

Rodrigo Siqueira-Batista¹, Andréia Patrícia Gomes¹, Sarah Fumian Milward Azevedo¹, Rodrigo Roger Vitorino², Eduardo Gomes de Mendonça³, Flávio Oliveira de Sousa⁴, Alcione de Paiva Oliveira⁴, Fábio Ribeiro Cerqueira⁴, Sérgio Oliveira de Paula⁵, Maria Goreti de Almeida Oliveira³

Linfócitos T CD4+CD25+ e a regulação do sistema imunológico: perspectivas para o entendimento fisiopatológico da sepse

CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes and regulation of the immune system: perspectives for a pathophysiological understanding of sepsis

1. Departamento de Medicina e Enfermagem, Universidade Federal de Viçosa - UFV - Viçosa (MG), Brasil.
2. Centro Universitário Serra dos Órgãos - UNIFESO - Teresópolis (RJ), Brasil.
3. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa - UFV - Viçosa (MG), Brasil.
4. Departamento de Informática, Universidade Federal de Viçosa - UFV - Viçosa (MG), Brasil.
5. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa - UFV - Viçosa (MG), Brasil.

RESUMO

A resposta inflamatória sistêmica representa o evento patogênico central da sepse, subjazendo às manifestações clínicas e aos achados laboratoriais presentes nos enfermos. Inúmeras pesquisas têm demonstrado que os linfócitos T CD4+CD25+ - também conhecidos como células T reguladoras (Treg) - participam dos processos de desenvolvimento da sepse, em virtude de sua capacidade de suprimir a resposta imune. Com base nessas ideias, propôs-se, no presente

artigo, a discussão do papel dos linfócitos Treg na sepse, com base na revisão da literatura com estratégia de busca definida (LILACS, PubMed e SciELO), tendo em vista duas abordagens principais: a participação dessas células nos processos de inflamação e imunidade, e as perspectivas de investigação fisiopatológica computacional da condição mórbida.

Descritores: Linfócitos T reguladores; Sepse/fisiopatologia; Sepse/terapia; Inflamação; Imunidade; Simulação por computador.

INTRODUÇÃO

A incidência da sepse apresentou um aumento extraordinário nas últimas duas décadas. Estima-se que 1,5 milhão de indivíduos, nos Estados Unidos da América e outros 1,5 milhão de pessoas, na Europa, desenvolvem sepse grave e/ou choque séptico anualmente, das quais 35 a 50% evoluem para o êxito letal.⁽¹⁾ Esse grande número de casos fatais tem alavancado dispareas investigações, com o propósito de compreender os intrincados mecanismos patogênicos da entidade nosológica, tendo em vista a possibilidade de desenvolvimento da terapêutica imunomoduladora.⁽¹⁻³⁾

A ruptura do complexo equilíbrio dos mecanismos pró e anti-inflamatórios desorganiza a resposta inflamatória nos enfermos vitimados pela sepse.⁽⁴⁾ Muitos constituintes do sistema imune do *Homo sapiens sapiens* estão envolvidos na anergia e no alentecimento da resposta à penetração de micro-organismos - designando uma típica imunossupressão, a qual, nesse contexto, pode ser chamada de síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (do inglês *compensatory anti-inflammatory response syndrome*, CARS).⁽⁵⁾ Ressalta-se que, desde essa perspectiva, algumas populações de linfócitos T, que vêm sendo mais bem descritas hodiernamente, parecem “se esquivar” da seleção tímica ou passar por um procedimento de “educação tímica”, adquirindo um estatuto diferente dos linfócitos nominados “tradicionais”. A exemplificação disso está no fato de que linfócitos autorreativos, amadurecidos exclusivamente no timo, executam um preponderante papel na regulação da autoimunidade. Essas células foram chamadas de linfócitos T reguladores CD4+CD25+ (Treg).⁽⁶⁾

Conflitos de interesse: Nenhum.

Submetido em 24 de Julho de 2012
Aceito em 28 de Setembro de 2012

Autor correspondente:

Rodrigo Siqueira-Batista
Departamento de Medicina e Enfermagem,
Universidade Federal de Viçosa
Avenida P. H. Rolfs s/n, Campus Universitário
CEP: 36571-000 - Viçosa (MG), Brasil
E-mail: rsbatista@ufv.br

As células Treg (CD4+CD25+) possuem um importante papel na regulação imunológica, destacando-se que os mecanismos de controle da resposta imune adaptativa têm implicação decisiva no bom funcionamento do sistema imune. Dentre os aspectos estreitamente dependentes dessa regulação, destacam-se as respostas imunes marcadas pela autorreatividade, cuja importância é decisiva em medicina interna, tanto no âmbito das doenças autoimunes,⁽⁷⁾ quanto na esfera das enfermidades infecciosas. Nesse contexto, vários estudos têm elucidado como essa subpopulação de linfócitos T participa dos eventos fisiopatológicos da sepse, com o propósito de clarear os mecanismos de instalação da condição mórbida e de criar novas estratégias terapêuticas.^(3,8-10)

A partir dessas considerações preliminares, o objetivo do presente artigo é apresentar uma breve revisão do papel das células Treg na sepse, considerando os aspectos fisiopatogênicos, e assinalar perspectivas de investigação científica da fisiopatologia da entidade nosológica, utilizando a modelagem computacional/experimentação *in silico*.

MÉTODOS

O presente artigo foi construído a partir da revisão da literatura com estratégia de busca definida. Para a obtenção dos artigos, foram consultadas as fontes Literatura Latinoamericana e do Caribe em Ciências de Saúde (LILACS), *National Library of Medicine* (PubMed) e *Scientific Eletronic Library Online* (SciELO). Os unitermos foram identificados segundo os Descritores de Ciências da Saúde (DeCS), destacando-se *Lymphocytes subsets* (subpopulações de linfócitos) e *sepsis* (sepse). O termo *regulatory T cell* (células T reguladoras), ainda que não presente no DeCS, foi também empregado. Para proceder à busca dos artigos, foram utilizadas as seguintes estratégias: estratégia 1 - *Lymphocytes subsets + sepsis*; estratégia 2 - *Regulatory T cell + sepsis*.

A busca empreendida resultou na obtenção de 1134 citações, das quais foram selecionados 50 artigos - conforme exposto no quadro 1 - utilizando-se como critério de elegibilidade a ênfase na abordagem do papel regulatório das Treg no sistema imune e da participação das Treg na fisiopatologia da sepse.

Além do emprego dos artigos selecionados, também foram consultados livros-texto de imunologia e medicina interna - e outras fontes bibliográficas de conhecimento prévio dos autores - como parte integrante do levantamento bibliográfico.

Quadro 1 - Número de citações obtidas na pesquisa bibliográfica

Estratégia de busca	Bases consultadas		
	PubMed	SciELO	LILACS
Estratégia 1: Lymphocytes subsets + sepsis	918	0	1
Estratégia 2: Regulatory T cell + sepsis	215	0	0

RESULTADOS

Os dados obtidos a partir da leitura dos textos selecionados foram organizados nas seguintes seções: linfócitos T CD4+CD25+ reguladores, os linfócitos T CD4+CD25+ e a patogênese da sepse. Ao final, foi elaborada uma breve seção intitulada Fronteiras Computacionais: Experimentos *in silico* com linfócitos Treg na sepse, com o intuito de apresentar perspectivas de investigação na área de modelagem computacional, ora desenvolvidas pelos autores do presente manuscrito.

Os linfócitos T CD4+CD25+ reguladores

O organismo dos membros da espécie *H. sapiens sapiens* dispõe de inúmeros mecanismos que promovem a homeostase, incluindo o sistema imune, o qual articula, complexamente, diferentes elementos de interação, na tentativa de manutenção do equilíbrio entre imunidade e tolerância imunológica,⁽¹¹⁾ responsável por determinar uma efetiva resposta aos desafios infecciosos e não infecciosos (por exemplo, tumores), sem incitar eventos autoimunes ou processos lesivos ao hospedeiro.⁽¹¹⁾ Nesse particular, tem destaque a esfera da tolerância imunológica: não resposta a um determinado antígeno previamente reconhecido, o qual consta com a significativa participação das células Treg.⁽¹²⁾

Origens e função supressora

As células Treg foram identificadas inicialmente em modelos murinos (no início da década de 1970) e, posteriormente, em espécimes de *H. sapiens sapiens*. Essas células representam uma subpopulação de linfócitos T, definida pela expressão das moléculas de CD4 e de CD25 e do fator de transcrição FoxP3 (*forkhead box P3*), destacando-se como imprescindíveis no controle da resposta imunológica a antígenos próprios e não próprios, ao induzirem a supressão das células T efetas.⁽¹³⁾ Sakaguchi et al.⁽¹⁴⁾ observaram que a transferência adotiva de uma população de linfócitos T isentos da molécula de superfície CD25 induzia autoimunidade, com acometimento de alguns órgãos e sistemas, especificamente em indivíduos imunodeficientes.⁽¹⁴⁾ O crescente interesse no estudo das Treg, nos últimos anos, diz respeito ao seu essencial papel na manutenção dos mecanismos que garantem a autotolerância e a regulação da resposta imune. De fato, quando as populações de células T que suprimiam a imunidade foram descritas, os investigadores as denominaram células T supressoras, supondo-se que se tratavam de linfócitos T CD8+. Sem embargo, investigações recentes elucidaram que, de fato, há células supressoras na orquestração da resposta imunológica, mas elas assemelham-se mais aos linfócitos T CD4+ do que aos T CD8+. A população de células T CD4+CD25+ abrange as Treg, as quais podem minimizar a multiplicação de outras

populações de células T, consoante ao já documentado *in vitro*.⁽¹⁵⁾ Os efeitos supressores dessas células dizem respeito à resposta imune adaptativa (células T e B) e, igualmente, às células da resposta imune inata (monócitos, macrófagos e células dendríticas). As células Treg naturais - logo que há ativação do receptor de células T (TCR) - impedem respostas imunes *in vivo* e *in vitro* de modo antígeno não específico, por meio de um processo independente das células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês *antigen presenting cells*) e vinculado a um complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) não restrito.⁽⁶⁾

As células T CD4+CD25+ são produzidas nos corpúsculos de Hassal no timo (células *naïve*) e, ao alcançarem o sangue periférico e os órgãos linfoides secundários, tornam-se ativadas, adquirindo fenótipo de memória.⁽¹⁶⁾ Destaca-se que, na periferia, correspondem a aproximadamente 5 a 15% dos linfócitos T CD4+ circulantes.⁽¹⁷⁾ O receptor de interleucina-7 (IL-7), CD127, regulado negativamente pelo fator nuclear FoxP3, é considerado, atualmente, o marcador mais específico na identificação das Treg entre os linfócitos T, além de permitir a caracterização daquelas com maior capacidade supressora.⁽¹⁸⁾

Os mecanismos utilizados pelas células Treg para exercerem sua função supressora são bastante complexos e ainda se encontram sob análise em estudos *in vitro*. Supõe-se que existem pelo menos três mecanismos:⁽¹⁹⁾

- por meio do contato físico (espaço-temporal) entre as células Treg e as células CD4 efetora, no qual a molécula CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) libera sinais inibitórios ao se ligar ao receptor CD80 das células dendríticas ou células T ativadas;⁽²⁰⁾

- a partir do papel das citocinas inibitórias - como a IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF-β1) - observadas em estudo *in vivo*.⁽²¹⁾ A IL-10 inibe a ativação das APC, além de ser antagonista do interferon gama (INF-γ), sendo considerada uma substância de controle dos processos inflamatórios;⁽²¹⁾

- a competição por fatores de crescimento, sobretudo a IL-2, com as células-alvo, constitui o terceiro mecanismo proposto. O resultado dessa concorrência seria a apoptose celular deflagrada por privação de citocinas.⁽¹⁹⁾

Além desses modos de operar, há ainda um quarto possível mecanismo de imunossupressão, no qual os linfócitos Treg adquirem uma atividade citotóxica e liberam granzimas e perforinas levando à citólise da célula-alvo.⁽²²⁾

Vale a pena ressaltar que são descritas células T efetoras resistentes à supressão por linfócitos Treg.⁽²³⁾

Grupos de linfócitos Treg

As células Treg são divididas, até o momento, em dois grupos: as naturais e as adaptativas.⁽²⁴⁾

As células Treg naturais expressam constitutivamente a molécula de superfície CD25+, sendo, então, denominadas linfócitos T CD4+CD25+.⁽²⁵⁾ Além do marcador CD25, os linfócitos Treg naturais expressam outros constituintes de superfície, os quais, embora não possuam especificidade, contribuem para sua identificação. Destacam-se, nesse bojo, o *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4), o *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor* (GITR), o *tumor necrosis factor receptor-2* (TNFR-2) e o *human leucocyte antigen* (HLA-DR).⁽¹⁹⁾ Ademais, as células Treg naturais foram qualificadas como linfócitos T CD4+ que expressam a cadeia alfa do receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25), mas não outras moléculas típicas de linfócitos T ativados. Com efeito, a deficiência genética do receptor da IL-2 (ou da própria IL-2) resulta do aparecimento de moléstias autoimunes.⁽¹²⁾ O consumo e a conseqüente menor disponibilidade de IL-2 no meio são algumas das prováveis modalidades de supressão empregadas por células Treg, conforme já mencionado. Foram encontradas significativas evidências de que a ação efetora das células T CD4+ é minimizada, *in vitro*, por esse mecanismo, mas ainda faltam evidências experimentais *in vivo*. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que tanto linfócitos Treg, quanto T CD8+, têm sua homeostase suscetível à regulação por IL-2 *in vivo*.⁽²⁶⁾

Embora os estímulos responsáveis pela produção e pelo desenvolvimento das células Treg naturais não estejam completamente elucidados, propõe-se que o reconhecimento de antígenos próprios no timo, mediado pelos receptores, TCR, de alta afinidade, constitui a sinalização implicada nesse processo.⁽¹²⁾

Alguns receptores presentes na superfície das Treg, como o CD27, Fas, CD62L, e os receptores de quimiocinas (CCR6, CCR7, CCR8 e CD103) permitem sua migração para os locais nos quais grassa o processo inflamatório. No entanto, esses marcadores refletem o estado ativado dos linfócitos T, não sendo específico para a subpopulação de Treg.⁽²⁴⁾

As células Treg adaptativas são geradas na periferia por meio de uma miríade de estímulos antigênicos (ou em situações tolerogênicas) exercendo sua função supressora a partir da liberação de citocinas, como IL-10 e TGF-β.⁽²⁷⁾ Dentre essas células, são citadas a TR1, a TR3, as células T CD4-CD8-, as células *natural killer* (NK), o linfócito CD8+ supressor e a gama-delta.⁽²⁸⁾ As células TR1 possuem a propriedade de controlar os linfócitos T de memória, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além de suprimir a resposta imune, Th1 e Th2 mediada, aos micro-organismos, aos alérgenos e aos processos oncogênicos,⁽²⁹⁾ mediada, principalmente, pela produção de IL-10.⁽³⁰⁾ Em contrapartida, os efeitos supressivos das células Th3 são antígeno-inespecíficos e mediados pela secreção de TGF-β, fator amplamente expresso e que regula

a atividade funcional de múltiplas células do sistema imune. Assim, as células Th3 secretoras de TGF- β provavelmente possuem uma importante participação, em muitos aspectos, no controle imunitário e na homeostase das células T.⁽³¹⁾

O papel do fator FoxP3

As células Treg podem ser “produzidas” no sangue periférico a partir da indução de linfócitos T CD4+ *naïve*, os quais são considerados uma fonte significativa de obtenção dessas estruturas no organismo. Diferentes substâncias solúveis, como citocinas, ácido retinoico e neuropeptídeos, levam a uma maior expressão de FoxP3, o que permite mais facilmente a geração de células Treg na periferia.^(32,33) Nesses termos, Hori et al.⁽³⁴⁾ evidenciaram que o fator de transcrição FoxP3 é predominantemente expresso nas Treg e que as células T *naïve* transfectadas com o mRNA do gene FOXP3 passam a exprimir propriedades de células reguladoras.⁽³⁴⁾ Nessa mesma investigação, evidenciou-se que as células transfectadas assumiam um fenótipo semelhante ao das Treg (produção de citocinas e outras moléculas que caracterizam as Treg, como CD25, CTLA-4, CD103 e GIRT), além de se tornarem capazes de suprimir a proliferação de outros linfócitos T e de inibir o desenvolvimento de doença autoimune *in vitro*.⁽³⁴⁾

Nos representantes da espécie *H. sapiens sapiens*, o gene FOXP3 está localizado no braço curto do cromossomo X, expresso predominantemente nas células do timo, do baço e dos linfonodos e, sobretudo, nas células T CD4+CD25+, sendo responsável pela síntese de um fator de transcrição, de natureza proteica, também denominado FoxP3, cuja ação é executada em regiões específicas do DNA, acentuando ou inibindo a transcrição de genes específicos.⁽²⁴⁾

Deficiência no FOXP3 provoca distúrbios autoimunes sistêmicos graves. Ademais, o comprometimento da gênese e/ou da função das células Treg (dependente do FOXP3) está associado ao desenvolvimento de colagenoses e vasculites, especialmente artrite reumatoide, doença mista do tecido conjuntivo, doença de Kawasaki, granulomatose de Wegener, lúpus eritematoso sistêmico e síndrome de Sjögren.⁽³⁵⁾ Em humanos, mutações nesse gene estão relacionadas à síndrome IPEX (*Immunodeficiency, Polyendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome*), caracterizada pela presença de enteropatia, diabetes *mellitus* com destruição das ilhotas pancreáticas, tireoidite e eczema, cujo desfecho é letal, por volta do segundo ano de vida.^(19,24,33) Foi verificado, em estudos com animais de experimentação, que alguns tipos de linfócitos T CD4+CD25+ impedem o estabelecimento de doenças autoimunes, como a doença inflamatória intestinal induzida experimentalmente, a encefalite alérgica experimental e o diabetes *mellitus* autoimune. Esse mecanismo de supressão está subordinado à ativação pelo TCR, sendo, assim, antígeno-

específico, o que implica o contato entre a célula supressora e seu alvo. São notáveis as implicações clínicas decorrentes da supressão das respostas imunes por células Treg. Como exemplo disso tem-se que a redução ou limitação de células Treg e a posterior imunização podem incrementar a resposta do sistema imune às vacinas convencionais. Ressalta-se que enfermidades alérgicas, autoimunes ou aquelas atinentes aos mecanismos que envolvam a rejeição de tecidos e a supressão de órgãos poderiam ser tratadas pelo aumento da função supressora de grupos das células Treg.^(15,35)

Com relação aos mecanismos de sinalização nuclear do FoxP3 nas células Treg, estudos têm evidenciado que, após a ligação do antígeno ao TCR, ocorre uma atenuação dos sinais intracelulares em decorrência da interação do *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) e do *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) com o FoxP3, resultando na inibição da transcrição dos genes das citocinas IL-2, IL-4 e INF- γ , além do aumento da expressão de CD25 e CTLA-4.^(36,37)

Visão atual

A despeito de décadas de dúvidas e de questionamentos de muitos pesquisadores, as células reguladoras, enfim, começam a ganhar maior destaque nos debates atuais em imunologia. As células Treg naturais CD4+CD25+ possuem uma importante função na manutenção da tolerância aos antígenos endógenos e na regulação da resposta imunológica dirigida aos antígenos externos, protegendo o hospedeiro de injúrias. Uma melhor compreensão acerca do funcionamento dessas células pode permitir seu uso como terapia adjuvante de inúmeras condições que estejam relacionadas ao sistema imune, como as doenças autoimunes, as moléstias alérgicas,⁽³⁸⁾ o câncer,⁽³⁹⁾ as imunodeficiências primárias,⁽²⁴⁾ as dermatoses,⁽⁴⁰⁾ a rejeição de transplantes,⁽¹⁷⁾ as enfermidades reumáticas⁽³⁵⁾ e as doenças infecciosas,⁽⁴¹⁾ com destaque para a sepse. Esse último ponto é comentado em seguida.

Os linfócitos T CD4+CD25+ e a patogênese da sepse

A patogênese da sepse está relacionada a uma disfunção generalizada da resposta imune/inflamatória, sobretudo no âmbito celular, a qual implica no aumento da morbidade dos pacientes acometidos.^(42,43) Em concomitância à intensa resposta inflamatória sistêmica, elaborada para tentar restabelecer a homeostase, mecanismos de regulação são requeridos para controlar o processo. No entanto, díspares evidências sugerem que os mecanismos regulatórios não restringem adequadamente o desenvolvimento da condição, culminado em disfunção da resposta imune inata e adaptativa durante a evolução da condição mórbida.⁽⁹⁾ Os principais aspectos evidenciados, até o presente momento, em termos de mecanismos fisiopatológicos são: linfopenia associada à apoptose

de linfócitos B, T e de células dendríticas;⁽⁴⁴⁾ aumento numérico das Treg na periferia e sua maior atividade supressora;^(8,45) importante alteração no fenótipo e na função dos monócitos, traduzida pela minoração da expressão do receptor da HLA-DR, do fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e, igualmente, da produção deficiente de citocinas pró-inflamatórias.⁽⁴⁶⁾

O incremento dos níveis séricos de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, reduz a capacidade de apresentação de antígenos relacionada com o declínio da expressão na superfície celular de moléculas do MHC-II, como a HLA-DR, além da apoptose.⁽⁴⁷⁾

Uma importante relação entre as respostas imunes inata e adaptativa consiste nos receptores *toll-like* (TLR), os quais são capazes de reconhecerem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). Evidências sugerem que os TLR também são expressos pelas Treg e responsáveis por orquestrar determinados mecanismos moleculares presentes na sepse.⁽⁴⁸⁾ Em uma investigação controlada, realizada em pacientes sépticos, foi constatado aumento dos níveis de TLR-2, predominantemente em infecções causadas por bactérias *Gram*-positivas, sugerindo que a tolerância de TLR pode comprometer a expressão dos TLR das bactérias *Gram*-negativas implicadas na sepse.⁽⁴⁹⁾ Inúmeros outros estudos têm demonstrado que o TLR-2 é responsável pela liberação e pela síntese de várias citocinas no contexto de uma infecção, contribuindo, por complexos mecanismos, para a imunopatogênese da sepse.⁽⁵⁰⁻⁵²⁾ Ademais, algumas alterações da expressão do FoxP3, por diferentes ligantes do TRL, estão implicadas em complexos mecanismos imunológicos presentes na sepse.⁽⁵³⁾

Tem sido descrito que a sepse se relaciona à emergência de falhas na resposta imune. De fato, há defeitos na função fagocítica, aumento da produção de citocinas imunossupressoras (como IL-10) e de células T CD25+FoxP3+.⁽⁵⁴⁾ Um dos primeiros mecanismos responsáveis por essas alterações é a morte, por apoptose, de células linfoides e mieloides. Recente investigação acrescentou um novo mecanismo a essa resposta, nos contextos em que a infecção cursa com estimulação por superantígenos. Observou-se que, nessas situações, um maior número de células T efetoras passa a expressar um fenótipo regulador, e linfócitos T passam a produzir um efeito superantígeno dependente da quantidade de citocinas produzidas.⁽⁵⁵⁾ Em uma pesquisa que procurava demonstrar, *in vivo*, a regulação da diferenciação e a expansão de células T CD8+ efetoras pelas Treg, mediada pela disponibilidade de IL-2, descreveram-se também os efeitos das células Treg sobre células CD4+. Observou-se, igualmente, que Treg limita tanto o *priming* dessas células nos linfonodos, quanto sua atividade efetora nos locais de inflamação, enquanto também executa um importante papel na homeostase celular, *priming*

e formação de memória das células CD8+.⁽²⁶⁾ Essas alterações imunes podem contribuir para o êxito letal, particularmente devido ao estado de anergia linfocitária descrita no domínio fisiopatológico da sepse.⁽⁵⁶⁾ A anergia dos linfócitos tem sido associada, igualmente, ao desenvolvimento de infecção secundária tardia.⁽⁵⁷⁾

Alguns estudos têm demonstrado que os linfócitos T CD4+CD25+ possuem a capacidade de suprimir a resposta imune adaptativa envolvida na disfunção imunológica na sepse.^(9,58)

Em um estudo, no qual se induziu sepse em ratos, observou-se um aumento significativo de células T CD4+CD25+ no sangue periférico e no baço, cujo mecanismo molecular subjacente é a expressão da proteína FoxP3, a qual foi capaz de amplificar as células Treg nos animais sépticos.⁽⁵⁹⁾ O mediador implicado na proliferação das células CD4+CD25+ foi a IL-6, cabendo comentar que não houve variação nos níveis de IL-10.⁽⁵⁹⁾ Achados semelhantes foram descritos em investigação realizada em *H. sapiens sapiens*. O percentual de células T CD4+CD25+ aumentou significativamente em enfermos sépticos em comparação com indivíduos saudáveis. Esse fato esteve relacionado à menor expressão do gene FOXP3 e, consequentemente, ao prejuízo na proliferação de linfócitos.⁽⁹⁾

Em modelos animais, há evidências de que o número insuficiente de células Treg pode contribuir para a autoimunidade, na medida em que o tratamento por meio da transferência adotiva dessas células obteve sucesso em seus resultados. Notou-se, igualmente, que, sob circunstâncias favoráveis, as células Treg poderiam ter sua produção estimulada na periferia e, consequentemente, proteger contra o estabelecimento de doenças autoimunes. Em humanos, a comprovação relacionada ao número insuficiente de células Treg é mais perceptível em pacientes com IPEX, nos quais há uma completa falta de células Treg.

Em doentes portadores dessas entidades nosológicas, a grande incitação está no estabelecimento da quantidade de células Treg e se ela é insuficiente no sítio no qual se instalou a inflamação. Enumerar células Treg tem sido muito difícil devido a algumas questões significativas: (1) definir quais células serão contadas, já que não há um marcador absolutamente específico para células Treg, e (2) também em consequência da grande diversidade de subpopulações das mesmas. A definição dos linfócitos Treg pode ser estabelecida pela análise da expressão de FOXP3, por meio da citometria de fluxo. No entanto, descobriu-se que células T efetoras também podem expressar FoxP3, levando ao impasse de que qualquer quantificação de células Treg, por esse método, poderia incluir também células T efetoras recentemente ativadas.⁽²³⁾

Como os linfócitos Treg têm sido implicados, usualmente, como causa de enfermidades, Prots et al.⁽³³⁾ revelaram, em recente investigação, que a reposição dessas células possibilitaria uma melhora nas condições mórbidas de fundamento autoimune, bem como na inflamação e na rejeição de enxertos, segundo observado em inúmeros modelos animais. Isso indica uma perspectiva terapêutica animadora e, conseqüentemente, aponta para necessidade de se estabelecer uma melhor compreensão sobre a gênese, o crescimento e a função desses grupos celulares.^(60,61)

FRONTEIRAS COMPUTACIONAIS: EXPERIMENTOS *IN SILICO* COM LINFÓCITOS TREG NA SEPSE

A simulação computacional (modelo *in silico*) do sistema imune é uma ferramenta recente que foi incorporada ao espectro metodológico disponível para o pesquisador da área de imunologia. Modelar o sistema imune em dispositivos computacionais tem servido tanto para sua melhor compreensão, como também para o emprego dos novos conhecimentos obtidos para a inspiração no desenvolvimento de soluções para problemas de outros campos científicos, como a computação e a engenharia. Dentre os aspectos que tornam a criação de modelos *in silico* do sistema imune relevantes, Li et al.⁽⁶²⁾ destacam que, na medicina, existem muitas hipóteses sobre como o sistema imune reage às infecções, as quais necessitam ser testadas. Desta feita, os modelos *in silico* podem ajudar os investigadores no entendimento dos mecanismos implicados na resposta imune. Além disso, podem empregar o conhecimento adquirido para desenvolver novos tratamentos e, utilizando o mesmo modelo, testar sua eficácia. Por fim, os mesmos autores⁽⁶²⁾ afirmam, ainda, que, além de mais baratos, os modelos *in silico* são mais rápidos do que os estudos *in vivo*.⁽⁶²⁾

Dentre as abordagens para a modelagem imunológica, aquela baseada em agentes autônomos, também conhecida como sistema multiagentes (MAS), tem se mostrado bastante promissora. Algumas das vantagens do uso de modelos baseados em agentes incluem a exploração da “emergência de funções macroscópicas complexas e determinísticas a partir de interações microscópicas estocásticas”,⁽⁶²⁾ ou seja, em termos da complexidade e do debate acaso/necessidade.⁽⁶³⁾ Por esse motivo, é possível verificar hipóteses de como células interagem entre si e de como comportamentos emergem dessas interações.

Dentre os simuladores do sistema imune baseado em agentes, pode-se citar o BIS, também conhecido como *The Basic Immune Simulator*,⁽⁶⁴⁾ e o AutoSimune.^(65,66) O BIS é um modelo baseado em agentes para investigar as interações entre células da imunidade inata e as células da imu-

nidade adaptativa. O AutoSimune é uma extensão do BIS voltada inicialmente para testar hipóteses sobre doenças autoimunes.⁽⁶⁷⁾

Sugere-se, com base nessas breves conjecturas, que a simulação do comportamento de células Treg pode se constituir em importante ferramenta para se testar hipóteses e evidenciar sua participação na sepse. Neste caso, o simulador desenvolvido por Possi et al.^(65,66) é um candidato natural para executar essa simulação. Para isso, é preciso incluir no modelo um agente que simule a célula Treg, juntamente de seu comportamento de regulação das células T efetoras. Torna-se necessário simular, também, o comportamento da citocinas envolvidas, principalmente as anti-inflamatórias, como a IL-10. Outra importante interação a ser modelada é a que ocorre entre os mastócitos e as Treg, uma vez que, segundo Lu et al.,⁽⁶⁸⁾ os mastócitos - já simulados no AutoSimune⁽⁶⁹⁾ - possuem um papel essencial na tolerância periférica dependente de linfócitos Treg.⁽⁶⁸⁾ Em última análise, aposta-se que tais investigações poderão auxiliar na elucitação da fisiopatologia da sepse.⁽⁷⁰⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A existência de células Treg capazes de modular, especificamente, a resposta imune tem significativas implicações clínicas. Há um grande interesse em demonstrar como a atividade das populações de células T CD4+CD25+ pode ser incrementada para minimizar as respostas imunes não desejadas, e como pode ser reduzida para promover respostas desejáveis.

Ao observar que um maior número de células CD4+CD25+ circulantes no sangue periférico em pacientes sépticos está associado à diminuição da resposta proliferativa, a quantificação das Treg pode representar um marcador biológico simples e valioso para externar a anergia dos linfócitos, aspecto que precisa ainda ser melhor elucidado, tanto em experimentos *in vivo*, quanto *in vitro* e *in silico*. Com base nessas ponderações, torna-se extremamente significativo o desenvolvimento de novos marcadores que permitam identificar mais facilmente células Treg, aspecto que contribuirá, possivelmente, para a investigação diagnóstica de pacientes com suspeita de sepse.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o apoio financeiro das seguintes Agências de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

ABSTRACT

The systemic inflammatory response represents the core pathogenic event of sepsis, underlying clinical manifestations and laboratory findings in patients. Numerous studies have shown that CD4+CD25+ T lymphocytes, also known as regulatory T lymphocytes (Treg), participate in the development of sepsis due to their ability to suppress the immune response. The present article discusses the role of Treg lymphocytes in sepsis based on a specific

search strategy (Latin American and Caribbean Health Sciences / Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde - LILACS, PubMed, and Scientific Electronic Library Online - SciELO) focusing on two main topics: the participation of Treg cells in inflammation and immunity as well as perspectives in the computational physiological investigation of sepsis.

Keywords: Regulatory T lymphocytes; Sepsis/pathophysiology; Sepsis/therapy; Inflammation; Immunity; Computer simulation

REFERÊNCIAS

- Gogos C, Kotsaki A, Pelekanou A, Giannikopoulos G, Vaki I, Maravitsa P, et al. Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection. *Crit Care*. 2010;14(3):R96.
- Ulloa L, Brunner M, Ramos L, Deitch EA. Scientific and clinical challenges in sepsis. *Curr Pharm Des*. 2009;15(16):1918-35.
- Wang L, de Zoeten EF, Greene MI, Hancock WW. Immunomodulatory effects of deacetylase inhibitors: therapeutic targeting of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat RevDrugDiscov*. 2009;8(12):969-81.
- Ceccon ME, Vaz FA, Diniz EM, Okay TS. Interleucina 6 e proteína C reativa no diagnóstico de sepsis tardia no recém-nascido. *Rev Assoc Med Bras*. 2006;52(2):79-85.
- Siqueira-Batista R, Gomes AP, Calixto-Lima L, Vitorino RR, Perez MC, Mendonça EG, et al. Sepsis: atualidades e perspectivas. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23(2):207-16.
- Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol*. 2006;126(1):15-24. Review.
- Haynes BF, Soderberg KA, Fauci AS. Introdução ao sistema imune e complexo gênico principal de histocompatibilidade. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, editores. *Harrison medicina interna*. 17a ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill; 2008. p. 2019-53.
- Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2009;35(4):678-86.
- Venet F, Chung CS, Monneret G, Huang X, Horner B, Garber M, et al. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol*. 2008;83(3):523-35.
- Huang LF, Yao YM, Dong N, Yu Y, He LX, Sheng ZY. Association between regulatory T cell activity and sepsis and outcome of severely burned patients: a prospective, observational study. *Crit Care*. 2010;14(1):R3.
- Siqueira-Batista R, Geller M, Gomes AP, Antonio VE, Conceição-Silva F. O sistema imunológico: atualidades e perspectivas para a prática clínica. *J Bras Med*. 2008;95(5/6):28-34.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008;124(1):13-22.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-64.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Imunologia de Kuby*. 6a ed. Porto Alegre: Artmed; 2008.
- Mesquita Júnior D, Araújo JA, Catelan TT, Souza AW, Cruvinel WM, Andrade LE, et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(5):552-80.
- Faria BA, Silva SM, Abreu MT, Napimoga MH. Ação dos linfócitos T regulatórios em transplantes. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(4):309-15.
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1701-11.
- Melo KM, Carvalho BT. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. *Rev Bras Alergia Imunopatol*. 2009;32(5):184-8.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
- Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine*. 2008;43(3):395-401.
- Braz-Silva PH. Recrutamento de células dendríticas imaturas e linfócitos T reguladores (Treg) em lesões associadas ao vírus Epstein-Barr (EBV): papel da citocina MIP3 [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2009.
- Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)/CD25(+) FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):849-59.
- Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(2):227-35; quiz 236-7. Review.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*. 2005;22(3):329-41.
- McNally A, Hill GR, Sparwasser T, Thomas R, Steptoe RJ. CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(18):7529-34.
- Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*. 2003;171(12):6323-7. Review.
- Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(3):189-98. Erratum in *Nat Rev Immunol*. 2003;3(6):509. François Bach J [corrected to Bach JF].
- Groux H. Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation*. 2003;75(9 Suppl):8S-12S.
- Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;129(4):263-76.
- Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat Immunol*. 2001;2(8):671-2.
- Calich VL, Vaz CA, coordenadores. *Imunologia*. 2a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2009. Tolerância imunológica. p.179-201.
- Prots I, Skapenko A, Lipsky PE, Schulze-Koops H. Analysis of the transcriptional program of developing induced regulatory T cells. *PLoS One*. 2011;6(2):e16913.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.
- Cruvinel WM, Mesquita Júnior D, Araújo JA, Salmazi KC, Kállas EG, Andrade LE. Células T regulatórias naturais (Tregs) em doenças reumáticas. *Rev Bras Reumatol*. 2008;48(6):342-55.

36. Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(4):305-10.
37. Siqueira-Batista R, Mendonça EG, Gomes AP, Vitorino RR, Miyadahira R, Alvarez-Perez MC, et al. Atualidades proteômicas na sepse. *Rev Assoc Med Bras*. 2012;58(3):376-82.
38. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med*. 2005;202(11):1539-47.
39. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood*. 2006;108(3):804-11. Review.
40. Lima HC. Papel das células T reguladoras no desenvolvimento de dermatoses. *An Bras Dermatol*. 2006;81(3):269-81.
41. Maddur MS, Vani J, Lacroix-Desmazes S, Kaveri S, Bayry J. Autoimmunity as a predisposition for infectious diseases. *PLoS Pathog*. 2010;6(11):e1001077.
42. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(10):776-87.
43. Ayala A, Lomas JL, Grutkoski PS, Chung CS. Pathological aspects of apoptosis in severe sepsis and shock? *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(1):7-15.
44. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock*. 2002;18(6):487-94.
45. Venet F, Pachot A, Debarb AL, Bohé J, Bienvenu J, Lepape A, et al. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med*. 2004;32(11):2329-31.
46. Pangault C, Le Tulzo Y, Tattevin P, Guilloux V, Bescher N, Drénou B. Down-modulation of granulocyte macrophage-colony stimulating factor receptor on monocytes during human septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34(4):1193-201.
47. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348(2):138-50.
48. Dai J, Liu B, Li Z. Regulatory T cells and Toll-like receptors: what is the missing link? *Int Immunopharmacol*. 2009;9(5):528-33.
49. Armstrong L, Medford AR, Hunter KJ, Uppington KM, Millar AB. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clin Exp Immunol*. 2004;136(2):312-9.
50. Kirschning CJ, Schumann RR. TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002;270:121-44.
51. Henneke P, Dramsi S, Mancuso G, Chraïbi K, Pellegrini E, Theilacker C, et al. Lipoproteins are critical TLR2 activating toxins in group B streptococcal sepsis. *J Immunol*. 2008;180(9):6149-58. Erratum in *J Immunol*. 2009;182(4):2551.
52. Han SH, Kim JH, Martin M, Michalek SM, Nahm MH. Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2. *Infect Immun*. 2003;71(10):5541-8.
53. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-6.
54. Annane D, Bellissant E, Cavillon JM. Septic shock. *Lancet*. 2005;365(9453):63-78. Review.
55. Taylor AL, Lewelyn MJ. Superantigen-induced proliferation of human CD4+CD25- T cells is followed by a switch to a functional regulatory phenotype. *J Immunol*. 2010;185(11):6591-8.
56. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med*. 2008;14(1-2):64-78.
57. Roth G, Moser B, Krenn C, Brunner M, Haisjackl M, Almer G, et al. Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308(4):840-6.
58. Kalechman Y, Gafter U, Gal R, Rushkin G, Yan D, Albeck M, et al. Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. *J Immunol*. 2002;169(1):384-92.
59. Wisnoski N, Chung CS, Chen Y, Huang X, Ayala A. The contribution of CD4+ CD25+ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. *Shock*. 2007;27(3):251-7.
60. Pugin J. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Found Symp*. 2007;280:21-7; discussion 27-36, 160-4.
61. Monneret G, Debarb AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, et al. Marked elevation of human circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med*. 2003;31(7):2068-71.
62. Li X, Wang Z, Lu T, Che X. Modelling immune system: Principles, models, analysis and perspectives. *J Bionic Eng*. 2009;6(1):77-85.
63. Siqueira-Batista R, Helayel-Neto JA. The chance is necessary? The case of The Drunkard's Walk: How Randomness Rules Our Lives. *Rev Bras Ensino Fis*. 2011;33(3):1-1.
64. Folcik VA, An GC, Orosz CG. The Basic Immune Simulator: an agent-based model to study the interactions between innate and adaptive immunity. *Theor Biol Med Model*. 2007;4:39.
65. Possi MA, Oliveira AP, Di Lório VO, Dias CM. A agent-based simulation tool of biological immune system: a case study of autoimmune diseases. In: *Brazilian Symposium on Bioinformatics*. BSB 2010 poster proceedings, August, 31 to September, 3, 2010, Búzios, Rio de Janeiro, Brasil. Búzios: Brazilian Computer Society;2010.
66. Possi MA, Oliveira AP, Chaves CM, Cerqueira FR, Arroyo JE. An *in-silico* immune system model for investigating human autoimmune diseases. In: *XXXVII Conferencia Latinoamericana de Informática (XXXVII CLEI)*. [S.l.: s.n.]; 2011.
67. Siqueira-Batista R, Gomes AP, Possi MA, Oliveira AP, Sousa FO, Silva CC, et al. Computational modeling of sepsis: perspectives for *in silico* investigation of antimicrobial therapy. II International Conference on Antimicrobial Research - ICAR2012 Lisbon (Portugal); 2012.
68. Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*. 2006;442(7106):997-1002.
69. Silva CC, Oliveira AP, Possi MA, Cerqueira FR, Gomes AP, Santana LA, et al. Immune system simulation: modeling the mastcell. In: *Proceeding of IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM)*. Philadelphia, USA, October 4-7; 2012.
70. Oliveira AP, Possi MA, Gomes AP, Sousa FO, Cerqueira FR, Miyadahira R, et al. Modelagem computacional do sistema imunológico para investigação da sepse. In: *IX Fórum Internacional de Sepse*, 2012, São Paulo. *Anais do IX Fórum Internacional de Sepse*. São Paulo; 2012.