

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

SUELEN MARTINS PEROBELLI

**IMPLICAÇÕES DA ESPLENECTOMIA E DO TRANSPLANTE AUTÓGENO DE
BAÇO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA *Listeria monocytogenes* e
Escherichia coli EM CAMUNDONGOS**

Juiz de Fora

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Suelen Martins Perobelli

**IMPLICAÇÕES DA ESPLENECTOMIA E DO TRANSPLANTE AUTÓGENO DE BAÇO
NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA *Listeria monocytogenes* e *Escherichia
coli* EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Saúde – área de concentração Saúde Brasileira do Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

Juiz de Fora

2008

SUELEN MARTINS PEROBELLI

**IMPLICAÇÕES DA ESPLENECTOMIA E DO TRANSPLANTE AUTÓGENO DE BAÇO
NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA *Listeria monocytogenes* e *Escherichia
coli* EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Saúde – área de concentração Saúde Brasileira do Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde.

Aprovado em: 07/08/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Sérgio Ibañez Nunes
Universidade Presidente Antônio Carlos

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho a todos que estiveram ao meu lado, apoiando, trazendo alegrias e confiança. E principalmente àqueles que não me deixaram desistir de seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Vânia Maria Martins Perobelli e José Carlos de Castro Perobelli por sempre me apoiarem a estudar e por contribuírem para que eu chegasse até aqui.

Agradeço à minha avó Zeny Botti Martins pelo carinho e paciência.

À minha irmã Soraya por me ajudar nos momentos que precisei.

Aos meus grandes amigos por me trazerem alegrias em todos os momentos.

Aos amigos do laboratório que tanto me auxiliaram e ensinaram fazendo com que este período de 2 anos fosse o mais produtivo possível.

Ao Prof. Fernando Lourenço, pelo incentivo no início do meu ingresso na imunologia.

À Prof^a. Dra. Maria Aparecida de Souza por todos os ensinamentos, ajudas e pela paciência.

À Prof^a. Dra. Ana Paula Ferreira pelo seu exemplo e disponibilidade nos momentos que precisei.

Ao Prof. Dr. Rogério Farias pela avaliação histológica.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ibañez Nunes por seu auxílio na realização da técnica cirúrgica.

Ao meu orientador Prof. Dr Henrique Couto Teixeira, por ser o facilitador deste trabalho e por sua confiança durante estes 2 anos.

À agência financiadora FAPEMIG.

RESUMO

A esplenectomia é procedimento comum em casos de traumas abdominais, nesses casos o transplante autólogo de baço é a única alternativa para se preservar as funções deste órgão. Foi descrito que a ocorrência de sepse por *Escherichia coli* é maior em animais esplenectomizados. Entretanto, na infecção por *Listeria monocytogenes* indivíduos esplenectomizados são capazes de controlar melhor a progressão da infecção em comparação a indivíduos que possuem o baço intacto. Neste trabalho avaliamos o efeito da esplenectomia e do transplante autólogo de baço na capacidade de camundongos BALB/c de controlarem a infecção por *L. monocytogenes* e *E. coli*. Nós avaliamos a infecção através da técnica de CFU de bactérias no fígado. O IFN- γ foi avaliado por ELISA em amostras de fígado e baço, e o óxido nítrico através do método de Griess. Nossos resultados confirmam que animais esplenectomizados (SP) apresentam menor número de *L. monocytogenes* e maior número de *E. coli* no fígado ($P < 0.05$) em comparação aos animais controle não esplenectomizados (CT). Os animais que receberam o transplante autólogo de baço no retroperitônio (RP) ou no grande omento (GO) apresentaram uma contagem de bactérias no fígado semelhante à do grupo CT nas duas infecções. Animais SP infectados por *E. coli* ou *L. monocytogenes* apresentaram maior produção de IFN- γ e óxido nítrico no fígado em comparação aos outros grupos estudados. Na infecção com *L. monocytogenes* camundongos SP tiveram maior acúmulo de células mononucleares no fígado, enquanto na infecção com *E. coli* foram observadas áreas de necrose tecidual no fígado, porém menor número de células inflamatórias, assim como baixos níveis de IgM no soro em comparação com os animais CT, RP e GO. Esses resultados sugerem que na infecção com *E. coli* a imunidade humoral tenha uma participação importante no controle da infecção. A produção de IFN- γ por células esplênicas, em ambas infecções, foi semelhante nos grupos transplantados em relação ao grupo CT, sugerindo que os fragmentos implantados se comportam de forma semelhante ao órgão original. A realização do transplante autólogo de baço é capaz de reverter o efeito da esplenectomia em ambas infecções estudadas, independente do sítio de implante utilizado.

PALAVRAS CHAVE: Baço. Transplante. *E. coli*. *L. monocytogenes*. Infecção. Resposta Imune.

ABSTRACT

The splenectomy is a common proceeding in cases of abdominal traumas. In these cases the autogenous transplant of the spleen is the only alternative that preserves the functions of this organ. It has been reported that the incident of sepsis for *E. coli* is larger in splenectomized animals. Meantime, in the infection by *L. monocytogenes* splenectomized individuals are better able to control the progression of the infection in comparison to individuals who have the spleen intact. In this work we evaluated the effect of splenectomy and of the autogenous transplant of the spleen on the capacity of BALB/c mice to control the infection by *L. monocytogenes* and *E. coli*. We evaluated the infection through the technique of bacteria CFU in the liver. The IFN- γ in liver and spleen was evaluated by ELISA, and the nitric oxide by the Griess method. Our results confirm that splenectomized animals (SP) present a lower number ($P < 0.05$) of *L. monocytogenes* and larger number ($P < 0.05$) of *E. coli* in the liver in comparison to the unsplenectomized control animals (CT). The animals that received the autogenous transplant of the spleen in the retroperitoneum (RP) or in the greater omentum (GO) showed a bacteria count in the liver similar to the CT group for both infections. SP animals infected by *L. monocytogenes* or *E. coli* presented a greater production of IFN- γ and NO in the liver in comparison to other groups studied. In the infection with *L. monocytogenes* SP mice had more accumulation of mononuclear cells in the liver, while in the infection with *E. coli* areas of residual necrosis were observed in the liver, although having a lower number of inflammatory cells, as well as low levels of IgM in the serum in comparison with the CT, RP, or GO groups. These results suggest that in the infection with *E. coli* the humoral immunity has an important function in the control of the infection. The production of IFN- γ by splenic cells in both infections was similar in the transplanted groups in comparison to that in the CT group, suggesting that the fragments introduced behave in a way similar to the original organ. The realization of the autogenous transplant of spleen is able to reverse the effect of the splenectomy in the two infections studied, independent of the site used for the implantation.

KEY WORDS: Spleen. Transplantation. *E. coli*. *L. monocytogenes*. Infection. Immune Response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do baço.....	15
Figura 2	Mecanismo de invasão da <i>Listeria monocytogenes</i>	20
Figura 3	Estrutura da bactéria <i>Listeria monocytogenes</i>	21
Figura 4	Estrutura da bactéria <i>Escherichia coli</i>	24
Figura 5	Técnica cirúrgica.....	29
Figura 6	Transplante autógeno de baço em retroperitônio.....	29
Figura 7	Transplante autógeno de baço em grande omento.....	30
Figura 8	Número de CFU no fígado de animais infectados com <i>L. monocytogenes</i>	36
Figura 9	Fotografia do CFU de <i>Listeria monocytogenes</i>	37
Figura 10	Produção de IFN- γ no fígado de animais infectados com <i>L. monocytogenes</i>	38
Figura 11	Produção de NO fígado de animais infectados com <i>L. monocytogenes</i>	39
Figura 12	Produção de IFN- γ em células esplênicas de animais infectados com <i>L. monocytogenes</i>	40
Figura 13	Fotografia das lâminas de fígado dos animais infectados com <i>L. monocytogenes</i>	42
Figura 14	Número de CFU no fígado de animais infectados com <i>E. coli</i>	44
Figura 15	Fotografia do CFU de <i>Escherichia coli</i>	45

Figura 16	Produção de IFN- γ no fígado de animais infectados com <i>E. coli</i> ...	46
Figura 17	Produção de NO fígado de animais infectados com <i>E. coli</i>	47
Figura 18	Produção de IFN- γ em células esplênicas de animais infectados com <i>E. coli</i>	48
Figura 19	Produção de anticorpos IgM no soro de animais infectados com <i>E. coli</i>	49
Figura 20	Fotografia das lâminas de tecido do fígado de animais infectados com <i>E. coli</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC	Sistema nervoso central
LLO	Listeriolisina O
IFN-γ	Interferon gamma
KDa	Kilodáltons
InIA	Internalina A
InIB	Internalina B
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
ActA	Actina A
CCR2	Chemokine C-C receptor 2 – Receptor de quimiocina C-C 2
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 – Proteína quimioatrativa de monócito
CCL-2	Chemokine C-C ligand 2 – Ligante de quimiocina C-C 2
TLR-4	<i>toll-like</i> receptor 4- Receptor tipo <i>Toll-4</i>
NO	Oxido nítrico
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica clássica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EHEC	<i>E. coli</i> entero-hemorrágica
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
DAEC	<i>E. coli</i> difusivamente aderente
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
MNEC	<i>E. coli</i> causadora de meningite/sepse
NEC	<i>E. coli</i> necrotizante
NTEC	<i>E. coli</i> necrotóxica
AIEC	<i>E. coli</i> aderente-invasiva
LPS	Lipopolissacarídeo

TNF-α	Tumor necrosis factor alfa- Fator de necrose tumoral alfa
IFPE	Infecção fulminante pós esplenectomia
Balb/c	Linhagem de camundongos
CFU	Colony forming units - Unidades formadoras de colônia
CBR	Centro de biologia da reprodução
CEA	Comitê de ética na experimentação animal
HKL	Heat Killed <i>Listeria</i> – <i>Listeria</i> morta pelo calor
HKE	Heat Killed <i>E. coli</i> – <i>E. coli</i> morta pelo calor
PBS	Phosphate buffered saline- tampão salina fosfatada
SFB	Soro fetal bovino
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay - ensaio imunoenzimático
ROI	Reativos intermediários do oxigênio
RNI	Reativos intermediários do nitrogênio
NOS2	Enzima óxido nítrico sintase
KC	Keratinocyte-derived chemokine – quimiocina derivada de queratinócito
RPMI	Meio líquido para cultura de célula
ATCC	American Type Culture Collection – Coleção americana de tipos em cultura

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	O baço e características básicas.....	14
1.2	Complicações da esplenectomia.....	15
1.3	Implante autólogo de baço.....	16
1.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	18
1.5	<i>Escherichia coli</i>	24
2.	OBJETIVOS	27
3.	METODOLOGIA	28
3.1	Animais e procedimento cirúrgico	28
3.2	Bactérias, infecção e preparação de antígenos.....	30
3.3	Contagem de unidades formadoras de colônia (CFU).....	31
3.4	Isolamento e cultura de células esplênicas.....	31
3.5	Dosagem dos níveis de IFN- γ	32
3.6	Dosagem de Óxido Nítrico.....	32
3.7	Deteção de anticorpos específicos(IgM)	33
3.8	Avaliação Histológica.....	33
3.9	Análise estatística	34
4.	RESULTADOS	35
4.1	Estudo da infecção com <i>Listeria monocytogenes</i> em camundongos BALB/c esplenectomizados e submetidos a transplante autólogo de baço.....	35
4.1.1	Efeito da esplenectomia na capacidade de camundongos BALB/c de controlar infecções por <i>L. monocytogenes</i>	35
4.1.2	Produção de IFN- γ pelas células do fígado dos animais após infecção com <i>L. monocytogenes</i>	38
4.1.3	Produção de NO pelas células do fígado dos animais após infecção com	

<i>L. monocytogenes</i>	39
4.1.4 Produção de INF- γ pelas células esplênicas dos animais após infecção com <i>L. monocytogenes</i>	40
4.1.5 Análise Histológica de tecido do fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>L. monocytogenes</i>	41
4.2 Estudo da infecção com <i>Escherichia coli</i> em camundongos BALB/c esplenectomizados e submetidos a transplante autólogo de baço.....	43
4.2.1 Efeito da esplenectomia na capacidade de camundongos BALB/c de controlar infecções por <i>E. coli</i>	43
4.2.2 Produção de IFN- γ pelas células do fígado dos animais após infecção com <i>E. coli</i>	46
4.2.3 Produção de NO pelas células do fígado dos animais após infecção com <i>E. coli</i>	47
4.2.4 Produção de INF- γ pelas células esplênicas dos animais após infecção com <i>E. coli</i>	48
4.2.5 Produção de anticorpos IgM no soro dos animais após infecção com <i>E. coli</i>	49
4.2.6 Análise Histológica de tecido do fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>E. coli</i>	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 O baço e características básicas

O sistema imunológico é constituído por células, tecidos, órgãos linfóides primários (medula óssea e timo), responsáveis pelo amadurecimento dos linfócitos T e B e os órgãos linfóides secundários (baço, linfonodos, apêndice, placas de Peyer e tonsilas) que são os principais locais de resposta a antígenos, onde ocorre a multiplicação e ativação dos linfócitos (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

O baço é o maior órgão linfóide secundário do corpo humano e está localizado no quadrante superior esquerdo do abdome. É um importante filtro sanguíneo para antígenos e faz a eliminação de hemácias senescentes da circulação. Este órgão é composto por duas regiões denominadas: polpa branca, onde se localizam células T, B, macrófagos; e polpa vermelha com células dendríticas, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e principalmente eritrócitos. Características como estas fazem do baço um órgão importante tanto para o sistema imunológico quanto para o sistema circulatório. Além disso, atua na depuração de bactérias da corrente sanguínea, funcionando como sítio para produção de anticorpos contra vários antígenos, além de estar envolvido com as reações do sistema complemento (MARQUES *et al.*, 2002). (Fig.1)

A fagocitose e a destruição intracelular de patógenos são mecanismos elementares da resposta imune inata durante infecções. Como o principal local de respostas imunológicas de antígenos provenientes do sangue, o baço é o mais importante sítio de fagocitose de microrganismos recobertos por anticorpos (opsonizados) e atua nos processos da imunidade inata e adaptativa (FRANKENBERG *et al.*, 2008). Além da proteção contra patógenos invasores, este órgão ainda detecta e elimina células senescentes, ou com danos estruturais e células aberrantes, que podem levar a formação de tumores (WLUKA & OLSZEWSKI., 2006).

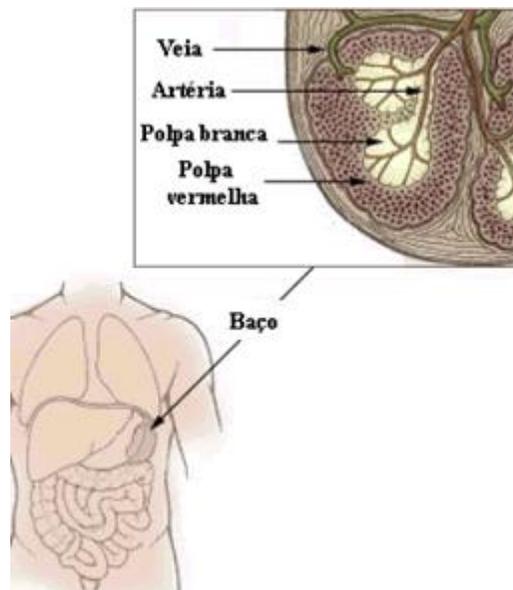


FIGURA 1: Estrutura do baço.
Fonte: <http://www.virtual.epm.br>

1.2 Complicações da esplenectomia

Por muitos anos o baço foi considerado um órgão que podia ser removido sem nenhum prejuízo ao organismo, ou seja, não estava associado a nenhuma função importante. Em algumas patologias, tais como doenças hemolíticas, hemorrágicas e em casos de esplenomegalias, os procedimentos de esplenectomia eram rotineiros (ROBSON, 1949). Além disso, em caso de traumas abdominais contusos, onde o baço é o principal órgão atingido, também vem sendo comum sua retirada (AVENDAÑO, 1997).

No entanto, a esplenectomia modifica os parâmetros imunológicos e favorece o aparecimento de doenças relacionadas às alterações sangüíneas, levando principalmente a uma maior susceptibilidade a doenças infecciosas. A falta do baço ou seu mau funcionamento podem causar anormalidades que incluem: decréscimo na habilidade de eliminação de células vermelhas danificadas e de corpos inclusos

intraeritrocíticos, altos níveis de imunocomplexos na circulação, produção defeituosa de IgM e IgG na fase inicial de infecções, baixa concentração de tuftsin e properdina, assim como baixa concentração de C3 e fator B (componentes do sistema complemento) (SUMARAJU *et al.*, 2001; KARAGÜLLE *et al.*, 2007).

Pacientes esplenectomizados são mais susceptíveis a infecções, particularmente por bactérias encapsuladas, como *Pneumococcus*, *Meningococcus* e *Hemophilus influenza*, organismos normalmente eliminados por meio da opsonização e fagocitose, funções estas prejudicadas pela falta do baço (MARQUES & PETROIANU, 2003).

1.3 O implante autógeno de baço

Devido à importância do baço para o organismo, algumas técnicas conservadoras têm sido utilizadas na abordagem das afecções esplênicas (CHRISTO & DIDIO, 1997; BUNTAIN & GOULD, 1985). O implante autógeno deste órgão é uma alternativa de preservação do tecido esplênico em casos de esplenectomias totais pós-traumas ou em casos de doenças que atingem o órgão, causando esplenomegalias com hiperesplenias acarretando a necessidade de sua retirada (NUNES *et al.*, 2005).

Segundo Orda (1983), o implante de fragmentos esplênicos em diferentes sítios do abdome não é uma prática recente. É baseada na esplenose, onde ocorre a implantação natural de fragmentos de tecido esplênico na cavidade peritoneal, após trauma abdominal. Alguns autores descrevem vários sítios de implantes diferentes incluindo, tecido celular subcutâneo, retroperitônio, músculo reto do abdome, e grande omento (LIANUNIGG *et al.*, 1992). O sítio de grande omento é o mais utilizado e preconizado pela literatura, no entanto não são encontradas diferenças significantes entre este local e outros sítios intraperitoneais (NUNES *et al.*, 2005). Pisters & Pachter (1994) recomendam envolver os tecidos esplênicos no grande omento, acredita-se que este local oferece rico suprimento sanguíneo, com geração de células inflamatórias, fatores de crescimento e citocinas. No entanto, apesar de a esplenose (implantação natural de fragmentos esplênicos, após trauma abdominal) poder ocorrer em

localizações extraperitoneais, alguns estudos experimentais têm dado preferência à implantação no sítio de grande omento por acreditarem que a manutenção do suprimento sanguíneo seja mais adequada, portanto com maior chance de regeneração e restabelecimento de drenagem venosa com a circulação portal (BRANDT *et al.*, 2001; POWER *et al.*, 2002). Por outro lado têm sido descritas desvantagens do sítio de implante no grande omento, que incluem casos de torção do implante, anemia e abscesso subfrênico, levando à necrose, do tecido implantado (ANDO *et al.*, 1997).

No entanto, a regeneração esplênica não indica necessariamente a manutenção da função imunológica deste órgão (MARQUES, PETROIANU & COELHO, 2003). Quando se questiona se o fragmento esplênico implantado é eficiente em todos os aspectos e funções, salienta-se a necessidade de avaliar parâmetros que permitam confirmar a recuperação imunológica do transplante autógeno, principalmente com relação à defesa contra infecções. Por este motivo é relevante investigar se o transplante autógeno é tão eficiente para a defesa do organismo como o órgão íntegro.

Nunes e colaboradores (2005), demonstraram que camundongos submetidos ao transplante autógeno de baço e imunizados com hemácias de carneiro conseguem estabelecer uma resposta imunológica com a formação de anticorpos contra essas hemácias, semelhante a dos animais controle (com baço íntegro) mostrando que este procedimento não alterou a função esplênica original. O retroperitônio se mostrou o sítio de implante mais adequado, uma vez que acarreta menos complicações como aderências e formação de granulomas de corpo estranho, quando comparado com o omento maior.

Karagülle e colaboradores (2007), confirmam estes resultados mostrando baixos níveis de IgM e IgG em grupos de coelhos esplenectomizados e mostra uma recuperação imunológica com produção normal de IgM e IgG no grupo com transplante autógeno, o que indica um benefício importante do transplante autógeno para a imunidade humoral. Recentemente foi avaliada a reatividade do transplante autógeno esplênico em animais infectados com *Staphylococcus aureus*. A presença do transplante autógeno confere maior capacidade de controle da disseminação sistêmica deste microrganismo, em comparação aos animais esplenectomizados, que

apresentaram um maior número de colônias bacterianas no fígado e nos pulmões, associados a uma alta produção de IL-10 e baixos níveis de IFN- γ e TNF- α . Foram encontrados baixos títulos de IgM e IgG1 após 6 dias de infecção também nos animais esplenectomizados, revelando a vantagem do transplante autógeno esplênico em relação aos esplenectomizados (TEIXEIRA *et al.*, no prelo). Entretanto, a reatividade imunológica do transplante autógeno contra microrganismos que apresentam características e comportamentos distintos ainda precisa ser avaliada, no intuito de investigar se a função do implante é semelhante à do baço íntegro em diferentes infecções.

1.4 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria extracelular, que possui habilidade de sobreviver no interior das células, onde está protegida. É um bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo e não esporulado, associada a infecções graves, tais como meningites, encefalites, infecções de mãe para feto (passagem transplacentária), e sepsse, resultando em morte (25 a 30% dos casos), principalmente em recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos (ARMSTRONG & WONG, 1982; HAMON, BIERNE & COSSART, 2006). Esta bactéria está amplamente disseminada na natureza, estando envolvida em um elevado número de fontes de infecção, incluindo o homem (FARBER & PETERKIN, 1995). A partir de 1980 foi definitivamente demonstrada a veiculação desta bactéria através de inúmeros alimentos, inclusive resultando em alguns surtos de grande repercussão (PINNER *et al.*, 1992).

A transmissão pode ocorrer tanto por contato direto quanto indireto com fontes contaminadas; pelas vias: oral, ocular, cutânea, respiratória e urogenital. Os portadores assintomáticos podem eliminar o microrganismo nas fezes por um tempo indeterminado aumentando o risco de transmissão. Na fase entérica, a sintomatologia é semelhante a da gripe, com febre moderada e dores no corpo, acompanhadas de diarréia. No

entanto, em alguns casos esses sintomas não são aparentes (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A ocorrência de infecção sistêmica em adultos não é rara e os sintomas mais comuns são: febre, fadiga, mal estar, podendo haver ou não, presença de náuseas, vômitos, dores e diarreia. Quando a doença compromete o SNC (sistema nervoso central), a manifestação é o aparecimento de meningites, encefalites e abscessos (FRANCO & LANDGRAF, 1996). *Listeria spp.* após infectar o organismo hospedeiro por via oral, atinge o trato intestinal, aderindo e invadindo sua mucosa. Em seguida, a célula bacteriana é fagocitada por macrófagos e após a lise da membrana do fagossomo, é liberada no citoplasma da célula hospedeira onde se multiplica rapidamente e se dissemina (LOVETT, 1988).

A forma pela qual este organismo causa a listeriose tem sido bem estudada, sabe-se que a bactéria possui algumas toxinas, destacando-se as toxinas hemolíticas (hemolisinas) e as toxinas lipolíticas (HAMON, BIERNE & COSSART, 2006). Diversos fatores de virulência são estudados para explicar os mecanismos de patogenicidade da bactéria (TAM & WICK, 2004 *et al.*; HAMON, BIERNE & COSSART, 2006). Dentre estes, a listeriolisina O (LLO), que é uma toxina formadora de poros que tem como função mediar a lise dos vacúolos que contém a bactéria. A LLO tem atividade ótima em pH ácido, no vacúolo fagosomal. Esta toxina permite que a bactéria escape do fagossoma e alcance o citoplasma da célula hospedeira, sendo o mais importante fator de virulência da *L. monocytogenes* estando também envolvida com a produção de IFN- γ (HARA *et al.*, 2007). A listeriolisina permite que a bactéria não sofra a ação das substâncias tóxicas produzidas no fagossoma e sobreviva no citoplasma do macrófago evitando ativação macrofágica, dessa forma favorecendo a disseminação do patógeno para as células vizinhas (BIRMINGHAM *et al.*, 2008; HARA *et al.*, 2007; HAMON, BIERNE & COSSART, 2006; JARADAT & BHUNIA, 2003; DE CHASTELLIER & BERCHE, 1994; NORTH & CONLAN, 1998; ARMSTRONG & WONG, 1982) (Fig. 2).

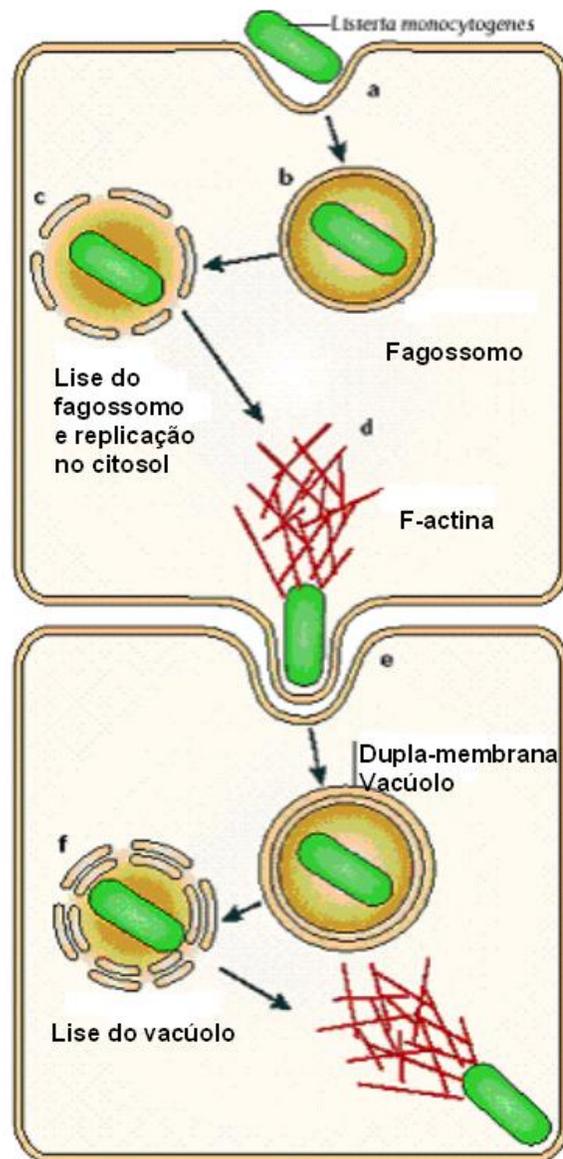


FIGURA 2. Mecanismo de invasão da *L. monocytogenes* adaptado de (HAMON *et al.*, 2006). Após ser fagocitada (a) a *L. monocytogenes* utiliza a LLO para escapar do fagossomo e ganhar o citoplasma (b) e (c). No citoplasma ela manipula o citoesqueleto através de proteínas polimerizadoras como a ActA e consegue invadir células vizinhas (d) e (e), reiniciando o ciclo (f).

A ação da LLO ocorre juntamente com fosfolipases, que hidrolisam os lipídeos da membrana, causando ruptura da célula (ORGUN & WAY, 2007). A proteína p60 (60 KDa), é uma proteína que também está associada à capacidade invasiva da bactéria e

as internalinas (InIA e InIB) são proteínas de membrana (80KDa) também associadas ao mecanismo de invasão da célula do hospedeiro (HAMON, BIERNE & COSSART, 2006).

No citoplasma, a bactéria começa a expressar uma proteína polimerizadora de actina (ActA) que permite o movimento da bactéria dentro da célula e sua expansão para células adjacentes (HAMON, BIERNE & COSSART, 2006).

A listeriose apresenta um quadro característico devido à natureza intracelular facultativa da bactéria, que provoca rupturas nas células hospedeiras produzindo sepse e favorecendo a infecção de tecidos não afetados habitualmente como, cérebro, sistema nervoso central, placenta e útero gravídico. (LOVETT, 1988) (Fig.3). A doença é comumente caracterizada pela formação de granulomas miliares e necrose focal ou por supuração no tecido infectado (LOGUERCIO *et al.*, 2001). Na ausência de tratamento médico a morte ocorre geralmente como resultado de meningites (DEDIOL *et al.*, 2002).

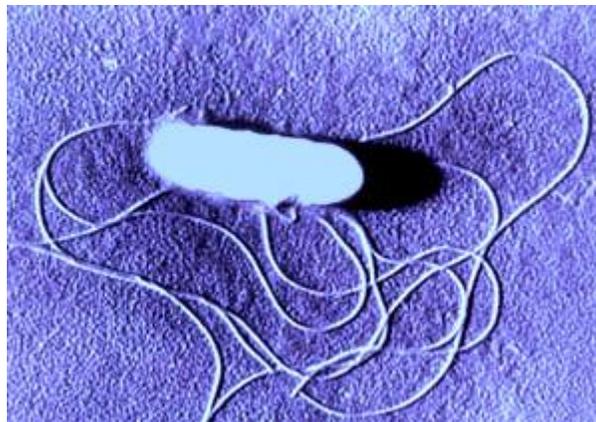


FIGURA 3. Estrutura da *L. monocytogenes* evidenciando seus inúmeros flagelos que auxiliam na mobilidade do microrganismo.

Fonte: <http://www.wales.nhs.uk/sites3/gallery/719/Listeria.jpg>

No curso da infecção experimental com *L. monocytogenes* é conhecido que o fígado captura mais de 90% do inóculo injetado por via endovenosa (i.v.) e o baço

recebe os 10% remanescentes, porém o grande crescimento inicial da bactéria ocorre no baço e não no fígado (CONLAN & NORTH, 1992).

Na resposta à *L. monocytogenes*, ambas as imunidade inata e adaptativa, são cruciais para o reconhecimento e eliminação do patógeno pelas células de defesa do hospedeiro (ZENEWIC & SHEN, 2007). Como é um microrganismo intracelular, a *L. monocytogenes* fica normalmente inacessível aos anticorpos circulantes e sua eliminação dependente da imunidade celular. Ao entrar no organismo a bactéria é fagocitada, porém utilizando seus fatores de virulência escapa para o citoplasma dos fagócitos, garantindo sua sobrevivência, replicação e disseminação para as células vizinhas (LOVETT, 1988). Por este motivo, na grande maioria das vezes a infecção não é totalmente erradicada, pois as bactérias escapam e se disseminam manipulando e reorganizando o citoesqueleto do hospedeiro.

Segundo Serbina e colaboradores (2008), monócitos inflamatórios respondem rapidamente ao estímulo microbiano secretando citocinas e expressando receptor de quimiocina CCR2, desta forma trafegam pelos sítios de infecção em resposta à secreção de proteínas quimiotáticas como CCL-2 e MCP-1. O CCR2 está envolvido no recrutamento de monócitos em infecções com *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* e *Cryptococcus neoformans*. Alguns macrófagos conseguem apresentar os antígenos da bactéria antes de seu escape do fagossomo e produzem IL-12, citocina que ativa as células natural killer (NK). As células NK juntamente com as células T atuam como principais produtoras de IFN- γ , citocina que ativa macrófagos auxiliando no combate às bactérias (TEIXEIRA & KAUFMANN, 1994). A resistência de camundongos à listeriose envolve uma fase inicial não específica (inata) mediada pelas células NK, seguida por uma fase específica (adquirida) mediada por células T (KAUFMANN, 1993). A ativação de fagócitos mononucleares pelo IFN- γ produzido por células NK e células T é comumente associada com resistência inespecífica e proteção específica, respectivamente, na defesa contra a infecção (HARA *et al.*, 2007; KAUFMANN & BRINKMANN, 1984).

O IFN- γ tem sido considerado a citocina mais importante para o desenvolvimento de resistência adquirida contra microrganismos intracelulares como *Listeria*

monocytogenes e *Mycobacterium tuberculosis*. Na listeriose sua produção está relacionada com a ligação do TLR-4 (receptor presente em macrófagos e células dendríticas) à moléculas específicas presentes na superfície da bactéria, como a LLO (HARA *et al.*, 2007). Desta forma, os fagócitos podem contribuir no controle da infecção, porque quando ativados eliminam a *L. monocytogenes* bloqueando seu escape do fagossomo. Espécies reativas de oxigênio e intermediários do nitrogênio, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO), produzidos por macrófagos ativados, são moléculas eficientes na lise de *L. monocytogenes* nos fagossomos (SHAUGHNESSY & SWANSON, 2007; TAM & WICK, 2004).

É aceito que o principal mecanismo de eliminação da *L. monocytogenes* se inicia com a diferenciação das células T CD4⁺ em células Th1, pela ação da IL-12. Células Th1 produzem IL-2 e IFN- γ , citocinas que induzem uma resposta celular ativando macrófagos, células NK e células T CD8⁺. As células T CD8⁺ são de grande importância nesta resposta, pois eliminam células infectadas que tiveram a bactéria se multiplicando no citoplasma, e que fizeram a apresentação de antígenos através do MHC de classe I (HARA *et al.*, 2007).

Diversos autores têm demonstrado que hospedeiros esplenectomizados e infectados resistem melhor à infecção por *L. monocytogenes* do que animais que possuem o baço intacto (KURANAGA *et al.*, 2005; PIETRANGELI *et al.*, 1983; CHEERS & MCKENZIE, 1978; SKAMENE & CHAYASIRISOBHON, 1977; SKAMENE, CHAYASIRISOBHON & KONGSHAVN, 1978). Segundo Wood e colaboradores (1984), este fato se deve a uma falha na produção de citocinas Th1 nos animais esplenectomizados e infectados com *L. monocytogenes*. Esta falha, no entanto, contrasta com o aumento da resistência do esplenectomizado a esta bactéria. Kuranaga e colaboradores (2005), atribuíram esta resistência à grande participação das células NK e NKT do fígado e sugere que estas podem estar atuando decisivamente nesta resposta, além disso, observa também um alto nível de IL-12 no soro dos animais esplenectomizados, em relação aos animais controle.

1.5 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um bastonete Gram-negativo, extracelular, aeróbio que constitui parte da microbiota residente do trato intestinal de humanos e de uma variedade de animais (Fig.4) (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas, epidemiológicas e sorotipagem, os patótipos de *E. coli* são agrupadas em classes. Destaca-se entre os patótipos que causam doenças intestinais: EPEC (enteropatogênica clássica), EIEC (enteroinvasora), ETEC (enterotoxigênica), EHEC (entero-hemorrágica), EAEC (enteroagregativa) e DAEC (difusivamente aderente). O patótipo causador de doenças do trato urinário, é conhecido como UPEC (uropatogênica). Além disso existe um patótipo de *E.coli* que é um agente comum em causar meningites Gram-negativas neonatais, este patótipo é conhecido como MNEC (*E.coli* associada a meningite/ sepsis). Por fim, atualmente têm sido descritos outros potenciais patótipos de *E.coli*, no entanto nenhum tão bem estabelecido como os descritos acima. São eles: AIEC (aderente invasiva) associada a doença de Crohn, NEC (necrotizante) causador de necrose do epitélio intestinal e NTEC (necrotóxica) (STENUTZ, WEINTRAUB & WIDMARM, 2006).

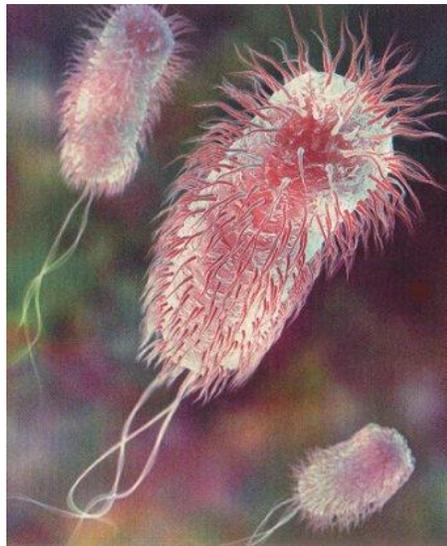


FIGURA 4. Estrutura da bactéria *E. coli* evidenciando suas fímbrias e pili que auxiliam na adesão do microrganismo à célula hospedeira.

Fonte: http://www.uni-heidelberg.de/zentral/ztl/grafiken_bilder/bilder/e-coli.jpg

A transmissão da *E. coli* ocorre pelo consumo de alimentos contaminados, direta ou indiretamente, por fezes. Dentre as fontes de infecção conhecidas destacam-se a carne, o leite cru, as saladas, e transmissão de pessoa a pessoa através da via oral-fecal. Esta bactéria tolera ambientes com acidez baixa, o que permite que atravesse o estômago sem ser afetada (MICHANIE, 2003).

A *E. coli* por ser uma bactéria Gram-negativa, apresenta como constituinte da parede celular o lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é uma endotoxina localizada na parede celular bacteriana que participa de funções essenciais como crescimento e sobrevivência bacteriana principalmente no contexto das interações parasito-hospedeiro (PARK *et al.*, 2006). O LPS das bactérias Gram-negativas também é conhecido por causar manifestações patológicas, como febre (PARK *et al.*, 2006). Segundo Hopkins *et al.*, (1998), a resposta ao LPS é importante para iniciar uma resposta imune mediada por citocinas. Esta endotoxina estimula monócitos e macrófagos a produzir várias citocinas como o TNF- α que contribui para a disfunção de órgãos durante a sepse (MATSUSHITA *et al.*, 2007). Além do LPS, a *E. coli* possui estruturas celulares importantes na invasão e multiplicação dentro do hospedeiro. As fimbrias e o pili (um filamento não flagelar formado na superfície da bactéria) auxiliam na adesão bacteriana à célula hospedeira (Fig. 3). Na infecção com a *E. coli* uropatogênica, o pili tipo I permite que a bactéria forme um biofilme, uma camada que protege as bactérias da urina, das defesas do hospedeiro, e até mesmo de antibióticos, permitindo infecções recorrentes quando as bactérias quiescentes eclodem do biofilme. (CEGELSKI *et al.*, 2008).

Estudos sobre as propriedades aderentes de diferentes cepas de *E. coli* na doença de Crohn mostram que são capazes de aderir a várias células e linhagens humanas. No patotipo AIEC (aderente-invasiva) o pili tipo I interage com o receptor CEACAM6 presente nas células ileais de pacientes portadores da doença, e promovem uma invasão mais efetiva juntamente com outros fatores de virulência, como o flagelo que permite maior mobilidade e outras proteínas que regulam os fatores de virulência da bactéria (BARNICH *et al.*, 2007).

Segundo Gillon e colaboradores (1984), a promoção da resposta imune à *E. coli* em infecções do trato urinário se deve à combinação da imunidade inata com a resposta adaptativa, levando assim à resolução da infecção. Neste caso, um influxo de neutrófilos é seguido pelo aparecimento de células mononucleares inflamatórias. A fagocitose da bactéria por células mononucleares, como macrófagos, reduz o número de bactérias nos órgãos infectados e é o primeiro passo na geração da resposta adaptativa. Antígenos bacterianos processados por macrófagos ativam linfócitos T, que participam da estimulação de células B produtoras de anticorpos anti-*E. coli*, que podem ser encontrados na urina. O número de anticorpos esplênicos tem uma correlação positiva com a infecção nos órgãos, evidenciando a importância das imunoglobulinas produzidas no baço, na resolução desta infecção (HOPKINS *et al.*, 1998).

Bactérias Gram-negativas como a *E. coli*, principalmente do fenótipo MNEC são agentes etiológicos responsáveis por infecções pós-esplenectomia caracterizando sepse, ou a IFPE (Infecção fulminante pós-esplenectomia) que ocorre com frequência em indivíduos esplenectomizados e estão associadas a uma alta incidência de mortes (MARQUES & PETROIANU, 2003; MARQUES, PETROIANU & COELHO, 2003; HANSEN & SINGER, 2001; SUMARAJU *et al.*, 2001). Em ratos a infecção por *E. coli* em esplenectomizados é progressiva, porém animais esplenectomizados e submetidos ao transplante autógeno de baço, preservam a função fagocítica esplênica (MARQUES, PETROIANU & COELHO, 2003).

O estudo do curso infeccioso e da resposta imune deste patógeno em animais que sofreram transplante autógeno se mostra relevante, uma vez que há maior risco de infecções bacterianas e sepse em indivíduos esplenectomizados. Por este motivo é importante conhecer os mecanismos efetores da resposta imunológica de animais transplantados submetidos a diferentes infecções.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Avaliar a capacidade de resposta imunológica de camundongos BALB/c submetidos ao transplante autólogo de baço no retroperitônio (RP) ou no omento maior (GO), frente às infecções por *L. monocytogenes* e *E. coli* em comparação com animais esplenectomizados (SP) e animais controle submetidos à cirurgia simulada (CT).

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a evolução da infecção em animais que receberam o transplante autólogo de baço comparando-os com os grupos SP e CT, através da contagem de CFU (unidades formadoras de colônia) de *L. monocytogenes* e *E. coli* no fígado.
2. Investigar a produção de NO e IFN- γ no fígado dos grupos de animais infectados com *L. monocytogenes* e *E. coli*.
3. Dosar IFN- γ em culturas de células esplênicas dos animais infectados com *L. monocytogenes* e *E. coli* após estimulação *in vitro* com concanavalina A e antígenos específicos, através do método de ELISA.
4. Analisar a histologia do tecido do fígado de animais infectados com *L. monocytogenes* e *E. coli*, avaliando a morfologia geral do órgão e o acúmulo de células mononucleares inflamatórias.
5. Avaliar a Influência da imunidade humoral, através da detecção de anticorpos IgM, no soro de camundongos infectados com *E. coli*, após esplenectomia, e transplante autólogo de baço em retroperitônio e grande omento.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais e Procedimento cirúrgico:

Camundongos BALB/c, fêmeas de 10-12 semanas de idade, obtidos no Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora foram mantidos no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia - UFJF em estantes ventiladas (Alesco®), em microisoladores livres de patógenos, onde receberam ração e água *ad libitum*. Para a realização da técnica cirúrgica (Fig.5), os animais foram divididos em 4 grupos (10 animais cada) de acordo com o grupo de cirurgia. Para cada infecção (*L. monocytogenes* ou *E. coli*) foram utilizados 40 animais. Os grupos de cirurgia foram: grupo esplenectomizado - onde o baço foi totalmente retirado; grupo retroperitônio - camundongos esplenectomizados e com transplante autógeno no retroperitônio (Fig.6); grupo grande omento - camundongos esplenectomizados e com transplante autógeno no grande omento (Fig.7) grupo controle cirurgia simulada onde foi realizada uma laparotomia seguida de laparorráfia.

Os animais foram anestesiados i.p. com solução anestésica composta por xilazina 2% e quetamina 5%. Os grupos retroperitônio e grande omento foram submetidos à laparotomia mediana, com esplenectomia total convencional, onde trinta por cento do tecido ressecado foi fragmentado em duas partes e implantado (transplantado) no retroperitônio ou grande omento, respectivamente. O grupo esplenectomizado teve o tecido esplênico totalmente retirado e no grupo operação simulada foi realizada abertura da cavidade abdominal, mobilização do baço e sutura, ou seja, uma operação simulada.

O estudo foi conduzido com aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora. Protocolo 020/2006-CEA.

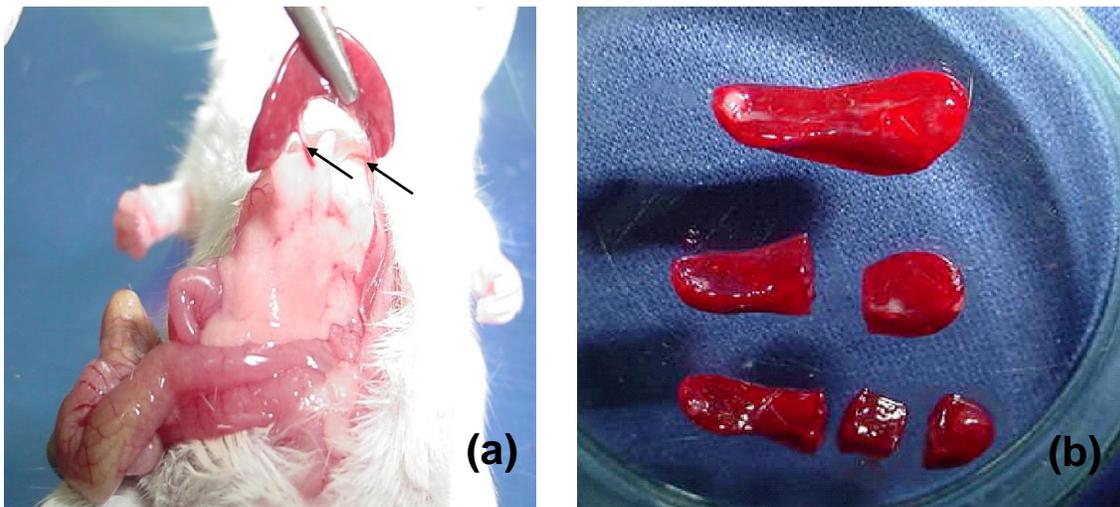


FIGURA 5. Técnica cirúrgica – (a) Pedículo vascular e vasos curtos esplênicos. (b) Secção do baço para o transplante autólogo; aproximadamente 30% do tecido esplênico é dividido em duas partes. Fonte: Rezende, *et al.*, (2007).

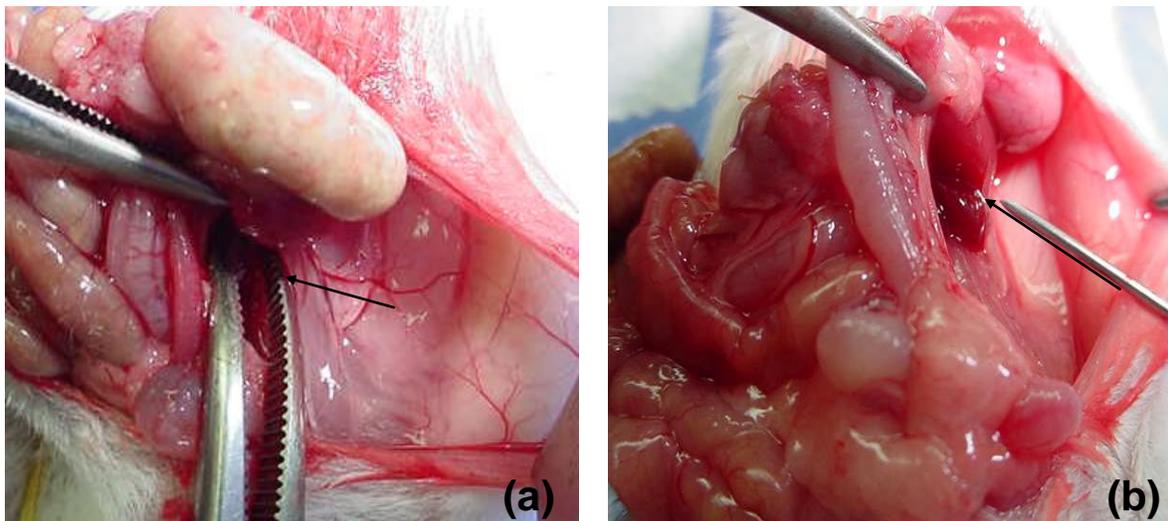


FIGURA 6. Transplante autólogo de baço em retroperitônio - (a) Acesso ao retroperitônio. (b) Colocação dos fragmentos sem fixação. Fonte: Rezende, *et al.*, (2007).

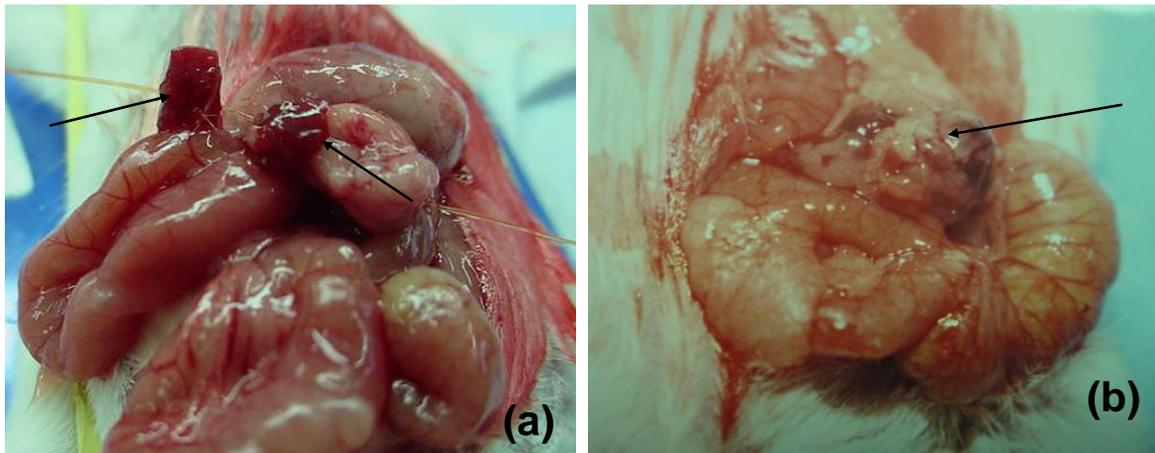


FIGURA 7. Transplante autólogo de baço em grande omento – (a) Transfixação dos fragmentos. (b) Bolsa confeccionada com grande omento envolvendo os fragmentos. Fonte: Rezende, *et al.*,(2007).

3.2 Bactérias, infecção e preparação de antígenos:

As bactérias, *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) foram cultivadas nos meios cultura “brain heart infusion” (BHI-Difco®) e “ágar MacConkey” (seletivo para *E. coli*) respectivamente, por 24h estufa umidificada a 37°C. Os inóculos foram preparados por centrifugação durante 20 minutos, seguidos de ressuspensão em PBS e 10% de glicerol.

Trenta dias após a cirurgia (cirurgia simulada, esplenectomia e transplante autólogo de baço), 40 animais foram infectados i.v. com *L. monocytogenes* na dose de 10^6 CFU/200 μ L e 40 animais foram infectados i.v. com *E. coli* na dose de 10^9 CFU/200 μ L. Os camundongos foram sacrificados após três dias de infecção.

Para a preparação dos antígenos, as bactérias foram mortas por incubação a 65°C por duas horas (*L. monocytogenes* morta pelo calor/ heat killed *L. monocytogenes* ou HKL; e *E. coli* morta pelo calor/heat killed *E. coli* ou HKE) e utilizadas para reestimulação *in vitro* na concentração de 10^7 bactérias por poço.

3.3 Contagem de unidades formadoras de colônia (CFU):

Após anestesia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O fígado de cada animal foi retirado e macerado em PBS, através de homogeneizadores e pistões previamente esterilizados. Diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} foram plaqueadas em placas de 6 poços contendo meio de cultura BHI (Difco®) para *L. monocytogenes* e ágar MacConkey para *E. coli*. O material remanescente (lobo esquerdo) foi utilizado para detecção de IFN- γ , NO e análise histológica.

Após 24h de incubação em estufa umidificada a 37°C, o número de unidades formadoras de colônia foi determinado. O número de bactérias nos órgãos dos animais foi expresso como o log do número de unidades formadoras de colônias (CFU) de *L. monocytogenes* ou *E. coli*. Foi realizado um teste de Gram para a confirmação da natureza Gram-positiva das bactérias, uma vez que o meio BHI não é seletivo para *L. monocytogenes*.

3.4 Isolamento e cultura de células esplênicas:

Baço e fragmentos esplênicos dos camundongos foram removidos e suas células ajustadas para 10^6 /mL em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 0,5% de antibiótico e 1% de aminoácidos não essenciais. Para a avaliação da produção de IFN- γ , as células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços por 48 horas, na concentração de 2×10^5 células/200 μ L. As culturas foram estimuladas *in vitro* com 10^7 de HKL ou HKE por poço. Após o período de cultivo em estufa de CO₂, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados e congelados a -20°C, para posterior dosagem de IFN- γ .

3.5 Dosagem dos níveis de IFN- γ utilizando macerado de tecido e sobrenadantes de culturas:

A dosagem das citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ L de tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6, contendo 4 μ g/mL de anticorpo anti-IFN- γ e incubadas por 16 horas a 4°C. As proteínas não ligadas à placa foram removidas por lavagem com PBS 0,015M contendo 0,05% Tween-20 e as placas foram bloqueadas com 300 μ L de PBS-Tween-20, contendo 10% de soro fetal bovino, por 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente com PBS-Tween-20 e 100 μ L dos sobrenadantes de cultura e dos macerados de tecido do fígado foram adicionados, em triplicata, e incubados por 16 horas à temperatura ambiente. Após lavagem, as placas foram incubadas novamente por 1 hora à temperatura ambiente com 100 μ L do segundo anticorpo biotilado anti-IFN- γ 0,5 μ g/mL. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas com 100 μ L de avidina-peroxidase. Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi adicionado o substrato tetrametilbenzidina (TMB, Zymed). A reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de uma solução de ácido sulfúrico 1M. A densidade óptica foi determinada em leitor de microplacas (Spectramax 190, Molecular Devices, USA) utilizando o filtro de 450nm.

3.6 Dosagem de Óxido Nítrico:

Os macerados de tecido do fígado foram clarificados com ácido tricloro acético (ATA) e utilizados para quantificação de nitritos (NO₂⁻) através da reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Alíquotas de 100 μ L do sobrenadante foram incubadas com 50 μ L de sulfanilamida (Sigma®) a 1% e 50 μ L de N-1-dihidrocloro de naftiletlenodiamina (Sigma®) a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5% (Sigma®) em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente a absorbância foi medida, em comprimento de onda de 540

nm. A produção de NO_2 foi quantificada através de comparação com curva-padrão, feita com diferentes concentrações de NaNO_2 .

3.7 Detecção de anticorpos específicos (IgM) no soro dos animais:

Após 72h de infecção, foram feitas coletas de sangue periférico de animais de todos os grupos, e os soros foram separados por centrifugação. Placas de ELISA foram sensibilizadas com o antígeno HKE de *E. coli*, e incubadas por 18h a 4°C. Então lavadas com PBS-Tween e bloqueadas com PBS-Tween +10% de SFB (Soro Fetal Bovino) por 2 horas. Após este período, as placas foram novamente lavadas quatro vezes em PBS-Tween e, em seguida, adicionados os soros dos animais. As placas foram incubadas por 18h a 4°C. Terminada a incubação as placas foram lavadas e adicionado o anticorpo anti-IgM conjugados com peroxidase e incubadas por mais 1 hora à temperatura ambiente. Mais quatro lavagens foram realizadas e a reação revelada pela adição do substrato contendo ácido cítrico 0,1M, fosfato de sódio 0,2M, água destilada, cromógeno OPD e água oxigenada 0,03%. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 1M e a leitura feita em espectrofotômetro a 492nm. As detecções dos anticorpos específicos foram quantificadas como densidade ótica (OD).

3.8 Avaliação Histológica:

Fragments de fígado foram retirados e fixados em solução de formol a 10%. Os fragmentos fixados foram embebidos em parafina e posteriormente cortes histológicos de aproximadamente 3 micrômetros de espessura foram feitos e corados com hematoxilina e eosina. Os números de acúmulos de células mononucleares inflamatórias no fígado foram determinados após análise de 20 campos em aumento de 400x. A avaliação da extensão dos infiltrados inflamatórios foi determinada de acordo com as seguintes escalas estabelecidas:

- Para a infecção com *L. monocytogenes* os níveis foram: I (leve, com 0-2 infiltrados de células mononucleares); II (moderado, com 3-5 infiltrados de células mononucleares); III (acentuado, com 6-10 infiltrados de células mononucleares).

- Para a infecção com *E. coli* os níveis foram: I (leve, com 0-2 infiltrados de células mononucleares); II (moderado, com 3-5 infiltrados de células mononucleares); III (acentuado, com 6-8 infiltrados de células mononucleares); e IV (alto, com mais de 8 infiltrados de células mononucleares).

3.9 Análise Estatística:

As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de D'agostino e Pearson para distribuição gaussiana dos dados. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, e o teste paramétrico, teste "t" de Student, para determinação das diferenças significantes entre os grupos de camundongos, com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). Para tal, utilizou-se o programa GraphPad Prism®5.0.

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO DA INFECÇÃO COM *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM CAMUNDONGOS BALB/C ESPLENECTOMIZADOS E SUBMETIDOS A TRANSPLANTE AUTÓGENO DE BAÇO

4.1.1 Efeito da esplenectomia na capacidade de camundongos BALB/c de controlar a infecção por *L. monocytogenes*

O efeito da esplenectomia na capacidade de camundongos BALB/c de conter o crescimento de *L. monocytogenes* no fígado, foi avaliado 72 horas após infecção endovenosa. Grupos de camundongos BALB/c, esplenectomizados, esplenectomizados e com transplante autógeno no retroperitônio ou no grande omento, e grupo controle cirurgia simulada foram infectados com 10^6 CFU de *L. monocytogenes* trinta dias após a cirurgia. A Fig. 8 mostra que número de CFU de *L. monocytogenes* foi maior no grupo cirurgia simulada que exibe um número de colônias semelhante ao dos grupos transplantados em retroperitônio e grande omento. Já o grupo esplenectomizado apresentou diminuição significativa ($p < 0.05$) de colônias, quando comparados aos demais grupos (Fig. 9).

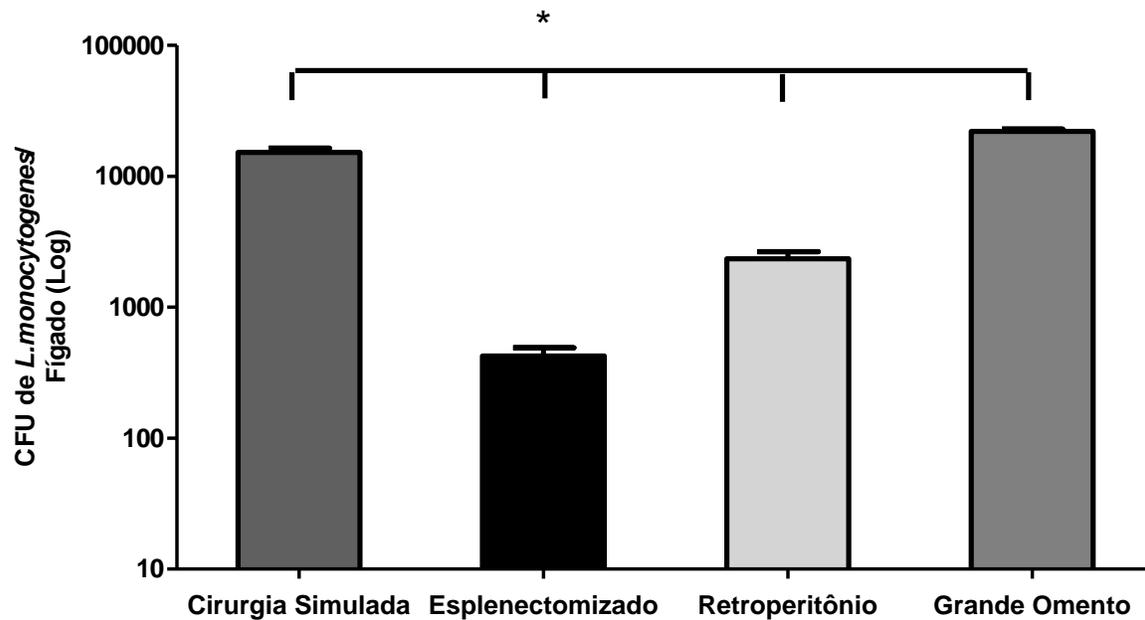


FIGURA 8. Efeito da esplenectomia e do transplante autógeno de baço no crescimento de *L. monocytogenes* no fígado de camundongos BALB/c infectados. Animais foram infectados i.v. com 10^6 *L. monocytogenes* e o número de unidades formadoras de colônias (CFU) de bactérias foi avaliado 72 horas após a infecção, em macerados de fígado. As barras representam a média dos Log de CFU \pm SEM. * = $p < 0,05$ quando comparados aos outros grupos estudados.

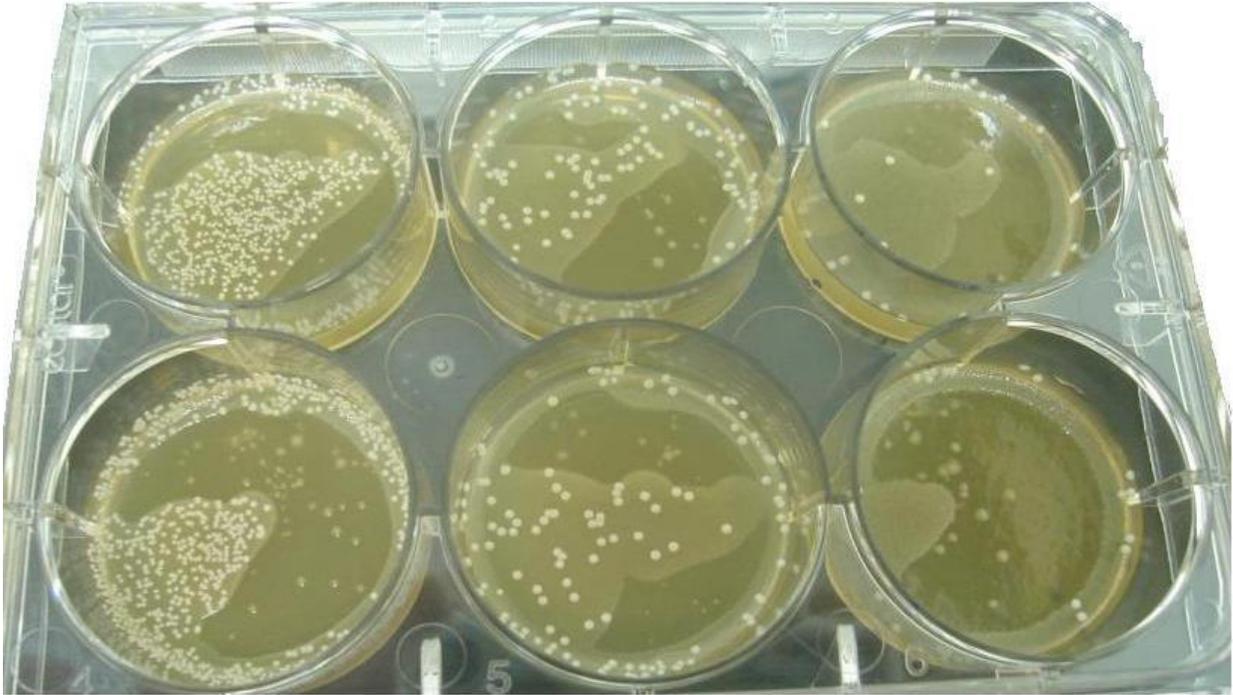


FIGURA 9. Fotografia de uma placa de 6 poços com as colônias de *L. monocytogenes* obtidas no macerado de fígado de um camundongo do grupo cirurgia simulada, após 24h de incubação a 37°C em estufa umidificada a 37°C. As bactérias foram cultivadas em meio BHI (brain heart infusion) nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} .

4.1.2 Produção de IFN- γ pelas células do fígado de animais esplenectomizados e com transplantes autógenos após infecção com *L. monocytogenes*

Os camundongos do grupo esplenectomizado apresentaram níveis mais elevados de IFN- γ (781 ± 128 pg/mL) em macerado de fígado em comparação aos demais grupos estudados (Fig.10). Os animais do grupo cirurgia simulada apresentaram menor produção de IFN- γ (482 ± 153 pg/mL), que se mostrou em níveis semelhantes aos observados nos animais dos grupos grande omento (563 ± 24 pg/mL) e retroperitônio (628 ± 45 pg/mL).

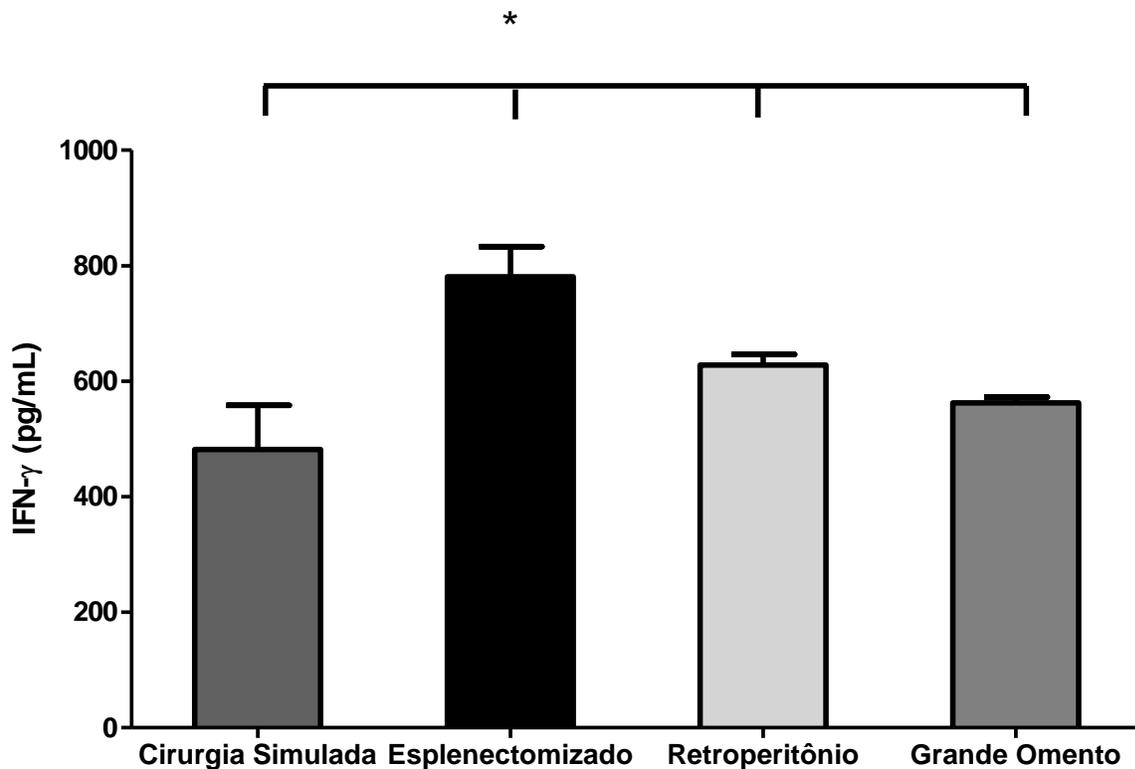


FIGURA 10. Produção de IFN- γ pelas células do fígado de camundongos BALB/c esplenectomizados e com transplantes autógenos. Níveis de IFN- γ no fígado dos animais após três dias de infecção com $10^6/200\mu\text{L}$ de *L. monocytogenes*. Valores representados em médias \pm SEM.*= $p < 0,05$ quando comparados aos outros grupos estudados.

4.1.3 Produção de NO pelas células do fígado de animais esplenectomizados e com transplantes autógenos após infecção com *L. monocytogenes*

A produção de óxido nítrico exibida no macerado de tecido do fígado nos grupos de camundongos cirurgia simulada, esplenectomizado, retroperitônio e grande omento infectados com *L. monocytogenes* teve um perfil semelhante ao observado na produção de $\text{INF-}\gamma$ (Fig.10). A produção de óxido nítrico pelas células do fígado do grupo esplenectomizado foi significativamente maior ($1,83 \pm 0,74\mu\text{M}$) que a produzida pelos grupos cirurgia simulada e omento maior nos animais infectados com *L. monocytogenes* (Fig.11). Os grupos retroperitônio e grande omento mostraram uma quantidade de NO semelhante à observada no grupo cirurgia simulada.

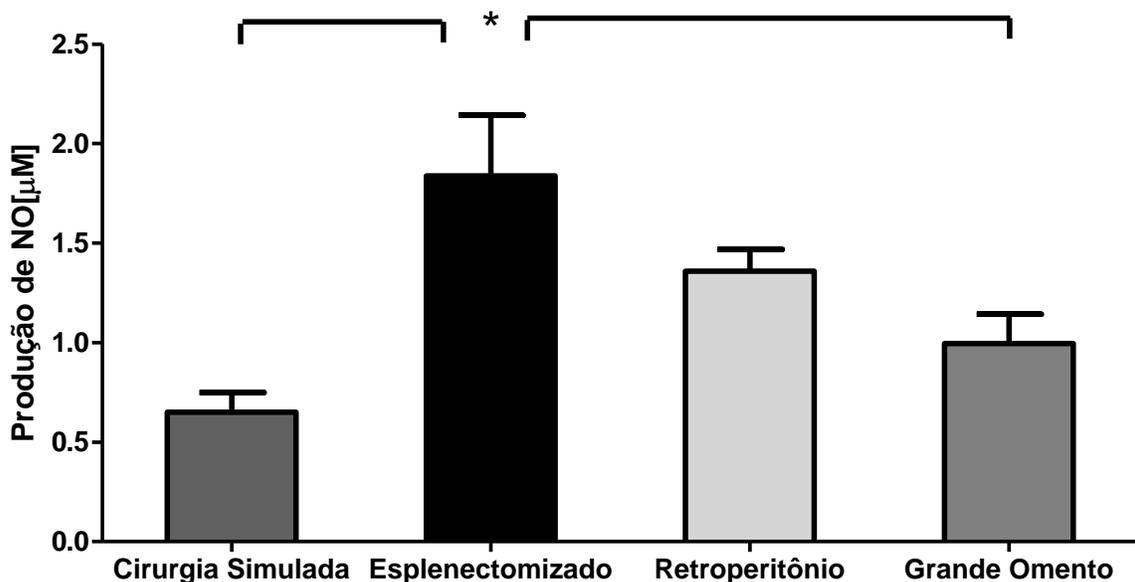


FIGURA 11. Produção de NO pelas células do fígado de camundongos BALB/c e esplenectomizados e com transplantes autógenos infectados com *L. monocytogenes*. Níveis de NO no fígado dos animais após três dias de infecção com $10^6/200\mu\text{L}$ de *L. monocytogenes*. A produção de NO foi avaliada pelo método de Griess. Valores representados em médias \pm SEM. * = $p < 0,05$ quando comparados aos outros grupos estudados.

4.1.4 Efeito da infecção com *L. monocytogenes* na produção de IFN- γ pelas células esplênicas de animais que receberam o transplante autógeno de baço

As células esplênicas do grupo cirurgia simulada (371 ± 97 pg/mL), dos grupos esplenectomizado e submetidos ao transplante autógeno no retroperitônio (249 ± 73 pg/mL) e esplenectomizado e submetidos ao transplante autógeno no grande omento (231 ± 54 pg/mL) produziram quantidades semelhantes de IFN- γ após 48h de cultura com o estímulo específico (HKL). (Fig.12).

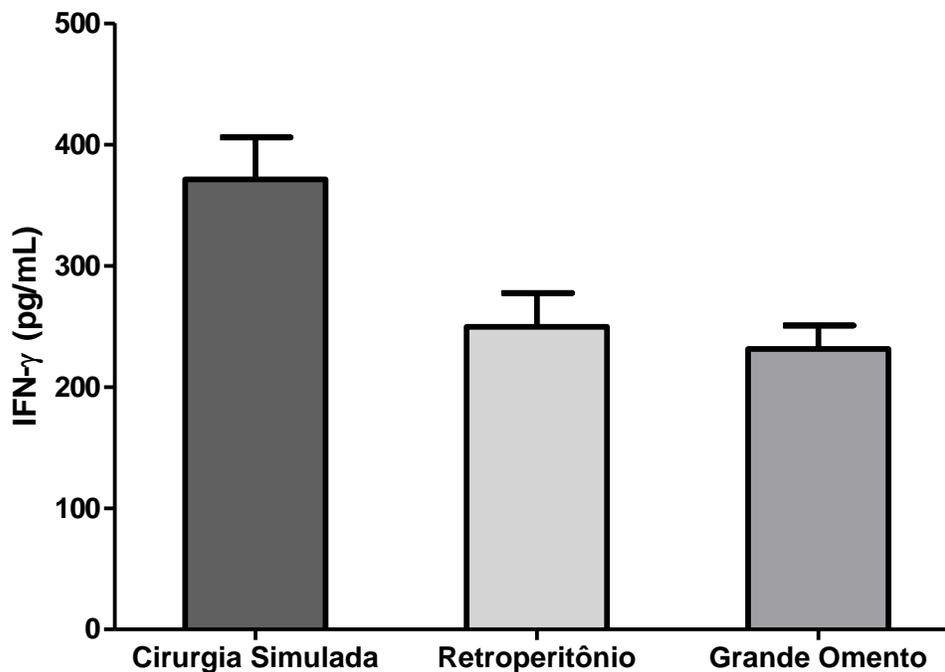


FIGURA 12. Produção de IFN- γ em cultura de células esplênicas. Camundongos BALB/c foram infectados com $10^6/200\mu\text{L}$ de *L. monocytogenes*. Após três dias de infecção a produção de IFN- γ por células esplênicas foi avaliada depois de 48h de cultura em presença de HKL ($10^7/\text{poço}$). Valores representados em médias \pm SEM.

4.1.5 Análise histológica de tecido do fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. monocytogenes*

A avaliação histológica dos animais infectados com *L. monocytogenes* revelou que o grupo esplenectomizado (Fig.13 C) apresenta um maior número de acúmulos de células mononucleares, com presença de infiltrados perivasculares e intra-parenquimatosos. De acordo com a classificação descrita anteriormente, o grupo esplenectomizado se encontra na categoria acentuado (nível III), possuindo mais de 5 acúmulos de células mononucleares, além disso também apresenta alguns raros neutrófilos nos sítios inflamatórios. O grupo cirurgia simulada (Fig.13 D) apresenta menor concentração de acúmulos celulares inflamatórios no fígado sendo classificado como leve (nível I), e os implantes esplênicos em retroperitônio e grande omento (Fig.13 A e B) foram classificados como moderado (nível II). Todo o material foi analisado por um mesmo observador e os campos foram escolhidos de forma aleatória. Foram considerados os seguintes itens de avaliação: (1) a estrutura geral do órgão, (2) morfologia dos hepatócitos, (3) presença de acúmulos de células mononucleares intra-parenquimatosas e perivasculares.

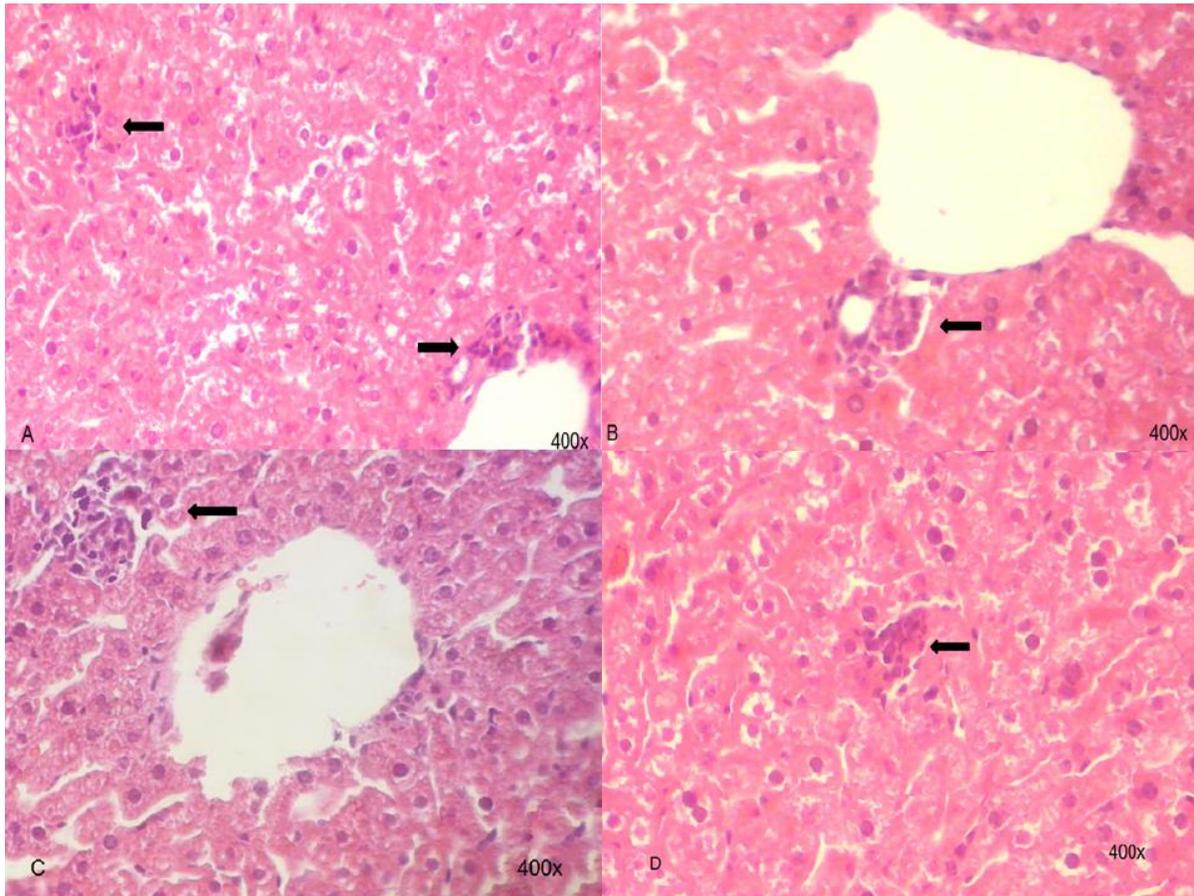


FIGURA 13. Fotografia das lâminas de tecido do fígado. (A) Acúmulo intraparenquimatoso de células mononucleares no fígado de um camundongo do grupo retroperitônio (seta). **(B)** Acúmulo perivascular de células mononucleares no fígado de um camundongo do grupo grande omento (seta). **(C)** Acúmulo intraparenquimatoso de células mononucleares no fígado de um camundongo do grupo esplenectomizado (seta). **(D)** Acúmulo intraparenquimatoso de células mononucleares no fígado de um camundongo do grupo cirurgia simulada (seta).

4.2 ESTUDO DA INFECÇÃO COM *ESCHERICHIA COLI* EM CAMUNDONGOS BALB/C ESPLENECTOMIZADOS E SUBMETIDOS A TRANSPLANTE AUTÓGENO DE BAÇO

4.2.1 Efeito da esplenectomia na capacidade de camundongos BALB/c de controlar infecções por *E. coli*

Trinta dias após a cirurgia para o transplante autógeno de baço, os camundongos BALB/c foram infectados com 10^9 CFU de *E. coli* e após três dias de infecção a contagem de *E. coli* no fígado revelou que os animais do grupo esplenectomizado apresentou maior ($p < 0.05$) número de colônias de *E. coli*, quando comparados aos demais grupos (Fig.14). Os animais do grupo cirurgia simulada tiveram número de colônias semelhante aos grupos que receberam transplante autógeno de baço, independente do sítio de implante utilizado retroperitônio ou grande omento (Fig.15).

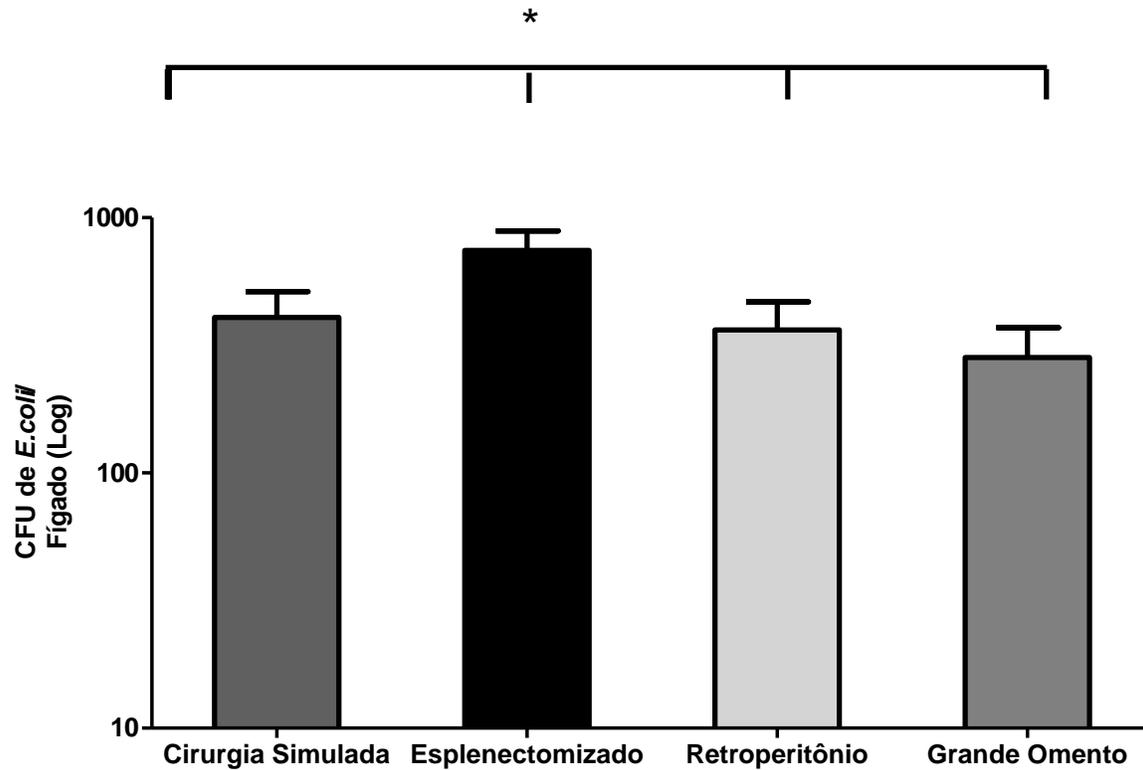


FIGURA 14. Efeito da esplenectomia e do transplante autógeno de baço no crescimento de *E. coli* no fígado de camundongos BALB/c infectados. Animais foram infectados i.v. com $10^9/200\text{mL}$ *E. coli* e o número de unidades formadoras de colônias (CFU) de bactérias foi avaliado 72 horas após a infecção, em macerados de fígado. As barras representam a média dos Log de CFU \pm SEM.* = $p < 0,05$ quando comparados aos outros grupos estudados.

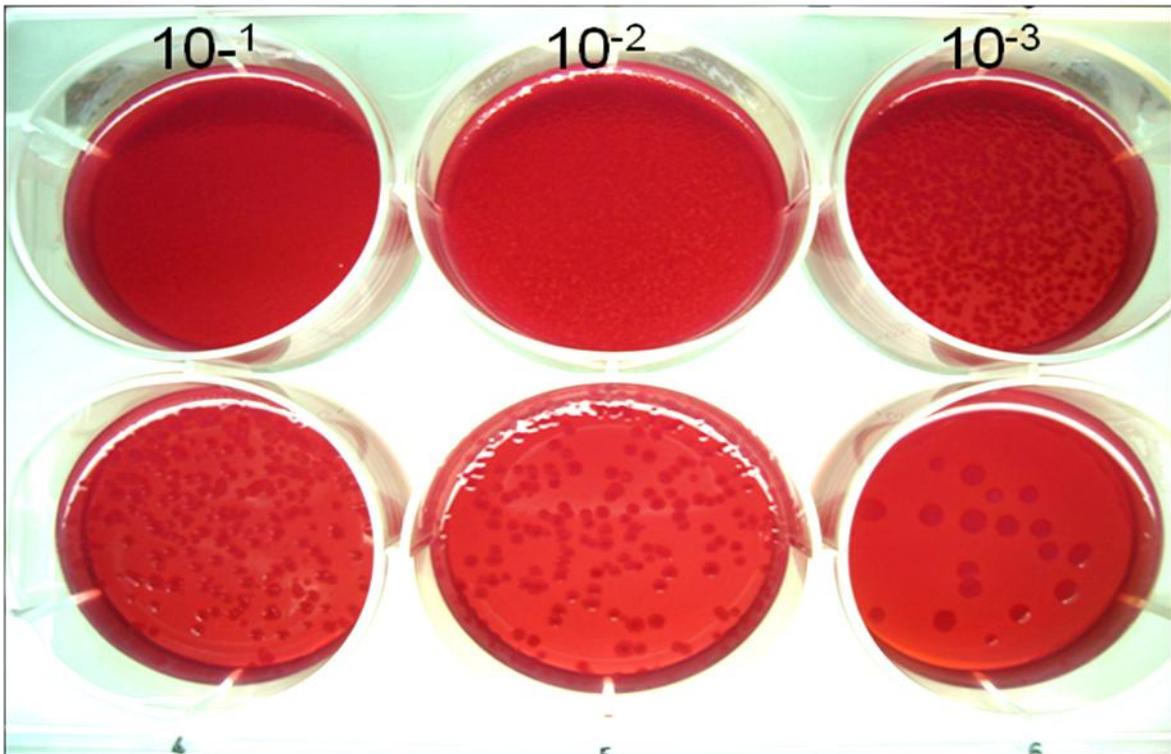


FIGURA 15. Fotografia de uma placa de 6 poços com as colônias de *E. coli* obtidas no macerado de fígado de um camundongo do grupo cirurgia simulada, após 24h de incubação a 37°C em estufa umidificada a 37°C. As bactérias foram cultivadas ágar MacConkey nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} .

4.2.2 Produção de IFN- γ pelas células do fígado de animais esplenectomizados e com transplantes autógenos após infecção com *E. coli*

A produção de IFN- γ no sobrenadante de fígado dos animais infectados e esplenectomizados foi maior (2023 ± 230 pg/mL) do que nos demais grupos ($p < 0,05$). A Fig.16 mostra que o grupo que possui o baço íntegro (cirurgia simulada) teve uma produção de IFN- γ (1684 ± 266 pg/mL) semelhante aos grupos transplantados tanto no retroperitônio (1572 ± 261 pg/mL) quanto no grande omento (1370 ± 226 pg/mL).

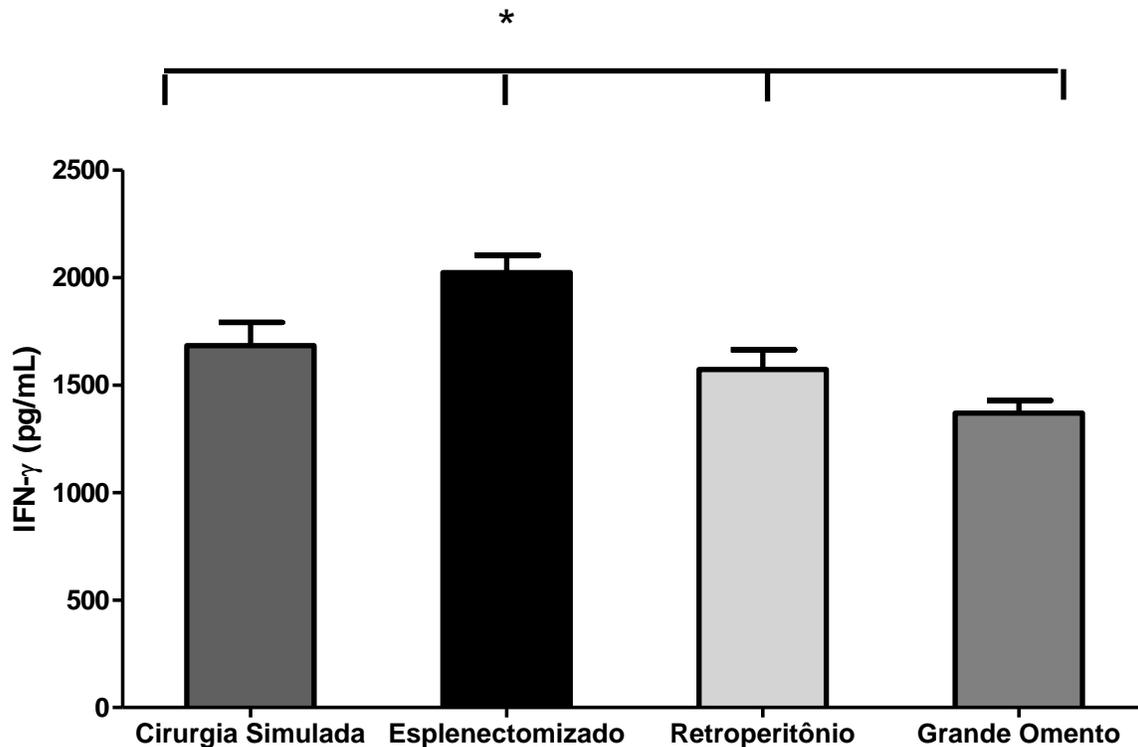


FIGURA 16. Produção de IFN- γ pelas células do fígado de camundongos BALB/c esplenectomizados e com transplantes autógenos. Níveis de IFN- γ no fígado dos animais após três dias de infecção com $10^9/200\mu\text{L}$ de *E. coli*. Valores representados em médias \pm SEM.*= $p < 0,05$ quando comparados aos outros grupos estudados.

4.2.3 Produção de NO pelas células do fígado de animais esplenectomizados e com transplantes autógenos após infecção com *E. coli*

A quantidade de NO produzido pelas células do fígado do grupo esplenectomizado foi maior ($1,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$) ($p < 0,05$) que a produzida pelo grupo grande omento ($1,2 \pm 0,17 \mu\text{M}$). A Fig. 17 mostra que os grupos com implante autógeno de baço no retroperitônio ($1,3 \pm 0,13 \mu\text{M}$) e no grande omento produziram uma quantidade de NO semelhante a produzida pelo grupo cirurgia simulada ($1,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$).

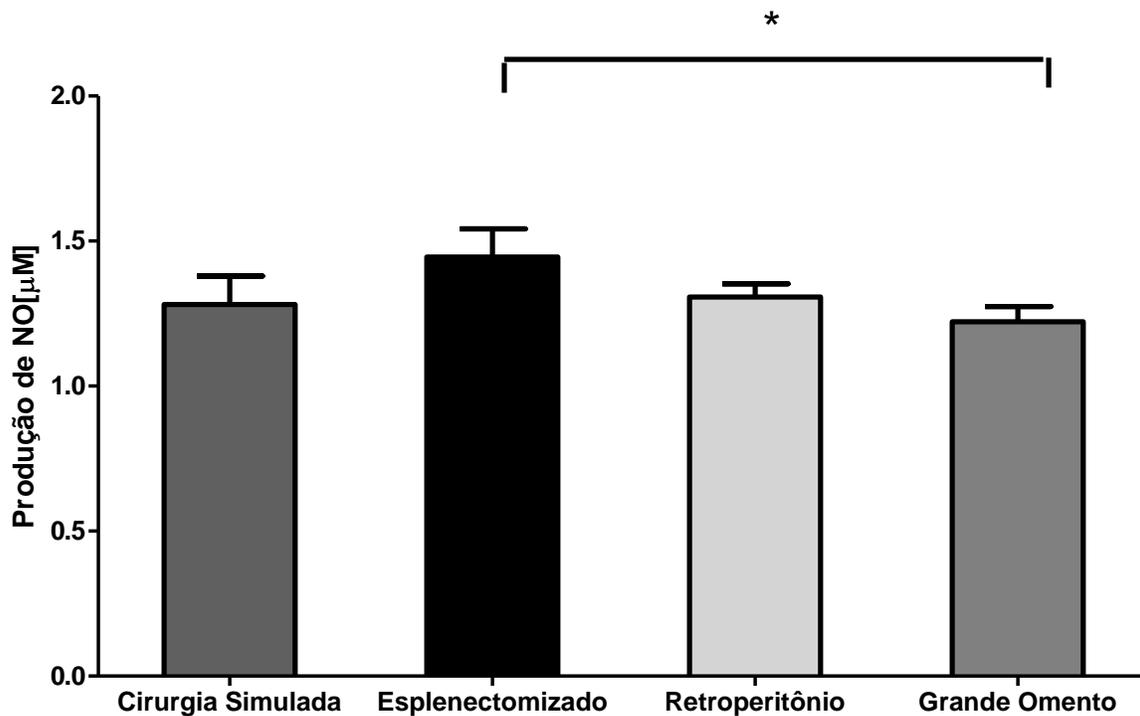


FIGURA 17. Produção de NO pelas células do fígado de camundongos BALB/c e esplenectomizados e com transplantes autógenos infectados com *E. coli*. Níveis de NO no fígado dos animais após três dias de infecção com $10^9/200\mu\text{L}$ de *E. coli*. A produção de NO foi avaliada pelo método de Griess. Valores representados em médias \pm SEM. * = $p < 0,05$ quando comparados aos outros grupos estudados.

4.2.4 Produção de IFN- γ pelas células esplênicas de animais esplenectomizados e com transplantes autógenos após infecção com *E. coli*

A avaliação da produção de IFN- γ no baço e fragmentos esplênicos de camundongos BALB/c infectados com *E. coli* como evidencia a Fig.18, mostra que as células do grupo cirurgia simulada (93 ± 25 pg/mL), dos grupos esplenectomizado e submetidos ao transplante autógeno no retroperitônio (155 ± 24 pg/mL) e esplenectomizado e submetidos ao transplante autógeno no grande omento (186 ± 11 pg/mL) produziram quantidades semelhantes de IFN- γ após 48h de cultura.

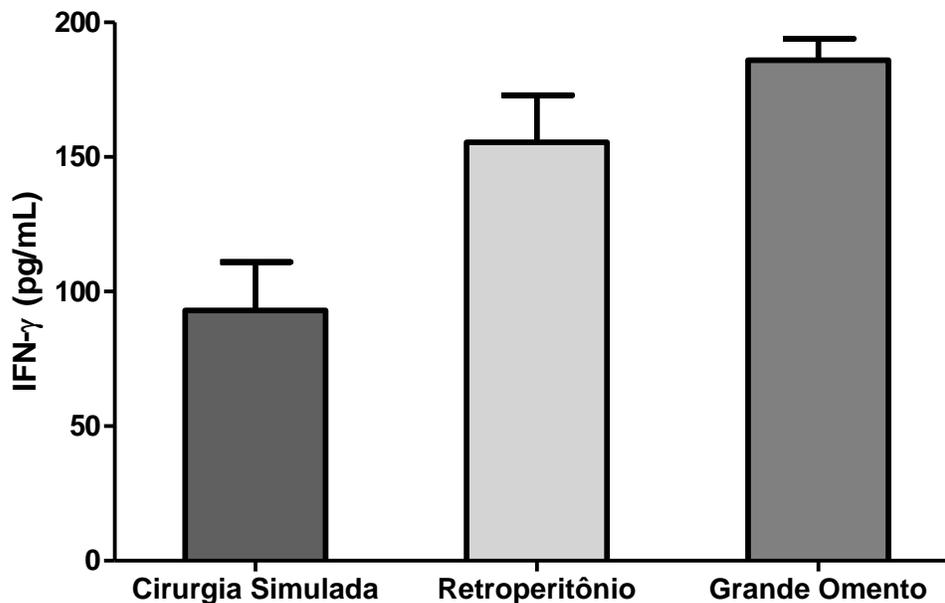


FIGURA 18. Produção de IFN- γ em 48h de cultura de células esplênicas. Camundongos BALB/c foram infectados com $10^9/200\mu\text{L}$ de *E. coli*. Após três dias de infecção a produção de IFN- γ por células esplênicas foi avaliada depois de 48h de cultura em presença de HKE ($10^7/\text{poço}$). Valores representados em médias \pm SEM.

4.2.5 Produção de anticorpos IgM no soro de animais esplenectomizados e com transplantes autógenos após infecção com *E. coli*

Os resultados da dosagem de anticorpos IgM anti-*E. coli* no soro dos animais mostraram que o grupo esplenectomizado apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) ($0,157 \pm 0,04$) de IgM sérica quando comparados aos demais grupos (Fig.19). Ambos os grupos transplantados, retroperitônio ($0,298 \pm 0,03$) e grande omento ($0,231 \pm 0,03$), mostraram níveis de IgM semelhantes ao do grupo cirurgia simulada ($0,300 \pm 0,01$).

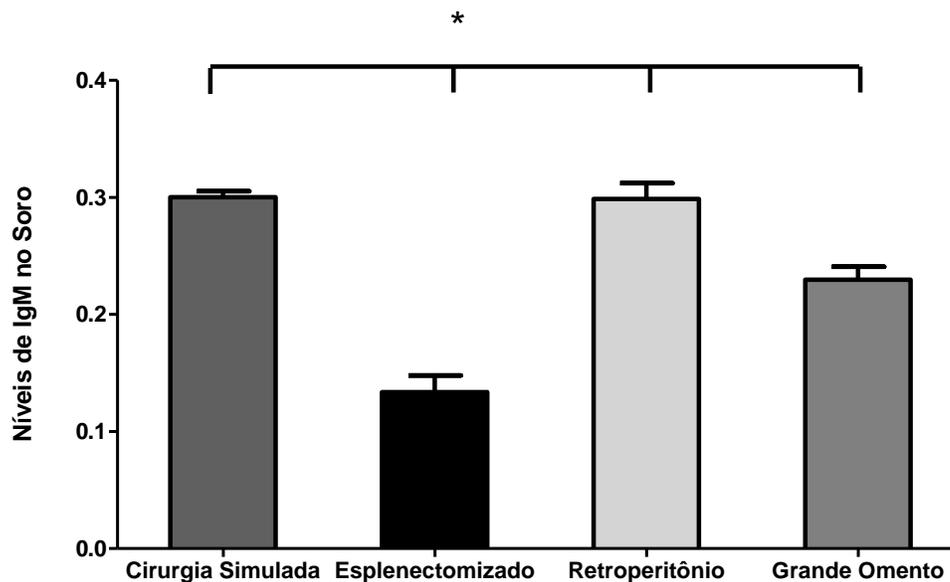


FIGURA 19. Produção de IgM no soro dos animais dos grupos cirurgia simulada, retroperitônio e grande omento. Camundongos BALB/c foram infectados com $10^9/200\mu\text{L}$ de *E. coli* e após três dias de infecção a produção de IgM no soro dos animais foi avaliada. * = $p < 0,05$ quando comparados aos outros grupos estudados.

4.2.6 Análise histológica de tecido do fígado de camundongos BALB/c infectados com *E. coli*

A avaliação histológica dos animais infectados com *E. coli* revelou que o grupo esplenectomizado apresenta um menor número de acúmulos de células mononucleares, com infiltrados intra-parenquimatosos (Fig.20 C) e alguns raros perivasculares, quando comparados aos demais grupos. Além disso, estes acúmulos foram de menor intensidade do que os encontrados em animais que possuíam baço intactos ou que receberam os fragmentos de baço. Foram observados alguns pontos de necrose tecidual nos animais infectados e esplenectomizados (Fig.20 A e B). De acordo com a classificação descrita anteriormente o grupo esplenectomizado se encontra na categoria moderado (nível I), possuindo menos de 5 acúmulos de células mononucleares por 20 campos de análise. O grupo cirurgia simulada apresenta maior concentração de acúmulos celulares inflamatórios (Fig.20 D) sendo classificado como alto (nível IV). Foram encontradas hiperplasia de células de Kupffer e em alguns pontos pode-se observar claramente áreas de necrose e corpos apoptóticos. Os implantes esplênicos em retroperitônio (Fig.20 E) e grande omento (Fig.20 F) foram classificados como acentuado (nível III). Foi possível observar mais de 5 acúmulos de células mononucleares espalhados pelo parênquima e alguns perivasculares, porém acúmulos de menor extensão do que os encontrados no grupo cirurgia simulada. No grupo grande omento, observou-se algumas áreas com hiperplasia de células de Kupffer. Todo o material foi analisado por um mesmo observador e os campos foram escolhidos de forma aleatória considerando os seguintes itens de avaliação: (1) a estrutura geral do órgão, (2) morfologia dos hepatócitos, (3) presença de acúmulos de células mononucleares intra-parenquimatosas e perivasculares.

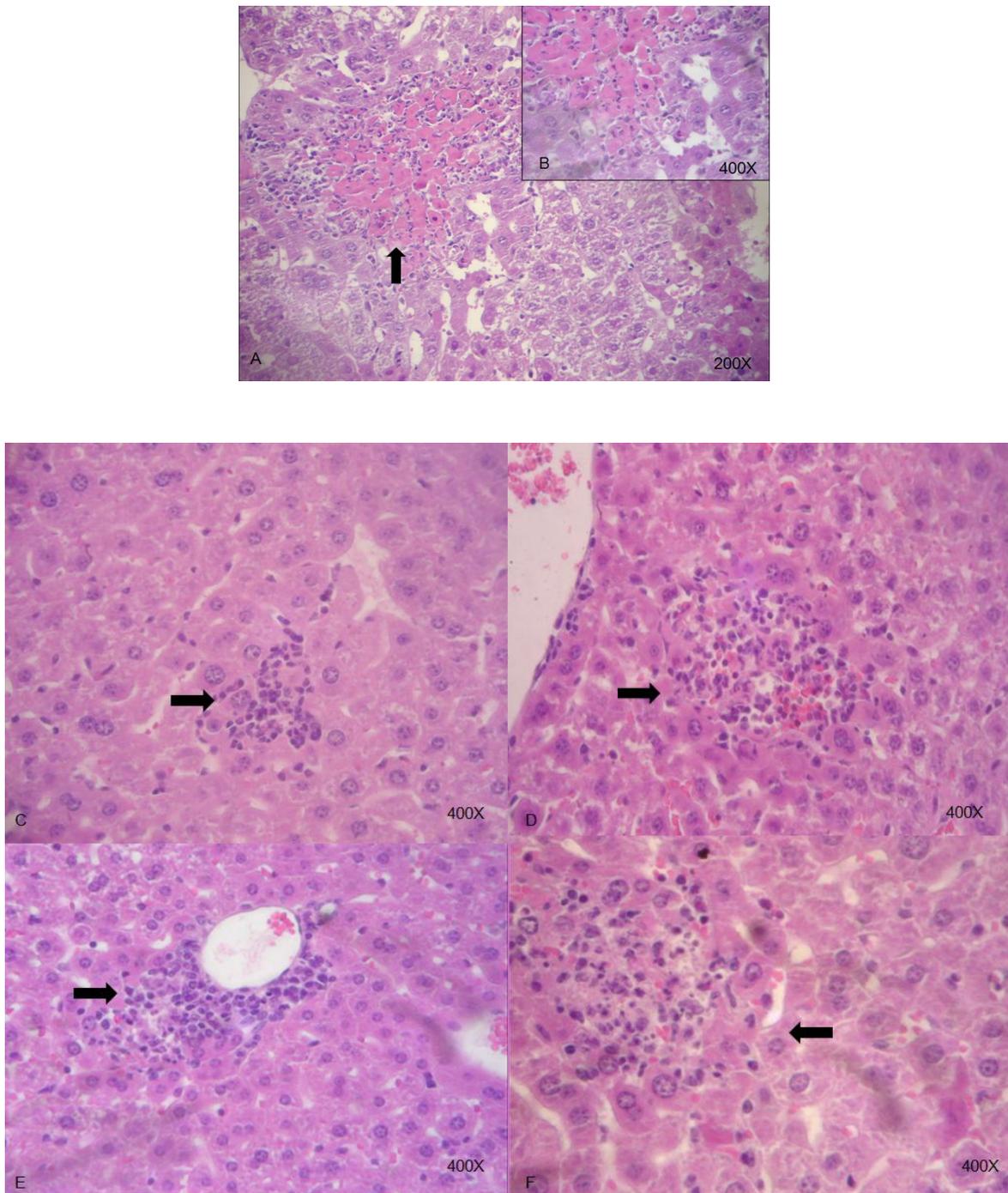


FIGURA 20. Fotografia das lâminas de tecido do fígado. (A) e (B) Área com infiltrado inflamatório e necrose central no fígado do grupo esplenectomizado (seta). **(C)** Acúmulo intraparenquimatoso de células mononucleares no fígado de um camundongo do grupo esplenectomizado (seta). **(D)** Acúmulo intraparenquimatoso de células mononucleares no fígado de um camundongo do grupo cirurgia simulada (seta). **(E) e (F)** Infiltrados inflamatórios dos grupos retroperitônio e grande omento, respectivamente (setas).

5 DISCUSSÃO

O transplante autólogo de baço é uma alternativa de preservação das funções do baço para pacientes onde a esplenectomia é inevitável (NUNES, *et al.*, 2005). É conhecido que pacientes esplenectomizados têm 58 vezes mais chances de desenvolver IFPE (infecção fulminante pós-esplenectomia) (MIKO *et al.*, 2001; KING & SCHUMACKER, 1952). Dois principais fatores são conhecidos por estarem envolvidos na patogenia da sepse pós-esplenectomia, fatores celulares principalmente relacionados à fagocitose e fatores humorais relacionados à produção de anticorpos. É aceito que o baço possui maior capacidade do que o fígado, por grama de tecido, para a fagocitose de microrganismos, contudo em casos de esplenectomia, a porção não esplênica do sistema mononuclear fagocitário, que inclui o fígado, compensa sua ausência (MARQUES & PETROIANU, 2003; CUNHA, 1998). O sistema imune do fígado é distinto de outros sítios, contendo muitos macrófagos residentes e linfócitos relacionados com a imunidade inata, como células NK (produtoras de IFN- γ) Estas populações garantem a vigilância contra antígenos estranhos (WANG *et al.*, 2005).

A resposta imune inata a bactérias Gram-positivas de persistência ou resistência intracelular, como a *L. monocytogenes*, envolve uma complexa rede de comunicações que abrange citocinas, mecanismos efetores bactericidas e múltiplos tipos celulares, como neutrófilos, macrófagos e células NK, todos estes com o objetivo de conter a disseminação bacteriana nos órgãos (BERG *et al.*, 2005). Neste estudo demonstramos que os animais que possuem baço íntegro, assim como os animais com transplantes autólogos foram mais susceptíveis à infecção por *L. monocytogenes*, enquanto animais apenas esplenectomizados, por sua vez, controlaram melhor a infecção e apresentaram um menor número de CFU no fígado, o que revela uma vantagem imunológica dos animais esplenectomizados.

Alguns autores já demonstraram a resistência dos esplenectomizados à *L. monocytogenes* (SKAMENE & CHAYASIRISOBHON, 1977; CHEERS & MCKENZIE, 1978; SKAMENE, CHAYASIRISOBHON & KONGSHAVN, 1978; PIETRANGELI *et al.*, 1983; KURANAGA *et al.*, 2005). No entanto, avaliamos pela primeira vez esta infecção em animais que sofreram transplante autógeno de baço em dois sítios de implante diferentes: retroperitônio e grande omento. Ambos os grupos transplantados exibiram uma resposta com número de CFU de *L. monocytogenes* semelhante ao do grupo cirurgia simulada, evidenciando que os fragmentos esplênicos se comportam como o órgão original.

O fato de o baço favorecer a multiplicação inicial da *L. monocytogenes* pode estar relacionado a uma falha exibida pelos leucócitos esplênicos na produção inicial de citocinas do tipo Th1 em resposta à infecção, enquanto que os leucócitos do fígado não apresentariam essa falha (KURANAGA *et al.*, 2005). Esta hipótese sugere que a *L. monocytogenes* pode explorar o meio ambiente com citocinas Th1 insuficientes para sua eliminação do baço, onde ela cresce explosivamente, e não no fígado, onde sua eliminação é mais efetiva. Foi demonstrado que a *L. monocytogenes* cresce exacerbadamente no baço e se expande para o fígado pela veia esplênica (KURANAGA *et al.*, 2005).

Conlan & North (1992), mostraram que numa infecção endovenosa por *L. monocytogenes*, o fígado recebe 90% do inóculo injetado e o baço recebe os 10% remanescentes. Desta forma, sugerimos que a esplenectomia pode acarretar ao fígado o recebimento de maior parte da carga bacteriana inoculada, e este órgão se mostra mais eficiente no combate à bactéria. Já foi demonstrado que em animais esplenectomizados ocorre um recrutamento de células NK para o fígado, processo regulado pela produção de quimiocinas e pela presença de células T (WANG *et al.*, 2005). Desta forma, as células NK do fígado participam da regulação do ambiente de citocinas Th1 e na diminuição da carga bacteriana no estágio inicial da infecção o que não ocorre no baço, por este motivo a multiplicação inicial da *L. monocytogenes* se apresenta mais alta no baço do que no fígado (KURANAGA, *et al.* 2005).

Com base nestas informações, acreditamos que os animais transplantados por possuírem apenas fragmentos esplênicos (30% do tecido total) recebam menores cargas bacterianas no fígado do que os animais controle que possuem o baço íntegro, pois a área de multiplicação inicial da *L. monocytogenes* é menor quando se tem um fragmento esplênico, desta forma, diminuindo o número de bactérias que se dirigem para o fígado.

A secreção de IFN- γ tem um papel importante, tanto na imunidade inata quanto na adaptativa frente à bactérias intracelulares, aumentando a resposta Th1 através da ativação de macrófagos, aumento da expressão de MHC-I e MHC-II e promovendo a inibição da proliferação de células Th2. O IFN- γ é produzido por múltiplos tipos celulares em resposta à *L. monocytogenes*, ou à combinação de IL-12 e IL-18, incluindo células NK, NKT, macrófagos, células B, células dendríticas, células T $\gamma\delta$, TCD8+ e TCD4+ do fenótipo Th1 (BERG *et al.*, 2005). É evidente que o IFN- γ tem um papel crítico na imunidade inata à *L. monocytogenes*. Experimentos com animais deficientes em IFN- γ ou em seu receptor, mostram grande aumento de mortalidade quando infectados com doses extremamente baixas de *L. monocytogenes*. Animais SCID, mostram maior susceptibilidade à *L. monocytogenes* quando depletados de IL-12 ou IFN- γ . Animais depletados de IL-12, quando tratados com IFN- γ têm a susceptibilidade revertida, mostrando a importância da IL-12 para a produção de IFN- γ e sugerindo que a baixa atividade de macrófagos é o provável mecanismo de aumento da susceptibilidade de camundongos deficientes no receptor de IFN- γ (BERG, *et al.*, 2005).

Nossos resultados mostram que de fato o aumento do IFN- γ contribuiu para o controle da *L. monocytogenes* no fígado dos animais. Os animais esplenectomizados mostraram um aumento desta citocina e apresentaram menores cargas bacterianas, no fígado em relação aos outros grupos.

Seo e colaboradores(2008), demonstraram que a molécula coestimulatória B7-H1 é regulada positivamente em populações de células, incluindo CD4+, CD8+, NK e macrófagos em infecções com *L. monocytogenes*. Ao administrar um antagonista desta

molécula, a produção de TNF- α e NO é inibida assim como a produção de IFN- γ pelas células NK, aumentando a mortalidade dos animais infectados com esta bactéria. Estes dados evidenciam a importância de moléculas, como NO e IFN- γ para a eliminação intracelular desta bactéria.

O controle efetivo da listeriose requer respostas imunes inatas e adaptativas, com os principais mediadores da eliminação bacteriana sendo neutrófilos e macrófagos. Citocinas importantes que dirigem a resposta inata são o IFN- γ (BUCHMEIER & SCHREIBER, 1985) e o TNF- α (HAVELL, 1989), que promovem ativação de macrófagos e dirigem a produção de mediadores como intermediários do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI). Segundo Shiloh e colaboradores (1999), camundongos *knockout* para a enzima óxido nítrico sintase (NOS2) e infectados com *L. monocytogenes* apresentam duas vezes mais bactérias no baço do que animais selvagens, isto indica que a molécula de NO é importante e tóxica para a bactéria, contribuindo fortemente para a sua eliminação.

Este trabalho sugere que a produção de NO, assim como de IFN- γ são importantes para eliminação da bactéria no fígado dos animais. Os animais esplenectomizados produziram maiores quantidades destas moléculas no fígado, o que pode explicar o maior controle da infecção por *L. monocytogenes* neste grupo. Foi possível observar que os grupos com implantes esplênicos produziram quantidades de IFN- γ e NO, no fígado semelhantes ao grupo cirurgia simulada.

A produção de IFN- γ na cultura de células esplênicas de animais infectados com *L. monocytogenes* e estimuladas com HKL mostra que em 48h de cultura, as células esplênicas de animais transplantados produzem IFN- γ em resposta ao antígeno específico de forma semelhante aos animais que possuem o baço íntegro, independente do sítio de implante utilizado.

Kuranaga e colaboradores (2005), mostraram dados que revelam que na infecção com *L. monocytogenes* o fígado produz maiores montantes de IFN- γ do que o baço, mesmo quando os animais são tratados com IL-18. Estes dados sugerem que a produção de IFN- γ pelas células esplênicas seja menos eficiente para a contenção da

infecção, do que o IFN- γ produzido no fígado. Desta forma, podemos confirmar que o baço não é de fundamental importância para o controle da infecção por *L. monocytogenes*. Além disso, North (1974), demonstrou que o fígado consegue destruir cerca de 50% da carga bacteriana recebida na infecção experimental com *L. monocytogenes* (onde o baço, recebe 10% e o fígado 90% da carga bacteriana), em 12h de infecção, como resultado da atividade microbicida dos macrófagos residentes do fígado. Desta forma, acreditamos que o IFN- γ seja essencial na ativação de macrófagos para a eliminação da *L. monocytogenes*, principalmente no fígado.

Segundo Skamene & Chayasirisobhon (1977), em animais esplenectomizados ocorre um aumento da atividade de macrófagos, mesmo antes da infecção. Wang e colaboradores (2005), relatam o influxo de células NK para o fígado de animais esplenectomizados. Este influxo de células é dependente da atividade de quimiocinas no fígado, e após a infecção com *L. monocytogenes* é conhecida a expressão de MCP-1, KC, e MIP-2 no fígado dos animais (IKEJIMA *et al.*, 2005). Desta forma o influxo de células mononucleares que é conseqüência da atividade das quimiocinas no fígado dos animais esplenectomizados se relaciona à resistência anti-listerial e ao declínio de microrganismos. Estes dados se confirmam pela análise histológica neste trabalho, onde o fígado dos animais esplenectomizados apresentou maior número de acúmulos de células mononucleares que do que os animais controle cirurgia simulada, ou os animais com transplantes autógenos. A análise histológica mostrou que após 3 dias de infecção os animais esplenectomizados possuem mais macrófagos ativados e eficientes na eliminação da *L. monocytogenes* no fígado, apontando para o envolvimento das células de Kupffer nesta resposta protetora (CONLAN & NORTH, 1992).

O fígado dos animais que receberam transplante autógeno de baço, assim como os animais do grupo cirurgia simulada, apresentaram menores quantidades de influxos mononucleares no fígado, o que justifica a maior concentração de bactérias, evidenciando que as células mononucleares do fígado se relacionam com a destruição da *L. monocytogenes* e o transplante autógeno de baço (no retroperitônio ou no grande

omento) é capaz de manter as funções esplênicas de forma semelhante ao órgão original.

A infecção com a *L. monocytogenes* mostra que a importância do baço é relativa, pois nesta infecção a presença esplênica é prejudicial. No entanto em outras bactérias, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* é conhecida a importância esplênica na eliminação destes microrganismos (HANSEN & SINGER, 2001; SUMARAJU *et al.*, 2001; MARQUES *et al.*, 2002; MARQUES & PETROIANU, 2003; MARQUES, PETROIANU & COELHO, 2003).

Este trabalho mostrou que ao contrário da resposta a *L. monocytogenes*, após 72 horas de infecção com *E. coli* os animais do grupo cirurgia simulada, e os animais que receberam implantes de baço, mostraram maior resistência à infecção em comparação ao grupo apenas esplenectomizado que teve maior contagem de bactérias no fígado. De fato, a *E. coli* é um dos principais agentes causadores de bacteremia após a esplenectomia e nossos resultados confirmam a importância do baço no controle desta infecção (MARQUES *et al.*, 2003; VAN SCHAİK *et al.*, 2007).

A *E. coli*, é uma bactéria extracelular, sujeita a ação de anticorpos circulantes, e o baço é um importante produtor de imunoglobulinas no organismo. Este fato indica a relevante participação esplênica assim como da imunidade humoral quando se trata da resolução desta infecção. No entanto a imunidade celular também é de grande importância no combate a infecção por bactérias. Ambas as respostas, humoral e celular participam da eliminação da *E. coli*. A fagocitose bacteriana pode ser considerada o primeiro passo para a geração de uma imunidade humoral, uma vez que os antígenos apresentados aos linfócitos T induzem ativação celular e participam da estimulação das células B produtoras de anticorpos. Anticorpos anti-*E. coli*, podem ser encontrados na urina, no caso de infecções do trato urinário (GILLON *et al.*, 1984; SIVAN *et al.*, 1982).

Na sepse induzida por *E. coli* ocorre um aumento na proporção de células TCD4+ e TCD8+ a partir do primeiro dia de infecção. As células T e suas citocinas, como o IFN-

γ , exibem um papel importante na defesa contra a *E. coli*. No entanto, já foi relatado o papel patogênico das células T nesta infecção. Animais deficientes em células T exibem uma diminuição na severidade da doença e camundongos deficientes em IFN- γ também apresentam queda nos sintomas de sepse e exibe reduzida ativação de células T, relacionando o papel patogênico das células T com a citocina inflamatória IFN- γ (VAN SCHAİK *et al.*, 2007). No entanto, o tratamento in vivo com IFN- γ recombinante em galinhas com infecção pulmonar induzida por *E. coli*, aprimora a resposta imune, com aumento no número de fagócitos no pulmão e sangue dos animais infectados (JANARDHANA *et al.*, 2007).

As células NK também participam da resposta contra *E. coli* produzindo IFN- γ em resposta ao LPS. Estas células são conhecidas por ser uma ponte entre imunidade inata e adaptativa. O IFN- γ produzido pelas células NK, é dependente da indução pelo LPS, mas também ocorre pela ação das citocinas IL-18 e IL-12. Animais que possuem deficiência nas células NK falham em ativar as células da imunidade inata em resposta ao LPS. As células NK além de fazer a ligação entre imunidade inata e adaptativa atuam como um passo inicial amplificador na resposta imune inata, e essa ação rápida e completa depende da produção inicial de IFN- γ pelas células NK (NAGARAJAN & KRONENBERG, 2007).

Em nosso trabalho, os níveis de IFN- γ no fígado dos animais esplenectomizados e infectados com *E. coli* foram altos, neste grupo também se encontrou a maior carga bacteriana. No entanto, nos grupos que possuíam tecido esplênico, grupo cirurgia simulada, e grupos com transplantes autógenos no retroperitônio e grande omento, a produção de IFN- γ no fígado foi menor, assim como a carga bacteriana, evidenciando que o baço exerce uma influencia importante no controle desta infecção. Sugerimos também que o controle desta infecção acontece por um mecanismo não restrito somente à produção de IFN- γ pelas células do fígado. Esta citocina não parece estar envolvida diretamente ou suficientemente na diminuição da carga bacteriana após 72h de infecção, neste caso propomos que a imunidade humoral do baço atue decisivamente na eliminação da *E. coli*.

Segundo Hopkins e colaboradores (1998), o número de anticorpos no baço de animais infectados com *E. coli* têm uma correlação positiva com a infecção nos órgãos, reforçando a importância dos anticorpos esplênicos na eliminação bacteriana. Cooney e colaboradores (1979), afirmam que mesmo que haja uma compensação imunológica pelo fígado nos animais esplenectomizados, esta é prejudicada com relação à produção de anticorpos. Nossos dados confirmam que animais esplenectomizados possuem baixos níveis de IgM no soro, enquanto os transplantes autógenos nos dois sítios estudados reverterem esses níveis. Os animais esplenectomizados exibem uma falha em controlar a infecção por *E. coli*, mesmo quando os níveis de IFN- γ e NO no fígado são altos. A este fato atribuímos a importante participação da imunidade humoral.

Fagócitos ativados produzem óxido nítrico, uma citotoxina conhecida presente na imunidade inata e ativa contra patógenos invasores. Alguns deles, como a *E. coli*, desenvolveram mecanismos para a detoxificação de NO e desta forma aumentam sua sobrevivência em ambientes oxigenados, micro-oxigenados, ou anóxicos, que podem ser encontrados em seus hospedeiros (WONDEREN, *et al.*, 2008).

Neste trabalho mostramos que animais esplenectomizados produziram maiores montantes de NO no fígado após infecção por *E. coli*. Porém, o fígado deste grupo possui maior número de unidades formadoras de colônias bacterianas quando se compara com os demais grupos. Este dado sugere que a participação do óxido nítrico produzido pelas células do fígado nesta infecção é relativa, assim como o IFN- γ não pode ser considerado o mecanismo mais efetivo na eliminação da *E. coli*. Este aumento de IFN- γ e NO, também pode ser visto como um indicativo de sepse, principalmente no grupo esplenectomizado com maior quantidade de bactérias no fígado. Os animais do grupo cirurgia simulada e os grupos que sofreram implantes autógenos esplênicos mostraram um menor número de unidades formadoras de colônias bacterianas no fígado, e também menores montantes de NO e IFN- γ , ressaltando novamente a importância da presença de tecido esplênico nesta infecção.

A análise histológica do tecido do fígado demonstrou que os animais esplenectomizados não apresentam grandes concentrações de células mononucleares, e apresentam algumas áreas de necrose tecidual, relacionando com a presença de maior número de bactérias. Os demais grupos, retroperitônio, cirurgia simulada, e grande omento, apresentaram mais acúmulos de células mononucleares, que podem estar relacionadas com maior eficiência no combate à *E. coli*.

As células esplênicas dos animais infectados com *E. coli* e estimuladas com HKE, não mostram diferenças significantes na produção de IFN- γ entre os grupos cirurgia simulada, retroperitônio e grande omento. Esta semelhança na produção de IFN- γ entre os grupos mostra que os implantes esplênicos, tanto em retroperitônio quanto em grande omento se comportam de maneira semelhante ao baço íntegro, reforçando que o tecido esplênico é importante na eliminação desta bactéria contribuindo na produção de citocinas.

O fígado mostrou ter um papel marcante nestas infecções, principalmente nos animais esplenectomizados. A atuação deste órgão é fundamental para a eliminação da *L. monocytogenes* em parte através da produção de NO e IFN- γ . Na infecção com *E. coli*, estas moléculas podem também ter uma atuação importante, porém não parecem ser o mecanismo que auxilia mais fortemente no controle da infecção, tendo a imunidade humoral aparentemente um papel mais relevante. Desta forma, sugerimos que o fígado dos animais esplenectomizados se mostra mais efetivo no controle da infecção com *L. monocytogenes* do que na infecção com *E. coli*, através de um mecanismo que envolve principalmente a ativação de imunidade celular.

Este trabalho mostrou que a realização do implante autógeno de baço é capaz de recuperar as funções deste órgão, relacionadas a resistência ou susceptibilidade à infecção, envolvendo a ativação de resposta imune humoral e celular.

6 CONCLUSÃO

- O transplante autógeno de baço é capaz de preservar as funções do órgão original relacionadas ao controle de infecções por *L. monocytogenes* e *E. coli*, independente do sítio de implante utilizado (retroperitônio ou grande omento).

- Na infecção com *L. monocytogenes*, o transplante autógeno de baço reverte as características da esplenectomia, tornando os animais mais susceptíveis, sendo o IFN- γ e o NO importantes na remissão bacteriana no fígado.

- Na infecção com *E. coli*, o transplante autógeno de baço, da mesma maneira, reverte as características da esplenectomia, no entanto torna os animais mais resistentes à infecção. O IFN- γ e o NO participam do controle da infecção, porém a imunidade humoral, com produção de IgM é aparentemente mais importante na diminuição da carga bacteriana, no fígado.

- O fígado é um órgão que participa do controle de infecções sistêmicas, sendo mais importante no combate à infecção por *L. monocytogenes* do que no controle da infecção por *E. coli*.

- A análise histológica revelou que o fígado dos animais esplenectomizados infectados por *L. monocytogenes* consegue montar uma resposta imune com maiores números de células mononucleares inflamatórias no combate à bactéria. Por outro lado, o fígado dos animais esplenectomizados e infectados com *E. coli* não é capaz de montar uma resposta imune satisfatória, sendo os animais esplenectomizados mais susceptíveis à infecção com *E. coli*, exibindo menor número de células mononucleares inflamatórias, e áreas de necrose tecidual. Os animais com implantes autógenos de baço, em ambas as infecções apresentaram semelhanças no tecido do fígado com o grupo que possui baço íntegro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. Cap. 2, p. 17-39.

ANDO, K.; MIYANO, T.; YAMATAKA, A.; LANE, G.; KOBAYASHI, H.; SHIMIZU, T.; YAMASHIRO, Y. Torsion of autotransplanted splenic tissue in Gaucher disease. **J. Pediatr. Surg.**, v. 32, p. 747-9, 1997.

ARMSTRONG, D.; WONG, B. Central nervous system infections in immunocompromised hosts. **Annu. Ver. Med.**, v. 33, p. 293-308, 1982.

AVENDAÑO, R.H. Traumatismo esplénico. **Cuad. Cir.**, v. 11, p. 71-8, 1997.

BARNICH, N.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World. J. Gastroenterol.**, v. 14, p. 5571-6, 2007.

BERG, R. E.; CROSSLEY, E.; MURRAY, S.; FORMAN, J. Relative contributions of NK and CD8 T cells to IFN-gamma mediated innate immune protection against *Listeria monocytogenes*. **J. Immunol.**, v. 175, p.1751-7, 2005.

BIRMINGHAM, C. L.; CANADIEN, V.; KANIUK, N. A.; STEINBERG, B. E.; HIGGINS, D. E.; BRUMELL, J. H. Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles. **Nature.**, v. 451, p. 350-354, 2008.

BRANDT, C. T.; MACIEL, D. T.; CANECA, O. A. F.; CASTRO, C. M. M. B. de.; ARAÚJO, L. B. Autotransplant of spleen tissue in children with schistosomiasis: evaluation of splenic function after splenosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 96, p 117-22, 2001.

BUCHMEIER, N. A.; SCHREIBER, R. D. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 82, p. 7404-8, 1985.

BUCHANAN, R. L.; DOYLE, M. P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O 157: H 7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Food. Technol.**, v. 51, p. 69-76, 1997.

BUNTAIN, W. L.; GOULD, H. R. Splenic trauma in children and techniques of splenic salvage. **World. J Surg.**, v. 9, p. 398, 1985.

CEGELSKI, L.; MARSHALL, G. R.; ELDRIDGE, G. R.; HULTGREN, S. J. The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, p. 17-27, 2008.

CHEERS, C.; MCKENZIE, I. F. C. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infections: genetics of listeriosis. **Infect. Immun.**, v. 19, p. 755-62, 1978.

CHRISTO, M. C.; DIDIO, L. J. Anatomical and surgical aspects of splenic segmentectomies. **Ann. Anat.**, v. 179, p. 461-74, 1997.

CONLAN, J. W.; NORTH, R. J. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 5164-71, 1992.

COONEY, D. R.; DEARTH, J. C.; SWANSON, S. E.; DEWANJEE, M. K.; TELANDER, R. L. Relative merits of partial splenectomy, splenic reimplantation, and immunization in preventing postsplenectomy infection. **Surgery.**, v. 86, p. 561-9, 1979.

CUNHA, B. A. Infections in nonleukopenic compromised hosts (diabetes mellitus, SLE, steroids, and asplenia) in critical care. **Crit. Care. Clin.**, v. 14, p. 263-82, 1998.

DE CHASTELLIER, C.; BERCHE, P. Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 543-53, 1994.

DEDIOL, C.; NACIF, N.J.; ANDRÉ, S.; SANCHEZ, M.L.; ACOSTA, M.V.; SFREDSO, S.E.; et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* en carne vacuna fresca en el área del Gran Mendoza. **Hig. Aliment.**, v.16, p.13-16, 2002.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 476-511, 1991.

FRANCO, B. D.; LANDGRAF, M. Microorganismos patogênicos de importância em alimentos. In: **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 33-81.

FRANKENBERG, T.; KIRSCHNEK, S.; HÄCKER, H.; HÄCKER, G. Phagocytosis-induced apoptosis of macrophages is linked to uptake, killing and degradation of bacteria. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 204-15, 2008.

GILLON, G. ; SMALL, M.; MEDALIA, O.; ARONSON, M. Sequential study of bacterial clearance in experimental cystitis. **J. Med. Microbiol.**, v. 18, p.319-26, 1984.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; et al: Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v.126, p.131-8, 1982.

HAMON, M.; BIERNE, H.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, p. 423-34, 2006.

HANSEN, K.; SINGER, D. B. Asplenic-hyposplenic overwhelming sepsis: Postsplenectomy sepsis revisited. **Pediatr. Dev. Pathol.**, v.4, p. 105-20, 2001.

HARA, H.; KAWAMURA, I.; NOMURA, T.; TOMINAGA, T.; TSUCHIYA, K.; MITSUYAMA, M. Cytolysin-dependent escape of the bacterium from the phagosome is required but not sufficient for induction of the Th1 immune response against *Listeria monocytogenes* infection: distinct role of Listeriolysin O determined by cytolysin gene replacement. **Infect. Immun.**, v.8, p. 3791-800, 2007.

HAVELL, E. A. Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. **J. Immunol.**, v. 143, p. 2894-9, 1989.

HOPKINS, W. J.; GENDRON-FITZPATRICK, A.; BALISH, E.; UEHLING, D. T. Time course and host responses to *Escherichia coli* urinary tract infection in genetically distinct mouse strains. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2798-802, 1998.

IKEJIMA, S.; SASAKI, S.; SASHINAMI, H.; MORI, F.; OGAWA, Y.; NAKAMURA, T.; ABE, Y.; WAKABAYASHI, K.; SUDA, T.; NAKANE, A. Impairment of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection in liver of db/db and ob/ob mice. **Diabetes.**, v.54, p.182-9, 2005.

JANARDHANA, V.; FORD, M. E.; BRUCE, M. P.; BROADWAY, M. M.; O'NEI, L. T. E.; KARPALA, A. J.; ASIF, M.; BROWNING, G. F.; TVENDALE, K. A.; NOORMOHAMMADI, A. H.; LOWENTHAL, J. W.; BEAN, A. G. IFN-gamma enhances immune responses to *E. coli* infection in the chicken. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 27, p. 937-46, 2007.

JARADAT, Z. W.; BHUNIA, A. K. Adhesion, invasion, and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 3640-5, 2003.

KARAGÜLLE, E.; HOŞCOŞKUN, Z.; KUTLU, A. K.; KAYA, M.; BAYDAR, S. The effectiveness of splenic autotransplantation: an experimental study. **Ulus. Travma. Acil. Cerrahi.Derg.**, v. 13, p. 13-19, 2007.

KAUFMANN, S. H.; BRINKMANN, V. Attempts to characterize the T-cell population and lymphokine involved in the activation of macrophage oxygen metabolism in murine listeriosis. **Cell. Immunol.**, v. 88, p. 545-50, 1984.

KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 129-63, 1993.

KING, H., SHUMACKER, H. B. Jr. I. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. **Ann. Surg.**, v. 136, p.239- 42, 1952.

KURANAGA, N.; KINOSHITA, M., KAWABATA, T.; SHINOMIYA, N.; SEKI, S. A defective Th1 response of the spleen in the initial phase may explain why splenectomy helps prevent a *Listeria* infection. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 140, p. 11-21, 2005.

LIAUNIGG, A.; KASTBERGER, C.; LEITNER, W.; KURZ, M.E.; BERGMANN, E.S.; SEIFRIEDSBERGER, M.; WEINTICH, D.; PIMPL, W.; THALHAMER, J. Regeneration of autotransplanted splenic tissue at different implantation sites. **Cell. Tissue. Res.**, v. 269, p.1-11, 1992.

LOGUÉRCIO, A. P.; SILVA, W. P.; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. de. *Listeria monocytogenes*:um importante patógeno de origem alimentar. **Hig. Aliment.**, v. 15, p. 39-48, 2001.

LOVETT, J. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. **Food. Technol.**, v. 51, p. 172–175, 1988.

MARQUES, R.G.; PETROIANU, A.; OLIVEIRA, M. B. N; FILHO, M.B. Importância da preservação de tecido esplênico para a fagocitose bacteriana. **Acta. Cir. Bras.**, v. 17, p. 388-93, 2002.

MARQUES, R.G.; PETROIANU, A. Overwhelming postsplenectomy infection. **Arq. Gastroenterol.**, v.40, p. 47- 54, 2003.

MARQUES, R. G.; PETROIANU, A.; COELHO, J.M.C de O. Bacterial phagocytosis by macrophage of autogenous splenic implant. **Braz. J. Biol.**, v.63, p. 491-5, 2003.

MATSUSHITA, A.; IWASE, M.; KATO, Y.; ICHIHARA, S.; ICHIHARA, G.; KIMATA, H.; HAYASHI, K.; HASHIMOTO, K.; YOKOI, T.; NODA, A.; KOIKE, Y.; YOKOTA, M.; NAGATA, K. Differential cardiovascular effects of endotoxin derived from *Escherichia coli* or *Pseudomonas aeruginosa*. **Exp. Anim.**, v. 56, p.339-48, 2007.

MICHANIE, S. La Bacteria que disparo el HACCP en la industria de la carne. **Rev. Uni. Ind. Carnica Arg.**, v. 4, p. 40– 42. 2003.

MIKÓ, I.; BRÁTH, E.; FURKA, I.; et al. Spleen autotransplantation in mice: a novel experimental model for immunology study. **Microsurgery.**, v. 21, p.140- 2, 2001.

NAGARAJAN, N. A.; KRONENBERG, M. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, v. 178, p. 2706-13, 2007.

NORTH, R. J.; CONLAN, J. W. Immunity to *Listeria monocytogenes*. **Chem. Immunol.**, v. 70, p. 1-20, 1998.

NORTH, R. J. T cell dependence of macrophage activation and mobilization during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 10, p.66- 71, 1974.

NUNES, S. I.; REZENDE, A.B.; TEIXEIRA, F. M. FERREIRA, A.P; ALVES, M. M.M J.; JAMES, N.; ASSIS, R.V.C.; TEIXEIRA, H.C. Antibody response of autogenous splenic tissue implanted in the abdominal cavity of mice. **World. J. Surg.**, v. 29, p. 1623, 2005.

ORDA, R. Splenosis: a beneficial condition. **J .R. Soc. Med.**, v. 761, p. 909-10, 1983.

ORGUN, N. N.; WAY, S. S. A critical role for phospholipase C in protective immunity conferred by listeriolysin O-deficient *Listeria monocytogenes*. **Microb. Pathog.**, v. 44, p. 159-63, 2007.

PARK B.J.; TAKATORI K.; LEE, M.H.; HAN, D-W.; WOO, Y. I.; SON, H. J.; KIM, J. K.; CHUNG, K-H.; HYUN, S. O.; PARK, J-C. *Escherichia coli* sterilization and lipopolysaccharide inactivation using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. **Surf. Coating Tech.**, v.201, p. 5738-5741, 2006.

PIETRANGELI, C.; PANG, K. C.; SKAMENE, E.; KONGSHAVN, P. A. L. Characteristics of mononuclear phagocytes mediating antilisterial resistance in splenectomized mice. **Infect. Immun.**, v. 39, p. 742-9, 1983.

PINNER, R. W.; SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; HAYES, P. S.; DEEVER, K. A.; WEAVER, R. E.; PLIKAYTIS, B. D.; REEVES, M.; BROOME, C. V.; WENGER, J. D. Role of foods in sporadic listeriosis. II. Microbiologic and epidemiologic investigation. The Listeria Study Group. **JAMA.**, v. 267, p. 2046-50, 1992.

PISTERS, P. W.; PACHTER, H. L. Autologous splenic transplantation for splenic trauma. **Ann. Surg.**, v. 219, p. 225-35, 1994.

POWER, R. E.; KAY, E. W.; BOUCHIER-HAYES, D. Exogenous and endogenous angiogenic stimuli do not augment splenic autotransplantation. **Eur. J. Surg.**, v.168, p. 247-50, 2002.

REZENDE, A.B.; NUNES, S.I.; FARIAS, R.E.; VIEIRA, F.R.; PETROIANU, A.; TEIXEIRA, H. C. Influência do baço, da asplenia e do implante esplênico autógeno no metabolismo lipídico de camundongos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 34, p.177-82, 2007.

ROBSON, H. N. Medical aspects of splenectomy. **Edinburgh. Med. J.**, v. 56, p. 381-95, 1949.

SERBINA, N.V.; JIA, T.; HOHL, T.M.; PAMER, E.G. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu. Ver. Immunol.**, v. 26, p.421-52, 2008.

SEO, S. K.; JEONG, H. Y.; PARK, S. G.; LEE, S. W.; CHOI, I. W.; CHEN, L.; CHOI, I. Blockade of endogenous B7-H1 suppresses antibacterial protection after primary *Listeria monocytogenes* infection. **Immunology.**, v. 123, p. 90-9, 2008.

SHAUGHNESSY, L. M.; SWANSON, J. A. The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. **Front. Biosci.**, v. 12, p. 2683-92, 2007.

SHILOH, M. U.; MACMICKING, J. D.; NICHOLSON, S.; BRAUSE, J.E.; POTTER, S.; MARINO, F.F.; DINAUER, M.; NATHAN, C. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. **Immunity.**, v. 10, p. 29-38, 1999.

SIVAN, Y.; GRIFFEL, B.; MEDALIA, O.; ARONSON, M. Comparative histology of the mouse bladder following initial infection and re-infection with *Escherichia coli*. **J. Pathol.**, v.138, p.353-64, 1982.

SKAMENE, E.; CHAYASIRISOBHON, W. Enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* in splenectomized mice. **Immunology.**, v.33, p.851- 8, 1977.

SKAMENE, E.; CHAYASIRISOBHON, W.; KONGSHAVN, P. A. L. Increased phagocytic activity of splenectomized mice challenge with *Listeria monocytogenes*. **Immunology.**, v.34, p. 901-7, 1978.

SOUZA, J. C. L. de.; ATHIE, E.; MARIGO, C.; RAHAL, F.; FAGUNDES, D.J. Estudo da regeneração esplênica autóloga e heterotópica em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, p. 253-257, 2005.

SERBINA, N. V.; PAMER, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. **Nat. Immunol.**, v. 7, p. 311-7, 2006.

STENUTZ, R.; WEINTRAUB, A.; WIDMALM, G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 30, p.382-403, 2006.

SUMARAJU, V.; SMITH, L. G.; SMITH, S. M., et al. Infectious Complications in Asplenic Hosts. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v.15, p. 551-65, 2001.

TAM, M. A.; WICK, M. J. Dendritic cells and immunity to *Listeria*: TipDCs are a new recruit. **Trends Immunol.**, v.25, p. 335-9, 2004.

TEIXEIRA, F.M; FERNANDES, B.F; REZENDE, A.B; MACHADO, R. R. P.; ALVES, C. C. S.; PEROBELLI, S. M.; NUNES, S. I.; FARIAS, R. E.; RODRIGUES, M. F.; FERREIRA, A. P.; OLIVEIRA, S. C.; TEIXEIRA, H. C. *Staphylococcus aureus* infection after splenectomy and splenic autotransplantation in BALB/c mice. **Clin. Exp. Immunol.** **2008**. No Prelo.

TEIXEIRA, H. C.; KAUFMANN, S. H. Role of NK1.1+ cells in experimental Listeriosis. NK1+ cells are early IFN- γ producers but impair resistance to *Listeria monocytogenes* infection. **J. Immunol.**, v. 152, p. 1873-82, 1994.

VAN SCHAIK, S. M.; ABBAS, A.K. Role of T cells in a murine model of *Escherichia coli* sepsis. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p.3101-10, 2007.

WANG, J.; XU, J.; ZHANG, W.; WEI, H.; TIAN, Z. TLR3 ligand-induced accumulation of activated splenic natural killer cells into liver. **Cell. Mol. Immunol.**, v.2, p. 449-53, 2005.

WONDEREN J. H.V.; BURLAT, B.; RICHARDSON, D. J.; CHEESMAN, M. R.; BUTT, J. N. The nitric oxide reductase activity of cytochrome c nitrite reductase from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 9587-94, 2008.

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

WLUKA, A.; OLSZEWSKI, W.L. Innate and adaptive processes in the spleen. **Ann. Transplant.**, v.11, p. 22, 2006.

ZENEWICZ, L. A.; SHEN, H. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 1208-15, 2007.

ANEXO