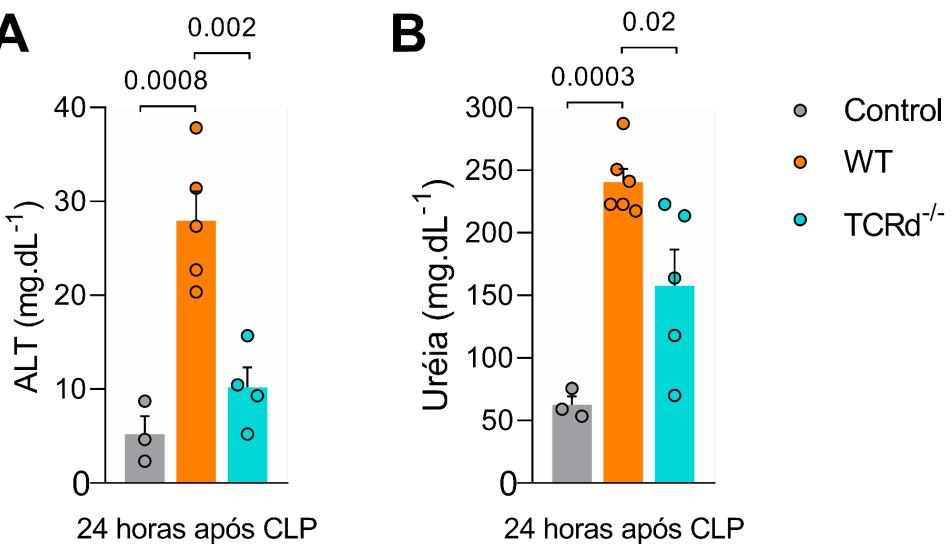
Além de avaliarmos a sobrevida dos camundongos submetidos ao CLP, na figura 7, avaliamos a carga bacteriana no foco infeccioso e sua disseminação para a circulação. Os animais WT e deficientes em células T  $\gamma\delta$  não apresentam diferença significativa na carga bacteriana presente no lavado peritoneal e no sangue em 24 e 48 horas após a indução de sepse.



**Figura 7: Camundongos WT e deficientes de células T gama delta apresentam a mesma carga bacteriana no lavado peritoneal e no sangue.** Carga bacteriana no lavado peritoneal (A) e no sangue (B) dos camundongos em 24 e 48 horas após a indução de sepse experimental por CLP, determinada pela contagem de CFUs. O experimento foi realizado com seis camundongos em cada grupo e repetidos independentemente por três vezes. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

#### 4.3. A ausência de células T $\gamma\delta$ no organismo resulta em menor lesão de órgãos

Realizamos a avaliação de lesão de órgãos para compreender o motivo pelo qual os camundongos  $TCRd^{-/-}$  apresentaram uma maior taxa de sobrevida em relação aos camundongos WT no experimento anterior. Para isso, avaliamos os níveis de marcadores bioquímicos de lesões de órgãos, ALT (Alanina Amino Transferase) e de Ureia nitrogenada no plasma para identificar a intensidade de lesões hepáticas e renais de camundongos WT e TCRd-KO submetidos à sepse. Os camundongos deficientes em células  $T\gamma\delta$  apresentam uma menor intensidade de lesão no fígado (figura 8A) e nos rins (figura 8B) em relação aos camundongos WT em 24 horas após a indução de sepse.



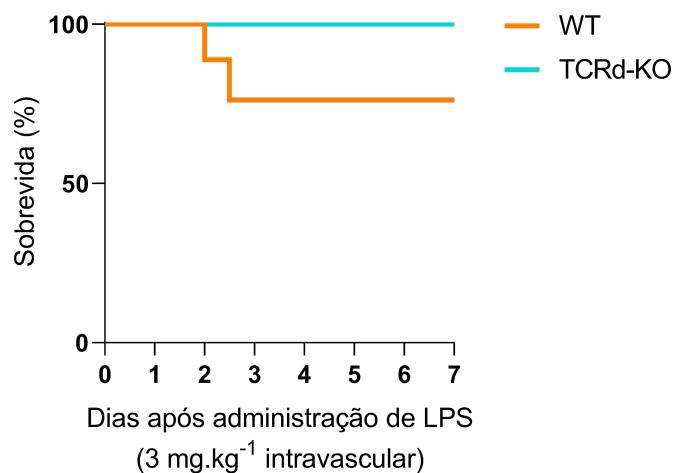
**Figura 8: Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam menores níveis bioquímicos de lesão tecidual.** Análise bioquímica do sangue demonstrando a função hepática (A) através da concentração de alanina aminotransferase (ALT) e a função renal (B) através da concentração de ureia nitrogenada em 24 horas após indução de sepse grave em camundongos WT e KO. O experimento foi repetido independentemente por duas vezes e foram utilizados seis camundongos em cada grupo, com exceção do grupo controle com três camundongos. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

#### 4.4. Camundongos deficientes de células T gama delta são mais resistentes à endotoxemia por LPS

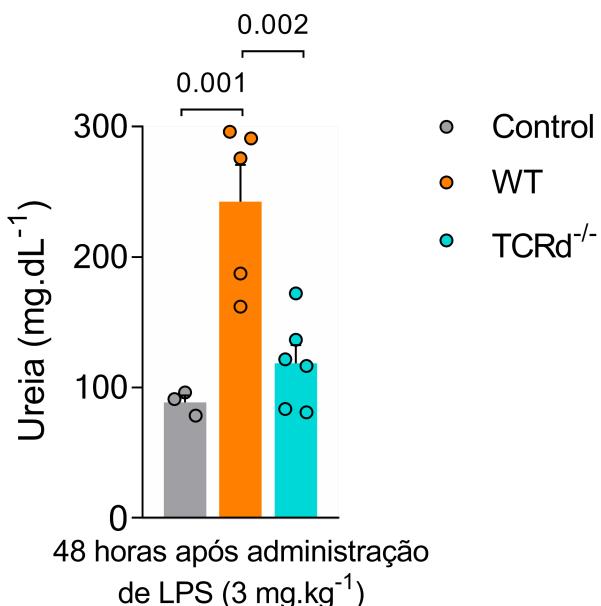
Assim como nos experimentos anteriores, os camundongos foram mantidos por *cohousing* por pelo menos três semanas antes do início do experimento. E ao atingirem a idade de 6 semanas, foi realizada a administração intravascular de LPS (3 mg/kg) nos camundongos WT e deficientes de células T  $\gamma\delta$ . Na figura 9, observamos uma sobrevida de 100% dos camundongos TCRd<sup>-/-</sup>, enquanto os camundongos WT apresentaram uma menor taxa de sobrevida, com cerca de 70%. Assim como no modelo de indução de sepse por CLP, observamos uma menor lesão renal em camundongos deficientes em células T  $\gamma\delta$  em relação aos camundongos WT em 48 horas após a administração de LPS (figura 10).

Os lipopolissacarídeos (LPS) compõem as endotoxinas presentes na membrana externa da maioria das bactérias gram-negativas e são os principais componentes responsáveis pelos eventos fisiopatológicos associados a infecções

dessas bactérias (RAETZ, 1990). Desse modo, a indução de endotoxemia por administração de LPS também pode ser utilizado como um modelo de sepse experimental em camundongos. Nesse contexto, utilizando um o modelo de indução de sepse por endotoxemia, foi possível avaliar a replicabilidade dos dados obtidos anteriormente utilizando a indução de sepse por CLP.



**Figura 9: Camundongos deficientes de células T gama delta são mais resistentes à sepse quando comparados aos camundongos WT no modelo de endotoxemia com LPS.** Gráfico de sobrevida de camundongos WT e TCRd-KO após indução de sepse por endotoxemia através da administração intravascular de LPS (3mg.kg<sup>-1</sup>). O experimento foi realizado com seis camundongos em cada grupo.

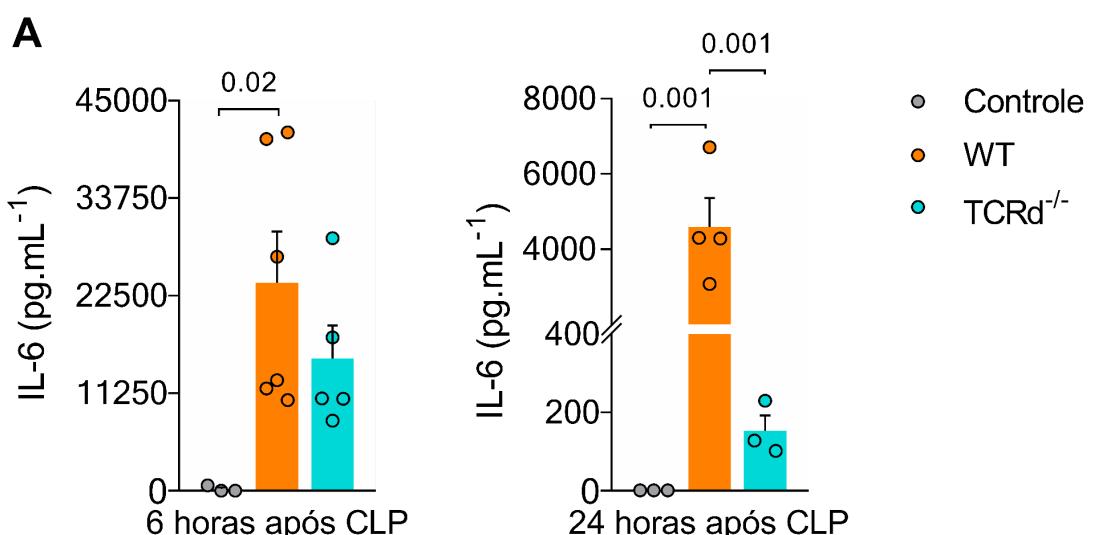


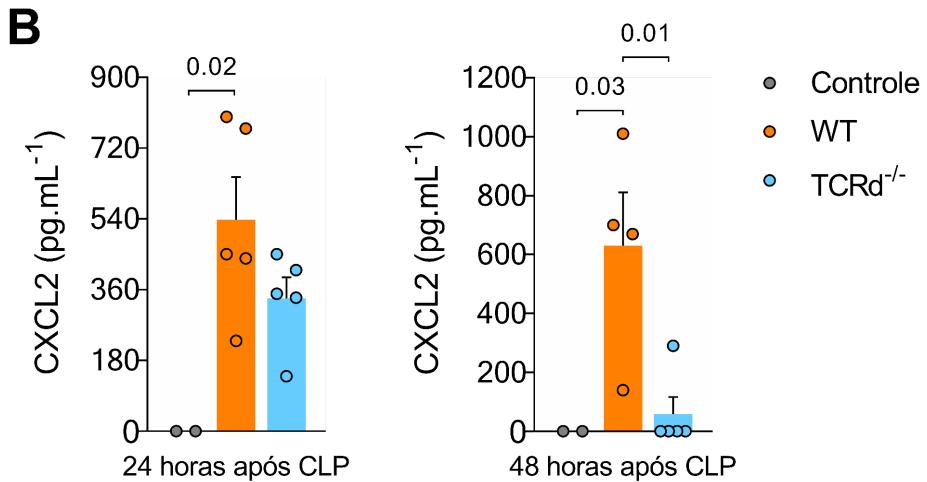
**Figura 10: Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam menor quantidade de marcador bioquímico de lesão renal.** Análise bioquímica do sangue demonstrando a função renal através da concentração de ureia nitrogenada em 48 horas após a administração de LPS (3 mg/kg) em camundongos WT e KO. O experimento foi repetido independentemente por duas vezes e foram utilizados seis camundongos em cada grupo, com exceção do grupo controle com três camundongos. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

#### 4.5. Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam menor inflamação sistêmica

Nosso próximo passo foi avaliar os níveis de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias na circulação sistêmica de camundongos sépticos WT e deficientes de células T  $\gamma\delta$ .

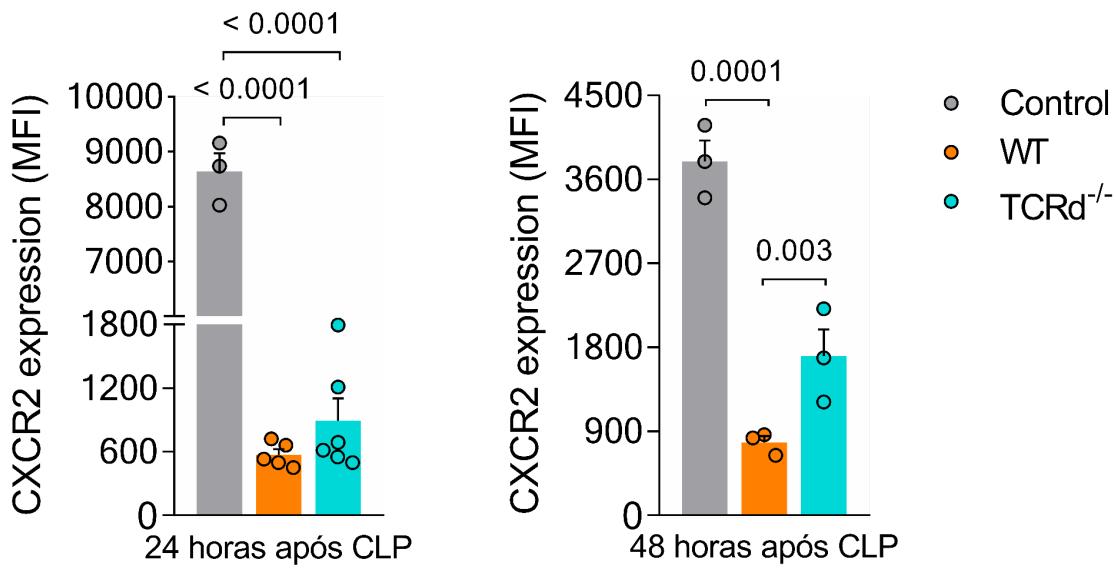
Nesse sentido, avaliamos a produção de IL-6 no plasma e não observamos diferença após 6 horas da indução de sepse entre os camundongos deficientes de células T  $\gamma\delta$  e camundongos WT (figura 11A). Contudo, observamos uma redução significativa dos níveis de IL-6 em camundongos deficientes de células T  $\gamma\delta$  após 24 horas da indução de sepse em relação aos camundongos sépticos WT (figura 11A). Um outro fator importante para análise a nível sistêmico é o ligante de quimiocina 2 (CXCL2). Na figura 11B, observamos menores níveis de CXCL2 no plasma dos camundongos  $TCR\delta^{-/-}$  em 48 horas após a indução de sepse em relação aos camundongos WT.





**Figura 11: Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam um menor nível sistêmico de inflamação quando submetidos à sepse grave.** Avaliação do nível sistêmico de inflamação através da dosagem de IL-6 (A) e de CXCL2 (B) em camundongos controles, sépticos WT e KO na circulação sanguínea após indução de sepse grave por CLP, utilizando o teste de Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Os experimentos foram repetidos independentemente por três vezes e foram utilizados cinco camundongos em cada grupo, com exceção do grupo controle com três camundongos. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

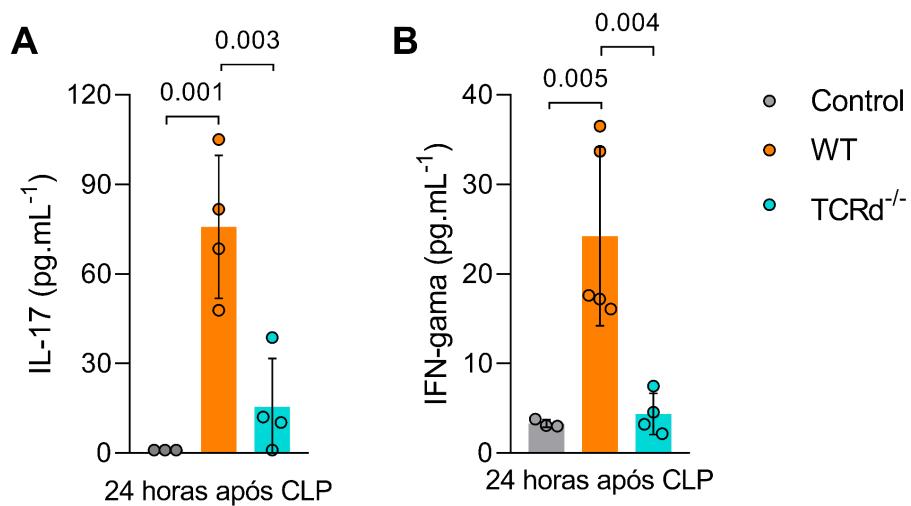
Em seguida, na figura 12, observamos que a expressão de CXCR2 em neutrófilos de camundongos submetidos à sepse letal foi significativamente reduzida quando comparada com expressão em camundongos do grupo controle, já descrito por Alves-Filho (2008). No entanto, não observamos diferença na expressão de CXCR2 em neutrófilos entre camundongos deficientes de células T  $\gamma\delta$  e WT, após 24 horas da indução de sepse. Em 48 horas após CLP, os neutrófilos circulantes em camundongos deficientes de células T  $\gamma\delta$  apresentam uma maior expressão de CXCR2 em comparação aos camundongos WT.



**Figura 12: Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam maior expressão de CXCR2 nos neutrófilos quando submetidos à sepse grave.** Avaliação da expressão de CXCR2 em neutrófilos circulantes em animais controles ou submetidos à sepse grave WT e KO, utilizando a citometria de fluxo, nos tempos 24 e 48 horas. O experimento foi repetido independentemente por duas vezes e foram utilizados seis camundongos em cada grupo, com exceção do grupo controle com três camundongos. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

#### 4.6. Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam menores níveis de IL-17 no foco da infecção

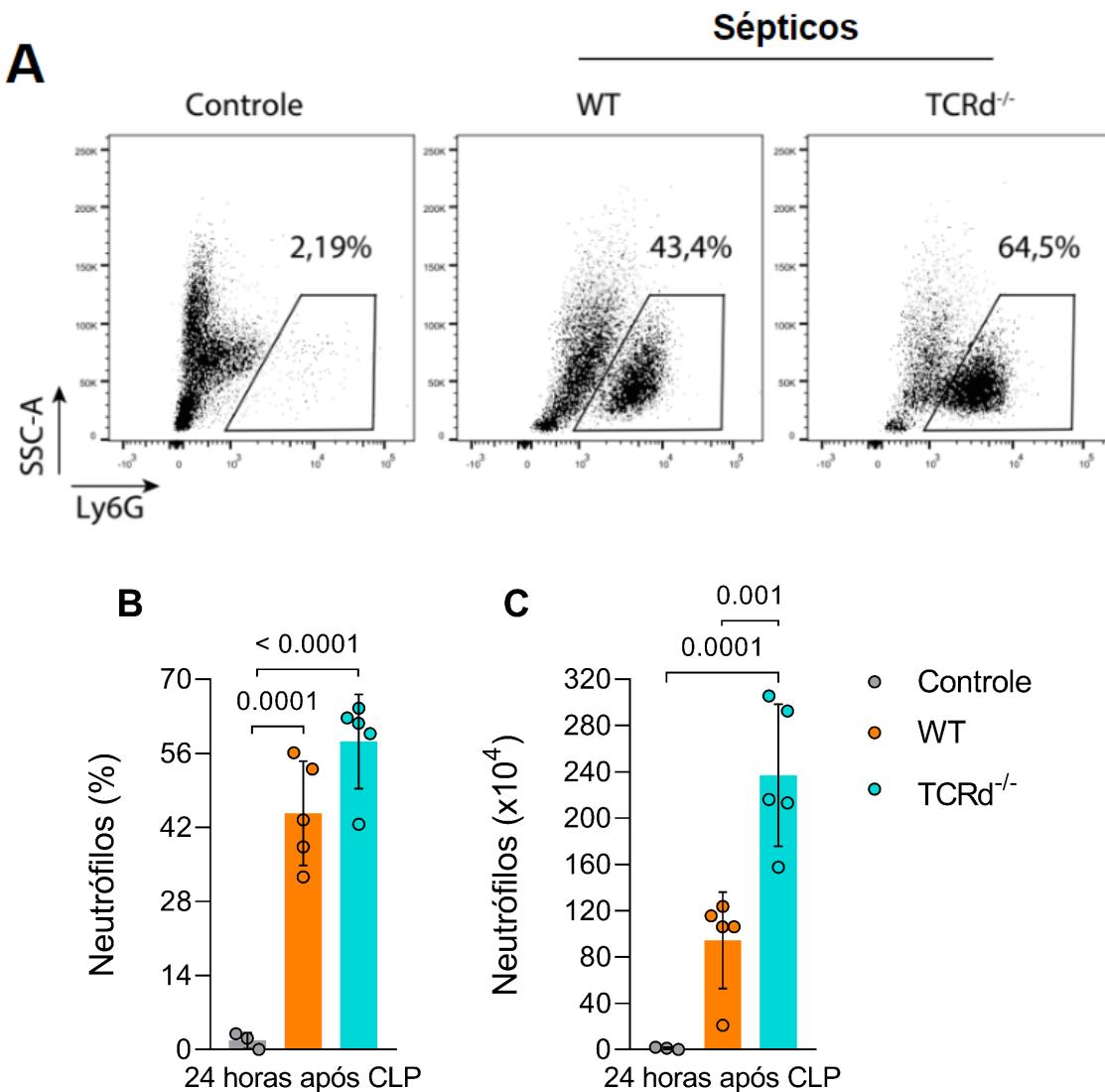
Para compreender se os níveis de citocinas produzidas pelas células T  $\gamma\delta$  pode ser afetada pela ausência destas células durante a sepse, dosamos os níveis de IL-17 e IFN- $\gamma$  em camundongos WT e TCRd<sup>-/-</sup> na cavidade peritoneal. Como esperado, encontramos menores níveis de IL-17 e IFN- $\gamma$  nos camundongos TCRd<sup>-/-</sup> em relação aos camundongos WT no foco da infecção em 24 horas após indução de sepse (figura 13).



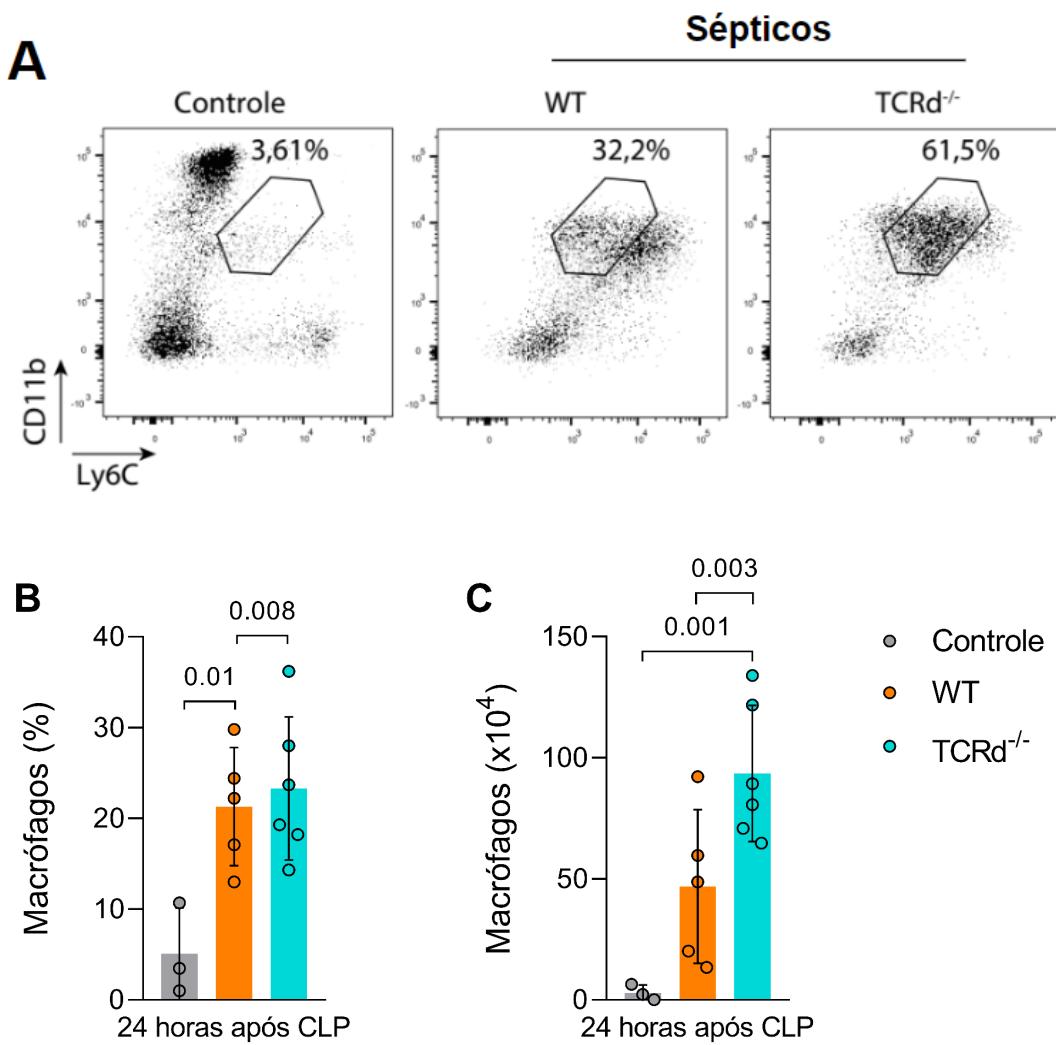
**Figura 13: Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam menores níveis de IL-17 e IFN-gama no foco da infecção após indução de sepse.** Dosagem da concentração de IL-17 (A) e de IFN-gama (B) em camundongos controles, sépticos WT e sépticos KO na cavidade peritoneal após a indução de sepse grave por CLP, utilizando o teste de Ensaio Imunoenzimático (ELISA). O experimento foi repetido independentemente por três vezes e foram utilizados cinco camundongos em cada grupo, com exceção do grupo controle com três camundongos. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

#### 4.7. Camundongos deficientes de células T $\gamma\delta$ apresentam maior quantidade de neutrófilos e macrófagos no foco da infecção

Também, avaliamos a presença de neutrófilos e macrófagos na cavidade peritoneal para observar se estas células imunes são moduladas em organismos deficientes de células T  $\gamma\delta$ . Nesses camundongos, observamos aumento da frequência e no número de neutrófilos após 24 horas da indução de sepse em relação aos camundongos WT (Figura 14). Além disso, encontramos um aumento no número de macrófagos em camundongos TCRd<sup>-/-</sup> em 24 horas após a indução de sepse quando comparados aos camundongos WT (Figura 15C). Não observamos aumento na frequência de macrófagos nesses camundongos em 24 horas após a CLP.



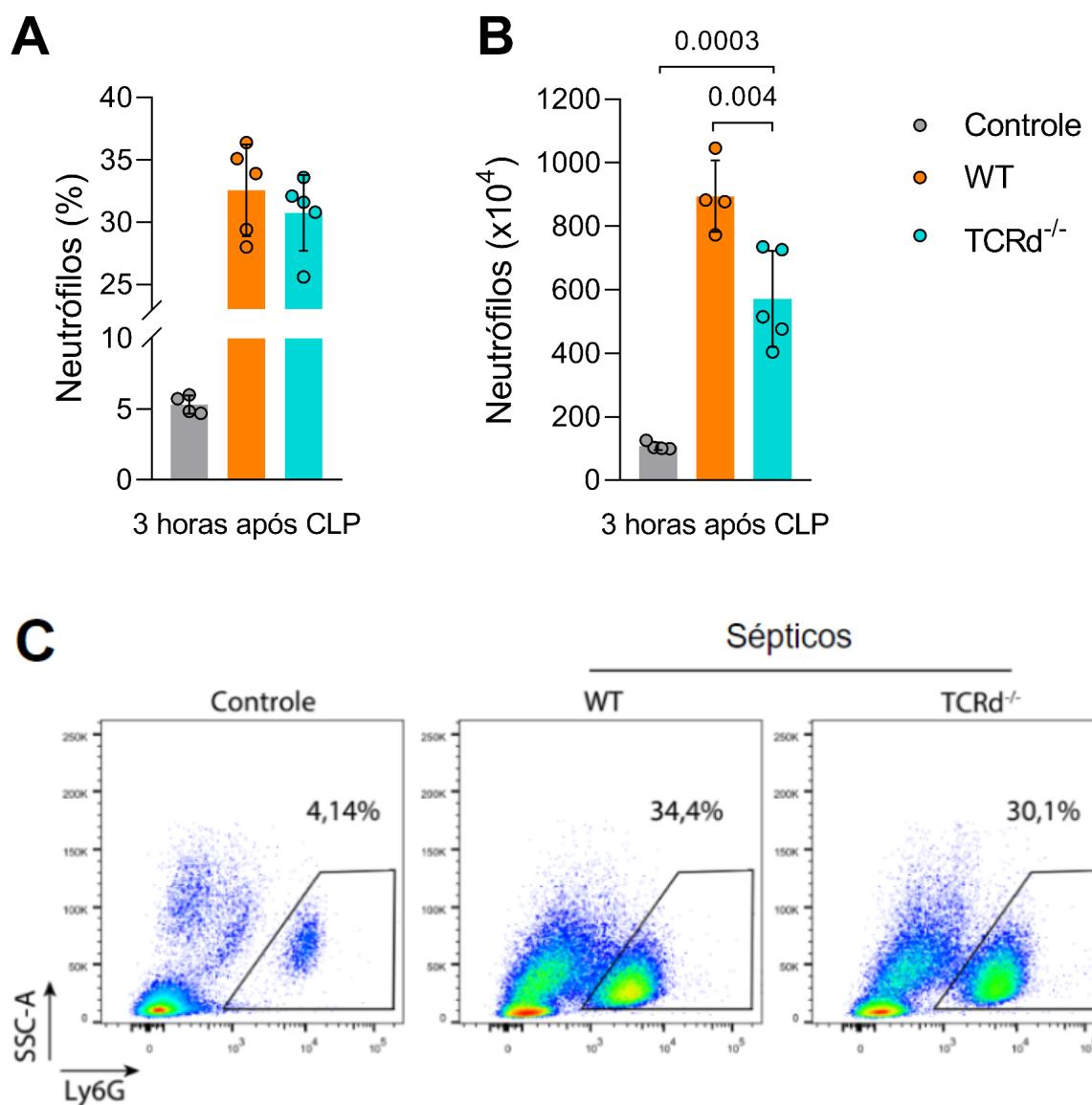
**Figura 14: Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam um maior infiltrado de neutrófilos no foco da infecção.** Dotplot representativo (A), frequência (B) e número de neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>) (C) presentes na cavidade peritoneal de camundongos WT e KO após a indução de sepse grave por CLP, determinados por citometria de fluxo. O experimento foi repetido independentemente por duas vezes e foram utilizados cinco camundongos em cada grupo, com exceção do grupo controle com três camundongos. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

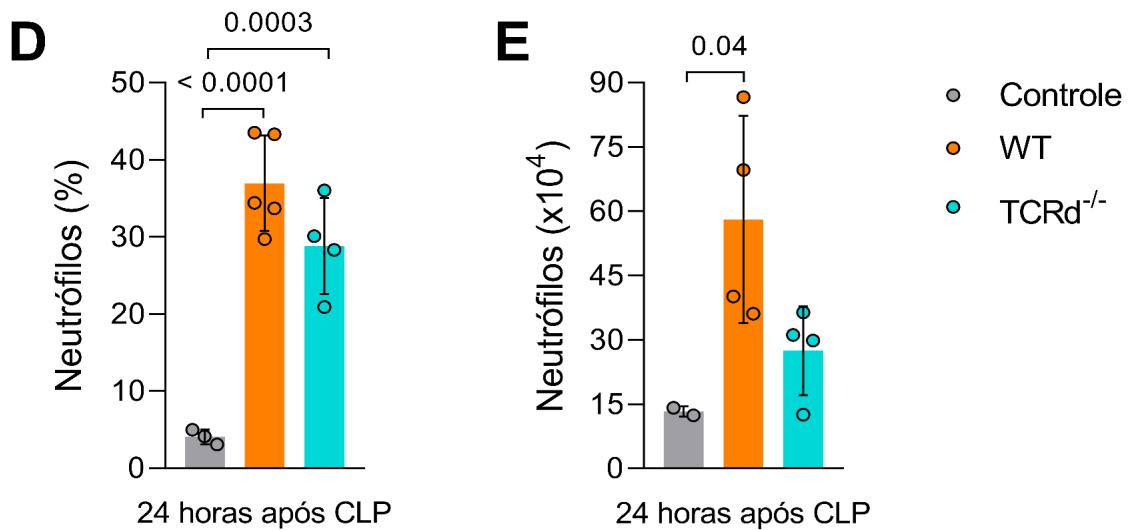


**Figura 15: Camundongos deficientes em células T gama delta apresentam um infiltrado de macrófagos no foco da infecção.** Dotplot representativo (A), frequência (B) e número (C) de macrófagos presentes na cavidade peritoneal de camundongos WT e KO após a indução de sepse grave por CLP, determinados por citometria de fluxo. O experimento foi repetido independentemente por duas vezes e foram utilizados cinco camundongos em cada grupo, com exceção do grupo controle com três camundongos. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

#### 4.8. Camundongos deficientes de células T $\gamma\delta$ apresentam menor infiltrado de neutrófilos nos pulmões e lesão tecidual reduzida

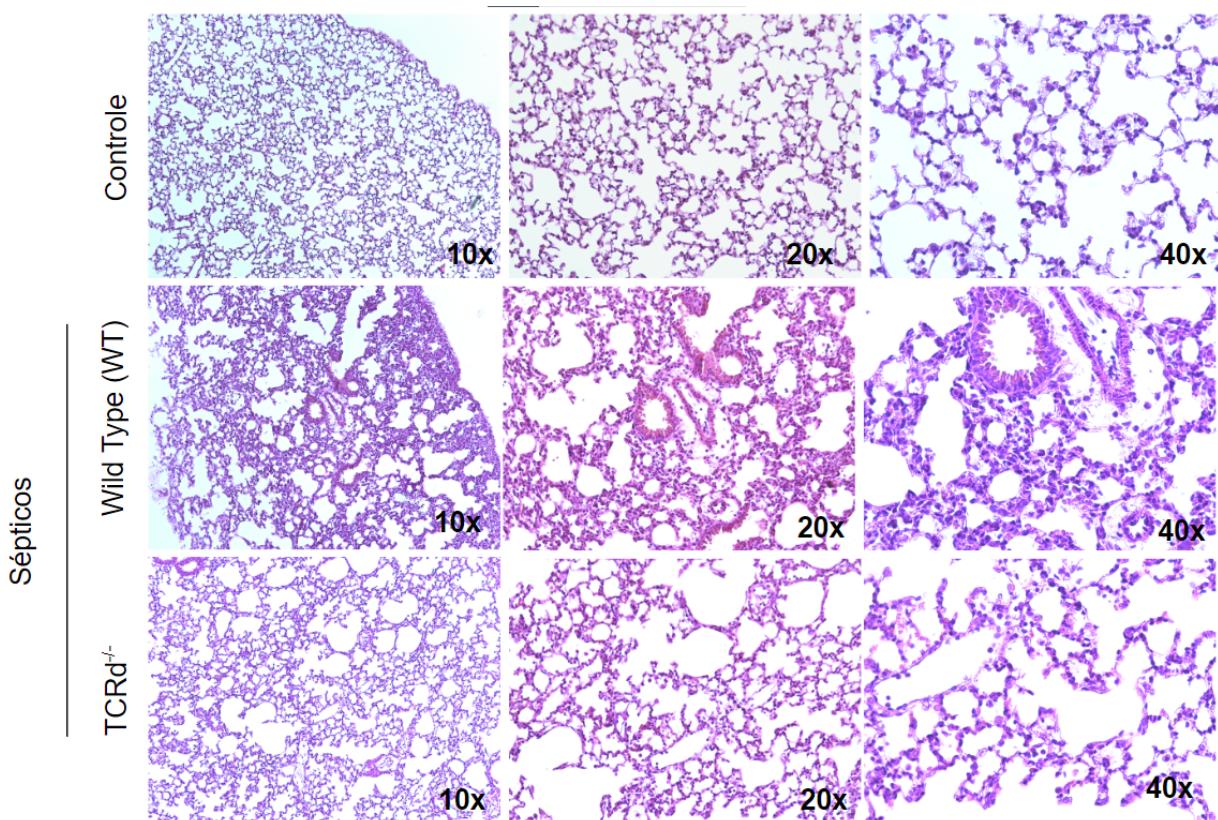
Nosso próximo passo foi avaliar a quantidade de neutrófilos no tecido pulmonar de camundongos sépticos WT e TCRd $^{-/-}$ . De maneira oposta ao que foi observado na cavidade peritoneal, encontramos menor número de neutrófilos no tecido pulmonar em camundongos TCRd $^{-/-}$  em 3 horas após a indução de sepse em comparação aos camundongos WT (Figura 16). Uma menor quantidade de neutrófilos também foi encontrada no tecido pulmonar em 24 horas após a indução de sepse nos camundongos TCRd $^{-/-}$  em comparação aos camundongos WT.





**Figura 16: Camundongos deficientes de células T gama delta apresentam um menor infiltrado de neutrófilos no pulmão.** Dotplot representativo, frequência e número de neutrófilos ( $Ly6G^+$ ) presentes no tecido pulmonar de camundongos WT e KO em 3 e 24 horas após a indução de sepse experimental grave por CLP, determinados por citometria de fluxo. O experimento foi repetido independentemente por duas vezes e foram utilizados cinco camundongos em cada grupo, com exceção do grupo controle com três camundongos. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA com correção de Bonferroni, nível de significância:  $p < 0,05$ ).

Em seguida, foi realizada análise histopatológica para observar se o tecido pulmonar também apresentava menor lesão tecidual após a indução de sepse como indicado pelos dados bioquímicos para os rins e para o fígado. Nos camundongos sépticos WT, os cortes corados com hematoxilina e eosina revelaram maiores alterações estruturais e um maior infiltrado celular no tecido pulmonar em comparação aos camundongos TCRd<sup>-/-</sup>. Os camundongos deficientes de células T  $\gamma\delta$  apresentaram mudança estrutural do tecido, porém em um menor grau do que os camundongos WT em 24 horas após a indução de sepse (Figura 17).



**Figura 17: Fotomicrografias de secções de tecido pulmonar com coloração de hematoxilina e eosina de camundongos saudáveis (controle), camundongos sépticos WT e camundongos sépticos deficientes de células T  $\gamma\delta$  (TCRd $^{-/-}$ ). Imagens representativas de 6 camundongos de cada grupo. Objetivas 10x, 20x e 40x.**

## 5. DISCUSSÃO

Durante a realização deste trabalho, tivemos como objetivo compreender o papel das células T  $\gamma\delta$  durante a sepse polimicrobiana de intensidade grave induzida em camundongos. O modelo experimental de sepse, por CLP, é capaz de representar mais fielmente o processo de desenvolvimento de sepse que ocorre em humanos (Hubbard et al., 2005). O modelo consiste na indução de uma infecção local pelo extravasamento de bactérias do intestino para a cavidade peritoneal. Assim, a administração de antibiótico nos camundongos teve como intuito controlar a infecção local e sistêmica após a indução de sepse grave, mimetizando a terapêutica que ocorre na clínica. Desse modo, podemos relacionar o desfecho da doença com os mecanismos de tolerância do organismo no modelo utilizado.

Inicialmente, avaliamos a quantidade de células T  $\gamma\delta$  no foco da infecção e nos pulmões de camundongos WT submetidos a sepse grave pelo método de CLP.

Essas células se assemelham às células do sistema imune inato em responderem rapidamente a uma infecção sendo capazes de se tornarem ativadas rapidamente. (WENCKER et al., 2014; PARKER; CIOFANI, 2020). Essa rápida ativação é explicada por essas células já estarem presentes no tecido e responderem a抗ígenos patogênicos, o que condiz com os nossos resultados no qual não observamos aumento da quantidade de células T  $\gamma\delta$  na cavidade peritoneal e pulmões, indicando que dentro do tempo de 24 horas após a indução de sepse não houve migração para o foco infeccioso.

A princípio, acreditava-se que a principal fonte de IL-17 eram as células T alfa beta (VELDHOEN et al., 2006). No entanto, observaram que as células T  $\gamma\delta$  juntamente com as células NK, as células NKT e várias populações de células linfóides inatas (ILCs) são capazes de produzir e secretar a IL-17. Assim, as células T  $\gamma\delta$  se mostraram importantes para a rápida produção de IL-17 em resposta a diversas infecções bacterianas já que promove o recrutamento de neutrófilos levando ao controle da infecção (SUTTON; MIELKE; MILLS, 2012). Utilizando o método de citometria de fluxo, observamos um rápido aumento na produção de IL-17 pelas células T  $\gamma\delta$  no foco infeccioso em 3 horas após a indução de sepse. Também dosamos a citocina através do ensaio de ELISA e observamos maiores níveis de IL-17 na cavidade peritoneal no início do desenvolvimento da doença. Desta forma, os dados obtidos sugerem que houve um aumento na quantidade de IL-17 devido ao aumento de sua produção pelas células T  $\gamma\delta$ . Em 24 horas após a indução de sepse, os níveis de IL-17 diminuem possivelmente pela alta inflamação sistêmica que promove morte celular. Ao avaliar a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T  $\gamma\delta$  no local da infecção, vimos que não houve alteração nos níveis da citocina em até 24 horas após a indução de sepse. Uma possível explicação para esse dado seria de que a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T  $\gamma\delta$  atingem os níveis máximos após o segundo dia de indução de sepse ou em torno do quinto dia após a indução de sepse, como visto por SELIN et al. (2001) e FERRICK et al. (1995), respectivamente. As células T  $\gamma\delta$  são produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-17 dependendo da expressão de moléculas em sua superfície e de diferentes estímulos recebidos durante o desenvolvimento. Com base nos resultados obtidos, podemos sugerir que as células T  $\gamma\delta$  produtoras de IL-17 estão presentes no foco da infecção em maior número do que as células T  $\gamma\delta$  produtoras de IFN- $\gamma$ .

Nos pulmões, não observamos alteração no número de células T  $\gamma\delta$  no primeiro dia após a indução de sepse muito provavelmente por estar no início do desenvolvimento da doença. Embora não tenhamos analisado, é provável que a quantidade de células T  $\gamma\delta$  no tecido pulmonar aumente conforme a inflamação sistêmica fique mais intensa, com aumento de citocinas e quimiocinas inflamatórias na circulação sanguínea e recrutamento de células imunes para o tecido. Também observamos a produção de IL-17 pelas células T  $\gamma\delta$  nos pulmões e vimos que, apesar do número de células T  $\gamma\delta$  não apresentar alteração significativa em 24 horas após a indução de sepse, houve um aumento da produção de IL-17 por células T  $\gamma\delta$  e um aumento da quantidade dessa citocina no órgão. Dessa forma, demonstramos que ocorre uma rápida ativação das células T  $\gamma\delta$  produtoras de IL-17 no foco infeccioso e também nos pulmões durante a sepse experimental.

Após compreender melhor as características das células T  $\gamma\delta$  durante a sepse em camundongos WT, decidimos utilizar camundongos deficientes de células T  $\gamma\delta$  (TCRd $^{-/-}$ ) para entender a influência destas células ao decorrer da doença visto que ainda há contradições na literatura. No trabalho de TSCHÖP et al. (2008) foi examinado o papel das células T  $\gamma\delta$  durante a sepse utilizando o método de CLP e foi observado que camundongos deficientes de células T  $\gamma\delta$  apresentaram aumento na taxa de mortalidade, nos níveis de IL-6 sistêmico e lesões renais após a indução de sepse em comparação a camundongos WT. Além disso, observaram um aumento na bacteremia de camundongos TCRd $^{-/-}$ , sendo assim, um dos fatores agravantes para a alta taxa de mortalidade. No mesmo trabalho, o pesquisador utilizou do tratamento com antibiótico e avaliou a carga bacteriana nos camundongos WT e TCRd $^{-/-}$ . No entanto, o tratamento não apresentou diferença significativa na taxa de mortalidade dos camundongos KO, sugerindo que as células T  $\gamma\delta$  estão envolvidas no controle da carga bacteriana, mas a carga bacteriana aumentada em camundongos deficientes de células T  $\gamma\delta$  não é o fator contribuinte para o aumento da mortalidade observada nesses camundongos. Um outro estudo realizado na sepse clínica por Andreu-Ballester et al. (2013) indica que a mortalidade de pacientes sépticos está associada a uma diminuição significativa nas células T  $\gamma\delta$ .

Por outro lado, o trabalho de FLIERL et al. (2008) demonstrou que os camundongos TCRd $^{-/-}$  apresentaram uma sobrevida significativamente maior após a

sepse induzida por CLP em comparação aos camundongos WT. Flierl sugeriu que a produção de IL-17 por células T γδ pode promover altos níveis de mediadores pró-inflamatórios, resultando em maior letalidade. Em nosso trabalho, acompanhamos a sobrevida de camundongos WT e TCRd<sup>-/-</sup> após a indução de sepse grave e com administração de antibioticoterapia. Com isso, observamos que as células T γδ apresentam um papel prejudicial nos camundongos submetidos à sepse experimental com uma taxa de mortalidade 5 vezes maior do que em camundongos TCRd<sup>-/-</sup>. No modelo de endotoxemia por LPS também observamos o mesmo efeito deletério dessas células nos camundongos WT.

Nos experimentos em que foram utilizados o modelo de CLP, avaliamos a carga bacteriana no local infeccioso e na corrente sanguínea para analisar o controle bacteriano nos camundongos durante a sepse. Não observamos diferença significativa na carga bacteriana entre os camundongos WT e TCRd<sup>-/-</sup> da cavidade peritoneal e da circulação sistêmica, o que indica que a antibioticoterapia foi eficaz em controlar e equiparar a bacteremia dos dois grupos estudados. O modelo de endotoxemia por LPS promove uma inflamação decorrente da presença de produtos tóxicos e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, neste modelo não há variação na carga bacteriana do camundongo. Os dois modelos escolhidos para avaliar a taxa de sobrevida dos camundongos WT e deficientes de células T γδ são importantes para observar que a diferença de sobrevida entre os grupos não está associada aos mecanismos de combate à infecção, mas sim aos mecanismos de tolerância ao dano. Sugerindo que a maior resistência observada nos camundongos TCRd<sup>-/-</sup> quando submetidos à sepse grave, pode estar relacionada à uma menor promoção de lesão de órgãos acarretada pela ativação de células T γδ.

Durante a sepse, a infecção desencadeia uma complexa resposta do hospedeiro, no qual mecanismos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios podem contribuir para o controle da infecção e recuperação do tecido. Por outro lado, esses mesmos mediadores podem contribuir para lesão de órgãos e infecções secundárias (VAN DER POLL; OPAL, 2008). Observamos uma menor lesão hepática e renal em camundongos TCRd<sup>-/-</sup> no modelo de CLP. No modelo de endotoxemia também vimos uma menor lesão renal em camundongos KO. Desta maneira, nossos resultados sugerem que os camundongos deficientes de células T

$\gamma\delta$  apresentam uma maior tolerância aos danos causados pela sepse, sendo esse um possível fator contribuinte para uma maior taxa de sobrevida destes camundongos.

Outro fator que observamos foram os menores níveis de IL-6 em camundongos TCRd<sup>-/-</sup> em relação aos camundongos WT após a indução de sepse. A IL-6 é uma citocina inflamatória produzida por leucócitos, células endoteliais, células mesenquimais, fibroblastos e outras diversas células em resposta a estímulos pró-inflamatórios. Esta citocina participa da defesa do hospedeiro contra infecções e lesões teciduais, desempenhando um importante papel na regulação das reações inflamatórias e os altos níveis de IL-6 vêm sendo relacionados com um maior risco e taxa de mortalidade na sepse (VAN SNICK, 1990; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). Em nossos resultados encontramos altos níveis de IL-6 em camundongos WT e que também apresentaram maior taxa de mortalidade e maior intensidade de marcadores de lesão tecidual. Assim, demonstramos que camundongos que possuem células T  $\gamma\delta$  no organismo apresentam maior inflamação sistêmica ocasionando maior lesão de órgãos e maior taxa de mortalidade em relação aos camundongos que não possuem estas células.

Como esperado, observamos uma redução na produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  em camundongos deficientes em células T  $\gamma\delta$  após a indução de sepse, ressaltando o importante papel das células T  $\gamma\delta$  na produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a diminuição desses mediadores nos animais KO ajudam a explicar a menor indução de inflamação e maior sobrevida desses camundongos durante a sepse. Sabemos que tanto a IL-6 quanto a IL-17 desempenham funções necessárias para o controle da infecção. No entanto, quando estas citocinas estão em excesso, podem causar danos e lesões teciduais para o organismo.

Um outro fator avaliado foi o recrutamento de células imunes para o local de infecção. Nosso grupo de pesquisa já descreveu uma redução na migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse grave utilizando o modelo de CLP acarretando o descontrole da infecção e morte (ALVES-FILHO et al., 2008). Em nosso trabalho, observamos que os camundongos WT apresentam menor migração de neutrófilos e macrófagos quando comparados aos camundongos TCRd<sup>-/-</sup> na cavidade peritoneal. Observamos que, de algum modo, a ausência de células T  $\gamma\delta$

favorece a migração de neutrófilos para o local de infecção, mas seria necessário um outro estudo para compreender quais os mecanismos envolvidos nessa resposta.

Com tudo, apesar da IL-17 apresentar função de recrutamento de células do sistema imune para o local de infecção, em nosso modelo, a citocina aparenta não ser essencial para no recrutamento dessas células considerando que em camundongos deficientes de células T  $\gamma\delta$  observamos menores quantidades de IL-17 no foco infeccioso. Nesse sentido, acreditamos que há outro fator influenciando na migração de células imunes para a cavidade peritoneal mais intensamente em camundongos TCRd $^{-/-}$ , possivelmente em decorrência do aumento da expressão de CXCR2 em neutrófilos.

O CXCL2 é uma proteína quimiotática, secretada por mastócitos e macrófagos em fases iniciais do recrutamento de células imunes para os tecidos, de forma que está associada à sinalização de ativação e direcionamento dessas células através do receptor CXCR2 para os locais de e inflamação (LOMAS-NEIRA; AYALA, 2007; DE FILIPPO et al., 2013). E o receptor de quimiocina CXCR2 é altamente expresso em neutrófilos e medeia a quimiotaxia dessas células em resposta a diversos tipos de infecções e lesões teciduais. A sinalização via receptor CXCR2 apresenta um papel essencial no recrutamento de neutrófilos para o foco de infecção (SEREE-APHINAN et al., 2020; SOUTO et al., 2011). Nesse sentido, dosamos a quimiocina na circulação sanguínea e a expressão de seu ligante em neutrófilos. Apesar de observar menores níveis sistêmicos de CXCL2 em camundongos TCRd $^{-/-}$ , vimos uma menor internalização de seu receptor nos neutrófilos desses camundongos. O fato da expressão de CXCR2 estar aumentada nesses camundongos pode ser um dos motivos da maior migração de neutrófilos observada para a cavidade peritoneal. Demonstrando que os camundongos deficientes em células T  $\gamma\delta$ , por apresentarem menor inflamação sistêmica, favorecem a migração de neutrófilos pela menor internalização do CXCR2 nessas células.

A lesão pulmonar aguda e a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) são as principais decorrências da falência múltipla de órgãos associada à sepse (SESSLER et al., 1996; KUMAR, 2020). Estudos indicam que a migração e a

ativação de leucócitos no pulmão levam à disfunção orgânica e podem progredir para SDRA. O papel das células T  $\gamma\delta$  nos pulmões durante a sepse ainda está em debate. Tam, King e Beaman (2001) demonstraram que as células T  $\gamma\delta$  são importantes para a resistência do hospedeiro à infecção pulmonar, visto que em camundongos sem essas células funcionalmente ativas, as infecções bacterianas resultaram em danos pulmonares inflamatórios aumentados devido ao descontrole da infecção. Outro estudo apresenta o mesmo achado, na ausência de células T  $\gamma\delta$ , há uma redução no recrutamento de macrófagos e consequente maior crescimento bacteriano, o que resulta em aumento do dano tecidual associado ao recrutamento de neutrófilos (SAUNDERS et al., 1998).

Desse modo, tivemos como objetivo analisar este órgão durante a sepse e, por citometria de fluxo, observamos menor presença de neutrófilos nos pulmões de camundongos TCRd $^{-/-}$ . Nossos resultados indicam que no tecido pulmonar, as citocinas pró-inflamatórias, IL-17 e IFN- $\gamma$ , produzidas pelas células T  $\gamma\delta$  apresentam função relevante para o recrutamento de neutrófilos para o órgão. Além disso, confirmamos um menor infiltrado de células imunes nos pulmões pela análise histológica e, consequentemente, observamos uma menor presença de lesão pulmonar.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos dados indicam que as células T  $\gamma\delta$  participamativamente da patogênese da sepse. Demonstrou-se que, no modelo de sepse por CLP com o controle da infecção através do tratamento com antibióticos, as células T  $\gamma\delta$  contribuem com o aumento da resposta inflamatória que resulta em lesões teciduais e, consequentemente, diminuição da sobrevida. Com isso, concluímos que as células T  $\gamma\delta$  podem apresentar um papel deletério durante a sepse experimental grave e é sugerido que a regulação de sua atividade por ser um potencial alvo terapêutico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-FILHO, José C. et al. **The role of neutrophils in severe sepsis.** Shock, v. 30, n. 7, p. 3-9, 2008.
- AMARAL, André; OPAL, Steven; VINCENT, Jean-Louis. **Coagulation in sepsis.** Intensive care medicine, v. 30, n. 6, p. 1032–1040, 2004.
- ANDREU-BALLESTER, Juan C. et al. **Association of  $\gamma\delta$  T cells with disease severity and mortality in septic patients.** Clinical and Vaccine Immunology, v. 20, n. 5, p. 738-746, 2013.
- ANGUS, Derek C. et al. **Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.** Critical care medicine, v. 29, n. 7, p. 1303-1310, 2001.
- ASARNOW, David M. et al. **Limited diversity of  $\gamma\delta$  antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells.** Cell, v. 55, n. 5, p. 837-847, 1988.
- BARTON, G. M.; MEDZHITOV, R. **Toll-like receptors and their ligands.** Toll-like receptor family members and their ligands, p. 81-92, 2002.
- BENDELAC, Albert; BONNEVILLE, Marc; KEARNEY, John F. **Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes.** Nature Reviews Immunology, v. 1, n. 3, p. 177-186, 2001.
- BONE, Roger C. **Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS).** Annals of internal medicine, v. 125, n. 8, p. 680-687, 1996.
- BONE, Roger C.; GRODZIN, Charles J.; BALK, Robert A. **Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process.** Chest, v. 112, n. 1, p. 235-243, 1997.
- BONE, Roger C.; SIBBALD, William J.; SPRUNG, Charles L. **The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure.** Chest, v. 101, n. 6, p. 1481-1483, 1992.

BONNEVILLE, Marc; O'BRIEN, Rebecca L.; BORN, Willi K.  **$\gamma\delta$  T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity.** *Nature Reviews Immunology*, v. 10, n. 7, p. 467-478, 2010.

BONNEVILLE, Marc; O'BRIEN, Rebecca L.; BORN, Willi K.  **$\gamma\delta$  T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity.** *Nature Reviews Immunology*, v. 10, n. 7, p. 467-478, 2010.

BORN, Willi K.; KEMAL AYDINTUG, M.; O'BRIEN, Rebecca L. **Diversity of  $\gamma\delta$  T-cell antigens.** *Cellular & molecular immunology*, v. 10, n. 1, p. 13-20, 2013.

CERRA, Frank B. **The Systemic Septic Response: Multiple Systems Organ Failure.** *Critical care clinics*, v. 1, n. 3, p. 591-607, 1985.

CHAN, James K. et al. **Alarmins: awaiting a clinical response.** *The Journal of clinical investigation*, v. 122, n. 8, p. 2711-2719, 2012.

CHUNG, Chun-Shiang et al. **Deficiency of  $\gamma\delta$  T lymphocytes contributes to mortality and immunosuppression in sepsis.** *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 291, n. 5, p. R1338-R1343, 2006.

DANAHY, Derek B. et al. **Clinical and experimental sepsis impairs CD8 T-cell-mediated immunity.** *Critical Reviews™ in Immunology*, v. 36, n. 1, 2016.

DAVIS, Mark M.; BJORKMAN, Pamela J. **T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.** *Nature*, v. 334, n. 6181, p. 395-402, 1988.

DE FILIPPO, Katia et al. **Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation.** *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 121, n. 24, p. 4930-4937, 2013.

DIELI, Francesco et al. **Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T lymphocytes.** *The Journal of infectious diseases*, v. 184, n. 8, p. 1082-1085, 2001.

ESTEBAN, Andrés et al. **Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward.** Critical care medicine, v. 35, n. 5, p. 1284-1289, 2007.

FERRICK, David A. et al. **Differential production of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 in response to Th1-and Th2-stimulating pathogens by  $\gamma\delta$  T cells in vivo.** Nature, v. 373, n. 6511, p. 255-257, 1995.

FLIERL, Michael A. et al. **Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis.** The FASEB Journal, v. 22, n. 7, p. 2198-2205, 2008.

FUNK, Duane J.; PARRILLO, Joseph E.; KUMAR, Anand. **Sepsis and septic shock: a history.** Critical care clinics, v. 25, n. 1, p. 83-101, 2009.

GEROULANOS, Stefanos; DOUKA, Evangelia T. **Historical perspective of the word “sepsis”.** Intensive care medicine, v. 32, n. 12, p. 2077-2077, 2006.

HAAS, Werner; PEREIRA, Pablo; TONEGAWA, Susumu. **Gamma/delta cells.** Annual review of immunology, v. 11, n. 1, p. 637-685, 1993.

HAYDAY, Adrian C. **Gamma delta cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection.** Annual review of immunology, v. 18, p. 975-1026, 2000.

HAYDAY, Adrian C.  **$\gamma\delta$  T cells and the lymphoid stress-surveillance response.** Immunity, v. 31, n. 2, p. 184-196, 2009.

HEIT, Bryan et al. **An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients.** The Journal of cell biology, v. 159, n. 1, p. 91-102, 2002.

HOTCHKISS, Richard S. et al. **Sepsis and septic shock.** Nature reviews Disease primers, v. 2, n. 1, p. 1-21, 2016.

HOTCHKISS, Richard S.; KARL, Irene E. **The pathophysiology and treatment of sepsis.** New England journal of medicine, v. 348, n. 2, p. 138-150, 2003.

HOTCHKISS, Richard S.; MONNERET, Guillaume; PAYEN, Didier. **Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy.** *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 12, p. 862-874, 2013.

KUMAR, Vijay. **Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury.** *Frontiers in immunology*, v. 11, p. 1722, 2020.

LALOR, Stephen J. et al. **Caspase-1-processed cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 promote IL-17 production by  $\gamma\delta$  and CD4 T cells that mediate autoimmunity.** *The Journal of Immunology*, v. 186, n. 10, p. 5738-5748, 2011.

LEVY, Mitchell M.; FINK, Mitchell P. **SCCM/ESICM/ACCP/ATs/SIS International Sepsis Definitions Conference.** 2003.

LOMAS-NEIRA, Joanne L.; AYALA, Alfred. **CXCL2 polymorphism in sepsis and acute respiratory distress syndrome: pathological significance lost in translation.** *Critical care medicine*, v. 35, n. 10, p. 2439-2440, 2007.

MACHADO, Flavia R. et al. **The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, 2017.

MAJNO, Guido. **The ancient riddle of σηψις (sepsis).** *The Journal of infectious diseases*, v. 163, n. 5, p. 937-945, 1991.

MARTIN, Greg S. et al. **The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.** *New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 16, p. 1546-1554, 2003.

MORATH, Anna; SCHAMEL, Wolfgang W.  **$\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell receptors: Similar but different.** *Journal of leukocyte biology*, v. 107, n. 6, p. 1045-1055, 2020.

PARKER, Morgan E.; CIOFANI, Maria. **Regulation of  $\gamma\delta$  T cell effector diversification in the thymus.** *Frontiers in immunology*, v. 11, p. 42, 2020.

PAUL, Sourav et al. **Phenotypic and Functional Plasticity of Gamma-Delta ( $\gamma\delta$ ) T Cells in Inflammation and Tolerance**. International reviews of immunology, v. 33, n. 6, p. 537-558, 2014.

PAULUS, Patrick; JENNEWEIN, Carla; ZACHAROWSKI, Kai. **Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis?**. Biomarkers, v. 16, n. sup1, p. S11-S21, 2011.

RAETZ, Christian RH. **Biochemistry of endotoxins**. Annual review of biochemistry, v. 59, n. 1, p. 129-170, 1990.

RHODES, Andrew et al. **Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016**. Intensive care medicine, v. 43, n. 3, p. 304-377, 2017.

RUDD, Kristina E. et al. **Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study**. The Lancet, v. 395, n. 10219, p. 200-211, 2020.

SAUNDERS, Bernadette M. et al. **Role of  $\gamma\delta$  T cells in immunopathology of pulmonary *Mycobacterium avium* infection in mice**. Infection and Immunity, v. 66, n. 11, p. 5508-5514, 1998.

SELIN, Liisa K. et al. **Innate immunity to viruses: control of vaccinia virus infection by  $\gamma\delta$  T cells**. The Journal of Immunology, v. 166, n. 11, p. 6784-6794, 2001.

SEREE-APHINAN, Chutima et al. **Distinguishing sepsis from infection by neutrophil dysfunction: a promising role of CXCR2 surface level**. Frontiers in immunology, v. 11, p. 608696, 2020.

SESSLER, Curtis N. et al. **Current concepts of sepsis and acute lung injury**. Clinics in chest medicine, v. 17, n. 2, p. 213-235, 1996.

SILVA, Eliézer et al. **Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study)**. Critical Care, v. 8, n. 4, p. 1-10, 2004.

SINGER, M. et al. **Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis**. WHO, 2017.

SINGER, Mervyn et al. **The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)**. *Jama*, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SOGAYAR, Ana et al. **A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units**. *Pharmacoeconomics*, v. 26, n. 5, p. 425-434, 2008.

SOUTO, Fabricio O. et al. **Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis**. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 183, n. 2, p. 234-242, 2011.

SUTTON, Caroline E.; MIELKE, Lisa A.; MILLS, Kingston HG. **IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells and innate lymphoid cells**. *European journal of immunology*, v. 42, n. 9, p. 2221-2231, 2012.

TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. **Pattern recognition receptors and inflammation**. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TAM, Stanley; KING, Donald P.; BEAMAN, Blaine L. **Increase of  $\gamma\delta$  T lymphocytes in murine lungs occurs during recovery from pulmonary infection by *Nocardia asteroides***. *Infection and immunity*, v. 69, n. 10, p. 6165-6171, 2001.

TANAKA, Toshio; NARAZAKI, Masashi; KISHIMOTO, Tadamitsu. **IL-6 in inflammation, immunity, and disease**. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 6, n. 10, p. a016295, 2014.

TSCHÖP, Johannes et al.  **$\gamma\delta$  T cells mitigate the organ injury and mortality of sepsis**. *Journal of leukocyte biology*, v. 83, n. 3, p. 581-588, 2008.

VAN DER POLL, Tom et al. **The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets**. *Nature Reviews Immunology*, v. 17, n. 7, p. 407-420, 2017.

VAN DER POLL, Tom; OPAL, Steven M. **Host-pathogen interactions in sepsis**. *The Lancet infectious diseases*, v. 8, n. 1, p. 32-43, 2008.

VAN SNICK, Jacques. **Interleukin-6: an overview**. *Annual review of immunology*, v. 8, n. 1, p. 253-278, 1990.

VANTOUROUT, Pierre; HAYDAY, Adrian. **Six-of-the-best: unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology.** *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 2, p. 88-100, 2013.

VELDHOEN, Marc et al. **TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells.** *Immunity*, v. 24, n. 2, p. 179-189, 2006.

VINCENT, Jean-Louis et al. **Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study.** *Critical care medicine*, v. 34, n. 2, p. 344-353, 2006.

VINCENT, Jean-Louis et al. **The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure.** *Intensive Care Med.* v. 22, n. 7, p. 707, 1996.

WENCKER, Melanie et al. **Innate-like T cells straddle innate and adaptive immunity by altering antigen-receptor responsiveness.** *Nature immunology*, v. 15, n. 1, p. 80-87, 2014.

WESCH, Daniela et al. **Modulation of  $\gamma\delta$  T cell responses by TLR ligands.** *Cellular and molecular life sciences*, v. 68, n. 14, p. 2357-2370, 2011.

ZACHARIADIS, O. et al.  **$\gamma\delta$  T cells regulate the early inflammatory response to *Bordetella pertussis* infection in the murine respiratory tract.** *Infection and immunity*, v. 74, n. 3, p. 1837-1845, 2006.

ZIMMERMAN, Guy A. et al. **The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis.** *Critical care medicine*, v. 30, n. 5, p. S294-S301, 2002.