

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

BRUNO FARIA FERNANDES

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ESPLENECTOMIA E DO IMPLANTE AUTÓGENO DE
BAÇO NA RESISTÊNCIA A INFECÇÃO CAUSADA POR *Streptococcus pneumoniae*
EM CAMUNDONGOS BALB/c

JUIZ DE FORA

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

BRUNO FARIA FERNANDES

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ESPLENECTOMIA E DO IMPLANTE AUTÓGENO DE
BAÇO NA RESISTÊNCIA A INFECÇÃO CAUSADA POR *Streptococcus pneumoniae*
EM CAMUNDONGOS BALB/c

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Mestrado em Saúde do Programa de
Pós-Graduação em Saúde – Área de
Concentração em Saúde Brasileira da
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

JUIZ DE FORA

2009

Fernandes, Bruno Faria.

Avaliação do efeito da esplenectomia e do implante autógeno de baço na resistência à infecção causada por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos BALB/c / Bruno Faria Fernandes. – 2009.
68 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Brasileira)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

1. Baço. 2. Esplenectomia. 3. *Streptococcus pneumoniae*. I. Título.

CDU 616.411

BRUNO FARIA FERNANDES

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ESPLENECTOMIA E DO IMPLANTE AUTÓGENO DE
BAÇO NA RESISTÊNCIA A INFECÇÃO CAUSADA POR *Streptococcus pneumoniae*
EM CAMUNDONGOS BALB/c

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de Concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde pela seguinte banca examinadora:

Aprovada em: 31/08/2009

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Sérgio Ibañez Nunes
Fundação José Bonifácio de Andrade - FUNJOB

Prof^a. Dr^a. Vânia Lúcia da Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me dá força de vontade a cada dia que nasce para concretizar minhas expectativas profissionais.

Aos meus pais, Airton Fernandes e Ana Beatriz Fernandes, pelo apoio e incentivo.

A minha noiva, Maria Luíza por sua paciência e compreensão nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Aos meus irmãos, Rafael Fernandes, Ana Luísa Fernandes e Mariana Fernandes por seus estímulos.

A todos os familiares por sua torcida.

Ao Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira pela confiança e orientação para a concretização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Imunologia por confiarem em mim.

Ao médico Patologista, Dr. Rogério Farias pela ajuda na análise histopatológica.

*“Os teus atos, e não os teus conhecimentos, é
que determinam o teu valor”.*

Johann Fichte.

RESUMO

A importância da preservação esplênica pela técnica do implante autógeno de tecido esplênico ou autotransplante esplênico é justificada pela alta incidência de infecção fulminante após esplenectomia (IFPE). Aproximadamente 80% dos casos relatados de IFPE, são causados pelo *Streptococcus pneumoniae*, também denominado pneumococo, é um coco Gram-positivo que tem como habitat a nasofaringe de seres humanos e é considerado o principal causador de otites media, meningite e pneumonia. Neste estudo buscamos investigar a capacidade de animais submetidos a esplenectomia e ao implante autógeno de baço em responder à infecção por *S. pneumoniae*. Foi avaliado a imunidade humoral e celular em camundongos BALB/c divididos em três grupos: Autotransplantado (AT), Esplenectomizado (SP) e Controle Sham (CT). A contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) no fígado e nos pulmões mostrou que os camundongos do grupo SP apresentaram maior número de bactérias em ambos os órgãos além de uma resposta imune humoral insatisfatória, sendo identificado os menores níveis séricos de IgM, IgG1 e IgG2a anti- *S. pneumoniae* nesse grupo. A presença do fragmento esplênico induz a produção de IL-17A e o recrutamento de neutrófilos no fígado e nos pulmões dos camundongos autotransplantados, porém os camundongos esplenectomizados apresentavam os menores níveis de IL-17 A. Esses dados podem ser relacionados o UFC nos pulmões e fígado dos animais. Os resultados obtidos sugerem que o implante autógeno de baço restaura a capacidade de camundongos esplenectomizados de combater a infecção por *S. pneumoniae*.

Palavras-chave: Baço. Esplenectomia. Implante esplênico autógeno *Streptococcus pneumoniae*.

ABSTRACT

The importance of the technique of autogenous implant of splenic tissue or splenic autotransplant is justified by the high incidence of overwhelming postsplenectomy infection (OPSI). Approximately 80 % of the reported cases of OPSI, are caused by *Streptococcus pneumoniae*, also called pneumococcus, which is a Gram-positive coccus having the human nasopharynx as habitat and considered the principal cause of otitis media, meningitis and pneumonia. In this study we investigate the capacity of animals having undergone splenectomy and autogenous implant of spleen for responding to infection by *S. pneumoniae*. Humoral and cellular immunity were evaluated in BALB/c mice divided into three groups: Autotransplanted (AT), Splenectomized (SP) and Sham (CT). The count of the number of colony forming units (CFU) in the liver and in the lungs showed that the mice of the SP group presented a greater number of bacteria in both organs aside from lower serum levels of IgM, IgG1 and IgG2a anti - *S. pneumoniae*. The presence of splenic fragment induces the production of IL-17A and the recruitment of neutrophils to the liver and lungs of the autotransplanted mice, however the splenectomized mice presented the lowest levels of IL-17A. These data can be related to the CFU in the lungs and liver of the animals. The results obtained suggest that the autogenous implant of spleen restores the splenectomized mouse's capacity for fighting infection with *S. pneumoniae*.

Keywords: Spleen. Splenectomy. Autogenous splenic implant. *Streptococcus pneumoniae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Grafico 1	Morfologia do <i>Streptococcus pneumoniae</i>	23
Grafico 2	Modelos de gates utilizados em células do baço e de pulmões visando separar as populações celulares.....	36
Grafico 3	Implante autógeno de baço restaura a resistência de camundongos BALB/c esplenectomizados submetidos à infecção por <i>S. pneumoniae</i>	38
Grafico 4	Efeito da esplenectomia nos níveis de anticorpos específicos anti- <i>S. pneumoniae</i> produzidos no soro de camundongos BALB/c infectados.....	39
Grafico 5	Níveis de IFN- γ , IL-10 e TNF- α em sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c infectados com <i>S. pneumoniae</i> e estimulados com antígenos específicos.....	40
Grafico 6	Níveis de IFN- γ , IL-10 e TNF- α nos pulmões e fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>S. pneumoniae</i>	42
Grafico 7	Porcentagem de neutrófilos e produção de IL-17 A no fígado e nos pulmões de camundongos esplenectomizados e autotransplantados infectados com <i>S. pneumoniae</i>	43
Grafico 8	Porcentagem de células TCD4 ⁺ , células TCD8 ⁺ , macrófagos (CD4 ⁺ CD40 ⁺ Cd3 ⁻) e células B (CD19 ⁺) nos pulmões de camundongos esplenectomizados e autotransplantados infectados com <i>S. pneumoniae</i> e avaliados por meio de citometria de fluxo.....	45
Grafico 9	Porcentagem de células TCD4 ⁺ , células TCD8 ⁺ , macrófagos (CD4 ⁺ CD40 ⁺ Cd3 ⁻) e células B (CD19 ⁺) em amostras de células mononucleares de sangue periférico de camundongos BALB/c esplenectomizados e autotransplantados infectados com <i>S. pneumoniae</i> e avaliados por meio de citometria de fluxo.....	46
Gráfico 10	Análise histológica de cortes do fígado corado com hematoxilina-eosina do grupo CT (A), grupo AT (B) e grupo SP (C).....	46
Grafico 11	Análise histológica de pulmões de camundongos esplenectomizados e autotransplantados infectados com <i>S. pneumoniae</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
APC	Células apresentadoras de antígenos
AT	Grupo autotransplantado
ATCC	American Type Culture Collection
BALB/c	Linhagem de camundongos
BSA	Bovine Seric Albumin
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CD	Marcador de diferenciação
CD4	Marcador de diferenciação 4
CD5	Marcador de diferenciação 5
CD8	Marcador de diferenciação 8
CD11b	Marcador de diferenciação 11b
CD19	Marcador de diferenciação 19
CD21	Marcador de diferenciação 21
CD25	Marcador de diferenciação 25
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
C57bl/6	Linhagem de camundongos
C-Ps	Polissacarídeos de parede celular
CT	Controle
DAB	Di-amino benzidina
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
g	grama
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
H₂O₂	Peróxido de nitrogênio
HKSp	Heat Killed <i>S. pneumoniae</i>
Igs	Imunoglobulinas
IgA	Imunoglobulina A

IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G tipo 1
IgG2a	Imunoglobulina G tipo 2a
IFN-gama	Interferon gama
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IL-17A	Interleucina 17 A
IL-10	Interleucina 10
i.p.	Intraperitoneal
LN	Logarítmo neperiano
LPS	Lipopolissacárides
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Militros
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minutos
μ M	Micromolar
NO	Óxido nítrico
NK	Células Natural Killer
OD	Optical density
OPD	o-fenilenodiamina
PBS	Phosphate buffered saline

pH	Concentração de íons hidrogênio em solução
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PALS	Periarteriolar Lymph sheath
PAMPs	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
p/v	Peso por volume (concentração)
RPM	Nº de rotações por minuto
SIGNR	Specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing nonintegrin-related 1
SP	Grupo esplenectomizado
TI	Antígenos timo-independentes
TD	Antígenos timo-dependentes
TI-1	Antígenos timo-independentes tipo 1
TI-2	Antígenos timo-independentes tipo 2
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral
TMB	Tetrametilbenzina
UFC	Unidades formadoras de colônia
v/v	volume por volume (concentração)
µl	Microlitros
µm	Micrômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 O baço - História.....	13
1.2 O baço e o sistema imune.....	14
1.3 Esplenectomia total.....	15
1.4 Infecção fulminante pós esplenectomia (IFPE).....	16
1.5 Esplenectomia Parcial.....	17
1.6 Implante autógeno de baço.....	18
1.7 Sítios de Implante.....	20
1.8 O <i>Streptococcus pneumoniae</i>	21
1.9 Resposta imune ao <i>S. pneumoniae</i>	23
1.10 Imunização ao <i>S. pneumoniae</i>	27
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3 METODOLOGIA.....	30
3.1 Animais	30
3.2 Anestesia e intervenção cirúrgica	30
3.3 Obtenção da linhagem bacteriana e condições de cultivo do <i>S. pneumoniae</i>	31
3.4 Infecção	31
3.5 Métodos de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)....	31
3.6 Ensaio Imunoenzimático – ELISA	32
3.7 Perfil e cinética de produção de citocinas no fígado e nos pulmões...	32
3.8 Detecção de anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a.....	33
3.9 Determinação dos subtipos celulares e coleta do plasma.....	33

3.10 Avaliação histopatológica	36
3.11 Análise Estatística.....	36
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Implante autógeno de baço restaura a resistência de camundongos BALB/c esplenectomizados submetidos à infecção com <i>S. pneumoniae</i> ..	37
4.2 Implante autógeno de baço restaura parcialmente a resposta imune humoral após a infecção por <i>S. pneumoniae</i> em camundongos esplenectomizados.....	38
4.3 Células esplênicas do implante esplênico autógeno aumentam a produção de citocinas em resposta a infecção por <i>S. pneumoniae</i> em presença de antígenos específicos.....	38
4.4 Camundongos esplenectomizados apresentam uma diminuição na produção de IFN- γ , IL-10 e TNF- α no fígado e nos pulmões após infecção por <i>S. pneumoniae</i>	40
4.5 A produção de IL-17A e o recrutamento de neutrófilos no fígado e nos pulmões é reduzida em animais esplenectomizados após infecção com <i>S. pneumoniae</i> , sendo aumentada após implante autógeno de baço.....	41
4.6 Porcentagem de células TCD4 ⁺ , células TCD8 ⁺ , macrófagos (CD4 ⁺ CD40 ⁺ Cd3 ⁻) e células B (CD19 ⁺) nos pulmões de camundongos esplenectomizados e autotransplantados infectados com <i>S. pneumoniae</i>	42
4.7 Porcentagem de células TCD4 ⁺ , células TCD8 ⁺ , macrófagos (CD4 ⁺ CD40 ⁺ Cd3 ⁻) e células B (CD19 ⁺) no sangue periférico de camundongos esplenectomizados e autotransplantados infectados com <i>S. pneumoniae</i>	43
4.8 Análise histológica de fígado e pulmões de camundongos esplenectomizados e autotransplantados infectados com <i>S. pneumoniae</i>	45
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Baço – História

Durante séculos, muitos mitos criados em torno da presença do baço no organismo dificultaram a busca de maiores conhecimentos sobre este órgão. Porém, em agosto de 1952, King e Shumacker publicaram no “Annals of Surgery” seu clássico trabalho “Susceptibilidade a infecções após esplenectomias” – despertando a atenção médica à coincidência, clinicamente detectada, entre a maior patogenicidade de algumas bactérias e a ausência do baço. Este estudo estimulou muitas investigações sobre o baço visando responder controvérsias científicas e culturais que se estendiam por mais de 2000 anos (CHRISTO, 2001).

Aristóteles (384-322 a.C.) considerava o baço um órgão equivalente ao fígado quanto à simetria, para Galeno (131 a.C.), o órgão seria responsável pela “cocção” da bile negra. A hipótese de que o baço integraria o sistema digestório, persistiu até o século XVI, quando Vesalius (1531) – por meio de suas disseções contestou-a definitivamente. O baço permaneceu um órgão sem função no organismo, já que o próprio Vesalius fora incapaz de definir seu papel (CHRISTO, 2001).

No século XVII foram efetuadas notáveis descobertas no campo da anatomia e da fisiologia esplênica. Em 1654, Francis Glisson foi o primeiro a descrever a distribuição de nervos que supriam o baço e o tecido conectivo trabecular que permeava o órgão. Marcello Malpighi, fundador da anatomia microscópica, interpretou corretamente a natureza do tecido conectivo dessa trabécula (GRAY, 1854; CROSBY, 1983; WILKINS, 2002).

Nesses mais de 20 séculos de folclore e estudos acadêmicos sobre o baço e sobre a sua cirurgia, em que mitos, tradições, eventos históricos e controvérsias científicas se misturam, só restou um consenso universalmente aceito – o baço poderia ser removido sem aparentes desvantagens para o organismo (CHRISTO, 2001).

1.2 O baço e o sistema imune

O sistema Imune é constituído por células, tecidos, órgãos linfóides primários (timo e medula óssea), responsáveis pelo amadurecimento dos linfócitos, e órgãos linfóides secundários (baço, linfonodos, apêndice, placas de peyer e tonsilas) que são os principais locais de resposta a antígenos e também onde ocorre a multiplicação e a ativação dos linfócitos (SHORTMAN e NAIK, 2007).

O baço é o maior órgão linfóide secundário do corpo humano, é maciço, muito vascularizado e está situado à esquerda do abdome, abaixo do diafragma. É suprido por uma única artéria esplênica que se divide e posteriormente perfura a cápsula na região do hilo e permanece cercada por trabéculas fibrosas para sua sustentação e proteção. O baço apresenta um fluxo sangüíneo de aproximadamente 200-300 ml/min para cada 100 a 150 gramas do órgão. O sangue passa através da polpa vermelha esplênica, uma espécie de filtro envolvido na remoção de partículas e eritrócitos senescentes ou danificados. Um papel fundamental exercido pelos macrófagos da polpa vermelha, assim como os macrófagos do fígado, é a fagocitose de eritrócitos e também a reciclagem do ferro. E ainda, a polpa vermelha esplênica é o principal sítio de fagocitose de microrganismos recobertos de anticorpos (opsonizados), como as bactérias encapsuladas (ALTAMURA, 2001; KNUTSON e WESSLING-RESNICK, 2003).

O sangue também atravessa a polpa branca que se divide em zonas de células T e B. Tanto as artérias centrais quanto as arteríolas possuem uma bainha concêntrica de linfócitos T, conhecida como bainha linfóide periarteriolar (periarterial lymphatic sheaths – PALS) (TIMENS, 1991; LIU, 1997; LODER *et al.*, 1999). Estas PALS são zonas de células T no baço que aparecem circundadas, como numa coroa, por folículos linfóides contendo linfócitos B. Outra importante área é a zona marginal, que se localiza mais externamente, circundando toda a estrutura. A zona marginal parece ser um sítio primário de entrada de células B e T para um eventual encontro com os antígenos trazidos por meio da circulação. SIGNR1 é um receptor específico presente nesta região e, juntamente com receptores do tipo toll, reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs) que funcionam como antígenos (CLAASSEN, 1986; LIU, 1988; TIMENS, 1991). Além disso, na zona marginal, células B de memória

podem ser encontradas após resposta imune primária (ALTAMURA, 2001). Estas células B se apresentam como um subtipo bastante peculiar, geralmente elas não circulam e têm fenótipo IgM⁺/IgD⁻ que é diferente àquele apresentado pelas células B foliculares que são IgM⁺/IgD⁺. Uma região de macrófagos separa a zona marginal das bainhas linfóides periarteriolas e dos folículos (KALINSKI, 2000; SPÖRRI e REIS E SOUSA, 2005; CESTA, 2006; PULENDRAN, 2008).

Os sinusóides da polpa vermelha terminam em vênulas que drenam para a veia esplênica, que transporta o sangue do baço para a circulação porta. O papel do baço na defesa imunológica, se relaciona ainda com a produção de IgM e tuftsin, sendo esta uma opsonina que exerce as propriedades bactericidas e fagocíticas dos neutrófilos. O baço é também uma fonte importante de properdina, um componente vital da via alternativa de ativação do complemento. Além disso, ele abriga a maior concentração de células do sistema imune (NUNES, 1994).

1.3 Esplenectomia total

Acreditou-se, durante muito tempo, que a remoção do baço não propiciaria conseqüências danosas aos pacientes. Quando ocorriam lacerações esplênicas - ainda que mínimas, decorrentes de trauma abdominal ou de manipulações cirúrgicas na parte superior do abdome, era comum a realização da esplenectomia total (MANLEY e MARINE, 1917; BILLIAR *et al.*, 1988; HEBERT, 1989; HOLDSWORTH, 1991). A esplenectomia era também indicada com finalidade diagnóstica, para estadiamento de enfermidades malignas como leucemias e linfomas e terapêutica para outras enfermidades como anemia, trombocitopenia e hipertensão porta (CUNHA, 1998; LYNCH, 1996; PETROIANU, 1997; ROSE *et al.*, 2000; CHERIF, 2006). Nos últimos anos, as indicações para esplenectomia vem nitidamente decrescendo, principalmente daquelas relacionadas ao trauma e a enfermidades hematológicas ou malignas. Tal fato deve-se ao reconhecimento da potencialidade de ocorrência da infecção fulminante pós esplenectomia (IFPE), ao desenvolvimento de métodos de diagnóstico por imagem que possibilitam segurança no tratamento conservador e de novas alternativas terapêuticas para algumas enfermidades (HANSEN e SINGER, 1984; MOORE *et al.*, 1984; ROSE *et al.*, 2000; STYRT, 1996; SUMARAJU, 2001; MARQUES e PETROIANU, 2003; CADILI e DE GARA, 2008).

Além disso, são descritas diversas alterações que ocorrem após esse procedimento, principalmente no sistema imunológico, como queda da atividade fagocítica a antígenos, diminuição dos níveis séricos de IgM e aumento da atividade de auto-anticorpos (IZBICKI *et al.*, 1989; TORRES *et al.*, 1994).

1.4 Infecção fulminante pós-esplenectomia (IFPE)

O primeiro caso de infecção pós-esplenectomia foi publicado em 1919, por Morris & Bullock. Entretanto, este assunto só alcançou projeção quando em 1952, King & Schumacker observaram sepse em cinco neonatos após esplenectomia.

Diamond, em 1969, chamou a atenção para o que denominou de infecção fulminante pós-esplenectomia (IFPE), condição clínica distinta de outras sepSES ou bacteremias, presentes em indivíduos com baço preservado, alertando para os riscos da asplenia. Mesmo desconhecendo sua etiologia, propôs que essa doença estava relacionada à eliminação do papel de filtro fagocitário bacteriano e perda da produção específica de anticorpos. Em 1973, Singer, mostrou que o risco de desenvolvimento da IFPE era muito maior que o imaginado previamente. Em 2.795 pacientes submetidos à esplenectomia total, a frequência de sepse variou entre 4% e 25%, com mortalidade de acordo com a indicação cirúrgica entre 2% e 52%.

A sepse fulminante pós esplenectomia total, é atualmente uma condição clínica muito bem conhecida. Em geral, o quadro clínico típico é de um início rápido de febre associado com náuseas e vômitos, seguido de uma pequena infecção respiratória. Ela progride rapidamente para sepse fulminante, associada à coagulação intra-vascular disseminada e insuficiência adrenal. Embora metade dos casos de IFPE ocorra dentro de um ano após esplenectomia, a síndrome tem sido relatada até 42 anos após o procedimento cirúrgico (MOORE, 1991; WAGHORN, 2001). As crianças apresentam maior possibilidade de desenvolvimento de IFPE fatal, devido ao predomínio esplênico na fagocitose de microrganismos durante os primeiros anos de vida. Enquanto todos os demais compartimentos celulares esplênicos completam sua maturação precocemente, a zona marginal mostra diferenças estruturais essenciais, comparada aos adultos, como a ausência de expressão de CD21 e alto percentual de células co-expressando IgM e IgD. Essa estrutura esplênica encontra-se especificamente envolvida na resposta imune a

antígenos polissacarídeos que compõem a cápsula de bactérias como no pneumococo. (LYNCH e KAPILA, 1996).

Organismos encapsulados estão freqüentemente envolvidos nas sepSES em pacientes que sofreram esplenectomia total. *Streptococcus pneumoniae* é o agente etiológico em aproximadamente 80% dos casos, mas também bactérias Gram-negativo (*Salmonella* e *Escherichia coli*) estão envolvidas no desenvolvimento de infecções fatais em pacientes esplenectomizados (ALTAMURA, 2001). Em 1991, Holdsworth *et al*, relataram que 50% desses casos são causados por *Streptococcus pneumoniae* e 25% por *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitis*, e *Streptococcus pyogenes*. Chapman e Newman em 1998, em um trabalho similar, relatam que os microrganismos responsáveis pela IFPE são geralmente bactérias encapsuladas e 48% destas bactérias são pneumococo.

A susceptibilidade de pacientes esplenectomizados aos microrganismos encapsulados está associada com a eliminação destas bactérias pelo baço. O sistema fagocitário mononuclear do baço parece ser eficaz, pois, produz IgM e opsoninas, protegendo assim o hospedeiro contra estes microrganismos (QUIE *et al.*, 2000; KURANAGA, 2006).

O risco elevado de sepse em infecções fulminantes pós-esplenectomia aumentou a importância de métodos conservadores na cirurgia esplênica (WAGHORN, 2001).

1.5 Esplenectomia parcial

Atualmente, existem diversas técnicas operatórias visando a preservação total ou parcial do baço, porém, ainda é controversa a massa de tecido esplênico a ser conservada (DE BOER, 1972; PEITZMAN, 2001). Van wyck e colaboradores (2005) demonstraram a importância da quantidade de tecido esplênico preservada na esplenectomia parcial em ratos infectados com pneumococos via endovenosa. Os animais foram submetidos a graus diversos de esplenectomia parcial, esplenectomia total e operação simulada (sham), para avaliar se a quantidade de tecido esplênico deixado influenciaria na resposta ao pneumococo. Os resultados mostraram que animais com resíduos de tecido esplênico maiores (300 mg) apresentaram proteção contra a infecção por pneumococo, em níveis comparados àqueles observados nos animais controle que tiveram operação simulada (grupo "sham"). Porém, animais

que possuíam resíduos de massa esplênica menores (100 mg) não apresentaram proteção. Bradshaw e Thomas (1982) em um trabalho similar, verificaram a existência de uma correlação direta entre a massa de tecido esplênico conservada (25%, 50% ou 75%) e a dose letal média de pneumococo. Além disso, observaram que abaixo do patamar crítico de 25%, não ocorreu uma resposta imune satisfatória.

Em estudos clínicos, a esplenectomia parcial apresentou vantagens em relação à esplenectomia total no que diz respeito à preservação das funções esplênicas. Petroianu e colaboradores (2003) após vários estudos, propuseram um modelo de esplenectomia parcial para hipertensão porta, com preservação do pólo superior do baço. E, com uma experiência superior a 230 operações, ainda não foram registradas complicações decorrentes deste procedimento.

1.6 Implante autógeno de baço

O baço é o órgão mais lesado em traumatismo abdominal fechado e também susceptível a vários tipos de incidentes iatrogênicos, principalmente em intervenções no estômago, cólon e pâncreas (BUNTAIM e GOLD, 1985; PISTER e PATCHER, 1994; ABRANTES *et al.*, 2002). Sabe-se, desde o final do século XIX, que o baço apresenta capacidade de regeneração. Griffini e Tizzoni, em 1883, foram os primeiros a mostrar áreas de regeneração esplênica espontânea no peritônio de cães submetidos a esplenectomia total. Poucos anos mais tarde, esse fato foi observado em humanos por Albrecht (1896), que notou a presença de múltiplos nódulos esplênicos na cavidade peritoneal e os denominou como baços acessórios múltiplos. Schilling, em 1907, encontrou nódulos similares em necropsia e também acreditou tratar-se de baços acessórios. Em 1910, von Kuttner foi o primeiro a chamar a atenção para a presença de múltiplos nódulos esplênicos encontrados em um paciente de 4 anos com trauma penetrante no abdome que resultou em ruptura do baço. Falt, em 1911, e von Stubenrauch, em 1912, relataram condições similares após trauma abdominal severo. Em 1939, Buchbinder e Lipkoff sugeriram a denominação de esplenose para o tecido esplênico regenerado espontaneamente dentro da cavidade abdominal, após trauma do baço. Em 1978, Pearson verificou a presença de função esplênica em crianças com esplenose, após esplenectomias por trauma. Por meio de cintilografia, esses autores constataram que havia tecido

esplênico residual regenerado em 26% a 64% desses pacientes e, nesses casos, não foram encontrados corpúsculos de Howell-Jolly ou hemácias senescentes no sangue periférico, como usualmente ocorre em pacientes asplênicos.

Baseado na esplenose surgiu a idéia de implantar seguimentos do baço em diferentes locais do abdômen - implante autógeno de baço (CALDER, 1939). Manley e Marine (1917) foram pioneiros no estudo da regeneração de tecido esplênico autotransplantado. Esses autores mostraram que auto-implantes esplênicos no tecido subcutâneo da parede abdominal, em coelhos, resultaram em neobaços com características morfológicas mantidas, como a presença de cápsula, trabécula e polpas branca e vermelha. Von Stubenrauch (1912) realizou implante autógeno de fragmentos esplênicos na cavidade abdominal de cães e verificou viabilidade desse tecido, 1 a 3 meses após a implantação.

Estudos cintilográficos evidenciaram a presença de tecido captante em fragmentos autotransplantados e também a análise histopatológica indicou que a arquitetura do autoenxerto é semelhante ao baço normal (COONE Y, 1979; SHARMA *et al.*, 1996; GÓMEZ, 2000; MIKÓ *et al.*, 2001; RESENDE, 2003; MIKÓ *et al.*, 2007).

Com base nos achados clinicopatológicos da regeneração de implantes esplênicos, o auto-implante esplênico heterotópico passou a ser considerado como opção na tentativa de preservar as funções do baço, nos casos em que fosse inevitável a sua retirada (RESENDE, 2001).

A maioria dos estudos realizados com o objetivo de comprovar uma resposta imune satisfatória após imunização ou infecção em animais esplenectomizados e autotransplantados utilizou como critério a dosagem sanguínea de IgM, IgG, contagem de linfócitos T, Tuftsin, Properdina, CD4, CD8 e resistência à infecções (LEEMANS 1996, LEEMANS 1999, RESENDE 2001, WESTERMAN 1990). Estudos experimentais que provam a eficácia da utilização do implante autógeno de tecido esplênico em proteger contra infecção existem na literatura desde a década de trinta. Perla e Marmorston-Gottesman, em 1930, observaram em ratos, que o auto-implante esplênico fornece proteção contra a infecção por *Bartonella muris*, usualmente fatal após esplenectomia em humanos. Likhite, em 1978, relatou que camundongos esplenectomizados e posteriormente infectados com *Streptococcus pneumoniae* tipo III estariam protegidos da sepse fulminante pós-esplenectomia se fosse realizado o implante autógeno de baço, devido à manutenção dos níveis de anticorpos

opsonizantes. Mais recentemente, Teixeira e colaboradores (2008), mostraram a importância da técnica do implante autógeno de baço na restauração das funções imunológicas em camundongos esplenectomizados frente à infecção por *Staphylococcus aureus*.

O implante autógeno de tecido esplênico é, portanto, uma alternativa para os casos onde a esplenectomia total é inevitável. Esta técnica demonstrou ser menos efetiva em preservar a função esplênica, quando comparado à esplenectomia parcial, mas, indubitavelmente, apresenta grande valor em relação à esplenectomia total, conforme os diversos estudos que demonstraram a viabilidade do implante, a manutenção do padrão histológico e a funcionalidade do tecido autógeno implantado (LEEMANS *et al.*, 1999; NUNES *et al.*, 2005; PETROIANU e PETROIANU, 2005; MIKÓ *et al.*, 2007).

1.7 Sítios de implante

É ainda um assunto controverso se a viabilidade e a capacidade de regeneração dos implantes estão associadas não apenas a massa de tecido preservada, mas também ao local escolhido para sua implantação (KARAGÜLLE, 2007).

Após o período inicial de necrose, o implante esplênico autógeno é capaz de regenerar-se, mas para manutenção de sua função alguns autores acreditam que a drenagem sanguínea deve ser mantida para o sistema porta. Em local adequado, os implantes formam neobaços, circundados por fina cápsula fibrosa, que contém polpas vermelha e branca, com a estrutura de suprimento sanguíneo similar à do órgão íntegro (RESENDE, 2001; NUNES *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

A capacidade do implante autógeno de tecido esplênico, em proteger animais esplenectomizados e infectados do possível desenvolvimento de sepse depende do sítio de implante. Animais que tiveram a região subcutânea como sítio não apresentaram índices de mortalidade diferentes, quando comparados a ratos esplenectomizados em resposta ao desafio por *Streptococcus*. Todavia, quando o sítio de implante utilizado foi a região intraperitoneal, ocorreu uma redução significativa na mortalidade com relação aos animais esplenectomizados,

alcançando uma proteção similar àquela observada nos animais controle (LIVINGSTON *et al.*, 1983).

O implante autógeno de tecido esplênico tem sido realizado em vários sítios, incluindo a região subcutânea, o retroperitônio, o músculo reto do abdômen e o grande omento, sendo este último o mais utilizado, embora apresente eventuais complicações, tais como casos de torção do implante, anemia e abscesso, devido à necrose do tecido implantado (LIAUNIGG, 1992; ANDO *et al.*, 1997). Trabalhos demonstraram que no implante em retroperitônio os padrões histológicos e a aceitação do enxerto não diferem com relação ao grande omento, e a sua facilidade técnica e os menores riscos de complicações podem ser determinantes na escolha deste local para o autotransplante (NUNES *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Desse modo, a localização dos fragmentos esplênicos parece ser importante no processo do autotransplante. Com base nos dados acima, neste trabalho o implante autógeno de baço foi realizado no retroperitônio de camundongos Balb/c.

1.8 O *Streptococcus pneumoniae*

O *Streptococcus pneumoniae*, também denominado pneumococo, é um coco Gram-positivo oval ou esférico, encapsulado, com 0,125 a 0,5 μm (Fig. 1). Em meios líquidos, apresenta-se aos pares ou em curtas cadeias, são imóveis e não formam esporos. Anaeróbios facultativos, seu crescimento ocorre em meios de cultura contendo ágar e suplementados com sangue de carneiro a 5%, no qual apresenta padrão alfa-hemolítico. É solúvel em sais biliares, podendo ser essa característica identificada como peculiar à espécie (SCHUTZE *et al.*, 2002).

Streptococcus pneumoniae tem como habitat a nasofaringe de seres humanos. Animais ou objetos inanimados podem abrigar esse organismo, entretanto não são considerados reservatórios principais. A transmissão ocorre diretamente, pessoa a pessoa, mas não é necessário o contato com indivíduos que apresentem sintomas clínicos, pois muitos abrigam o microrganismo sem apresentar sintomatologia (MANDEL, 1999; SCHAECHTER, 1999).

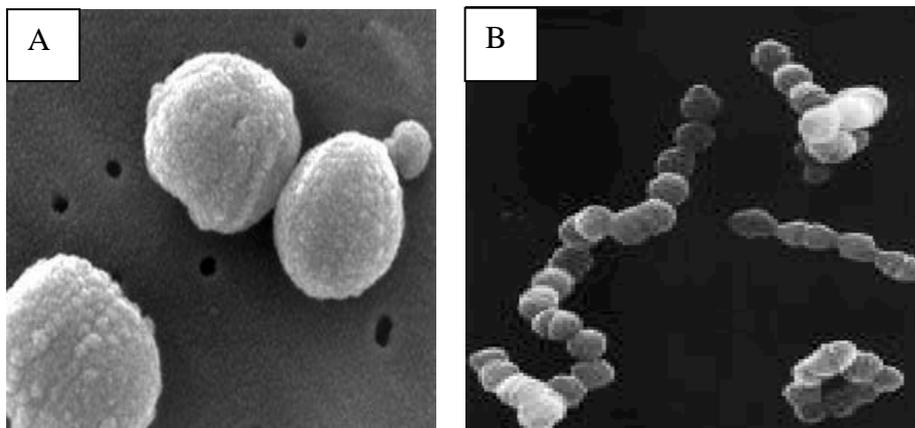


Figura 1 – Morfologia do *Streptococcus pneumoniae*. **A.** *Streptococcus pneumoniae* no arranjo diplococo. **B.** *S. pneumoniae* no arranjo em cadeia.
Retirado de: www.unituebingen.de/modeling/images/strep.gif

O *Streptococcus pneumoniae* é o principal causador de otites media, meningite e pneumonia. Infecções causadas por pneumococos podem ocorrer em qualquer idade, sendo mais freqüentes em crianças, pessoas idosas e pacientes imunocomprometidos (NEELEMAN, *et al.*, 1999). Há um risco aumentado da infecção com pneumococos após esplenectomia (STYRT, 1990; SHINEFIELD, 1966; SCHUTZE *et al.*, 2002).

Em infecções pneumocócicas humanas, 90 sorotipos de *S. pneumoniae* foram identificados baseando-se em diferenças na composição dos polissacarídeos capsulares. Atualmente 23 sorotipos causam 90% dos casos de pneumonia. Esta seletividade pode ser relacionada às diferenças na habilidade das cepas colonizarem e invadir os hospedeiros, mas, uma vez que a infecção é estabelecida, o significado clínico total de uma linhagem é também o resultado de sua habilidade em induzir a doença severa. (GORDON e HOSTETTER, 1986).

O sorotipo 3 (ATCC 6303), é um dos mais comuns, vem sendo isolado nos últimos 50 anos e é reconhecidamente resistente à fagocitose e ainda, potencialmente imunogênico (GORDON e HOSTETTER, 1986; GORDON, 1986).

1.9 Resposta imune ao *Streptococcus pneumoniae*

Diversas substâncias estão envolvidas no mecanismo molecular pelo qual o *S. pneumoniae* invade, causa danos e, algumas vezes, leva a óbito o hospedeiro. A cápsula é o principal fator de virulência, embora existam outros antígenos que parecem desempenhar papéis de importância na patogênese desse agente. Pneumolisina, neuroamidases, autolisinas, hialuronidase e adesina de superfície A, são algumas substâncias que estão sendo estudadas para o melhor entendimento do mecanismo pelo qual o *S. pneumoniae* provoca infecção, e também para o desenvolvimento de vacinas que promovam proteção sorotipo-independente (SCHAECHTER, 1999; HIRST, 2004).

O pneumococo é o protótipo do patógeno extracelular cuja virulência está relacionada aos polissacarídeos capsulares que impedem a fagocitose. Para a efetivação do mecanismo de fagocitose desta bactéria há necessidade de opsonização, que se faz por anticorpos específicos aos polissacarídeos capsulares e por componentes de ativação das proteínas do sistema complemento, sendo os anticorpos específicos considerados fundamentais neste processo. Durante uma resposta de anticorpos, há produção de diferentes classes de imunoglobulinas. A resposta humoral primária é breve e tem o predomínio de IgM, responsável pela opsonização de bactérias encapsuladas, como o *S. pneumoniae* e ativação da via clássica do complemento, enquanto as respostas secundárias são mais prolongadas e com predomínio de IgG contribuindo também para ativação da via clássica do complemento. Com a reexposição ao antígeno ocorre produção de anticorpos de afinidade mais alta (ALTAMURA, 2001; SAELAND *et al.*, 2003; YUSTE, 2005).

O início de uma resposta imune mediada por anticorpos se dá pelo reconhecimento antigênico através da apresentação do antígeno, por células apresentadoras de antígeno (APC) aos linfócitos T. A interação do antígeno associado à molécula do complexo principal de histocompatibilidade com o receptor de linfócito T é responsável pela especificidade da resposta. Depois de sensibilizados, os linfócitos T proliferam e amplificam a resposta imune, pela liberação de citocinas, capazes de induzir os linfócitos B a produzirem anticorpos específicos. Portanto, um aumento adequado do nível de anticorpos após a provocação antigênica depende da integridade funcional das APCs, dos linfócitos T

regulatórios, da comunicação intercelular promovida pelas citocinas e moléculas de adesão, e da capacidade de produção de anticorpos antígeno-específicos pelos linfócitos B (ALONSODEVELASCO, 1995).

Classicamente, a produção de anticorpos contra antígenos protéicos é precoce em relação à produção frente a antígenos polissacarídeos, que ocorre mais tardiamente. Os polissacarídeos, principais imunógenos das bactérias encapsuladas, são considerados antígenos timo-independentes (TI), ao contrário dos antígenos protéicos, constituintes da maioria dos vírus e dos toxóides tetânico e diftérico, que se comportam como timo-dependentes (TD). Os antígenos TI foram assim denominados porque induzem à formação de anticorpos específicos em camundongos atímicos.

De acordo com o grau de independência em relação aos linfócitos T, eles são subdivididos em dois grupos, antígenos TI tipo 1 e antígenos TI tipo 2. Estes grupos apresentam diferentes características. Os antígenos TI do tipo 1 são totalmente T-independentes, e, por não ativarem os linfócitos T auxiliares, não induzem à maturação da afinidade dos anticorpos, nem à formação de linfócitos T de memória. Em concentrações elevadas, são ativadores policlonais dos linfócitos B. O protótipo deste grupo é o lipo-polissacáride (LPS), componente da parede celular de várias bactérias Gram-negativas. Já os antígenos TI do tipo 2 não estimulam a produção de anticorpos "*in vitro*", se os linfócitos T auxiliares forem totalmente removidos do experimento (REN *et al.*, 2004). Exemplos destes são os antígenos capsulares do pneumococo, o dextran e o ficol, sendo a maioria destes polissacárides compostos de múltiplos epítomos idênticos. Eles estimulam os linfócitos T específicos e não funcionam como ativadores policlonais. Caracterizam-se por promoverem um desenvolvimento tardio de anticorpos, com restrição a determinados isótipos de Igs, e a dificuldade de levar a aquisição de memória imunológica (REN *et al.*, 2004; ELOMAA *et al.*, 1995; OEHEN *et al.*, 2002; KOPPEL *et al.*, 2004; LANOUE *et al.*, 2004; KNAPP *et al.*, 2004; WLUKA e OLSZEWSKI, 2006).

A modulação da resposta inflamatória inicial em uma infecção pelo *S. pneumoniae* tem sido considerada como uma estratégia de tratamento alternativo para reduzir a mortalidade precoce (RUBINS e POMEROY, 1997). O interferon-gamma (IFN- γ) foi identificado em estudos realizados na última década como um imunomodulador crítico na defesa inicial contra uma variedade de infecções

(FARRAR E SCHREIBER, 1993). Como um componente precoce de defesa contra a infecção, IFN- γ é uma molécula chave na ativação de macrófagos e na citotoxicidade de células natural killer (NK), além de participar do recrutamento de neutrófilos e linfócitos circulantes aos sítios de infecção. Estudos demonstraram que camundongos IFN- γ deficientes infectados com *S. pneumoniae* exibem maior quantidade de bactérias no sangue e nos pulmões, demonstrando maior susceptibilidade à infecção. (RUBINS e JANOFF, 1998; MIZRACHI-NEBENZAHL *et al.*, 2003).

Em 1986, Weigent e colaboradores mostraram diminuição da mortalidade precoce de camundongos injetados intra-peritonealmente (i.p.) com IFN- γ antes da infecção com o tipo 25 do *S. pneumoniae*, em comparação com camundongos injetados com um diluente controle. Mais recentemente, Van der Poll e colaboradores (1996), forneceram provas indiretas da importância do IFN- γ na defesa do hospedeiro contra *S. pneumoniae*, demonstrando que a administração de interleucina-10 (IL-10), causou a diminuição das concentrações de IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF) nos pulmões e conseqüentemente, ocorreu um aumento da contagem bacteriana tanto nos pulmões quanto no sangue do hospedeiro, resultando em letalidade quase imediata por *S. pneumoniae*.

As principais conseqüências das respostas do hospedeiro às bactérias extracelulares são a inflamação e a sepse, havendo participação decisiva de citocinas produzidas principalmente por macrófagos ativados. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é o principal mediador do choque séptico. De fato, os níveis séricos de TNF- α são preditivos de prognóstico das infecções bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas como o *S. pneumoniae* (KNAPP *et al.*, 2008). O TNF- α é produzido por macrófagos e células dendríticas como uma resposta primária às infecções e danos aos tecidos, e é constitutivamente expresso em várias doenças auto-imunes. Ele desempenha um papel importante na ativação e recrutamento de leucócitos ao tecido inflamado (CLARK, 2007), e tem sido envolvido na defesa do hospedeiro contra uma série de importantes patógenos humanos, incluindo *S. pneumoniae* (KEANE e STRIETER, 2001; ROTHE *et al.*, 1993; KIRBY, 2006). No entanto, TNF- α também está associado à inflamação e imunopatologia excessiva em infecções e doenças auto-imunes e, especificamente, o TNF- α pode estar envolvido

na quebra da barreira hemato-encefálica durante a disseminação hematogênica da meningite pneumocócica (MOGENSEN, 2008).

A sepse é iniciada pela produção sistêmica de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , e quimiocinas, o que resulta em lesão tecidual excessiva e morte em cerca de 25 a 35% dos pacientes. A exagerada resposta inflamatória que ocorre na sepse é contrabalanceada pela potente expressão de citocinas antiinflamatórias, incluindo IL-10 (AYALA *et al.*, 1999). Estudos indicam que a IL-10 desempenha importante papel, porém ainda contraditório, na sepse e na resposta à pneumonia bacteriana (KARZAI e REINHART, 1998). Por um lado, em modelos animais de sepse, todavia, a neutralização de IL-10 resulta em expressão exagerada de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , levando o animal à morte, enquanto que a administração de IL-10 recombinante confere proteção significativa nesses modelos (KEEL *et al.*, 1997). Inversamente, no caso de pneumonia bacteriana, a IL-10 endógena parece inibir a proteção conferida pela resposta imune inata. Além disso, esta citocina inibe diretamente macrófagos e neutrófilos e suas atividades bactericidas e fagocíticas *in vitro*. Em modelos clínicos e murinos, o período que se segue a eventos sépticos demonstrou resultar na expressão preferencial de citocinas antiinflamatórias, especialmente IL-10. (REDDY *et al.*, 2001).

Estudos recentes demonstram um possível envolvimento da citocina IL-17A na patogenia do *S. pneumoniae* no modelo murino, entretanto o mecanismo preciso através do qual IL-17A medeia a resposta imune continua a ser indeterminado. Porém, há muitas evidências de que em camundongos a IL-17A desempenha um papel crítico no recrutamento de neutrófilos e na formação de abscessos, bem como na indução de peptídeos antimicrobianos. Estes mecanismos podem ser responsáveis pela proteção observada e estão atualmente sob investigação (MALLEY *et al.*, 2006; BASSET *et al.*, 2007).

1.10 Imunização ao *Streptococcus pneumoniae*

Devido ao papel primordial das infecções pneumocócicas na IFPE, todos os pacientes submetidos à esplenectomia total deverão receber imunização contra *S. pneumoniae*, usando a vacina pneumocócica 23-valente (Pneumovax; Pnu-Imune), que cobre 73% das linhagens causadoras de IFPE (USLU *et al.*, 2006). Se possível, as vacinas devem ser administradas 2 semanas antes da cirurgia, já que a resposta imunológica à vacina é mais eficaz quando o baço está intacto. A vacina pneumocócica pode falhar quer devido às cepas não incluídas na vacina, ou por uma baixa resposta imunitária humoral, como consequência da esplenectomia ou doença subjacente. Uma dose reforço é recomendada em 3-5 anos ou 5-10 anos. A vacina 7-valente composta de proteínas pneumocócicas conjugadas, recentemente tornou-se disponível (Prenevar). É provavelmente mais imunogênica, e não requer uma dose reforço (DAVIDSON e WALL, 2001).

Porém, estudos recentes demonstram que a proteção por anticorpos anticapsulares é limitada pela especificidade de seu sorotipo, o que tem levado vários pesquisadores a avaliar outros tipos de vacina. Em particular, algumas proteínas pneumocócicas têm sido avaliadas como candidatas a vacinas em modelos animais, tanto pela via mucosa quanto pela via parenteral (ALEXANDER *et al.*, 1998; BRILES *et al.*, 2000; OGGUNIYI, 2000; BRILES *et al.*, 2003). A imunização via mucosa com algumas dessas proteínas, em particular, tem demonstrado liberação de anticorpos sistêmicos e de mucosa, além de conferir proteção contra doença e colonização pneumocócica (BRIDGEN *et al.*, 2000).

Duas novas vacinas via mucosas têm sido testadas, são baseadas em antígenos não capsulares: uma de célula-total, consistindo de pneumococos mortos e outra vacina contendo os polissacarídeos da parede celular (C-Ps), que estão presentes em todos os isolados de pneumococos (LU *et al.*, 2008). A imunização intranasal com qualquer um destes dois antígenos confere proteção independente de anticorpos e dependentes de células T CD4⁺ contra a colonização pneumocócica. A estratégia dessas vacinas que previnem a colonização pneumocócica é evitar a eclosão de uma infecção pneumocócica em pacientes colonizados que desenvolvam imunossupressão como por exemplo, pacientes esplenectomizados (MALLEY, 2006; BASSET *et al.*, 2007; LU *et al.*, 2008).

Nosso trabalho sugere que a prática de se realizar a cirurgia de remoção do baço, tanto após trauma como em patologias que acometem este órgão, deve ser repensada e reavaliada, a fim de se buscar alternativas que mantenham resquícios de tecido esplênico, tais como, esplenectomia parcial ou implante autógeno de tecido esplênico, e assim, conservar a capacidade de montar uma resposta imune satisfatória, principalmente contra infecções por microrganismos encapsulados, como o *Streptococcus pneumoniae*, em indivíduos asplênicos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da esplenectomia e do implante autógeno de baço na resposta imune humoral e celular na resistência à infecção causada por *Streptococcus pneumoniae*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. pneumoniae* no fígado e pulmões, em camundongos Balb/c esplenectomizados e submetidos ao implante autógeno de baço e no grupo controle, infectados com *S. pneumoniae*.
- Avaliar níveis séricos de IgM, IgG1 e IgG2a em camundongos BALB/c esplenectomizados e submetidos ao implante autógeno de baço e no grupo controle, infectados com *S. pneumoniae*.
- Avaliar a produção de IFN- γ , IL-10 e TNF- α em células esplênicas e IL-17A, IFN- γ , IL-10 e TNF- α , no fígado e pulmões de camundongos BALB/c esplenectomizados submetidos ao implante autógeno de baço e no grupo controle, infectados com *S. pneumoniae*.
- Investigar o perfil de células B esplênicas (CD19⁺), neutrófilos (CD11b⁺) e macrófagos (CD40⁺), em camundongos BALB/c esplenectomizados e submetidos ao transplante autógeno de baço e no grupo controle, infectados com *S. pneumoniae*.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, de 8-10 semanas de idade. Os animais foram obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR-UFJF) e mantidos no setor de manutenção e experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB-UFJF, em microisoladores colocados em estantes climatizadas, tendo como forma de alimentação exclusivamente ração própria e água. Para cada experimento, os animais foram divididos em 3 grupos, assim distribuídos: Grupo Controle Sham (CT): 10 camundongos submetidos a operação simulada. Grupo Esplenectomizado (SP): 10 camundongos esplenectomizados e Grupo Autotransplantado (AT): 10 camundongos esplenectomizados e autotransplantados no retroperitônio. O projeto está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro De Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela Comissão De Ética Na Experimentação Animal (CEEAA), da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, protocolo nº. 059/2007.

3.2 Anestesia e Intervenção Cirúrgica

Após anestesia com solução composta por cloridrato de quetamina 5%, cloridrato de xilazina 2% e cloreto de sódio 0,9%, injetados pela via intra-peritoneal, foi realizada uma laparotomia com subsequente esplenectomia e ligação do pedículo vascular utilizando catgut 5.0 (Shalon, Goiânia, Brasil). Todas as operações foram realizadas em câmara de fluxo laminar, sob condições estéreis. No grupo AT, 30% do tecido esplênico ressecado foi individualizado, pesado e dividido em 2 partes. O retroperitônio foi exposto próximo ao rim esquerdo e os dois fragmentos foram alocados nas proximidades dos grandes vasos abdominais sem fixação. A laparorráfia foi realizada utilizando nylon 4.0 (Shalon, Goiânia, Brasil).

3.3 Obtenção da linhagem bacteriana e condições de cultivo do *S. pneumoniae*

A cepa de *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6303) foi obtida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), localizado na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro.

O crescimento de *S.pneumoniae* foi realizado em meio Trypticase Soy Agar (Isofar Ltda), diluído em água livre de impurezas MiliQ (Milipore) e submetido à fervura e esterilização por meio de autoclave por 15 minutos. Foi adicionado, posteriormente ao meio de cultura, 5% de sangue desfibrinado de carneiro (RCL Ltda). Placas NUNC® de seis poços foram utilizadas como recipiente para o meio solidificado e as culturas foram incubadas por 24 h em estufa a 37°C, contendo 5 % de CO₂. A técnica de Gram foi usada para comprovar a pureza da linhagem de *S. pneumoniae* na cultura em questão.

3.4 Infecção

Trinta dias após a cirurgia os camundongos dos grupos esplenctomizados, autotransplantados e grupo controle sham, foram infectados pela via endovenosa, no plexo retro orbital, com *Streptococcus pneumoniae* na dose de 1×10^6 bactérias. Os animais não infectados receberam 100 µl de solução PBS estéril.

3.5 Método de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Os camundongos foram mortos no 5º dia após a infecção, por exsanguinação sob anestesia, e o fígado e os pulmões de cada animal foram retirados e macerados em PBS. Diluições seriadas de 1:10 e 1:100 foram feitas em placas de 6 poços contendo o meio Trypticase Soy Agar com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Após incubação em estufa por 24 horas, com 5% de CO₂ a 37°C, o número de unidades formadoras de colônia no fígado e pulmões foi determinado para cada animal. O grau de proteção nos grupos foi expresso como log de unidades formadoras de colônia de bactérias encontradas nos grupos infectados.

3.6 Ensaio Imunoenzimático – ELISA

Os baços dos camundongos do grupo controle (CT) e do grupo autotransplantado (AT) estudados foram macerados e passados através de uma malha de nylon para obtenção de uma suspensão de células. As células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e foram mantidas em cultura contendo meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicillina, 100 µg/ml de streptomicina, 10 µl/ml de aminoácido não-essencial e 5% de soro fetal bovino inativado por calor. Depois as células foram plaqueadas a uma razão de 2×10^5 células/poço, em placa de 96 poços específica para cultura de células. Esplenócitos foram estimulados com 10^6 *S. pneumoniae* mortos por aquecimento a 60°C por 10 min. Após 72 horas de cultura de esplenócitos a 37°C, em 5% de CO₂, os níveis de IFN- γ , IL-10 e TNF- α contidos no sobrenadante foram determinados por ELISA. A ligação dos anticorpos foi detectada por meio do complexo estreptoavidina-biotina peroxidase (Southern Biotechnology Associates), TMB e H₂O₂. A reação foi interrompida com a utilização de ácido sulfúrico 1 M, de acordo com as especificações do fabricante (R&D). As placas foram lidas em leitor de microplacas (Spectramax 190 - Molecular Devices) no comprimento de onda de 450 nm. As amostras foram comparadas com a curva padrão de anticorpo recombinante IFN- γ , IL-10 e TNF- α e os valores foram expressos na concentração de pg/ml.

3.7 Perfil e cinética de produção de citocinas no fígado e nos pulmões

A produção de IL-17A, IL-10, TNF- α e IFN- γ foi avaliada em homogeneizados de fígado e pulmão, colocados em solução de extração de citocinas contendo antiproteases (0,1 mM PMSF, 0.1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) na proporção de 0,1 g de tecido para cada ml de solução. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4°C após esse procedimento o sobrenadante foi coletado e então armazenado em alíquotas de 1 ml em freezer -20°C. A dosagem de citocinas foi realizada pelo método de Elisa conforme procedimento descrito anteriormente no item 3.6. As amostras foram

comparadas com a curva padrão de anticorpo recombinante IL-17A, IFN- γ , IL-10 e TNF- α e os valores foram expressos na concentração de pg/ml.

3.8 Detecção de anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a

No quinto dia após a infecção com *S. pneumoniae*, amostras de sangue (1ml/animal) foram coletadas por meio do plexo reto orbital de camundongos dos três grupos CT, AT e SP. Os soros dos animais foram obtidos e utilizados para a avaliação da resposta imune humoral, e dos isótipos presentes (IgM, IgG1 e IgG2a), por meio do ensaio de ELISA. Placas de 96 poços (Maxisorp; Nunc®) foram incubadas 16 horas com antígeno total recuperado de cultura de *S. pneumoniae* em tampão carbonato, pH 9,6 a 4°C. Após lavar as placas com PBS-Tween 20, foi adicionada solução bloqueio (PBS contendo Tween 20 0,05%, mais 10% de soro fetal bovino) e incubadas por 2 h a 37°C. Os soros provenientes dos camundongos infectados foram diluídos na proporção de 1:100 em PBS-Tween 20, colocados nas placas e incubados por 2 h a 37°C. A fim de determinar os níveis de IgM, IgG1 e IgG2a, foram adicionadas às placas moléculas de anticorpo conjugadas a peroxidase anti-IgM, anti-IgG1 ou anti-IgG2a (Sigma). A reação se desenvolveu com a adição de 200 μ M de α -fenilenodiamina OPD (Sigma) e 0,04 % de H₂O₂. A reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico H₂SO₄ 5 % e as placas foram lidas em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) no comprimento de onda de 492 nm.

3.9 Determinação dos subtipos celulares e coleta do plasma

Amostras de sangue foram obtidas 5 dias após infecção por *S. pneumoniae* através de sangramento pelo plexo reto orbital e coletadas em tubos de 1,5 ml contendo citrato de sódio 3 % com utilização de pipeta Pasteur rinsada com o mesmo anti-coagulante. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min a 4 °C e os plasmas foram coletados e armazenados em tubos de 0,6 ml em freezer - 20 °C. No quinto dia também, os camundongos foram mortos e fragmentos dos pulmões foram coletados, colocados em placas de Petri contendo 5 ml de PBS e

macerados com o pistilo de uma seringa estéril. Macerados dos pulmões foram digeridos com colagenase (solução de 100 UI/ml) em 5 ml de meio RPMI contendo soro fetal bovino 10 % no banho-maria a 37°C por 40 minutos. Os macerados dos dois órgãos foram filtrados em uma tela de 70 µm (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) para tubos de 15 ml. As suspensões de células obtidas do baço e pulmão foram centrifugadas por 8 min a 1000 rpm e 4°C. Após descarte do sobrenadante, os eritrócitos foram removidos pela adição de tampão de lise Tris/NH₄Cl em um pH de 7,65 e as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI 1640 (Gibco). A viabilidade celular foi determinada por meio do método de exclusão por azul de trypan e as células passaram novamente por centrifugação por 8 min a 1000 rpm e 4°C. O sedimento de células foi então ressuspensionado em tampão de marcação (PBS, soro fetal bovino 3% e ázida sódica 0,005%) a 4°C em uma concentração de células de 2x10⁷ células/ml.

Suspensões celulares a 10⁶ (50 µl) foram adicionadas aos tubos contendo os anticorpos nas diluições recomendadas pelo fabricante e foram incubadas por 20 minutos em banho de gelo para mais tarde serem acrescentados 400 µl de tampão de marcação. Finalmente, a suspensão celular foi mantida no gelo até a análise por citometria de fluxo. Os subtipos celulares foram mensurados por meio de citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson), utilizando o “gate” indicado para tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e os seguintes critérios: neutrófilos – gate R3, CD11b⁺ e CD69⁺; macrófagos – gate R5, CD4⁺, CD40⁺ e CD3⁻; células T CD4 – gate R2, CD3⁺ e CD4⁺; células T CD8 – gate R2, CD3⁺ e CD8a⁺; células B – gate R2 e gate R4 (CD19⁺). Foram utilizados os seguintes anticorpos: PerCP controle isotípico IgG1a; PE controle isotípico IgG3; FITC controle isotípico IgG1a; PerCP anti-CD3; PerCP anti-CD69; FITC anti-CD19; FITC anti-CD80; FITC anti-CD40; FITC anti-CD8a; PE anti-CD152; PE anti-CD11b; PE anti-CD4 (Pharmingen, USA)(Figura 2).

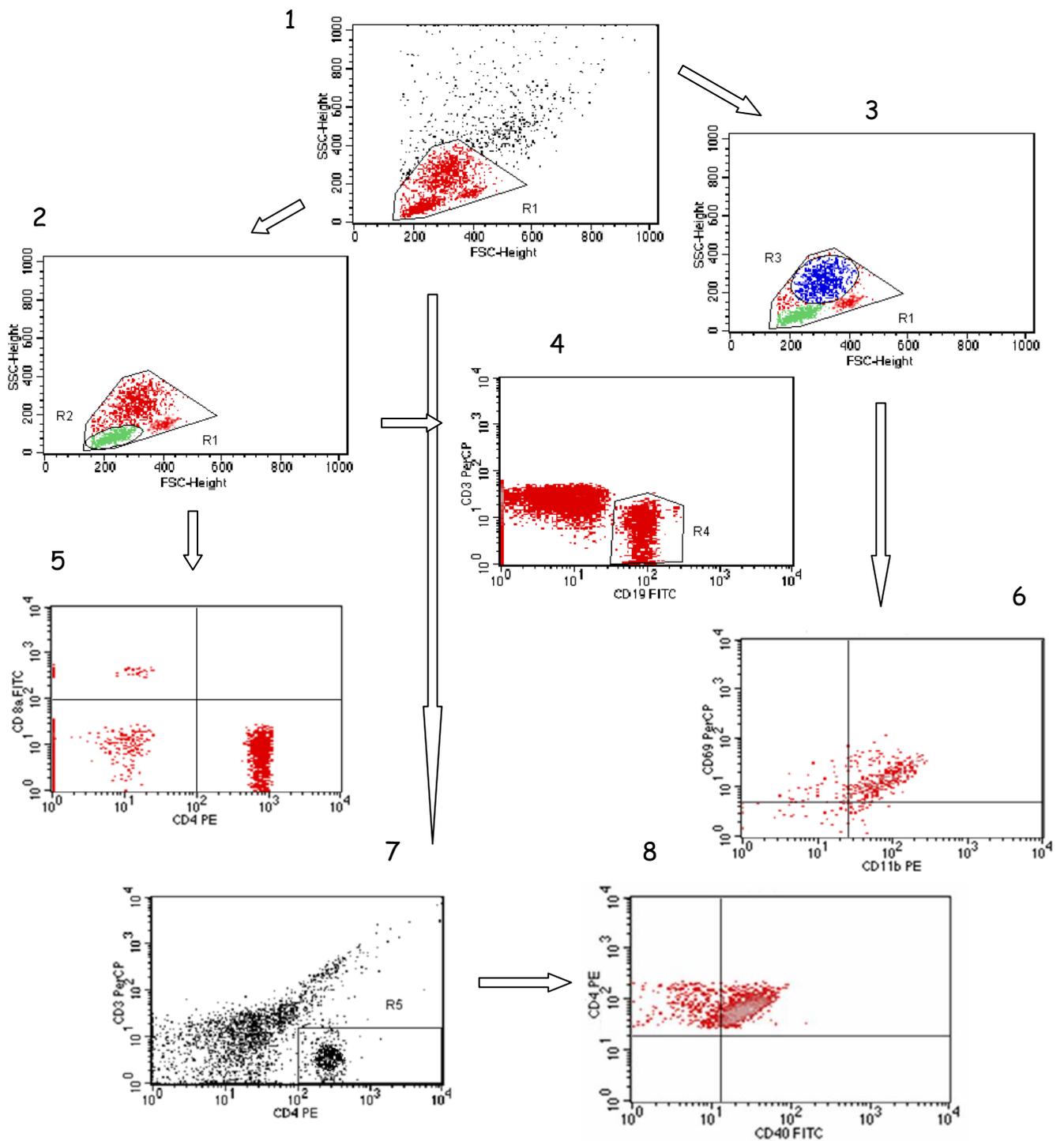


Figura 2: Gates utilizados. Modelos de gates utilizados em células do baço e de pulmões visando separar as populações celulares (R1 – linfócitos, granulócitos e macrófagos), (R2 – linfócito T auxiliar – CD4⁺ e linfócito T citotóxico – CD8⁺), (R3 – granulócitos – CD11b⁺ e CD69⁺), (R2 e R4 – células B – CD19⁺) e (R1 e R5 – macrófagos – CD4⁺, CD40⁺ e CD3⁻) (10000 eventos por amostra).

3.10 Avaliação Histopatológica

Fragmentos de fígado e pulmões foram retirados 5 dias após a infecção com *S. pneumoniae* e fixados em solução de formol a 10%. Os fragmentos fixados foram incluídos em parafina e depois cortes histológicos de aproximadamente 4 micrômetros de espessura foram corados com hematoxilina e eosina. O número de acúmulos de neutrófilos no fígado foi determinado após análise de 40 campos em aumento de 400x. A avaliação da extensão dos acúmulos de neutrófilos foi determinada de acordo com as seguintes escalas estabelecidas: Para a infecção com *S. pneumoniae* os níveis foram: I (leve, com 2-6 neutrófilos por acúmulo; II (moderado, com 7-15 neutrófilos por acúmulo); III (acentuado, com mais de 15 neutrófilos por acúmulo). Os fragmentos de pulmão foram avaliados por análise de 40 campos em aumento de 200x para cada fragmento avaliado. As amostras de pulmão foram avaliadas com base na quantidade de células inflamatórias por amostra de tecido.

3.11 Análise Estatística

As diversas variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Para as variáveis que possuíam distribuição normal a avaliação estatística foi realizada por meio de análise variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni de comparação múltipla. Caso contrário, foi utilizado o teste não-paramétrico de kruskal-Wallis. Os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Implante autógeno de baço restaura a resistência de camundongos BALB/c esplenectomizados submetidos à infecção com *S. pneumoniae*

A importância do baço no controle da infecção por *S. pneumoniae* foi avaliada por meio da contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC), no fígado e nos pulmões dos animais infectados. O Gráfico 3 mostra que o grupo de animais apenas esplenectomizado (SP) apresentou um maior número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. pneumoniae*, acima de 1 log, tanto no pulmão (8,6 LN UFC) quanto no fígado (7,6 LN UFC), em comparação aos grupos controle (CT) e autotransplantado (AT). O número de UFC de *S. pneumoniae* no fígado e pulmões, após 5 dias de infecção, foi similar nos grupos CT e AT.

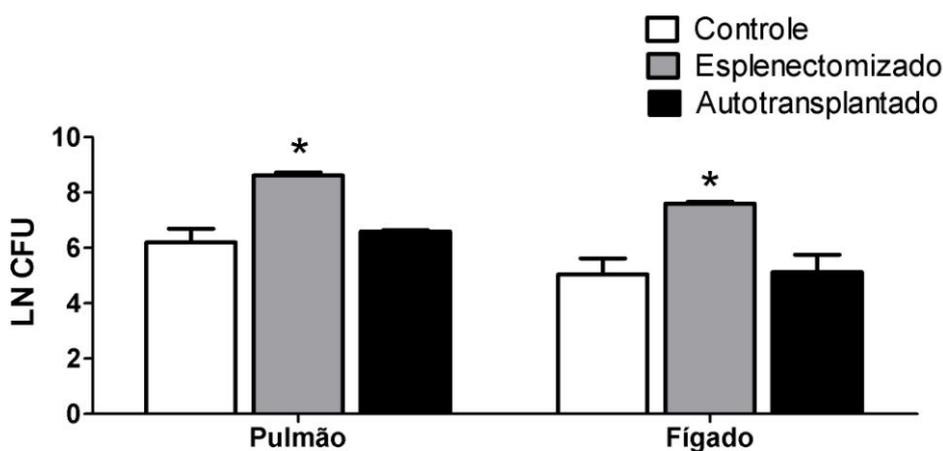


Gráfico 3: Implante autógeno de baço restaura a resistência de camundongos BALB/c esplenectomizados submetidos à infecção por *S. pneumoniae*. Camundongos BALB/c foram infectados por via endovenosa com 10^6 *S. pneumoniae*, 30 dias após a cirurgia. No quinto dia após a infecção, o número de UFC nos pulmões e no fígado foi determinado. As barras representam a média de 5 camundongos/grupo, sendo representativo de três experimentos realizados. * ($p < 0,05$).

4.2 Implante autógeno de baço restaura parcialmente a resposta imune humoral após a infecção por *S. pneumoniae* em camundongos esplenectomizados

Níveis séricos de anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a anti-*S. pneumoniae* foram avaliados em camundongos dos grupos CT, AT e SP após 5 dias de infecção com *S. pneumoniae*. Camundongos SP mostraram redução significativa de todos os anticorpos avaliados em relação aos grupos CT e AT (Gráfico 4). Interessantemente, o grupo AT apresentou nível sérico de IgM similar ao observado no grupo CT, mas níveis de IgG1 e IgG2a inferiores em relação ao controle (Gráfico 4). Esses resultados sugerem que implante autógeno de baço favorece a recuperação da resposta humoral específica de animais esplenectomizados frente à infecção por *S.pneumoniae*.

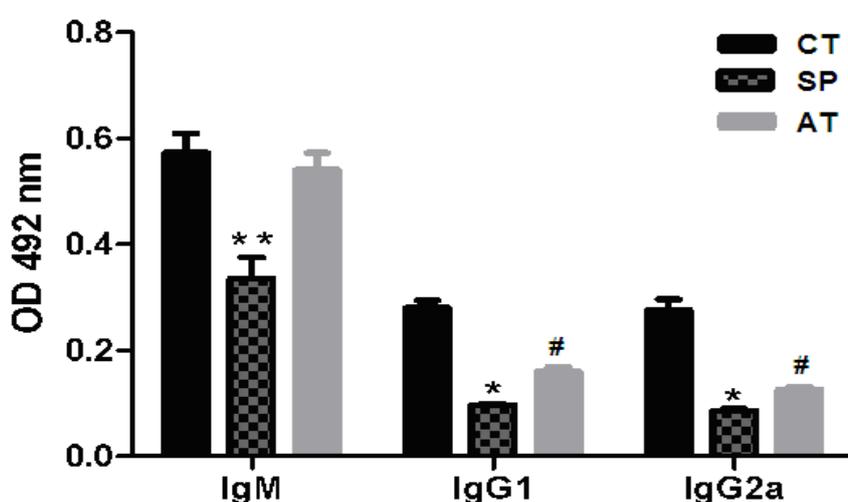


Gráfico 4: Efeito da esplenectomia nos níveis de anticorpos específicos anti-*S. pneumoniae* produzidos no soro de camundongos BALB/c infectados. Camundongos foram infectados pela via endovenosa com 1×10^6 UFC/camundongo. 30 dias após a cirurgia. Anticorpos das classes IgM, IgG1 e IgG2a específicos para antígenos de *S. pneumoniae* foram avaliados no soro 5 dias após a infecção por meio do método de ELISA. Os resultados apresentam a média de cinco camundongos em um experimento representativo dentre três experimentos com resultados semelhantes. * =p < 0,05 versus CT e AT, ** =p<0,01 versus CT e AT, # =p<0,05 versus SP.

4.3 Células esplênicas do implante esplênico autógeno aumentam a produção de citocinas em resposta a infecção por *S. pneumoniae* em presença de antígenos específicos

A seguir, fomos verificar se as células do implante autógeno de baço possuem capacidade semelhante às do órgão original, de responder a estímulo

específico com produção de citocinas, após 5 dias de infecção por *S. pneumoniae*. $2,5 \times 10^5$ Células esplênicas de camundongos do grupo controle (CT) e do grupo autotransplantado (AT), infectados com 10^6 *S. pneumoniae*, foram cultivadas *in vitro* por 72 h na presença de *S. pneumoniae* mortos por calor (HKSp)/poço. Um grupo não infectado e não estimulado com HKSp foi incluído como controle negativo. Os níveis de IFN- γ , IL-10 e TNF- α nos sobrenadantes de cultura dos animais infectados, aumentaram nos grupos CT e AT na presença de HKSp, em comparação ao grupo infectado não estimulado (Gráfico 5). Esses resultados sugerem que o implante autógeno de baço restaura a capacidade de produção de IFN- γ , IL-10 e TNF- α em resposta a antígenos específicos, em animais BALB/c esplenectomizados.

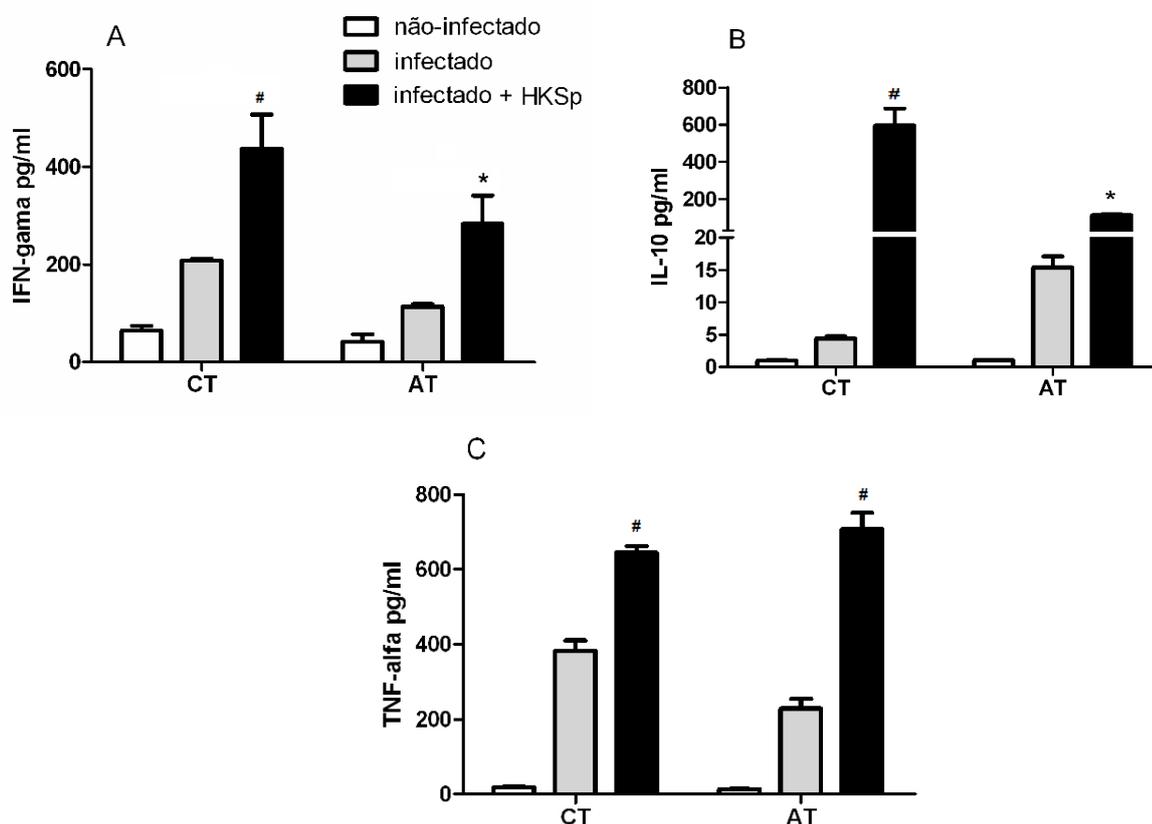


Gráfico 5: Níveis de IFN- γ , IL-10 e TNF- α em sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c infectados com *S. pneumoniae* e estimulados com antígenos específicos. 2×10^5 células esplênicas de camundongos CT e AT foram cultivadas por 72 h a 37°C, 5% CO₂ e estimuladas com ... HKSp. A produção de IFN- γ , IL-10 e TNF- α foi avaliada por ELISA. * = p < 0,05 versus infectado, # = p < 0,01 versus infectado. Os resultados são representativos de um experimento que utilizou 5 camundongos/grupo.

4.4 Camundongos esplenectomizados apresentam uma diminuição na produção de IFN- γ , IL-10 e TNF- α no fígado e nos pulmões após infecção por *S. pneumoniae*

Avaliamos a produção de IFN- γ , IL-10 e TNF- α em homogeneizado de fígado e pulmões de camundongos BALB/c infectados com *S. pneumoniae*. O grupo esplenectomizado apresentou níveis reduzidos ($P < 0,05$) de IFN- γ , IL-10 e TNF- α no fígado e nos pulmões quando comparados aos grupos CT e AT, exceto em relação a produção de TNF- α no pulmão, quando os grupos estudados mostraram resultados semelhantes. Os grupos AT e CT não diferiram entre si quanto a produção de IFN- γ e TNF- α , havendo, no entanto, maior produção de IL-10 no fígado dos animais AT (Gráfico 6).

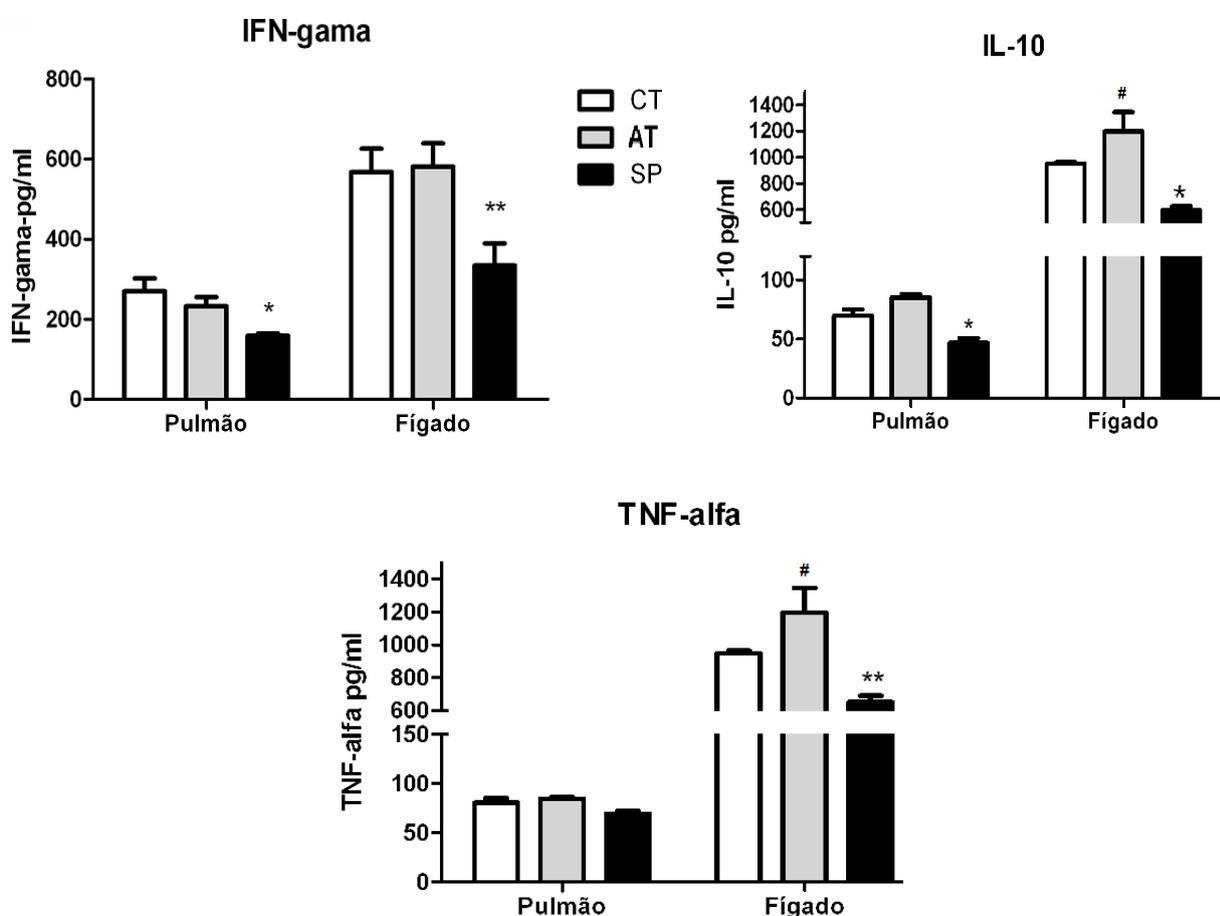


Gráfico 6: Níveis de IFN- γ , IL-10 e TNF- α nos pulmões e fígado de camundongos BALB/c infectados com *S. pneumoniae*. Os níveis de IFN- γ , IL-10 e TNF- α produzidos no pulmão e fígado de camundongos BALB/c infectados por *S. pneumoniae* foram avaliados por meio do método de ELISA para dosagem de citocinas. * = $p < 0,05$ versus CT e AT), ** = $p < 0,01$ versus CT e AT), # = $p < 0,05$ versus CT.

=p<0,05 versus CT. Os resultados são representativos de um experimentos feito com 5 camundongos de cada grupo.

4.5 A produção de IL-17A e o recrutamento de neutrófilos no fígado e nos pulmões é reduzida em animais esplenectomizados após infecção com *S. pneumoniae*, sendo aumentada após implante autógeno de baço

O Gráfico 7A mostra que os níveis de IL-17 A observados tanto nos pulmões quanto no fígado dos camundongos dos grupos CT e AT não diferiram entre si, e foram maiores com relação ao observado no grupo SP ($p < 0,05$). De forma semelhante, a porcentagem de neutrófilos (células CD11b⁺ CD69⁺) no fígado e nos pulmões foi menor no camundongos do grupo SP, em relação aos animais dos grupos CT e AT (Gráfico 7B e 7C).

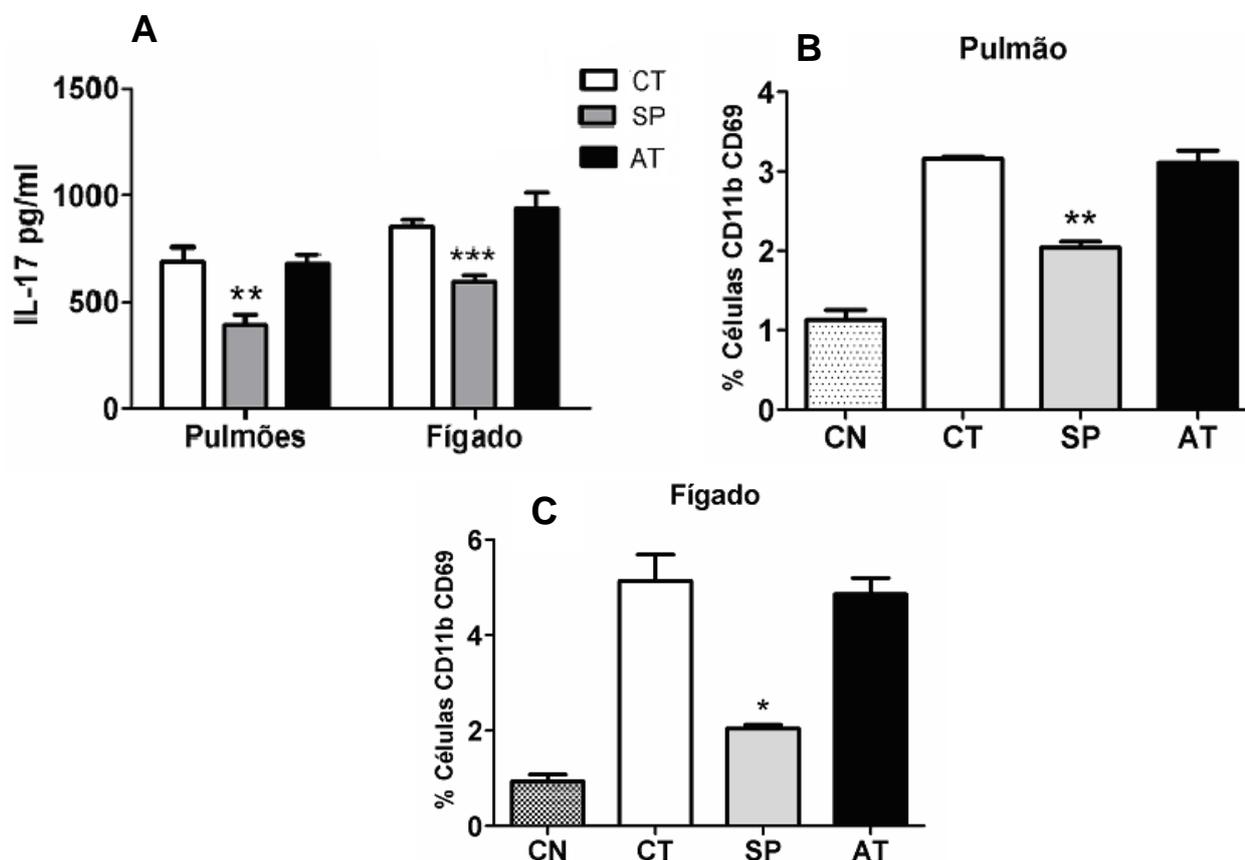


Gráfico 7: Porcentagem de neutrófilos e produção de IL-17 A no fígado e nos pulmões de camundongos esplenectomizados e autotransplantados infectados com *S. pneumoniae*. Utilizando o gate indicado em materiais e métodos obtivemos a população de neutrófilos (células CD11b⁺ CD69⁺) no pulmão fígado dos animais dos grupos esplenectomizado (SP) e autotransplantados (AT). A produção de IL-17A foi determinada no 5º dia após infecção em macerados de fígado e pulmões de camundongos BALB/c esplenectomizados e autotransplantados infectados com *S. pneumoniae*, avaliados por meio da técnica de ELISA. Os resultados representam um experimento com 5 camundongos. * =p <0,05 versus CT e AT, ** =p <0,01 versus CT e AT, *** =p <0,001 versus CT e AT. CN= controle negativo não operado e não infectado.

4.6 Porcentagem de células TCD4⁺, células TCD8⁺, macrófagos (CD4⁺ CD40⁺ Cd3⁻) e células B (CD19⁺) nos pulmões de camundongos esplenectomizados e autotransplantados infectados com *S. pneumoniae*

A análise por citometria de fluxo mostrou diferenças significativas entre os grupos CT, AT e SP quanto a porcentagem de células T, B e macrófagos no pulmão dos camundongos infectados com *S. pneumoniae*. De acordo com o Gráfico 8, o grupo SP apresentou as menores porcentagens de células B (CD19⁺), macrófagos (CD40⁺) e células T CD4⁺ e células T CD8⁺ em comparação aos grupos CT e AT que apresentaram porcentagens similares dessas populações celulares, exceto com relação às células T CD8⁺ em que o grupo AT apresentou uma porcentagem maior que o grupo CT.

Pulmão

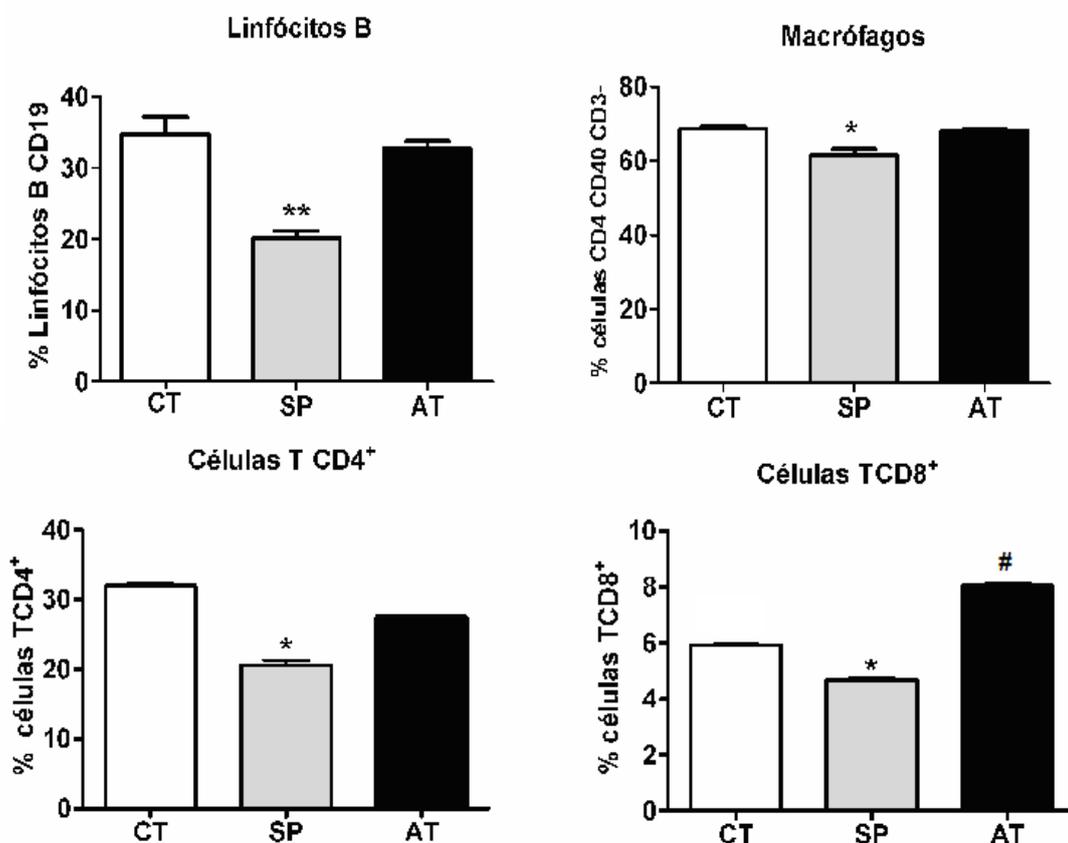


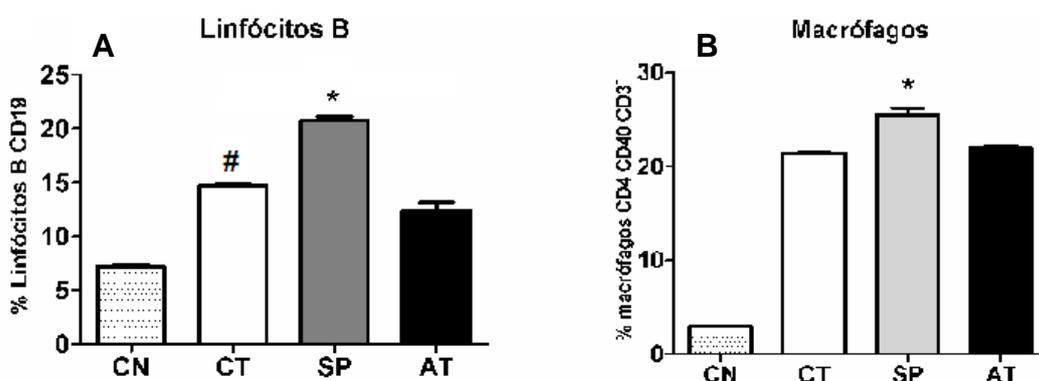
Gráfico 8: Porcentagem de células TCD4⁺, células TCD8⁺, macrófagos (CD4⁺ CD40⁺ Cd3⁻) e células B (CD19⁺) nos pulmões de camundongos esplenectomizados e autotransplantados infectados com *S. pneumoniae* e avaliados por meio de citometria de fluxo. Utilizando os gates indicados em materiais e métodos obtivemos a porcentagem de macrófagos (gate R5, CD4⁺, CD40⁺ e CD3⁻) (B) e células B (gate R4 e CD19⁺) nos pulmões de camundongos infectados por *S. pneumoniae* (barra cinza). * =p < 0,05 versus CT e AT, ** =p <0,01 versus CT e AT, # =p <0,05 versus CT e SP. Os

resultados representam um experimento com 5 camundongos infectados por *S. pneumoniae* e são representativos de três experimentos independentes.

4.7 Porcentagem de células TCD4⁺, células TCD8⁺, macrófagos (CD4⁺ CD40⁺ Cd3⁻) e células B (CD19⁺) no sangue periférico de camundongos esplenectomizados e autotransplantados infectados com *S. pneumoniae*

As porcentagens de células TCD4⁺, células TCD8⁺, macrófagos (CD4⁺ CD40⁺ Cd3⁻) e células B (CD19⁺) foram avaliadas em amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) em camundongos esplenectomizados e autotransplantados após 5 dias de infecção com *S. pneumoniae*. O Gráfico 9A e 9B mostra que animais do grupo SP apresentam maior porcentagem de células B e macrófagos entre as células no sangue periférico (PBMC). Entretanto, a porcentagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ foi menor no grupo SP em relação aos grupos CT. Os grupos CT e AT apresentaram porcentagem de células B, T e macrófagos semelhantes, exceto em relação a porcentagem de células CD8⁺ que estava maior no grupo CT.

PBMC



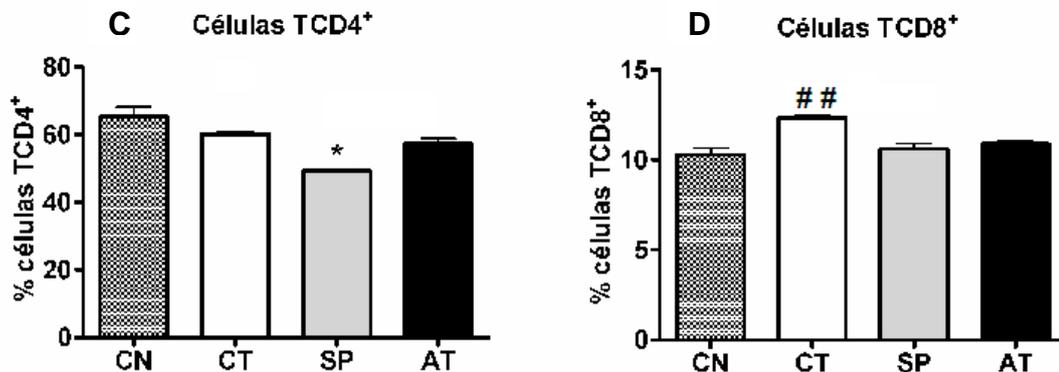


Gráfico 9: Porcentagem de células TCD4⁺, células TCD8⁺, macrófagos (CD4⁺ CD40⁺ Cd3⁻) e células B (CD19⁺) em amostras de células mononucleares de sangue periférico de camundongos BALB/c esplenectomizados e autotransplantados infectados com *S. pneumoniae* e avaliados por meio de citometria de fluxo. Utilizando os gates indicados em materiais e métodos obtivemos a porcentagem de células TCD4, células TCD8, macrófagos (gate R5, CD4⁺, CD40⁺ e CD3⁻) (B) e células B (gate R4 e CD19⁺) nos pulmões de camundongos infectados por *S. pneumoniae* (barra cinza). * =p < 0,05 versus CT e AT, # =p < 0,05 versus AT e ## =p < 0,05 versus SP e AT. Os resultados são provenientes de um experimento com 5 camundongos infectados por *S. pneumoniae* e são representativos de três experimentos independentes. CN: Controle Negativo.

4.8 Análise histológica de fígado e pulmões de camundongos esplenectomizados e autotransplantados infectados com *S. pneumoniae*

Cortes de tecidos hepático e pulmonar corados com hematoxilina e eosina foram preparados e avaliados quanto à presença de acúmulos de neutrófilos, utilizando um aumento de 200x. O Gráfico 10 C mostra que o grupo SP apresentou poucos neutrófilos por acúmulo inflamatório no fígado em relação aos grupos CT e AT. A análise da resposta inflamatória nos pulmões dos animais infectados com *S. pneumoniae* mostrou que o grupo SP apresentava celularidade leve (Gráfico 11a), em relação aos grupos CT e AT, que mostraram celularidade aumentada, de moderada a acentuada. Acúmulos inflamatórios bem delimitados com grande quantidade de células fagocíticas foram observados no grupo AT (Gráfico 11c). Esses resultados sugerem que uma maior celularidade nos pulmões está relacionada com a presença do baço, indicando a importância desse órgão como mediador da resposta imune e inflamatória após a infecção por *S. pneumoniae*.

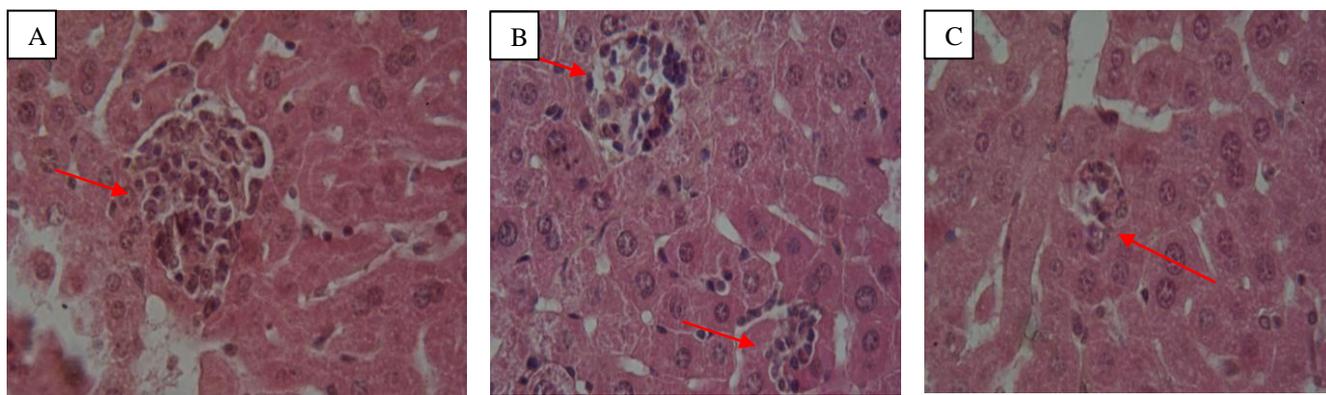


Gráfico 10: Análise histológica de cortes do fígado corado com hematoxilina-eosina do grupo CT (A), grupo AT (B) e grupo SP (C). As setas em vermelho evidenciam a presença de acúmulos inflamatórios contendo diferentes números de neutrófilos. (Aumento de 200x).

Tabela 1- Número de neutrófilos por acúmulos inflamatórios no fígado dos animais infectados com *Streptococcus pneumoniae*

Grupos	Nível 1 Leve ^a	Nível 2 Moderada ^b	Nível 3 Acentuada ^c
CN	-	-	-
CT	+	+	+
AT	+	+	+
SP	+	-	-

^a presença de 2 a 6 neutrófilos por acúmulos inflamatórios; ^b presença de 7 a 15 neutrófilos por acúmulo inflamatório; ^c presença de mais de 15 neutrófilos por acúmulo inflamatório. CN= controle negativo não operado e não infectado.

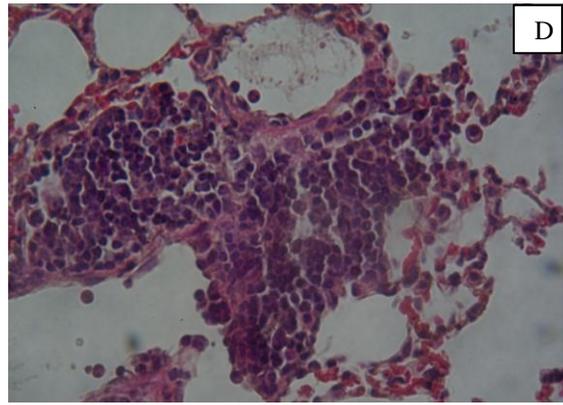
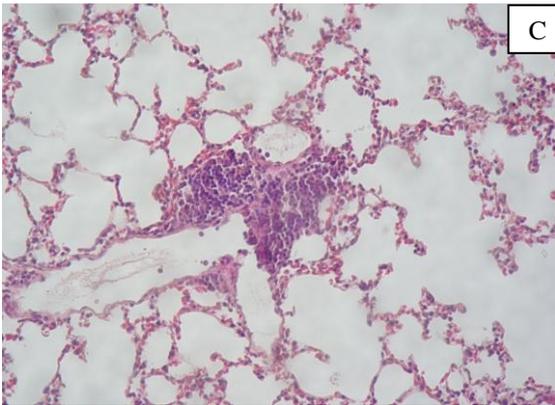
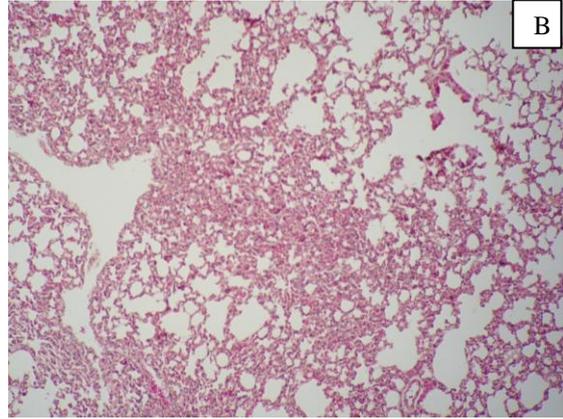
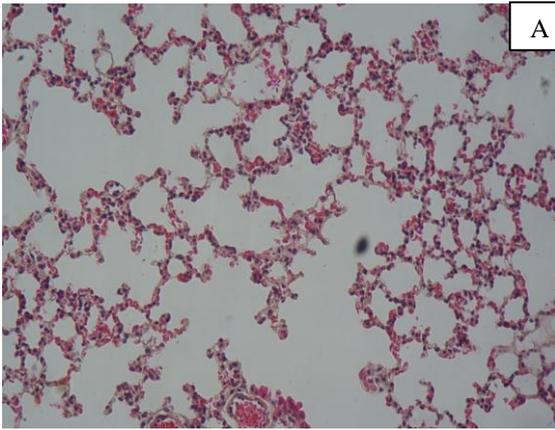


Gráfico 11: Análise histológica de cortes de pulmões de camundongos esplenectomizados e autotransplantados infectados com *S. pneumoniae*, foram corados com hematoxilina-eosina no 5º dia de infecção. Grupo SP (A), grupo CT (B) e grupo AT (C) Aumento de 200X, e aumento de 400x em D.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, em diversos centros hospitalares, a maioria dos cirurgiões não reconhece a importância das alternativas à esplenectomia total, como a esplenectomia parcial e o implante autógeno do baço, representando possibilidades de preservação das funções do baço original. Técnicas conservadoras do baço visam a manutenção de atividades exercidas pelo baço, como a filtração do sangue para a retirada de eritrócitos senescentes, reciclagem de ferro e, principalmente, depuração de bactérias encapsuladas (MEBIUS e KRAAL, 2005). Portanto, a ausência do baço resulta em um risco aumentado no desenvolvimento de sepse grave considerada letal em muitos casos. A incidência global de morte por infecção fulminante pós esplenectomia (IFPE) em pacientes esplenectomizados permanece baixa, mas tem sido relatada como sendo de até 600 vezes maior que na população em geral. (WAGHORN, 2001).

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de camundongos BALB/c esplenectomizados e autotransplantados em controlar a infecção causada por *S. pneumoniae*, o maior responsável pelos casos de IFPE (infecção fulminante após esplenectomia) (ALTAMURA, 2001).

Os principais resultados obtidos neste trabalho mostram que: 1) animais esplenectomizados tiveram maior número de *S. pneumoniae* no fígado e nos pulmões, cinco dias após a infecção, em comparação ao grupo controle; 2) a realização do implante autógeno de baço nos animais esplenectomizados aumentou a resistência frente a infecção, não havendo diferença significativa no número de UFC de *S. pneumoniae* no fígado e nos pulmões, entre os grupos AT e CT; 3) camundongos do grupo SP tiveram menores níveis séricos de IgM, IgG1 e IgG2a anti-*S. pneumoniae*, em relação aos grupos CT e AT; 4) a maior susceptibilidade à infecção por *S. pneumoniae* em animais esplenectomizados foi associada a um menor recrutamento de neutrófilos e diminuída produção de IL-17A, IFN- γ , e TNF- α no fígado e nos pulmões, em comparação aos grupos AT e CT; 5) a análise histopatológica do fígado e dos pulmões dos grupos estudados confirmou haver menor recrutamento de neutrófilos apenas nos animais do grupo SP.

O número de UFC de *S. pneumoniae* foi maior no grupo de animais apenas esplenectomizados, e a realização do implante autógeno de baço aumentou a capacidade de depuração de bactérias nos animais do grupo AT, a níveis semelhantes aos observados no grupo controle. Resultados similares foram descritos após infecção com *Staphylococcus aureus* (Teixeira *et al.*, 2008) e *Escherichia coli* (Perobelli *et al.*, manuscrito em preparação). Kuranaga e colaboradores (2005), entretanto, demonstraram que a esplenectomia reduz o crescimento de UFC de *Listeria monocytogenes* no fígado de camundongos C57BL/6, após infecção pela via endovenosa. Esses resultados sugerem que o baço exerce uma importância fundamental no controle de infecções sistêmicas causadas por microrganismos extracelulares.

A capacidade do baço de produzir IgM e tuftsin, associado a ativação da cascata de proteínas do sistema complemento (COOPER, 1988; DE CIUTIS *et al.*, 1978), moléculas que atuam na opsonização de microrganismos facilitando a fagocitose, o aprisionamento e a destruição de patógenos, favorece a depuração principalmente de bactérias encapsuladas como *S. pneumoniae*. Estudos recentes mostram que o mecanismo de adesão do pneumococo à célula apresentadora de antígenos, ocorre por meio de receptores que reconhecem padrões moleculares específicos de patógenos (PAMPs), como os receptores do tipo “toll-like 2” (receptores semelhantes ao toll, um tipo de receptor específico para patógenos encontrado primariamente em drosófilas) (KNAPP *et al.*, 2004; KNAPP *et al.*, 2008). Sendo assim, a possibilidade do reconhecimento de *S. pneumoniae* de por meio dos receptores do tipo toll, além de outros receptores, como o SIGNR1 (“Specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing nonintegrin-related 1”) e o MARCO (receptor de macrófago com estrutura de colágeno), presentes na superfície dos macrófagos, está ligado ao desenvolvimento da resposta imune e a resistência a infecção (TIMENS, 1991; MEBIUS e KRAAL, 2005,). Este processo de reconhecimento de patógenos conhecido como a fase cognitiva da resposta imune, se encontra, portanto, interconectado à resposta prévia ou concomitante no baço, capaz de reconhecer polissacarídeos presentes principalmente em bactérias encapsuladas e bactérias Gram positivo, como *S. pneumoniae*. Na resposta T independente do tipo 2, que ocorre frente a polissacarídeos, a maior parte das células B se diferencia em plasmócitos produtores de anticorpos (ZANDVOORT e

TIMENS, 2002), o que nos leva a considerar este mecanismo como um forte aliado na resposta imune dirigida a este patógeno. Neste trabalho observamos maior produção de IgM, IgG1 e IgG2a em camundongos autotransplantados, sendo isto associado a uma menor susceptibilidade à infecção por *S. pneumoniae*. Estudos recentes já demonstraram que a ausência de baço reduz os níveis de IgM e conseqüentemente a depuração de bactérias encapsuladas e não-encapsuladas (BOES, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 2008;). Vários autores têm demonstrado que a via de infecção induz um padrão de resposta imune distinto (MIZRACHI-NEBENZAHL, 2003; EIGENBERGER *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2008). PALANIAPAN e colaboradores, utilizando uma via de infecção intranasal com pneumococos em camundongos, observaram que estes apresentaram uma resposta imune independente de anticorpos e dependente de células TCD4⁺. Porém, no nosso trabalho, a infecção ocorreu via endovenosa, simulando um modelo de doença sistêmica, portanto, sendo indispensável o papel de anticorpos na fase inicial da infecção (PALANIAPAN *et al.*, 2005).

A dosagem de citocinas em células esplênicas dos camundongos autotransplantados, mostrou que a presença do fragmento esplênico no grupo AT mantém a capacidade desses animais em responder a antígenos específicos (HKSp), com produção aumentada de IFN- γ , IL-10 e principalmente TNF- α , como observado no grupo controle. Este resultado comprova que células do implante autógeno de baço mantém características funcionais semelhantes às observadas no órgão original. É reconhecido que o IFN- γ aumenta as funções microbidas dos macrófagos, além de estimular a expressão de receptores de alta afinidade para IgG e proteínas do complemento, que estão envolvidos na opsonização e fagocitose de microrganismos (PARK-MIN *et al.*, 2007). Foi demonstrado que o TNF- α tem uma participação efetiva no combate a infecções bacterianas. Trata-se de uma citocina fundamental no desenvolvimento da resposta inflamatória, aumentando a expressão de moléculas de adesão além de induzir a produção de quimiocinas nas células do endotélio, recrutando então, fagócitos para o sítio de infecção. (ALVES-FILHO, 2005). A dosagem dessas citocinas neste trabalho mostrou que camundongos esplenectomizados infectados com *S. pneumoniae* tiveram uma diminuição significativa na produção de IFN- γ e TNF- α no fígado e nos pulmões, enquanto que, os camundongos do grupo AT apresentaram valores semelhantes na produção de

IFN- γ e TNF- α no fígado e nos pulmões quando comparado com o grupo CT. Estes resultados sugerem uma maior susceptibilidade à infecção causada por *S. pneumoniae* nos animais esplenectomizados. De fato, Lau e colaboradores demonstraram que animais que sofreram esplenectomia apresentaram ineficiente atividade microbicida dos macrófagos alveolares que foi associado a baixos níveis de IFN- γ e TNF- α nesses animais (LAU *et. al.*, 1983). E também, linfonodos pulmonares em camundongos esplenectomizados apresentam maior quantidade de bactérias do que em camundongos controle em resposta ao desafio por pneumococo (HEBERT *et al.*, 1994).

Estudos demonstram o importante papel dos neutrófilos na sepse. Esse tipo celular está relacionado com a fagocitose de microrganismos no foco da infecção. O estímulo que faz os neutrófilos migrarem até o sítio de infecção foi recentemente relacionado com aumento na produção de IL-17A, (ALVES-FILHO, 2005; MATSUKAZI e UMEMURA, 2007; RENKO *et al.*, 2008; CROSSARA-ALBERTO, 2008). Neste trabalho, foi observado que os níveis de IL-17A estavam menores no grupo esplenectomizado, quando comparados ao grupo CT e ao grupo AT. A menor produção de IL-17A no grupo SP correlacionou com reduzido recrutamento de neutrófilos nos pulmões e no fígado dos animais infectados. Esses resultados sugerem que a maior capacidade de recrutamento de neutrófilos e maior produção IL-17A, favorece a eliminação de um maior número de bactérias no fígado e pulmão nos camundongos dos grupos CT e AT, sendo este resultado apoiado pela contagem de bactérias nesses órgãos.

Os níveis de células B nos pulmões de camundongos esplenectomizados infectados com *S. pneumoniae* foram menores quando comparados aos níveis observados nos grupos CT e AT, o que sugere uma baixa resposta imune humoral no sítio de infecção. Por outro lado, no sangue periférico, os níveis de células B do grupo SP estavam mais elevados quando comparados aos demais grupos, sugerindo que esses camundongos têm uma deficiência no recrutamento de células B para o sítio de infecção, o que pode estar relacionado com seu estado de ativação e com a expressão de moléculas de adesão às células endoteliais.

O macrófago, assim como o neutrófilo, é um importante fagócito encontrado em sítios inflamatórios. Neste trabalho, tanto o grupo AT quanto o grupo CT apresentavam níveis semelhantes de macrófagos nos pulmões e sangue periférico,

enquanto que no grupo SP esses valores foram significativamente mais baixos. Nossos resultados sugerem que nos grupos CT e AT, ocorre um maior influxo de neutrófilos e macrófagos, o que pode favorecer a fagocitose e a diminuição do número de bactérias nos tecidos infectados. O número aumentado de células B e macrófagos no PBMC dos animais esplenectomizados pode refletir não apenas uma falha no recrutamento dessas células para o sítio de infecção mas também o aumento das mesmas no sangue devido a ausência do tecido esplênico que habitualmente abriga a maior parte desses tipos celulares (SIPKA *et al.*, 2007).

Como já foi dito, na resposta inicial frente à infecção por *S. pneumoniae* via endovenosa ocorre ativação da resposta imune humoral, com participação de anticorpos específicos que contribuem para opsonização e ativação de sistema complemento. Porém, passada a fase inicial, a resposta imune celular com presença de células TCD4⁺ se torna fundamental para o sucesso na eliminação dos microrganismos. A ativação de células TCD4⁺ e células TCD8⁺ é dependente do tipo de patógeno. Na infecção sistêmica por *S. pneumoniae*, uma bactéria encapsulada, a opsonização e a fagocitose ocorrem principalmente no baço, onde também ocorre a apresentação de antígenos às células TCD4⁺ naïve. Nosso estudo mostrou que a porcentagem de células TCD4⁺ estava maior no grupo CT e se apresentou em níveis intermediários no grupo AT, enquanto o grupo SP apresentou a menor porcentagem deste subtipo celular. Além disso, a infecção por *S. pneumoniae* mobiliza preferencialmente células TCD4⁺ em comparação às células TCD8⁺ (KURANAGA *et al.*, 2006).

Interessantemente, os animais do grupo SP apresentaram poucos acúmulos de células inflamatórias no fígado, com poucos neutrófilos por acúmulo, ao contrário os grupos CT e AT que apresentaram muitos acúmulos inflamatórios no fígado, contendo muitos neutrófilos. Nos pulmões dos camundongos do grupo AT haviam infiltrados inflamatórios bem delimitados com muitos neutrófilos em seu interior, porém o grupo CT não apresentou infiltrados inflamatórios bem delimitados mas apresentou uma grande quantidade de neutrófilos por todo o tecido, sugerindo que essas células inflamatórias estavam se organizando para formar infiltrados inflamatórios bem delimitados. Esses resultados corroboram com a dosagem de IL-17A nos pulmões e no fígado dos grupos estudados sugerindo que IL-17A tem um papel fundamental no recrutamento de neutrófilos para sítios inflamatórios. Os

animais esplenectomizados têm uma deficiência no recrutamento de neutrófilos, provavelmente devido a baixos níveis de IL-17A nos tecidos estudados, fazendo com que um maior acúmulo de bactérias seja encontrado nos pulmões e fígado desses animais. Já no grupo AT, a presença de uma menor quantidade de bactérias, quando comparada ao grupo SP, pode estar relacionada com o maior número de neutrófilos nesses tecidos. Esses resultados demonstram que a presença do baço tem um papel fundamental no recrutamento de neutrófilos para o foco de infecção, favorecendo a eliminação do patógeno.

6 CONCLUSÃO

1. O implante autógeno de baço restaura a capacidade de camundongos BALB/c esplenectomizados de controlarem a infecção com *S. pneumoniae* no fígado e nos pulmões, conforme verificado pela contagem de UFC nestes órgãos.
2. Animais dos grupos CT e AT apresentaram resposta imune humoral com elevada produção de IgM, IgG1 e IgG2a, favorecendo a opsonização e a fagocitose de *S. pneumoniae*.
3. A infecção por *S. pneumoniae* causou influxo de neutrófilos e macrófagos para os pulmões dos camundongos dos grupos CT e AT, sendo que camundongos do grupo SP apresentaram menor acúmulo desses tipos celulares nos pulmões.
4. A dosagem de citocinas em células esplênicas dos camundongos autotransplantados frente ao estímulo com *S. pneumoniae* mortos por calor, mostrou que o fragmento esplênico permanece funcional e contribui para uma resposta efetiva específica contra o invasor. Nos demais tecidos a presença do implante autógeno do baço restaura a capacidade de produção de citocinas dos camundongos esplenectomizados a níveis semelhantes ao grupo controle.
5. Os níveis reduzidos de linfócitos B e macrófagos nos pulmões e os níveis elevados no PBMC dos camundongos do grupo SP em contraste com os grupos CT e AT, sugerem que a ausência do tecido esplênico altera a resposta humoral e o recrutamento de fagócitos no sítio de infecção.
6. O perfil histológico no fígado e pulmões dos animais autotransplantados demonstram que a presença do fragmento esplênico auxilia no processo de recrutamento de células fagocíticas para o foco inflamatório, o que resulta na maior eliminação de bactérias nesses órgãos como mostrado pelos resultados de UFC.

Referências

- ABRANTES, W.L., SILVA, R.C.O., RIANI, E.B., FREITAS M.A.F. Preservação do baço na pancreatectomia distal por trauma. **Rev. Col. Bras. Cir.**, 29:83-87, 2002.
- ALBRECHT H. Ein fall von sehr zahlreichen über das ganze peritoneum versprengten. **Beier z Pathol Anat u z Allg Path**, 20: 513. 1896.
- ALEXANDER J.E, BERRY A.M, PATON J.C, RUBINS J.B, ANDREW P.W, MITCHELL T.J. Amino acid changes affecting the activity of pneumolysin alter the behaviour of pneumococci in pneumonia. **Microb Pathog.**, 24(3):167-74, 1998.
- ALONSODEVELASCO E., VERHEUL A. F., VERHOEF J., SNIPPE H. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. **Microbiol Rev.**, 59(4):591–603, 1995.
- ALTAMURA, M., CARADONNA, L., PELLEGRINO, N. M., URGESI, G., MINIELLO, S. Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, 23(2):153-161, 2001.
- ALVES-FILHO J.C., BENJAMIM C., TAVARES-MURTA B.M., CUNHA F.Q. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 1:223-6, 2005.
- 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.**, 32(5):747-749, 1997.
- AYALA A, CHUNG C.S., XU Y.X., EVANS T.A., REDMOND K.M., CHAUDRY I.H. Increased inducible apoptosis in CD4+ T lymphocytes during polymicrobial sepsis is mediated by Fas ligand and not endotoxin.. **Immunology**, 97(1)45-55, 1999.
- BASSET A., THOMPSON C.M., HOLLINGSHEAD S.K., BRILES D.E., ADES E.W., LIPSITCH M., MALLEY R. Antibody-independent, CD4+ T-cell-dependent protection against pneumococcal colonization elicited by intranasal immunization with purified pneumococcal proteins. Infect Immun.*, 11:5460-4, 2007.
- BILLIAR T.R., WEST M.A., HYLAND B.J., SIMMONS R.L. Splenectomy alters Kupffer cell response to endotoxin. **Arch. Surg.**, 123:327-32, 1988.
- BOES, M., ANDREY P., TARA S., MICHAEL C., JIANZHU C. A Critical Role of Natural Immunoglobulin M in Immediate Defense Against Systemic Bacterial Infection. **J. Exp. Med.**, 188(12), 2381–2386, 1998.
- BRADSHAW, P. H., THOMAS, C. G. Jr. Partial splenectomy and overwhelming infection in rats. **J Surg Res.**, 32(2):173-175, 1982.

BRIGDEN, M.L., ANDREW P., GAIL B. Pneumococcal Vaccine Administration Associated With Splenectomy: The Need for Improved Education, Documentation, and the Use of a Practical Checklist. **Amer. J. Hemat.**, 65:25–29, 2000.

BRILES D.E., HOLLINGSHEAD S.K., KING J., SWIFT A., BRAUN P.A., PARK M.K., FERGUSON L.M., NAHM M.H., NABORS G.S. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. **J Infect Dis.**, 182(6):1694-701, 2000.

BRILES D.E., HOLLINGSHEAD S.K., PATON J.C., ADES E.W., NOVAK L., VAN GINKEL F.W., BENJAMIN W.H. JR. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with Streptococcus pneumoniae. J Infect Dis., 188(3):339-48, 2003.

BUCHBINDER, J.H., LIPKOPF, C.J. Splenosis: multiple peritoneal splenic implants following abdominal injury. **Surgery**, 6, 927–930, 1939.

BUNTAIN, W.L., GOULD, G.S. Splenic trauma in children and techniques of splenic savage. **World J. Surg.**, 9(3):398-409, 1985.

CADILI, A., DE GARA, C. Complications of Splenectomy. **The American Journal of Medicine**, 121:371-375, 2008.

CALDER R.M. Autoplastic spleen grafts: their use in the study of the growth of splenic tissue. **J. Pathol. Bacteriol.**, 49:351-62, 1939.

CESTA, M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicol Pathol.**, 34(5):455-465, 2006.

CHAPMAN W.C., NEWMAN M. Disorders of the spleen. In: Lee R, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, editors. Wintrabe's clinical hematology. **Egypt: Mass Publishing**, 10:1969-85, 1998.

CHERIF, H., LANDGREN, O., KONRADSEN, H. B., KALIN, M., BJORKHOLM, M. Poor antibody response to pneumococcal polysaccharide vaccination suggests increased susceptibility to pneumococcal infection in splenectomized patients with hematological diseases. **Vaccine**, 24:75–81, 2006.

CHRISTO, M. C., DIDIO, L. J. A. Anatomical and surgical aspects of splenic segmentectomies. **Ann. Anat.**, 179:461-474, 1997.

CHRISTO, M. C. Baço, cirurgia e história. **Rev. Med. Minas Gerais**, 11:251-254, 2001.

CLAASSEN, E., KORS, N., DIJKSTRA, C. D., VAN ROOIJEN, N. Marginal zone of the spleen and the development and localization of specific antibody forming cells

against thymus-dependent and thymus-independent type-2 antigens. **Immunology**, 57:399-405, 1986.

CLARK I.A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. **Cytokine Growth Factor Rev.**,18(3-4):335-43, 2007.

COONEY D.R., DEATH J.C., SWANSON S.E. Relative merits of partial splenectomy splenic reimplanted and immunization in preventing postesplenectomy infections. **Surgery**, 86(4): 561-69, 1979.

COOPER, N. R. Complement and infectious agents. **Rev Infect Dis.**, 10(2):S447-S449, 1988.

CROSBY, W. H. An historical sketch of splenic function and splenectomy. **Lymphology**, ,16(2):52-55, 1983.

DAVIDSON R. N. AND WALL R. A. Prevention and management of infections in patients without a spleen. **Clin Microbiol Infect.**, 7: 657–660, 2001.

DE BOER, J., SUMNER-SMITH, G., DOWNIE, H. G. Partial splenectomy technique and some hematologic consequences in the dog. **J Pediatr Surg.**, 7(4):378-381, 1972.

DE CIUTIIS, A., POLLEY, M. J., METAKIS, L. J., PETERSON, C. M. Immunologic defect of the alternate pathway-of-complement activation postsplenectomy: a possible relation between splenectomy and infection. **J Natl Med Assoc.**, 70(9):667-670, 1978.

DIAMOND L.K. Splenectomy in childhood and the hazard of overwhelming infection. Demonstration of splenosis. **Clin. Nucl. Med.**, 11:161-4, 1969.

EIGENBERGER, K., CHRISTIAN S., MANFRED G., HARALD H., HERMANN W., WOLFGANG G., RAINER G., HEINZ B. Antibody responses to pneumococcal and hemophilus vaccinations in splenectomized patients with hematological malignancies or trauma. **The Middle European Journal of Medicine**, 119/7–8: 228–234, 2006.

ELOMAA, O., KANGAS, M., SAHLBERG, C., TUUKKANEN, J., SORMUNEN, R., LIAKKA, A., THESLEFF, I., KRAAL, G., TRYGGVASON, K. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. **Cell**. 80(4):603-609, 1995.

FALTIN, R. Milzartige bildungen in peritoneum, beobachtet Ca, 6 jahresnce nach wegen milzruptur vorgenommen splenekfomie. **Deutsch. Z. Chir.**, 110: 160–163, 1911.

FARRAR M.A., SCHREIBER RD.The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. **Annu Rev Immunol.**,11:571-611, 1993.

GOMEZ L, EGIDO R, GUARINO G, PEREZ L, PINÖL C. Studio istologico del trapianto splenico sperimentale nei ratti. **Minerva chir.**, 55:741-44, 2000.

GORDON D.L., HOSTETTER M.K. Complement and host defense against microorganisms. **Pathology**, 8:365–375, 1986.

GORDON D.L., JOHNSON G.M., HOSTETTER M.K. Ligand-receptor interactions in the phagocytosis of virulent *Streptococcus pneumoniae* by polymorphonuclear leukocytes. **J. Infect. Dis.**, 154 :619–626, 1986.

GRAY, H. On the structure and use of the spleen. London, John W. Parker and Son. 1854.

GRIFFINI L, TIZZONI G. Etude expérimentale sur la reproduction partielle de la rate. **Arch Ital Biol.**, 4:303-6, 1883.

HANSEN K., SINGER D.B. Asplenic-hyposplenic overwhelming sepsis: postsplenectomy sepsis revisited. **Pediatr. Dev. Pathol.**, 4:105-21, 2001.

HEBERT, J. C. Pulmonary antipneumococcal defenses after hemisplenectomy. **J Trauma**. 29(9):1217-1221, 1989.

HEBERT, J. C., O' REILLY, M., YUENGER, K., SHATNEY, L., YODER, D. W., BARRY, B. Augmentation of alveolar macrophage phagocytic activity by granulocyte colony stimulating factor and interleukin-1: influence of splenectomy. **J Trauma**. 37:909-912, 1994.

HIRST, R. A., KADIOGLU, A., O'CALLAGHAN C., ANDREW, P. W. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. **Clin Exp Immunol.**, 138:195–201, 2004.

HOLDSWORTH R.J., IRVING A.D., CUSCHIERI A. Postsplenectomy sepsis and its mortality rate: actual versus perceived risks. **Br. J. Surg.**, 78:1031-1038, 1991.

IZBICKI, J.R., ZIELGLER-HEITBROCK, MEIER, M., LÜTTICKEN R., WILKER D.K., SIEBECK M., SCHEUBER H.P., SCHWEIBERER L. The impact of splenectomy on antibody response in the porcine model. **J. Clin. Lab. Immunol.**, 30:13-19, 1989.

KALINSKI, P., HILKENS, C. M., WIERENGA, E. A., KAPSENBERG, M. L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunol Today**, 12:561-567, 2000.

KARAGÜLLE, E., HOŞCOŞKUN Z., KUTLU A.K., KAYA M., BAYDAR S. The effectiveness of splenic autotransplantation: an experimental study Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery **Ulus Travma. Acil. Cerrahi. Derg.**, 13:13-19, 2007.

KARZAI W., REINHART K. Sepsis: definitions and diagnosis. **Int J Clin Pract Suppl.**, 95:44-8, 1998.

KEANE M.P., STRIETER R.M. The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease. **Respir Res.**, 3:5-9, 2001.

KEEL M, UNGETHÜM U, STECKHOLZER U, NIEDERER E, HARTUNG T, TRENTZ O, ERTEL W. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. **Blood**, 90(9):3356-63, 1997.

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

KIRBY A.C., RAYNES J.G., KAYE P.M. CD11b regulates recruitment of alveolar macrophages but not pulmonary dendritic cells after pneumococcal challenge. **J Infect Dis.**, 15;193(2):205-13, 2006.

KNAPP S., CATHARINA W., WIELAND, C., OSAMU T., SHIZUO A., SANDRINE F., VAN DER POLL T. Toll-Like Receptor 2 Plays a Role in the Early Inflammatory Response to Murine Pneumococcal Pneumonia but Does Not Contribute to Antibacterial Defense. **The Journal of immunology.**, 172: 3132–3138, 2004.

KNAPP P.E., STORER T.W., HERBST K.L., SINGH A.B., DZEKOV C., DZEKOV J., LAVALLEY M., ZHANG A., ULLOOR J., BHASIN S. Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of nf-Kb and modulated by the pro-inflammatory cytokines tnf-alfa and il-1beta. **Scand J Immunol.**, 67(2):169-176, 2008.

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

KOPPEL, E. A., LUDWIG, I. S., HERNANDEZ, M. S., LOWARY, T. L., GADIKOTA, R. R., TUZIKOV, A. B., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M., VAN KOOYK, Y., APPELMEL, B. J., GEIJTENBEEK, T. B. Identification of the mycobacterial carbohydrate structure that binds the C-type lectins DC-SIGN, L-SIGN and SIGNR1. **Immunobiology**, 209(1-2):117-127, 2004.

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.**, 140(1):11-21, 2005.

KURANAGA, N., KINOSHITA, M., KAWABATA T., HABU, Y., SHINOMIYA, N., SEKI, S. Interleukin-18 protects splenectomized mice from lethal *Streptococcus pneumoniae* sepsis independent of interferon-g by inducing IgM production. **The J of Infec Diseases** 2006; 194:993–1002.

LANOUE, A., CLATWORTHY, M. R., SMITH, P., GREEN, S., TOWNSEND, M. J., JOLIN, H. E., SMITH, K. G., FALLON, P. G., MCKENZIE, A. N. SIGN-R1 contributes to protection against lethal pneumococcal infection in mice. **J Exp Med.**, 200(11):1383-1393, 2004.

LAU, H. T., HARDY, M. A., ALTMAN, R. P. Decreased pulmonary alveolar macrophage bactericidal activity in splenectomized rats. **J Surg Res.**, 34(6):568-571, 1983.

LEEMANS R., BEEKHUIS H., TIMENS W., THE T.H., KLASSEN H.J. Spleen autotransplantation provides restoration of functional splenic lymphoid compartments and improves the humoral immune response to pneumococcal polysaccharide vaccine. **Clin. Exp. Immunol.**, 117:596-604, 1996.

LEEMANS R., HARMS G., RIJKERS G.T., TIMENS W. Immune response capacity after human splenic autotransplantation: restoration of response individual pneumococcal vaccine subtypes. **Ann. Surg.**, 229(2):279-85, 1999.

LIAUNIGG, A., KASTBERGER, C., LEITNER, W. Regeneration of autotransplanted splenic tissue at different implantation sites. **Cell. Tissue Res.**, 269:1-11, 1992.

LIKHTE, V. V. Protection against fulminant sepsis in splenectomized mice by implantation of autochthonous splenic tissue. **Exp Hematol.**, 6(5):433-9, 1978.

LIU, Y. J. Sites of B lymphocyte selection, activation, and tolerance in spleen. **J Exp Med.**, 186(5):625-629, 1997.

LIVINSTONE C.D., LEVINE B.A., SIRINEK K.R. Site of splenic autotransplantation affects protection from sepsis. **Am. J. Surg.**, 146: 734-37, 1983.

LODER, F., MUTSCHLER, B., RAY, R. J., PAIGE, C. J., SIDERAS, P., TORRES, R., LAMERS, M. C., CARSETTI, R. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. **J Exp Med.**, 190(1):75-89, 1999.

LU Y.J., GROSS J., BOGAERT D., FINN A., BAGRADE L., ZHANG Q., KOLLS J.K., SRIVASTAVA A., LUNDGREN A., FORTE S., THOMPSON C.M., HARNEY K.F., ANDERSON P.W., LIPSITCH M., MALLEY R. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. **PLoS Pathog.**, 4(9):e1000159, 2008.

LYNCH A.M., KAPILA R. Overwhelming postsplenectomy infection. **Infect. Dis. North Am.**, 10:693-707, 1996.

MALLEY R., SRIVASTAVA A., LIPSITCH M., THOMPSON C.M., WATKINS C., TZIANABOS A., ANDERSON P.W. Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to pneumococci in mice immunized intranasally with the cell wall polysaccharide. **Infect Immun.**, 74(4):2187-95, 2006.

MANDEL G.L., BENNET J.E., CHURCHILL R.D. **Principles and practice of infectious diseases**, 5:152-155, 1999.

MANLEY O.T., MARINE D. The transplantation of splenic tissue into the subcutaneous fascia of the abdomen in rabbits. **J. Exp. Med.**, 25:619-27, 1917.

MARQUES, R.G., PETROIANU, A. Infecção fulminante pós-esplenectomia. **Arq Gastroenteol.**, 40(1):47-54, 2003.

MATSUZAKI G, UMEMURA M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. **Microbiol. Immunol.**, 51(12):1139-47, 2007.

MEBIUS, R. E., KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat. Rev. Immunol.**, 5(8):606-616, 2005.

MIKÓ I., BRÁTH E., FURKA I., KOVÁCS J., KELVIN D., ZHONG R. Spleen autotransplantation in mice: a novel experimental model for immunology study. **Microsurgery**, 21: 140-42, 2001.

MIKÓ I., BRATH E., NEMETH N., FURKA A., SIPKA S. JR., PETO K., SERFOZO J., KOVACS J., IMRE S., BENKO I., GALUSKA L., SIPKA S., ACS G., FURKA I. Spleen autotransplantation. Morphological and functional follow-up after spleen autotransplantation in mice: a research summary. **Microsurgery**, 27(4):312-6, 2007.

MIZRACHI-NEBENZAHL Y, LIFSHITZ S, TEITELBAUM R, et al. Differential activation of the immune system by virulent *Streptococcus pneumoniae* strains determines recovery or death of the host. **Clin Exp Immunol.**, 134:23–31, 2003.

MOGENSEN TH, BERG RS, OSTERGAARD L, PALUDAN SR. *Streptococcus pneumoniae* stabilizes tumor necrosis factor alpha mRNA through a pathway dependent on p38 MAPK but independent of Toll-like receptors. **BMC Immunol.**, 9:52-60, 2008.

MOORE F.A., MOORE E.E., MOORE G.E., MILLIKAN J.S. Risk of splenic salvage after trauma. Analysis of 200 adults. **Am. J. Surg.**, 148:800-5, 1984.

MOORE F.A., MOORE E.E., ALBERKATHY C.M. Injury to the spleen. In: Moore – Mattox – Feliciano. **Trauma: appleton and Lange**, 3:465-482, 1991.

MORRIS D.H., BULLOCK F.S. The importance of the spleen in resistance to infection. **Ann Surg.**, 5:513-21, 1919.

NEELEMAN C., GEELEN S.P., AERTS P.C., DAHA M.R., MOLLNES T.E., ROORD J.J., POSTHUMA G., VAN DIJK H., FLEER A. Resistance to Both Complement Activation and Phagocytosis in Type 3 Pneumococci Is Mediated by the Binding of Complement Regulatory Protein Factor H. **Infection And Immunity**, 67(9):4517–4524, 1999.

NUNES C. C. A., NUNES, W. V., WAECHTER, F. L., LIMA, L. P. Trauma esplênico. Valor do autotransplante. **Rev. Médica Sta Casa**, 5:1038-1044, 1994.

NUNES, S. I., REZENDE, A. B., TEIXEIRA, F. M., FERREIRA A.P., ALVES M.M., JAMEL N., ASSIS R.V., TEIXEIRA H.C. Antibody response of autogenous splenic tissue implanted in the abdominal cavity of mice. **World J. Surg.**, 29:1623-1629, 2005.

OEHEN, S., ODERMATT, B., KARRER, U., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R., LÓPEZ-MACÍAS, C. Marginal zone macrophages and immune responses against viruses. **J Immunol.**, 169(3):1453-1458, 2002.

OGUNNIYI A.D., FOLLAND R.L., BRILES D.E., HOLLINGSHEAD S.K., PATON J.C. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun.**, 68(5):3028-33, 2000.

PALANIAPPAN R., SINGH S., SINGH U.P., SAKTHIVEL S.K., ADES E.W., BRILES D.E., HOLLINGSHEAD S.K., PATON J.C., SAMPSON J.S., LILLARD J.W. JR. Differential PsaA-, PspA-, PspC-, and PdB-specific immune responses in a mouse model of pneumococcal carriage. **Infect Immun.**, 73(2):1006-13, 2005.

PARK-MIN, K. H., SERBINA, N. V., YANG, W., MA, X., KRYSTAL, G., NEEL, B. G., NUTT, S. L., HU, X., IVASHKIV, L. B. Fc-gammaRIII-dependent inhibition of interferon-gamma responses mediates suppressive effects of intravenous immune globulin. **Immunity.**, 26(1):4-6, 2007.

PEARSON H.A., JOHNSTON D., SMITH K.A., TOULOUKIAN R.J. The born-again spleen. Return of splenic function after splenectomy of trauma. **N. Engl. J. Med.**, 298:1389-92, 1978.

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

PERLA D., MARMORSTON-GOTTESMAN J. Studies on *Bartonella muris* anemia of albino rats. III. The protective effect of autoplasmic splenic transplants on the *Bartonella muris* anemia of splenectomized rats. **J. Exp. Med.**, 52:131-43. 1930.

PETROIANU A., SILVA R.G., SIMAL C.J.R., CARVALHO D.G., SILVA R.A.P. Late postoperative follow-up of patients submitted to subtotal splenectomy. **Am. Surg.**, 63:735-40, 1997.

PETROIANU A. Avaliação da função fagocitária em remanescentes de esplenectomia subtotal e autoimplante esplênico autógeno. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 25(1): 25, 2003.

PETROIANU, A., PETROIANU, L. P. Splenic autotransplantation for treatment of portal hypertension. **Can J Surg.**, 48(5):382-386, 2005.

PISTERS, P. W. T.; PACHTER, H.L. Autologous splenic transplantation for splenic trauma. **Ann. Of Surg.**, 219(3):225-235. 1994.

PULENDRAN, B., TANG, H., DENNING, T. L. Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. **Curr Opin Immunol.**, 20:61-67, 2008.

QUIE H., VERBRUGH H. A., VAN DIJK W. C., PETERS R., VAN DER TOL M. E., PETERSON P. K., VERHOEF J. Staphylococcus aureus opsonization mediated via the classical and alternative complement pathways. A kinetic study using MgEGTA chelated serum and human sera deficient in IgG and complement factors C1s and C2. **Immunology**, 36(3): 391–397, 2000.

REDDY R.C., CHEN G.H., TEKCHANDANI P.K., STANDIFORD T.J. Sepsis-induced immunosuppression: from bad to worse. **Immunol Res.**, 24(3):273-87, 2001.

REN B., MCCRORY M.A., PASS C., BULLARD D.C., BALLANTYNE C.M., XU Y., BRILES D.E., SZALAI A.J. Effects of PspA and Antibodies to PspA on Activation and Deposition of Complement on the Pneumococcal Surface. **Infect. and Immun.**, 72(1):114-122, 2004.

RENKO M., VALKONEN P., TAPIAINEN T., KONTIOKARI T., MATTILA P., KNUUTTILA M., SVANBERG M., LEINONEN M., KARTTUNEN R., UHARI M. Xylitol-supplemented nutrition enhances bacterial killing and prolongs survival of rats in experimental pneumococcal sepsis. **BMC Microbiol.**, 11(8):45-51, 2008.

RESENDE V., PETROIANU A. Estudo funcional tardio do auto-implante esplênico após trauma complexo do baço humano. **Rev. Col. Bras. Cir.**, 28: 165-70, 2001.

RESENDE V., PETROIANU A. Functions of the splenic remnant after subtotal splenectomy for treatment of severe splenic injuries. **Am. J. Surg.**, 185:311-15, 2003.

ROSE A.T., NEWMAN M.I., DEBELAK J., PINSON C.W., MORRIS J.A. JR, HARLEY D.D., CHAPMAN W.C. The incidence of splenectomy is decreasing: lessons learned from trauma experience. **Am. Surg.**, 66:481-6, 2000.

ROTHER J., LESSLAUER W., LÖTSCHER H., LANG Y., KOEBEL P., KÖNTGEN F., ALTHAGE A., ZINKERNAGEL R., STEINMETZ M., BLUETHMANN H. 1993. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. **Nature**, 26;364(6440):798-802, 1993.

RUBINS J.B, POMEROY C. Role of gamma interferon in the pathogenesis of bacteremic pneumococcal pneumonia. **Infect Immun.**, 65(7):2975-7, 1997.

RUBINS, J. B., JANOFF, E.N. Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. **J. Lab. Clin. Med.**, 131:21–27, 1998.

SAELAND E., VIDARSSON G., LEUSEN, J. H. W., VAN GARDEREN E, NAHM MH, VILE-WEEKHOUT H, WALRAVEN V, STEMERDING AM, VERBEEK JS, RIJKERS GT, KUIS W, SANDERS EA, VAN DE WINKEL JG. Central Role of Complement in

Passive Protection by Human IgG1 and IgG2 Anti-pneumococcal Antibodies in Mice. **The Journal of Immunology**, 170: 6158–6164, 2003.

SCHAECHTER M. A pattern to Microbiology and Molecular Biology Reviews. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 63(2):265-269, 1999.

SCHUTZE G.E., MASON E.O. JR, BARSON W.J., KIM K.S., WALD E.R., GIVNER L.B., TAN T.Q., BRADLEY J.S., YOGEV R., KAPLAN S.L. Invasive pneumococcal infections in children with asplenia. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 21:278–82, 2002.

SCHILLING K. Uber ein en fall von multiplen nebenmilzen. **Arch Pathol Anat.**, 88: 65. 1907.

SHARMA, R., MONDAL, A., KASHYAP, R., CHAKRAVARTY, S. K., SAWROOP, K., SINGH, T. Radiolabeled denatured RBC scintigraphy in autologous splenic transplantation. **Clin Nucl Med.**, 21(7):534-536, 1996.

SHINEFIELD H.R., STEINBERG C.R., KAYE D. Effect of splenectomy on the susceptibility of mice inoculated with *Diplococcus pneumoniae*. **J. Exp. Med.**, 123(5):777–94, 1966.

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

SIPKA S JR, BRÁTH E, TÓTH FF, ALEKSZA M, KULCSÁR A, FÁBIÁN A, BARÁTH S, BALOGH P, SIPKA S, FURKA I, MIKÓ I. Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice. **Transpl Immunol.**, 16(2):99-104, 2006

SPÖRRI, R., REIS E SOUSA, C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. **Nat Immunol.**, 6:163-170, 2005.

STYRT B. Infection associated with asplenia: risks, mechanisms, and prevention. **Am. J. Med.**, 88(5N):33N–42N, 1990.

STYRT, B.A. Risks of infection and protective strategies for the asplenic patient. **Infect Dis Clin Pract.**, 5:94-100, 1996.

SUMARAJU, V., SMITH L.G., SMITH S.M. Infectious complications in asplenic hosts. **Infect Dis Clin North Am.**, 15:551-65, 2001.

TEIXEIRA F.M., FERNANDES B.F., REZENDE A.B., MACHADO R.R., ALVES C.C., 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.**, 154(2):255-63, 2008.

TIMENS, W. The human spleen and the immune system: not just another lymphoid organ. **Res Immunol.**, 142:316, 1991.

TORRES, O.J.M., DIETZ, U.A., LIMA, E.J.B. Histological evaluation of the regeneration of splenic autotransplants: experimental study in rats. **Acta Cir. Bras.**, 9(2):81-87, 1994.

USLU, A., YETKİ, H., AHMET, A. The efficacy and immunogenicity of Pneumo-23 and ACT-HIB in patients undergoing splenectomy. **Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.**, 12(4):277-281, 2006.

VAN DER POLL T., COYLE S.M., MOLDAWER L.L., LOWRY S.F. Changes in endotoxin-induced cytokine production by whole blood after in vivo exposure of normal humans to endotoxin. **J Infect Dis.**, 174(6):1356-60, 1996.

VAN WYCK, D. B., WITTE, M. H., WITTE, C. L., THIES, A. C. Jr. Critical splenic mass for survival from experimental pneumococemia. **J Surg Res.**, 28(1):14-17, 1980.

WAGHORN, D. J. Overwhelming infection in asplenic patients: current best practice preventive measures are not being followed. **J Clin Pathol.**, 54:214–218, 2001.

WEIGENT D.A., HUFF T.L., PETERSON J.W., STANTON G.J., BARON S. Role of interferon in streptococcal infection in the mouse. **Microb Pathog.**, 1(4):399-407, 1986.

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

WILKINS, B. S. The spleen. **Br J Haematol.**, 117(2):265-274, 2002.

WLUKA, A., OLSZEWSKI, W. L. Innate and adaptive processes in the spleen. **Ann Transplant.**, 11(4):22-29, 2006.

YUSTE, J., BOTTO, M., PATON, J.C., HOLDEN, D.W., BROWN, J.S. Additive Inhibition of Complement Deposition by Pneumolysin and PspA Facilitates *Streptococcus pneumoniae* Septicemia. **J. Immunol.**, 175(3):1813-1819, 2005.

ZANDVOORT, A., TIMENS, W. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. **Clin Exp Immunol.**, 130(1):4-11, 2002.