Fabiano Pinheiro da Silva

**Caracterização da função dos receptores Fc
de imunoglobulinas nas bacteremias**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Emergências Clínicas

Orientador: Dr. Renato Costa Monteiro Filho
Co-orientador: Dr. Murilo Chiamolera

São Paulo

2005

À minha mãe e ao meu irmão

It is true that convictions can best be supported with experience and clear thinking. The weak point of his conception is, however, that those convictions which are necessary and determinant for our conduct and judgments cannot be found solely along this solid scientific way. Yet it is equally clear that knowledge of what is does not open the door directly to what should be. One can have the clearest and most complete knowledge of what is, and yet not be able to deduct from that what should be the goal of our human aspirations. Objective knowledge provides us with powerful instruments for the achievements of certain ends, but the ultimate goal itself and the longing to reach it must come from another source. And it is hardly necessary to argue for the view that our existence and our activity acquire meaning only by the setting up of such a goal and of corresponding values.

Einstein, maio de 1939

Agradecimentos

Ao Dr. Renato C. Monteiro, meu orientador de tese pela Universidade de São Paulo, a confiança em meu trabalho, proporcionando-me a possibilidade de desenvolvê-lo ao máximo. Agradeço, ainda, as inúmeras discussões sobre esse projeto, graças às quais adquiri formação em Imunologia. Sendo esses os objetivos que eu esperava alcançar quando iniciei minha tese, assim como pelo relacionamento de respeito e cumplicidade, espero conseguir transparecer nessas linhas toda minha admiração e afeto. Minhas expectativas foram enormemente superadas. Obrigado por tudo!

Ao Dr. Murilo Chiamolera, meu co-orientador de tese pela Universidade de São Paulo, ter me acompanhado desde os primeiros passos desse projeto, seu incentivo constante, seu companheirismo, seu entusiasmo, sua inesgotável colaboração e sua enriquecedora presença. Trabalhar ao seu lado foi um gigantesco privilégio e um imenso prazer!

Ao meu orientador de tese pela Université Pierre et Marie Curie, Dr. Marc Benhamou, ter me aceito como seu aluno, abrindo-me dessa forma as portas para novas possibilidades de acesso à Ciência. Agradeço as discussões, a generosidade, a franqueza, a ajuda inestimável e a clareza com a qual, muitas vezes, me fez ver, o que lhe era óbvio. Um enorme obrigado, Marc!

Ao Dr. Luiz Monteiro da Cruz Neto, graças a quem devo minha rápida adaptação no Departamento de Emergências Clínicas da Universidade de São Paulo, quando cheguei egresso da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, para iniciar Residência Médica em Terapia Intensiva. Agradeço-lhe enormemente ter me oferecido formação nessa especialidade, ter aguçado meu interesse em sepse, ter me iniciado em Pesquisa e ter me aberto os olhos, quanto à relevância do modelo de ligadura e punção cecal. Minha gratidão é imensa.

Ao Prof. Irineu Tadeu Velasco, Professor Titular do Departamento de Emergências Clínicas da Universidade de São Paulo, o incentivo e entusiasmo destinados à Pesquisa Fundamental. Agradeço o apoio dado ao meu trabalho, assim como ao estabelecimento dos laços que tornaram possível essa tese em co-tutela.

Ao Prof. Adolpho José Melfi, Reitor da Universidade de São Paulo, e ao Prof. Gilbert Béréziat, Presidente da Université Pierre et Marie Curie, a possibilidade dada aos alunos de Pós-graduação dessas duas Universidades, de estabelecerem vínculos e formação profissional conjunta.

Ao Prof. Jean Chambaz, diretor da École Doctorale de Physiologie et Physiopathologie (Université Paris VI), ter me aceito como aluno e por toda atenção dada, ao longo de minha estadia na França.

À Dra. Armelle Leturque, da Comissão de Teses da Universidade Paris VI, a simpatia e atenção destinada a esse trabalho.

A meu amigo Yutaka Kanamaru, pós-doutorando do Laboratório do Prof. Renato C. Monteiro, a imensidão de informações e técnicas que me transmitiu em Imunologia e por sua agradável presença. Plein de papiers, Yutaka!

A meu amigo Nicolas Charles, graças a quem pude satisfazer todas minhas curiosidades e dúvidas sobre o seu país, agradeço a simpatia e as discussões científicas... Um excelente pós-doc, Monsieur!

A meu amigo David Skurnik, médico-microbiologista do Hospital Xavier Bichat, as inúmeras vezes que trabalhamos conjuntamente, discutindo resultados e dúvidas.

Ao Prof. Antoine Andreumont, chefe do Departamento de Microbiologia do Hospital Xavier Bichat, a generosidade e entusiasmo com que, desde o início, abriu as portas do seu serviço ao meu projeto de tese.

Ao Prof. Augusto Scalabrini, ao Dr. Heraldo Possolo de Souza, ao Prof. Francisco Garcia Soriano, ao Prof. Roger Chammas e à Profa. Vanda Jorgetti. Obrigado a ajuda e as opiniões expressas, nas diversas vezes que considerei dever consultá-los, por saber o quanto me seriam valiosas.

Ao Dr. Ulrich Blank, a simpatia e generosidade, assim como a experiência profissional enriquecedora.

A todos os meus colegas das Unidades de Terapia Intensiva do Departamento de Emergências Clínicas da Universidade de São Paulo, a amizade e brilhantismo profissional, com o que tanto aprendi.

A todas as pessoas com quem trabalhei no Hospital Xavier Bichat (Paris, França), durante esses dois últimos anos: Abdel, Agnès, Benoit, Catherine, Cécile, Charlotte, Claudine, Cristina, Cristiana, Houda, Ivan, Julie, Hélène Cohen, Hélène Fohrer, Lisa, Meryem, Michelle, Nathalie, Nicolas S, Omid (Viens visiter le Brésil, Monsieur!), Pierre e Séverine. Obrigado também à Dra. Agnès Lehuen e à Lucie, do Hospital Saint-Vincent de Paul! Um enorme obrigado à Madame Sandrine LeMoigne, do escritório de Relações Internacionais da Universidade Pierre et Marie Curie!

À minha amiga Maria Luiza Guzzo, bióloga do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, as inúmeras cirurgias que fez ao meu lado. Obrigado Hermes, Obrigado Antônio. Obrigado Adriana, Martha e Patrícia. Obrigado Dra. Vilma. Obrigado a todos os demais funcionários desta faculdade. Muito obrigado Angélica, Rose e Lúcia!

Ao CNPq (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Ministério da Ciência e Tecnologia do Brasil) e ao INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), o incentivo e fomento à Pesquisa.

*Stimulate the phagocyte.
Drugs are a delusion!*

*Bernard Shaw
The Doctor's dilemma, 1906*

Sumário

Lista de siglas

Resumo

Résumé

Summary

1 Introdução.....	pg. 1
2 Revisão da literatura.....	pg. 6
2.1 Sepse – Visão histórica e aspectos clínico-epidemiológicos.....	pg. 7
2.2 Imunidade Inata.....	pg. 15
2.3 Receptores Fc de Imunoglobulinas.....	pg. 30
2.3.1 Receptores de IgG.....	pg. 32
2.3.2 Receptores de IgA.....	pg. 34
2.3.3 Cadeia gamma dos Receptores Fc (FcR γ), ITAM e ITIM.....	pg. 38
2.3.4 Receptores relacionados à família dos receptores Fc.....	pg. 45
2.3.5 Receptores Fc e doenças inflamatórias.....	pg. 49
2.4 Modelos animais de endotoxemia e sepse.....	pg. 52
3 Objetivos.....	pg. 61
4 Métodos.....	pg. 63
5 Resultados.....	pg. 82
6 Discussão.....	pg. 112
7 Conclusão.....	pg. 133
8 Anexos.....	pg. 136

Anexo I – *Fabiano Pinheiro da Silva, Murilo Chiamolera, Nicolas Charles, Yutaka Kanamaru, Irineu Tadeu Velasco, Marc Benhamou and Renato C. Monteiro* **B lymphocytes undergo apoptosis due to FcγRIIb stress response to infection: A novel mechanism of cell death in sepsis. *Shock***; submitted in June 2005, accepted for publication in August 2005

9 Referências..... pg. 155

Lista de siglas

AA: ácido araquidônico

ADCC: citotoxicidade celular dependente de anticorpo

APC: células apresentadoras de antígenos

BCR: receptor de linfócitos B

CARS: “Compensatory anti-inflammatory response syndrome”, síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória

CD: “cluster of differentiation”, marcador celular

Células NK: célula “natural-killer”

CLP: modelo de punção e ligadura cecal

DAG: diacilglicerol

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

ERK: Quinase reguladora de sinal extra-celular (“extracellular signal-regulated kinase”)

FcR: Receptor Fc de imunoglobulinas

FcR β : cadeia β do Fc ϵ RI

Fc γ R, Fc α R, Fc μ R, Fc ϵ R e Fc δ R: Receptores Fc, respectivamente, de IgG, IgA, IgM, IgE e IgD

FcR γ : cadeia gamma dos FcR

FcRH: Homólogos dos receptores Fc

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GM-CSF e M-CSF: Fatores estimuladores de crescimento de colônias (“Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor” e “macrophage colony-stimulating factor”)

GPI: ligação glicosil-fosfatidil-inositol

IFN- γ : interferon gamma

ILT: “Immunoglobulin-like transcripts

IP3: inositol trifosfato

ITAM: motivo imuno-ativador baseado em tirosina

ITIM: motivo imuno-inibitório baseado em tirosina

JAK: Janus quinase

JNK: quinase c-Jun N-terminal

KIR: “Killer-cell Ig-like receptors”

LIR: “Leukocyte Ig-like receptors”

LPA: lesão pulmonary aguda

LPS: lipopolissacáride

MAPK: “Mitogen-activated protein kinase”

MCP-1 e 2: “Monocyte chemoattractant proteins” 1 e 2

MHC: Complexo humano de histocompatibilidade

MIP: Proteína inflamatória macrofágica

MIR: “Monocyte/macrophage Ig-like receptors”

NOS: “nitric oxide synthase”

PAF: fator ativador de plaquetas

PAMP: “Pathogen-associated molecular pattern” (padrão molecular associado ao patógeno)

PG: prostaglandina; prostaglandina-E2 (PGE-2), por exemplo

PI 3-quinase: Fosfoinositídeo 3-quinase

PIR: “Paired Ig-like receptors”

PKC: proteinoquinase C

PLA2: fosfolipase A2

PLC: fosfolipase C

SARA: Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto

SIgA: Imunoglobulina A secretória

SHIP: inositol polifosfatase 5-fosfatase

SHP-1, SHP-2: Tirosino-fosfatases com domínio homólogo a *Src* (“Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatases”)

SIRS: Resposta Inflamatória Sistêmica (“Systemic Inflammatory Response Syndrome”)

STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição

TCR: receptor de linfócitos T

TGFβ: “Transforming growth factor-beta”

TLR: receptores “Toll-like”

TNFα: fator de necrose tumoral alpha

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

RESUMO

Sepse é a primeira causa de morte em Unidades de Terapia Intensiva. A gravidade dessa doença é considerada consequência de um desequilíbrio da resposta inflamatória e, apesar dos avanços em diagnóstico e tratamento, os índices de mortalidade se mantêm inalterados. O papel dos receptores Fc de imunoglobulinas nesta situação é pouco esclarecido. Tais receptores deflagram respostas imunes opostas, que dependem do receptor envolvido e podem ser tanto ativatórias, quanto inibitórias. As respostas ativatórias são atribuídas a um motivo chamado ITAM, enquanto as inibitórias são relacionadas ao motivo ITIM. Camundongos apresentam dois receptores de IgG ativatórios (FcγRI e FcγRIII), que portam motivos ITAM, associados a uma sub-unidade conhecida como cadeia gamma, assim como um receptor de IgG que apresenta um motivo ITIM na sua porção intra-citoplasmática (FcγRII). Este trabalho teve como objetivo o estudo do papel destes receptores em bacteremias e sepsis. Para isso, utilizamos um modelo de peritonite induzida por ligadura e punção cecal. Este projeto descreve pela primeira vez, um papel importante do FcRγII na indução de apoptose em linfócitos B, durante infecção bacteriana severa. Nossos resultados colocaram em evidência, ainda, o fato de que animais deficientes em cadeia gamma apresentam mortalidade diminuída, quando submetidos a esse modelo de peritonite, e que essa diminuição é associada a menores valores de TNFα no soro e nos fluidos peritoneais, menor recrutamento peritoneal de células inflamatórias, assim como a um surpreendente aumento na fagocitose de *E. coli*. Hemocultura e cultura do lavado peritoneal desses animais revelaram uma flora multimicrobiana, enquanto camundongos selvagens apresentaram uma forte predominância de *E. coli* e um número total bastante superior de bactérias. Esse papel inibitório da cadeia gamma pode estar relacionado a mecanismos de auto-tolerância. Lisado total de células peritoneais de camundongos deficientes em cadeia gamma apresentam fosforilação aumentada de diversas proteínas, quando comparados a lisados obtidos, a partir de camundongos selvagens. Estudos semelhantes realizados com camundongos transgênicos para o receptor de IgA (FcαRI), entretanto, não demonstraram um papel crucial desse receptor nesta doença. Este trabalho abre, portanto, novas perspectivas para o tratamento de doenças infecciosas, através de intervenção sobre a cadeia gamma e coloca em discussão os conceitos atuais de ITAM e ITIM.

Descritores: imunoglobulinas; bacteriemia; receptores Fc; inflamação; sepsis

RESUME

Le sepsis est la première cause de décès dans les services de réanimation. La cause en est attribuée à une dérégulation de la réponse inflammatoire et, malgré le développement des techniques de diagnostic et traitement, la mortalité se maintient inaltérée. Le rôle des récepteurs Fc des immunoglobulines dans ce cadre n'est pas bien éclairci. Ces récepteurs déclenchent des réponses opposées, qui dépendent du récepteur agrégé et peuvent être activatrices, ainsi qu'inhibitrices. Les réponses activatrices sont attribuées à un motif, connu comme ITAM, et les réponses inhibitrices au motif ITIM. Les souris expriment deux récepteurs aux IgG qui sont activateurs (RFcγI et RFcγIII), lesquels ont des motifs ITAM dans une sous-unité à laquelle ils sont associés et qui s'appelle chaîne gamma, ainsi qu'un récepteur aux IgG qui porte un motif ITIM dans sa portion intracytoplasmique. Le but de ce travail a été d'étudier le rôle de ces récepteurs dans les bactériémies et dans le sepsis. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de péritonite, induite par ligature et perforation caecales (CLP). Ce projet décrit pour la première fois, un rôle important pour le RFcγII, dans l'apoptose des lymphocytes B, détecté lors des infections bactériennes sévères. De plus, nos résultats ont mis en évidence que les souris déficientes pour la chaîne gamma ont une mortalité diminuée dans ce modèle, laquelle est associée à une diminution des taux de TNFα dans le sérum et dans les lavages péritonéaux, à un recrutement moins important de cellules inflammatoires dans le péritoine, ainsi qu'à une surprenante augmentation de la phagocytose des *E. coli*. Hémoculture et culture des lavages péritonéaux ont révélé une flore polymicrobienne 24 heures après CLP, alors que les souris sauvages ont présenté une forte prédominance de *E. coli* et un nombre total bien supérieur de bactéries. Les lysats totaux des cellules péritonéales des souris déficientes pour la chaîne gamma ont montré une phosphorylation augmentée de plusieurs protéines, par rapport aux souris sauvages. Ces résultats suggèrent un rôle inhibiteur de la chaîne gamma qui pourrait avoir un rapport avec mécanismes de tolérance au soi. En conclusion, ce travail ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour le traitement des maladies infectieuses, par le ciblage de la chaîne gamma et remet en discussion les concepts actuels de ITAM et ITIM.

Descripteurs : immunoglobulines; bactériémie ; récepteurs Fc; inflammation ; sepsis

SUMMARY

Sepsis is the first cause of death in Critical Care Units and despite the development in its diagnosis and treatment, mortality remains unaffected. The role of immunoglobulin Fc receptors in sepsis is not clearly understood. These receptors initiate opposing responses, depending on their aggregation by the ligand and can induce activating or inhibitory responses. The activating responses are attributed to a motif known as ITAM, and the inhibitory responses to another one called ITIM. Mice express two activating IgG receptors (Fc γ RI et Fc γ RIII) which have ITAM motifs in the intracytoplasmic domain of an associated subunit, called the FcR γ chain, as well as an inhibitory IgG receptor which possesses an ITIM motif in its intracytoplasmic domain. The objective of this work is to study the importance of these receptors in bacteremia and in sepsis. To this aim, we have used a peritonitis model, induced by cecal ligation and puncture (CLP). This project describes for the first time, an important role of Fc γ RII in B lymphocytes apoptosis. Moreover, our results show that FcR γ chain knockout mice have a decreased mortality in this model, which is associated to diminished TNF α serum and peritoneal fluids levels, to a reduced recruitment of peritoneal inflammatory cells and to a surprising increase in *E. coli* phagocytosis. Blood and peritoneal fluid cultures have shown a polymicrobial flora 24 hours post-CLP for FcR γ -chain deficient mice, whereas wild-type mice present a strong predominance of *E. coli* in the same cultures and an increased bacteria total count. Lysates from FcR γ -chain deficient peritoneal cells revealed augmented phosphorylation of many proteins, as compared to wild-type cells. This FcR γ chain inhibitory role could be related to self-tolerance mechanisms. This work opens new perspectives for the treatment of bacterial diseases, proposing FcR γ chain targeting and the reexamination of the actual concepts of ITAM and ITIM.

Descriptors: immunoglobulins; bacteremia; Fc receptors; inflammation; sepsis

1. Introdução

Os mecanismos que desencadeiam a resposta inflamatória sistêmica a uma infecção bacteriana levam a uma alta mortalidade e correspondem à primeira causa de óbito em Unidades de Terapia Intensiva não-coronarianas¹. Sepsé, o nome atribuído a esta resposta, é uma doença pouco compreendida e o manuseio dos fenômenos imunológicos a ela subjacentes, visando ao seu tratamento, faz parte ainda da medicina experimental.

Apesar do desenvolvimento crescente de diversos métodos diagnósticos e terapêuticos, a taxa de mortalidade devido a essa doença permanece, há décadas, em torno de 30 a 40%². Se analisarmos grupos específicos, como doentes idosos e com doenças crônicas, essa taxa se eleva a índices que giram em torno de 70%. No presente momento, além do uso de agentes antimicrobianos e do suporte inespecífico da vida, através do uso, por exemplo, de drogas vasoativas, ventilação mecânica e métodos dialíticos, pouco mais pode ser feito. Muitos destes métodos, além disso, se tornaram fonte significativa de infecção nosocomial, enquanto que o uso indiscriminado de antibióticos acaba propiciando a seleção de bactérias resistentes.

A elevada mortalidade decorrente de um episódio de sepsé foi, durante a década de 80, atribuída a uma ativação, explosiva e desgovernada, de mecanismos pró-inflamatórios. Componentes da bactéria, desta forma, levariam a um descontrole da resposta imune e os efeitos deletérios decorrentes, acabariam sobrepujando os efeitos benéficos, levando, não raro, o indivíduo à morte. Diversas estratégias, desta forma, foram investigadas no intuito de controlar essa hiperatividade inflamatória, algumas delas, chegando à fase de ensaio clínico³⁻¹². Em decorrência dos resultados negativos, após um longo período, esse conceito começou a ser repensado. Na metade da década de

90, foi proposta a hipótese de que uma resposta anti-inflamatória maciça, compensatória, teria papel importante na patogênese desta doença e poderia explicar o insucesso, decorrente do uso de agentes que inibem a resposta inflamatória¹³⁻¹⁵. Neste caso, tais terapêuticas agravariam ainda mais essa resposta anti-inflamatória compensatória e os pacientes acabariam morrendo, na verdade, devido a uma imunossupressão severa.

O conceito atual é de que sepse é uma doença heterogênea¹. Como esta doença acomete doentes de diferentes faixas etárias e com antecedentes mórbidos diversos, acredita-se que grupos de pacientes semelhantes tendem a desenvolver uma resposta imune, pró ou anti-inflamatória, característica. Indivíduos jovens e previamente saudáveis tenderiam a uma resposta pró-inflamatória descontrolada, enquanto que, por exemplo, pacientes idosos e com doenças associadas, evoluiriam rapidamente para um estado de imunodepressão e anergia, existindo ainda um amplo espectro de apresentações dentro do qual essa doença poderia se manifestar, entre esses dois extremos.

O mecanismo exato pelo qual os pacientes morrem, apesar de tudo, continua desconhecido¹. Necrópsias realizadas pouco após a morte, em pacientes sépticos, não evidenciam lesões que justificam a morte ou que não poderiam ter sido contornadas por tratamento de suporte¹. A realidade, na maioria das vezes, é que o paciente acaba morrendo inesperadamente, ou quando os médicos decidem interromper a progressão dos esforços¹, habitualmente, após um longo período de internação na UTI, quando o indivíduo já se encontra em insuficiência de múltiplos órgãos¹⁶, sem expectativas de melhora ou qualidade de vida.

Além da complexidade e multiplicidade de mecanismos que interagem na patogênese de um episódio de sepse, outros fatores colaboraram para a dificuldade de se compreender e dissecar os eventos envolvidos na evolução desta doença. Dentre eles, a meu ver, teve particular efeito negativo o uso insistente de modelos animais inadequados para o estudo do assunto em questão. Os ensaios clínicos com drogas anti-inflamatórias e anticorpos monoclonais citados acima, visando ao controle de uma pressuposta hiperatividade imune, iniciaram devido aos resultados animadores obtidos na época, em experimentos com animais¹⁷⁻¹⁹. Apesar de diversos destes experimentos terem sido realizados com modelos que confirmaram, posteriormente, sua semelhança com os achados clínicos e fisiopatológicos encontrados em humanos, notadamente os modelos animais de peritonite, grande parte destes trabalhos utilizaram modelos de injeção endovenosa de bactérias ou fragmentos bacterianos¹⁷⁻¹⁹. Tais modelos, por sua vez, levaram a resultados enganosos, atrasando o progresso na compreensão dessa doença, e serão discutidos, juntamente com uma revisão dos modelos animais de endotoxemia e sepse, mais adiante.

Ainda no que se refere a modelos animais, um impressionante avanço na elucidação da função e mecanismos de ação de inúmeras proteínas foi possível, a partir do final da década de 80, graças à obtenção de organismos geneticamente modificados. Indiscutivelmente, o desenvolvimento das técnicas de transgênese, “knock-out” e, posteriormente, “knock-in”, vêm possibilitando um enorme avanço no campo da Imunologia. Graças a isso, muito do que vem sendo elucidado, no que se refere à Pesquisa Fundamental, tem sido transportado à Pesquisa Clínica, no intuito de se avançar na compreensão e, por fim, no tratamento das mais variadas doenças.

O presente trabalho se dedica a investigar e caracterizar a importância dos receptores Fc de imunoglobulinas na fisiopatologia da sepse, utilizando organismos geneticamente modificados. Tais receptores nos chamaram particularmente a atenção, como será adiante longamente exposto, devido ao seu importante papel no equilíbrio da inflamação, decorrente de suas potentes características pró e anti-inflamatórias.

Achados relevantes confirmaram um papel de destaque destes receptores, no desencadeamento e na evolução da doença em questão. Novas perspectivas se abrem, como será discutido, ao final da exposição que se inicia.

2. Revisão da Literatura

2.1. Sepses – Visão histórica e aspectos clínico-epidemiológicos

Sepses, segundo o consenso atual, é uma doença definida por critérios clínicos. Mediante reunião de especialistas no tema, organizada em 1991 pelo “American College of Chest Physicians” e pela “Society of Critical Care Medicine”²⁰, no intuito de padronizar a nomenclatura, até então confusa, sobre essa doença, as seguintes definições foram propostas, sendo até hoje respeitadas:

- Infecção: Fenômeno microbiano caracterizado por uma resposta inflamatória à presença destes microrganismos ou à invasão de tecidos do hospedeiro, normalmente estéreis, por estes agentes
- Bacteremia: Presença de bactérias viáveis no sangue
- Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS): Resposta inflamatória sistêmica, deflagrada por infecção ou por diversos outros insultos, tais como pancreatite, isquemia, trauma, choque hemorrágico, administração exógena de mediadores inflamatórios, entre outros. É caracterizada pela presença de ao menos dois, dos seguintes parâmetros: 1) hipotermia (temperatura corpórea menor do que 36°C) ou febre (acima de 38°C); 2) Taquicardia (frequência cardíaca acima de 90bpm); 3) taquipnéia (frequência respiratória acima de 20ipm ou pCO₂ abaixo de 32mmHg; 4) leucocitose (contagem de leucócitos acima de

12×10^9 células/L), leucopenia (abaixo de 4×10^9) ou mais do que 10% de formas imaturas.

- Sepses: Resposta inflamatória sistêmica à infecção.
- Septicemia: O uso deste termo é desencorajado, por ser ambíguo e frequentemente utilizado, inapropriadamente, para se designar bacteremia.
- Sepses severas: Sepses, acompanhadas de disfunção orgânica e anormalidades de perfusão (acidose láctica, oligúria, alterações do nível de consciência, por exemplo), na ausência de outras causas conhecidas para essas anormalidades ou acompanhadas de episódios de hipotensão (pressão sistólica < 90 mmHg ou redução de 40 mmHg dos valores basais), responsivas a hidratação vigorosa
- Choque séptico: Sepses na presença de hipotensão, irresponsiva a hidratação vigorosa, em conjunto com disfunção orgânica e anormalidades de perfusão, na ausência de outras causas conhecidas para essas anormalidades.
- Síndrome de insuficiência de múltiplos órgãos: Presença de função anormal de três ou mais órgãos, em paciente crítico, no qual homeostasia não pode ser mantida sem intervenção.

Uma revisão recente das hospitalizações ocorridas de 1979 até o ano de 2000, nos Estados Unidos da América, identificou 10.319.418 casos de sepse nesse período². Sepse foi mais frequente em homens do que em mulheres (risco relativo de 1,28) e entre indivíduos de raça não-branca do que em indivíduos de raça branca (risco relativo de 1,90). Foi observado no período, um aumento de 8,7% na incidência dessa doença, sendo as bactérias gram-positivas o agente predominante desde 1987, superando a primazia, até então, dos germes gram-negativos. A incidência de sepse por infecção fúngica aumentou em 207%. A mortalidade intra-hospitalar diminuiu de 27,8% (1979 a 1984) para 17,9% (1995 a 2000), apesar do número total de mortes ter continuado a aumentar.

O sítio de infecção ou o agente etiológico são aspectos fundamentais no manejo de um episódio de sepse. Dentre os fatores que permitem a invasão de bactérias na circulação sanguínea, cabe ressaltar: (1) alteração na flora do hospedeiro, contribuindo para o crescimento de outras bactérias; (2) disfunções do sistema imune; (3) permeabilidade aumentada das barreiras epiteliais, não raro devido a mecanismos de tratamento e monitorização invasivos.

Os pulmões são o local mais comum de infecção, seguidos do abdomen e trato urinário²¹. Em 20 a 30% dos pacientes, um sítio de infecção não é determinado e mesmo quando um local é fortemente suspeito, as culturas se demonstram, não raro, estéreis e o resultado dos estudos microbiológicos, questionáveis. Hemoculturas positivas são encontradas em apenas 30% dos casos. Infecções pleurais, pericárdicas e em seios paranasais podem passar facilmente despercebidas. Nenhum exame de imagem, além disso, pode descartar um foco suspeito de maneira definitiva.

A dificuldade de se confirmar microbiologicamente um episódio de sepse, reflete diretamente sobre a demora no progresso da compreensão dos fenômenos subjacentes a essa doença. A teoria de que a alta mortalidade em sepse se deve a uma estimulação pró-inflamatória exagerada do sistema imune, como já comentado, foi baseada em estudos animais que utilizaram largas doses de endotoxina ou bactérias e, conseqüentemente, os níveis de citocinas, como TNF α , se elevaram a valores exponencialmente maiores do que o encontrado em pacientes sépticos, não reproduzindo adequadamente, portanto, as características dessa doença. Estudos clínicos, por sua vez, são de elevada complexidade, devido não só à dificuldade em se isolar o agente etiológico, mas à ampla heterogeneidade dos pacientes nos seus mais diversos aspectos, como sexo, idade, doenças associadas e antecedentes mórbidos¹.

Antimicrobianos são necessários, porém não suficientes para o tratamento de sepse e, paradoxalmente, podem desencadear uma piora clínica por liberação de produtos microbianos. A administração precoce e eficaz de agentes antimicrobianos, entretanto, diminui a mortalidade em 10 a 15%, com relação a pacientes que não os recebem rápido e corretamente. Desta forma, a conduta habitual é a administração de antibioticoterapia de amplo espectro, quando o agente é incerto, a qual é reavaliada, quando se consegue definir a etiologia e a sensibilidade do agente. Uso indiscriminado de antibióticos, por sua vez, tem levado, largamente, ao surgimento de germes resistentes, um problema particularmente grave, quando se trata de infecção nosocomial.

Tratamento de suporte correto é imprescindível. A mortalidade aumenta em 15 a 20%, para cada órgão que entra em insuficiência¹. Disfunção pulmonar ocorre precocemente e persiste, enquanto choque, que também ocorre precocemente, é

resolvido rapidamente ou é fatal. Aproximadamente 85% dos pacientes necessitam de suporte ventilatório e quase metade preenche os critérios para Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA). Anormalidades da função hepática, neurológicas e da coagulação, tendem a ocorrer horas a dias, após o início da sepse e persistem por períodos intermediários. Insuficiência renal aguda é extremamente comum e pode requerer tratamento dialítico, apesar disso ocorrer em apenas 5% dos casos. Na maioria das vezes, responde satisfatoriamente, quando há hidratação adequada do paciente, tendo caráter transitório.

Tratamento de suporte adequado, portanto, assim como a prevenção de complicações (trombose venosa profunda, úlceras de stress, úlceras de decúbito, aspiração naso-gástrica, desnutrição proteico-calórica, entre outras), parecem justificar boa parte da diminuição de mortalidade observada nos últimos anos, já que, além do uso de antibióticos e da erradicação do foco de infecção, pouco mais se pode oferecer em termos de benefícios terapêuticos concretos. Tais avanços terapêuticos, entretanto, apesar de lentos e quase que, invariavelmente, em fase experimental, são nítidos. Em grande parte, decorrentes dos resultados desapontadores do passado.

A fase, durante a década de 80, em que se tentou diminuir a mortalidade por sepse, através do uso de agentes anti-inflamatórios, e seu evidente insucesso, impôs reavaliação desta hipótese e novas idéias. A teoria de que morte por sepse é decorrente de uma resposta pró-inflamatória exagerada foi baseada em estudos animais que não refletem o quadro clínico encontrado em humanos. Estudos mais recentes têm demonstrado que a frequência de uma resposta inflamatória exagerada, é menor do que antes se pensava. Debets et al. relataram que somente 11 de 43 pacientes sépticos

estudados, tinham níveis detectáveis de TNF α na circulação (limite de detecção de 5 pg/ml)²². Em outro estudo com 87 pacientes, semelhantemente, menos do que 10% tinham níveis detectáveis de TNF α ou IL-1 β ^{23,24}.

Apesar de uma resposta inflamatória exagerada continuar a ser algo considerado como um mecanismo importante na fisiopatologia dessa doença, já está suficientemente claro que a abolição dos fenômenos pró-inflamatórios, além de não ser uma forma eficaz de tratamento, resulta em respostas analogamente deletérias. Mesmo que ainda se acredite em que uma resposta inflamatória exacerbada é maléfica, parece claro que níveis mínimos são necessários para o combate a uma infecção. Bloqueio dos efeitos de TNF α , após peritonite induzida, por exemplo, piorou a sobrevida desses animais²⁵. Em estudos clínicos, da mesma forma, administração de um antagonista de TNF α aumentou a taxa de mortalidade²⁶. Ademais, pouco após um insulto bacteriano, um período refratário sabidamente se manifesta, sendo caracterizado por uma redução na capacidade das células mononucleares de produzirem citocinas pró-inflamatórias e uma maior inibição da resposta pró-inflamatória pode prolongar esse período de maneira indesejada. Tal fenômeno é conhecido como tolerância à endotoxina, apesar desta designação não ser adequada, já que endotoxina não é a única substância à qual tais células se mostram refratárias durante esse período, e exposição prévia a toxina não é um pré-requisito obrigatório para esse fenômeno acontecer. Meta-análises, no entanto, sugerem que apesar do efeito em geral negativo, certos grupos parecem se beneficiar dessas estratégias imunossupressoras¹².

Havendo ou não esse benefício, incerto e restrito a determinadas sub-populações de pacientes, ainda parece-me que a evolução de maior impacto tem sido a lenta, porém

sustentada evolução na compreensão dos fenômenos que circundam essa doença, já que conforme foi dito, há quase uma década, “somente compreendendo perfeitamente como as proteínas implicadas nestas respostas agem, se será possível desenvolver agentes efetivos que combatam seus efeitos destrutivos, preservando seus efeitos benéficos” ²⁷. Igualmente importante, parece-me a percepção de que tamanha heterogeneidade populacional não pode ser abordada, sem que se consiga distinguir qual a resposta predominante, ou seja, em qual espectro um determinado paciente se encontra. Uma nova classificação dessa doença, na tentativa de se caracterizar seus diversos sub-grupos e a melhor forma de abordá-los, embasada em semelhante argumento, foi recentemente proposta na literatura ²⁸.

É na metade da década de 90, mais precisamente em artigos que saíram publicados no ano de 1996¹³⁻¹⁵, que se começa a encontrar na literatura o papel que teria uma eventual resposta anti-inflamatória, nomeada de CARS (“Compensatory anti-inflammatory response syndrome”), em sepse. Esta resposta antagonística, deflagrada pela resposta pró-inflamatória inicial, desta forma, seria uma explicação para a ineficácia dos agentes até então testados, assim como uma nova avenida, para a compreensão desta doença. Muitos pacientes morreriam, portanto, na preponderância de uma resposta imune anti-inflamatória ou, ainda, anérgicos. Atribui-se à CARS, deficiências características do sistema imune, pouco compreendidas e encontradas com frequência em pacientes sépticos, como apresentação antigênica ineficaz, hiporresponsividade de linfócitos T, anergia, proliferação diminuída de células Th1 e presença aumentada de células apoptóticas, principalmente linfócitos e células epiteliais intestinais. Lesão orgânica, decorrente de morte por apoptose, e a imunossupressão secundária à perda de

linfócitos, podem contribuir para infecções secundárias. Além disso, fagocitose de células apoptóticas por macrófagos pode estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10²⁹. Os níveis séricos de IL-10, inclusive, são preditores de mortalidade³⁰. De acordo com estas observações, reversão da resposta Th2 melhorou a sobrevida de pacientes sépticos em determinados estudos³¹. No mais, alguns autores enfatizam que uma resposta anti-inflamatória pode, ainda, ocorrer não como uma resposta contra-reguladora, mas independentemente da resposta inflamatória, até mesmo antes dela e, inclusive, antes mesmo do desenvolvimento de processo infeccioso, sendo assim, não o curso natural da doença ou uma resposta à infecção, mas fator predisponente a um quadro de sepse e resultado de um outro insulto, justificando, assim, a maior incidência de infecção, por exemplo, em pacientes politraumatizados^{32,33}.

Esse conceito de respostas contra-regulatórias em desarmonia, vem se solidificando com o decorrer dos anos, sendo extremamente atual. Existe reconhecimento crescente de que um largo número de pacientes não apresenta resposta pró-inflamatória exagerada, apresentando, por outro lado, anergia e imunossupressão. Entretanto, conforme já comentado, a intensidade com a qual, seja a resposta pró-inflamatória, seja a anti-inflamatória, se manifestam, é imensamente variável e condicionado a diversos fatores³⁴, como faixa etária, antecedentes mórbidos e doenças co-existent, aspecto de difícil transposição para estudos experimentais em modelos animais, o que contribui bastante para a lentidão na evolução da compreensão dessa doença. Sepse, enfim, é uma doença heterogênea, tanto com relação à diversidade populacional na qual pode se manifestar, quanto temporalmente, ao longo do seu curso, em um mesmo indivíduo.

2.2. Imunidade Inata

A imunidade costuma ser dividida em inata e adaptativa. A imunidade adaptativa, que é o foco principal deste trabalho, é mediada por linfócitos B e T, distribuídos clonalmente. A imunidade inata, por sua vez, por um longo período foi considerada uma resposta inespecífica, caracterizada pela internalização e digestão de microrganismos e substâncias estranhas, por macrófagos e leucócitos. Entretanto, a imunidade inata tem especificidade considerável, sendo capaz de discriminar os patógenos do hospedeiro e atacar imediatamente organismos estranhos, sem necessidade de exposição prévia. Além disso, estudos recentes já deixaram suficientemente claro que a ativação da imunidade inata é um pré-requisito essencial para o deflagramento da resposta adaptativa, motivo pelo qual se torna indispensável a abordagem desse tema, para compreensão do tipo de resposta que vem a seguir, e suas consequências.

Inicialmente, a rápida reação inflamatória devido a uma infecção é mediada, principalmente, por monócitos, neutrófilos e células endoteliais e pode ser reproduzida *in vitro*, sem componentes da imunidade adquirida. Uma série de substâncias quimiotáticas para neutrófilos aumenta o número dessas células, rapidamente, no sítio de infecção. Os neutrófilos são as células fagocíticas recrutadas mais precocemente, seguidos pelos monócitos. Componentes bacterianos estimulam diretamente o aumento na expressão de células de adesão, no endotélio, contribuindo para o recrutamento de leucócitos. Integrinas participam regulando o tráfego de leucócitos. A ativação dos leucócitos, além disso, estimulada pela ligação aos receptores das células promotoras de adesão, estimula a produção de espécies reativas do oxigênio, que contribuem para o

ataque aos microrganismos invasores. Ocorre estímulo, ainda, para a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α e IL-1, que amplificam a resposta à infecção³⁵. Diversos elementos da resposta imune são ativados pela liberação de citocinas, sendo os efeitos principais a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, as quais podem se ligar à superfície das bactérias e ativar o sistema do complemento ou fagocitose, assim como a sustentação dos mecanismos deflagrados diretamente pelas bactérias, como indução de reação inflamatória local, alterando características da superfície e permeabilidade dos vasos sanguíneos e permitindo o recrutamento de fagócitos, células imunes e diferentes moléculas para o sítio infeccioso.

A cascata do complemento, entretanto, é ativada, principalmente, através das conhecidas vias clássica e alternativa. Na primeira, C3, o componente inicial de ambas as cascatas, é ativado por anticorpos (IgG e IgM) que se encontram ligados ao antígeno. No que se refere à imunidade inata, no entanto, a via de defesa mais importante do complemento é a cascata alternativa, na qual C3 se cliva espontaneamente e se liga à superfície dos patógenos. Ambas as vias geram, por fim, as moléculas efetoras do complemento e o complexo de ataque à membrana. As principais consequências são opsonização do patógeno (C3b, C4b), recrutamento de células inflamatórias (C3a, C5a) e lise direta do patógeno (C5b, C6, C7, C8, C9). A ativação do complemento pela via alternativa ocorre nas primeiras horas após infecção. Para controlar invasão microbiana local, ainda, o recrutamento de mais fagócitos e proteínas de fase aguda é estimulado pela liberação de citocinas e diversos mediadores inflamatórios, como espécies reativas do oxigênio e outros, até agora não mencionados neste texto, como óxido nítrico e metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de

plaquetas). Alterações endoteliais, por fim, induzidas pelos mediadores inflamatórios, promovem a expressão de moléculas que favorecem um estado pró-coagulatório, o que pode ter um papel de contenção local do patógeno no sítio de infecção. Quando ocorre bacteremia, porém, os mesmos mecanismos que contêm localmente uma infecção, podem induzir resposta inflamatória sistêmica, levando a vasodilatação, instabilidade hemodinâmica, depressão miocárdica, distúrbios metabólicos, coagulação intravascular disseminada e lesão isquêmica de múltiplos órgãos, num quadro conhecido como choque séptico, conforme já definido. A imunidade inata, ainda, é capaz de reconhecer sinais endógenos de perigo (“heat shock proteins”, por exemplo) ou dano celular (necrose) e, desta forma, não necessita obrigatoriamente de agentes infecciosos ou exógenos para ser ativada, o que nos ajuda a compreender resposta inflamatória sistêmica, após eventos como isquemia prolongada, lesão extensa de partes moles, pancreatite aguda ou choque hemorrágico³⁶.

Os mecanismos que controlam a ativação antígeno-específica do sistema imune começaram, recentemente, a ser melhor compreendidos. Mecanismos de reconhecimento específico, componentes da resposta inata, têm sido caracterizados como uma via de controle da imunidade adquirida. Esses mecanismos são deflagrados por receptores de membrana celular, que, por sua vez, são ativados por moléculas comuns a diversos antígenos, porém não produzidos pelo hospedeiro, e que têm sido designados na literatura como PAMP’s (“pathogen-associated molecular patterns “– padrão molecular associado a patógeno). Entre eles, são conhecidos o lipopolissacáride (LPS), o ácido lipoteicóico, peptidoglicano, fragmentos de DNA bacteriano, flagelina, zymosan, taxol, dentre vários outros. Diversos receptores foram nos últimos anos encontrados, capazes

de reconhecer essas moléculas e ativar, assim, a resposta inata. A família mais bem estudada é a dos receptores “Toll-like” (TLR).

TLRs são proteínas transmembrana, compondo até o presente momento uma família de 10 receptores em humanos, com motivos ricos em leucina na sua porção extra-celular, assim como uma porção citoplasmática que é homóloga à do receptor de IL-1, sendo capaz de desencadear sinalização intracelular. São expressas em células do sistema imune, assim como em diversas outras, tais como células endoteliais, adipócitos e miócitos.

Os diversos membros dessa família têm distribuição heterogênea, não respondendo aos mesmos estímulos. O mesmo receptor “toll-like”, em contrapartida, responde a estímulos surpreendentemente diversos. TLR2, por exemplo, além de cooperar para a discriminação de patógenos com TLR1 e 6, reconhece lipoproteínas presentes, por exemplo, em bactérias gram-negativas e *mycoplasma*, assim como peptidoglicano, zymosan, porinas e diversas formas atípicas de LPS. TLR4, como veremos a seguir, é o receptor que reconhece o LPS de enterobactérias, como *E. Coli* e *Salmonella spp*, estreitamente relacionados a episódios de sepse.

Um dos primeiros indícios da importância desses receptores de imunidade inata, foi exatamente a observação de que camundongos C3H/HeJ, que são deficientes na resposta a LPS, são homozigotos para uma mutação no gene *tlr4*, que substitui histidina por prolina, na posição 712. A partir de então, começou a se tornar evidente a importância do TLR4 na defesa contra os microrganismos que possuem essa endotoxina³⁷. Camundongos deficientes em TLR4 foram gerados, sendo igualmente hipo-responsivos a LPS, confirmando que tal receptor é essencial para o seu

reconhecimento. Interessante, ambos os animais são mais sensíveis à sepse autêntica, do que camundongos selvagens.

A via de sinalização da família dos TLR é extremamente homóloga à da família do receptor de IL-1³⁸. Ambas interagem com uma molécula adaptadora, MyD88, que se associa tanto com os TLRs, tanto com o receptor de IL-1. Mediante estímulo, MyD88 recruta uma serina/treonina quinase, a quinase associada a receptor de IL-1 (IRAK), que é ativada por auto-fosforilação e se associa, por sua vez, a TRAF6, levando à ativação de duas vias de sinalização, JNK e NF- κ B. A atividade do NF- κ B é regulada pela sua associação com I κ B, o qual seqüestra NF- κ B no citoplasma até sua fosforilação pelo complexo I κ B quinase (IKK). Esta fosforilação leva à dissociação e translocação nuclear do NF- κ B (Figura 1). LPS, ainda, é capaz de induzir ativação de NF- κ B, independentemente de MyD88, mas com uma cinética mais lenta. Similarmente ao TLR4, cada TLR parece ter também sua própria via de sinalização, além da via comum dependente de MyD88.

Figura 1. Vias de sinalização celular da família dos receptores *Toll-like*.
Adaptado de Takeda et al. Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol*, 2003

LPS é um componente da membrana celular de bactérias gram-negativas, sendo um complexo glicolipídico, composto de um polissacarídeo hidrofílico e um domínio hidrofóbico, conhecido como lipídeo A, o qual é responsável pela atividade biológica do LPS. O LPS se une a uma proteína carreadora sérica (LBP – “LPS binding protein”) e, na membrana celular, se liga ao CD14, em células mielóides. Entretanto, devido à presença no soro de CD14 solúvel, células que não expressam CD14 também podem responder a LPS, tais como células endoteliais e epiteliais. CD14 não ativa, entretanto, sinalização intracelular, necessitando se acoplar ao TLR4, o qual tem uma longa porção intracelular, para que isso ocorra. MD-2 foi identificada como uma molécula que se

associa com a porção extra-celular do TLR4 e aumenta a responsividade a LPS. Através de experimentos com camundongos “knockout” para MD-2, foi demonstrado seu papel essencial nessa resposta. Outra proteína de superfície celular, RP105, também está envolvida no reconhecimento de LPS. RP105 é expressa, preferencialmente, em células B e associa-se, funcionalmente, ao TLR4 para o reconhecimento de LPS. Portanto, diversos componentes estão implicados no reconhecimento de LPS, indicando que esse receptor funcional forma um grande complexo³⁹. Por outro lado, diversos estudos têm sugerido que LPS poderia também ser reconhecido, independentemente de TLR4.

LPS é rapidamente internalizado no citoplasma, após ligação à superfície celular, o que parece importante para certas respostas celulares, sugerindo que LPS deve ser reconhecido no citoplasma, assim como na superfície. Uma molécula candidata ao seu reconhecimento intra-celular é Nod1, já que Nod1 induz ativação de NF- κ B em resposta a LPS⁴⁰. NF- κ B regula a transcrição de mais de 150 genes, particularmente os relacionados a uma atividade pró-inflamatória, como TNF α , IL-6, IL-8, cicloxigenase-2, iNOS e LBP. A forma transcripcionalmente ativa do NF- κ B é um homo ou heterodímero, constituído de várias proteínas pertencentes à família do NF- κ B. Estas proteínas incluem p50, p65, c-Rel, p52 e Rel-B. A forma mais abundante é um heterodímero constituído de p65 e p50. Ativação de NF- κ B tem sido reconhecido como um marcador de mau prognóstico em sepse⁴¹.

As MAPKs p38, ERK e JNK têm um papel importante na ativação da resposta inata. p38 é ativada por produtos bacterianos, como LPS ou peptidoglicano, ou citocinas pró-inflamatórias como TNF α e IL-1. Diversos mecanismos de cooperação entre as vias de sinalização das MAPKs e do NF- κ B vêm sendo esclarecidas.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, IL-1, IL-12, IL-18 e TNF α são as de maior relevância e as mais estudadas em sepse. IL-2, IL-8 e IFN γ são, igualmente, citocinas pró-inflamatórias secretadas em sepse.

TNF α é produzido por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, NK e linfócitos T, sendo a primeira citocina liberada em resposta a endotoxina por monócitos e macrófagos, atingindo níveis séricos máximos, 1 a 2 horas após a infusão de LPS. Além de LPS, sua liberação é estimulada por TNF α , IL-1, IL-6, IL-12, IFN γ , PAF e C5a, sendo inibida por IL-4, IL-10, IL-13, TGF β , corticoesteróides e por substâncias que aumentam o AMP cíclico (cAMP) intracelular, como a PGE $_2$, os inibidores da fosfodiesterase e os agonistas β 2 adrenérgicos. TNF α induz a liberação de IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, PAF, eicosanóides, antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) e receptor de TNF solúvel (TNFR solúvel). TNF α é um potente ativador de macrófagos e neutrófilos e induz à proliferação, a produção de IL-1 e de moléculas de adesão por células endoteliais. Ele induz hipotensão, aumento da permeabilidade vascular, acúmulo de neutrófilos nos pulmões, anorexia, diminuição do fluxo sanguíneo esplâncnico, dano à mucosa intestinal, hiperglicemia, alterações no perfil lipídico, acidose, coagulação e, por ação direta no hipotálamo, hiperpirexia⁴².

IL-1 apresenta duas isoformas, a IL-1 α e a IL-1 β . A IL-1 α é ativa na membrana celular, enquanto a IL-1 β , menos ativa, é liberada por clivagem pela enzima conversora de IL-1 β (ICE), respondendo pelos efeitos endócrinos da citocina. A expressão da IL-1 é estimulada pelo LPS, ácido teicóico, TNF α , GM-CSF, M-CSF, IFN γ , TGF β . As IL-4, IL-10, IL-13, PGE $_2$, corticoesteróides e cAMP inibem sua liberação. A produção de IL-

IL-1 pode ter modulação autócrina ou pelo antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra). Vários de seus efeitos biológicos são semelhantes e sinérgicos aos do TNF α , mas ela não é capaz de induzir sozinha lesão celular ou apoptose. IL-1 estimula a sua própria liberação e a de IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ , PAF, eicosanóides e fatores de crescimento. Ela induz ativação de neutrófilos, monócitos e linfócitos, a expressão de moléculas de adesão no endotélio, a coagulação, hipotensão, febre e anorexia⁴².

IL-12 é produzida por monócitos e células dendríticas. Ela induz produção de IFN γ em células NK e T, é um fator de crescimento de células T com efeitos similares aos da IL-2. A IL-12 promove a diferenciação de células T auxiliares (CD4+/CD8-) imaturas Th0 em Th1 e, em sinergismo com a IL-2, induz proliferação de células B e monócitos. Ela age em células T e NK induzindo a liberação de IL-2, IL-3, IL-8, IL-10, TNF α , M-CSF, GM-CSF e IFN γ e inibindo a produção de IL-4. Sua produção é inibida por IL-4, IL-10 e IL-13. O IFN γ potencializa a síntese da IL-12 e é o mediador de muitos de seus efeitos⁴².

IL-18 é uma citocina estruturalmente similar a IL-1 β , produzida por monócitos/macrófagos sendo induzida pelo LPS. Ela induz produção de IL-2, GM-CSF e TNF α por células T e inibe a produção de IL-10. A IL-18 induz produção de TNF α e quimiocinas, além de moléculas de adesão. Ela induz produção de IFN γ por células T e NK. Os níveis séricos de IL-18 estão aumentados em sepse⁴².

As citocinas anti-inflamatórias são uma série de moléculas imunorregulatórias que controlam a resposta pró-inflamatória. Dentre elas, se incluem IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-13. A regulação da resposta inflamatória é complexa, já que o sistema imune

apresenta vias redundantes com múltiplos elementos, apresentando efeitos fisiológicos similares. Ademais, com a possível exceção do receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra), todas as citocinas anti-inflamatórias apresentam também, propriedades pró-inflamatórias⁴³. O efeito de uma citocina, portanto, depende do momento em que ela foi secretada, o local, a presença ou não de agentes antagonistas e a responsividade tissular a cada citocina.

IL-1ra é um inibidor específico dos dois outros membros da família do IL-1, IL-1 α e IL-1 β . IL-1ra se liga ao receptor de IL-1 e inibe ativação celular pelos outros componentes desta família. IL-1ra é produzida por monócitos e macrófagos. As citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 inibem a síntese de IL-1 β , mas estimulam a de IL-1ra.

IL-4 é uma citocina extremamente pleiotrópica que é capaz de influir na diferenciação de células Th em células Th2, as quais perpetuam esta polarização de maneira autócrina. Secreção de IL-4 e IL-10 leva à supressão de respostas Th1, via “downregulation” da secreção macrofágica de IL-12. IL-4 é produzida por células Th2, assim como por células de linhagem basofílica e mastocítica, tendo um importante papel em respostas alérgicas. IL-4 é capaz de inibir a secreção monocítica de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-8 e MIP-1 (“macrophage inflammatory protein”). IL-4, ainda, é capaz de inibir a capacidade citotóxica de macrófagos, o “killing de parasitas” e a produção de óxido nítrico por macrófagos. O papel desta citocina em infecções bacterianas é pouco compreendido. Foi demonstrado que IL-4 aumenta o “clearance” de *Pseudomonas aeruginosa* em modelos experimentais

de pneumonia e age como um fator de crescimento para *Staphylococcus aureus*, resultando em infecção disseminada.

IL-6 foi, durante muito tempo, vista como uma citocina pró-inflamatória, induzida por LPS e citocinas como TNF α e IL-1. IL-6 é utilizada frequentemente como um marcador de resposta sistêmica pró-inflamatória. IL-6, entretanto, apresenta propriedades pró e anti-inflamatórias. Estudos recentes com camundongos “knockout” para IL-6 demonstraram que seu papel é predominantemente anti-inflamatório. IL-6 “downregula” a síntese de IL-1, TNF α , IFN γ , GM-CSF e MIP-2⁴⁴, tendo pouco efeito sobre citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF β . IL-6 induz síntese de glucocorticóides e promove a síntese de IL-1ra e receptores solúveis de TNF α .

IL-10 é um potente inibidor de citocinas Th1, dentre elas, IFN γ e IL-12. IL-10 é sintetizada por células Th2, monócitos e linfócitos B. IL-10 inibe secreção macrofágica de TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF, MIP-1 e MIP-2. Além disso, inibe a expressão celular de MHC-II, moléculas acessórias e CD14. IL-10 inibe, ainda, a produção de citocinas por neutrófilos e células NK, além de promover o “shedding” de receptores de TNF α e inibir a translocação do NF- κ B, após estímulo com LPS. IL-10, em geral, protege o hospedeiro de resposta inflamatória sistêmica induzida por toxinas, mas deixa-o susceptível numa variedade de modelos experimentais de infecção.

IL-11 compartilha diversas características com IL-6, tendo sido descrita, inicialmente, como um fator de crescimento, com particular atividade na trombocitopoiese. IL-11 apresenta importantes atividades imunoregulatórias, atenuando a síntese de IL-1 e TNF α por macrófagos, assim como a de IFN γ e IL-12 por linfócitos T. IL-11 não induz síntese de IL-10, nem de TGF β .

IL-13, um potente modulador *in vitro* da função de monócitos e células B humanas, é secretado por linfócitos T ativados. IL-13 e IL-4 compartilham um receptor comum, o que explica as diversas similaridades entre estas duas citocinas anti-inflamatórias. A principal diferença entre IL-13 e IL-4 é que esta é um mediador central na diferenciação Th2, sua proliferação e atividade, enquanto IL-13 exerce efeitos mínimos na função de linfócitos T⁴⁵. IL-13 pode atenuar a produção de TNF α , IL-1, IL-8 e MIP-1 por monócitos e exerce um efeito profundo na expressão de moléculas de superfície, tanto em monócitos, quanto em macrófagos. IL-13 estimula a expressão de β 2-integrinas e do MHC-II e inibe ou atenua a expressão do CD14 e de receptores Fc de imunoglobulinas. IL-13 inibe a ativação do NF- κ B em macrófagos e suprime injúria pulmonar, causada por depósito de imunocomplexos^{46,47}.

TGF β é sintetizado na sua forma inativa. Existem três isoformas. TGF β é um regulador importante de proliferação celular e de matrix extracelular⁴⁸. TGF β induz diferenciação de células escamosas da mucosa brônquica e parece contribuir à fase fibroproliferativa da lesão pulmonar aguda (LPA). Como diversas citocinas, TGF β tem efeitos pró e anti-inflamatórios. Funciona como um “switch” biológico, alterando ou antagonizando a ação de outras citocinas ou fatores de crescimento.

Diversos receptores solúveis de citocinas apresentam propriedades anti-inflamatórias. Os receptores de TNF α dos tipos I e II existem na membrana celular ou como forma solúvel, podendo ser solubilizados para a circulação sistêmica e competir com os receptores de membrana, impedindo, assim, que ocorra ativação celular. Receptores solúveis de IL-1 também podem ser detectado em situações patológicas. IL-18, igualmente, apresenta seu receptor também na forma solúvel⁴⁹.

IL-18 é secretado por macrófagos na forma inativa, sendo ativado pela caspase-1. IL-18 ativado estimula a síntese de IFN γ por linfócitos T e apresenta propriedades semelhantes à citocina pró-inflamatória IL-12.

Os membros da superfamília dos receptores de citocinas exercem suas funções, deflagradas pelo ligante, via fosforilação de motivos tirosina, através da ação de tirosina-quinases, conhecidas como Janus quinases (JAKs). São recrutadas, desta forma, proteínas da família dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs), as quais compõem cascatas de sinalização até o núcleo celular⁵⁰.

Diversas bactérias têm a capacidade de alterar a síntese de citocinas do hospedeiro, degradar citocinas pró-inflamatórias ou utilizar receptores solúveis como veículos para invasão celular⁵¹.

Por fim, cabe comentar em maiores detalhes a atenção crescente que vem sendo destinada ao estudo do papel das mais diversas quimiocinas em sepse. A maior parte das quimiocinas têm quatro cisteínas características e, dependendo do motivo apresentado pelas duas primeiras, foram classificadas em quatro classes chamadas de CXC ou α , CC ou β , C ou γ e CX3C ou δ . Duas pontes dissulfídricas são formadas entre a primeira e a terceira cisteínas e entre a segunda e a quarta. A única exceção é a linfotactina que tem apenas dois resíduos cisteína. Até o presente momento, 43 quimiocinas humanas foram identificadas⁵², sendo intenso objeto de pesquisa. IL-8, RANTES, MIP-1 e 2, assim como MCP-1 a 4 são alguns exemplos.

Um acelerado ritmo vem sendo testemunhado, no que se refere à descoberta, assim como à compreensão da função de diversas quimiocinas, deixando claro que estas moléculas estão implicadas em variados processos, que se estendem muito além dos

mecanismos de migração de células hematopoiéticas. Tais processos incluem reparo tissular, tráfego de linfócitos, polarização Th1/Th2, angiogênese, inflamação, recrutamento celular, propagação de metástases, desenvolvimento de órgãos linfóides e inflamação⁵³. É fundamental para a compreensão da atividade das quimicinas, o conhecimento de sua expressão por células endoteliais e moléculas da matrix extracelular, mediando mecanismos de comunicação intercelular⁵⁴. Citocinas como IL-1, TNF α , IFN γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-17, induzidas por injúria ou infecção, estimulam, através de seus respectivos receptores, a produção das mais diversas quimiocinas⁵⁵.

Diversos estudos têm sido divulgados na literatura, possibilitando avanços na compreensão da importância destas moléculas em sepse. Múltiplas quimiocinas CXC são produzidas por pacientes sépticos. Por exemplo, pacientes com SARA de origem infecciosa têm concentrações significativamente aumentadas de IL-8, ENA-78 e GRO α nos lavados broncoalveolares⁵⁶. Um padrão semelhante é obtido, mediante estímulo com LPS⁵⁷. Cummings et al. detectaram diminuição de 50% na expressão de membrana de CXCR2, ao estudarem neutrófilos de pacientes sépticos⁵⁸. Utilizando o modelo de CLP, Ness et al. demonstraram que tal diminuição protege os camundongos de lesões inflamatórias, provavelmente, pela diminuição no recrutamento das células responsáveis por esse tipo de dano⁵⁹. Por outro lado, MCP-1 demonstrou um papel protetor em sepse, o que nos leva mais uma vez a observar a instabilidade da balança inflamatória nesta doença e a enormidade de fatores que podem influir em sentidos opostos⁶⁰.

Em paralelo com a ativação destas respostas efectoras iniciais, o antígeno está sendo degradado e apresentado aos linfócitos T. Os sinais para ativação da imunidade

adquirida são largamente fornecidos pelas células dendríticas. Células dendríticas imaturas, residindo na periferia, têm uma alta capacidade de endocitose. Elas são ativadas por vários componentes microbianos e exprimem diversos TLRs, como TLR1, 2, 4 e 5. Uma vez ativadas, as células dendríticas migram para os linfonodos, onde apresentam o antígeno às células T.

“Priming” da resposta imune adaptativa, ou seja, sua ativação inicial, requer não somente a apresentação do antígeno pelo complexo humano de histocompatibilidade (MHC) do tipo II, mas também a indução de sinais acessórios (moléculas co-estimuladoras e citocinas), pelas células apresentadoras de antígenos (APC). Os TLR, presentes nas APC, assim como outros receptores de reconhecimento de padrões, têm sido implicados como reguladores desses sinais acessórios, através do reconhecimento de PAMP's e, conseqüentemente, no controle da ativação da resposta imune adaptativa antígeno-específica e na direção que toma a seguir, essa mesma resposta⁶¹. Quando um antígeno é apresentado a um linfócito Th “naïve”, este se diferencia em um, de dois sub-grupos: Th1 ou Th2. Células Th1 secretam interferon- γ , TNF α , IL-1, IL-2 e promovem, principalmente, imunidade celular; células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e promovem, principalmente, imunidade humoral. As citocinas que as APC começam a produzir, após ativação pelos PAMP's, além das características do antígeno que está sendo apresentado, parecem ser fatores determinantes da conversão do linfócito em um desses dois sub-grupos. IL-12 leva a diferenciação em Th1, enquanto IL-4 induz diferenciação Th2. Infecção por microrganismos intracelulares induz, em geral, diferenciação celular em Th1, enquanto infecções helmínticas induzem uma resposta Th2⁶². LPS de *E. Coli* induz resposta Th1 *in vivo*⁶³.

2.3. Receptores Fc de Imunoglobulinas

Para que ocorra uma resposta aos mais variados antígenos, as células B e T rearranjam os genes que codificam suas imunoglobulinas e receptores de células T, para gerar mais de 10^{11} diferentes receptores de antígenos. O reconhecimento de determinado antígeno pelo seu receptor específico, desta forma, deflagra expansão clonal dos linfócitos e posterior produção de anticorpos antígeno-específicos. Esse sistema sofisticado é observado somente em vertebrados, sendo uma potente defesa contra infecção microbiana.

A interação antígeno-anticorpo é reconhecida na superfície celular por uma classe de glicoproteínas de membrana, pertencentes à superfamília das imunoglobulinas e chamadas de receptores Fc de imunoglobulinas. A interação entre anticorpo e FcR propicia o reconhecimento do antígeno, especificamente pelas células que apresentam aquele determinado FcR. Tal interação resulta numa série de respostas celulares, dentre as quais, apresentação de antígenos, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), degranulação, fagocitose, endocitose, transcitose e desencadeamento de cascatas de sinalização celular, que culminam na liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios. Todas essas interações são iniciadas pela ligação da porção Fc de anticorpos ou imunocomplexos a estes receptores⁶⁴. O complexo anticorpo-FcR, desta forma, funciona como um receptor de membrana para antígenos, sem especificidade pré-determinada. Os anticorpos, assim, ao se ligarem ao FcR determinam ao antígeno, especificidade a uma variedade de tipos celulares, muitos das quais não têm estruturas de reconhecimento antigênico.

Existem receptores Fc de alta e de baixa afinidade. Os de alta afinidade podem ligar imunoglobulinas monoméricas não-complexadas. Imunoglobulinas monoméricas se ligam a esses receptores com afinidades constantes na ordem de 10^8 M^{-1} para Fc γ Rs de macrófagos e $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ para Fc α Rs de monócitos. FcRs de baixa afinidade não ligam imunoglobulina monomérica com afinidade mensurável. Ligam, entretanto, imunoglobulinas agregadas ou anticorpos complexados com antígenos multivalentes com uma alta avidéz. FcRs de alta e baixa afinidade deflagram resposta celular com igual eficácia. A diferença está na ordem dos eventos. As imunoglobulinas monoméricas se ligam aos de alta afinidade, antes de serem complexadas, pela ligação a um antígeno multivalente. Os anticorpos precisam, por outro lado, formar imunocomplexos com os antígenos, antes de se ligarem aos FcRs de baixa afinidade. FcRs existem como receptores de membrana e na forma solúvel. Este trabalho será direcionado à caracterização da função dos receptores de membrana em seps.

Mais recentemente, começou a ser caracterizado que além das funções ativadoras, os FcRs iniciam também sinalização inibitória⁶⁵. Está bem esclarecido que a variabilidade das respostas celulares, resulta da heterogeneidade estrutural de tais receptores. Um grande progresso vem ocorrendo, na compreensão da importância do balanço das respostas ativadoras pelas inibitórias, e vice-versa⁶⁶. Modelos animais nos quais essa resposta inibitória foi deletada, desencadearam respostas efetoras exacerbadas, tanto por citotoxicidade, como mediada por imunocomplexos⁶⁶⁻⁶⁸.

Os receptores Fc são definidos pela sua especificidade por isótipos de imunoglobulinas. Receptores Fc de IgG são chamados Fc γ R; de IgE, Fc ϵ R; de IgA, Fc α R; de IgD, Fc δ R e de IgM, Fc μ R. No presente trabalho, direcionamos os esforços no

estudo dos receptores que previamente consideramos potencialmente mais relevantes na fisiopatologia da sepse, a saber, os Fc γ Rs e o Fc α R. Desta forma, nos parágrafos seguintes, a atenção será voltada para eles.

2.3.1. Receptores de IgG - Atualmente, conhecemos três grupos de receptores de IgG (Fc γ Rs), designados Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII. Receptores estruturalmente relacionados, dentro de um grupo, mas codificados por genes distintos, são chamados por letras maiúsculas (A,B,C,...). Em humanos, além do Fc γ RI, encontramos três genes homólogos para o Fc γ RII (Fc γ RIIA, Fc γ RIIB e Fc γ RIIC) e dois para o Fc γ RIII (Fc γ RIIIA e Fc γ RIIIB). Em camundongos, é importante ressaltar que, além do Fc γ RI, um único gene codifica o Fc γ RII, assim como um outro, o Fc γ RIII, não existindo diferentes homólogos para nenhuma dessas sub-classes.

Fc γ RI (CD64) é um receptor de alta afinidade para IgG, presente em monócitos e macrófagos⁶⁹. Sua expressão pode ser induzida em neutrófilos humanos, por IFN- γ . Diferentemente dos demais receptores para IgG, o Fc γ RI contém três domínios extracelulares. Fc γ RI medeia ADCC, através de macrófagos e monócitos, fagocitose, produção de espécies reativas do oxigênio e secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Fc γ RII (CD32) é um receptor de baixa afinidade, sendo o mais largamente distribuído⁷⁰. É encontrado em células dendríticas, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, macrófagos, monócitos, plaquetas, linfócitos B e células pluripotenciais. Não é encontrado em células NK. Em humanos, além disso, não é encontrado em células T, apesar de ter sido caracterizado em células T murinas. Todos os homólogos humanos

(IIA, IIB e IIC) apresentam dois domínios extra-celulares praticamente idênticos. A diferença se encontra nos domínios intra-citoplasmáticos. FcγRIIB, entretanto, é o único homólogo encontrado em camundongos. O FcγRIIB murino apresenta duas isoformas: b1 e b2. Tais isoformas são originadas por “splicing” alternativo dos exons que codificam o fragmento citoplasmático. A isoforma b1 é expressa, preferencialmente, em linfócitos e a b2, em macrófagos. Em humanos, além dessas duas isoformas do FcγRIIB, encontrou-se ainda uma terceira (b3), assim como duas isoformas do FcγRIIA (a1 e a2)^{70,71}.

FcγRIII (CD16) é um receptor de baixa afinidade, com dois domínios extra-celulares, semelhantes ao FcγRII. Em humanos, encontramos dois homólogos. FcγRIIIA é o único FcR em células NK, mediando ADCC. Além disso, é encontrado em macrófagos, neutrófilos e precursores mielóides, sendo o único FcγRIII encontrado também em camundongos. Camundongos “knock-out” para o FcγRIII mostraram incapacidade de degranular, quando estimulados por imunocomplexos, assim como se mostraram incapazes de desenvolver reação de Arthus, revelando um papel primordial deste receptor no desenvolvimento de reações de hipersensibilidade do tipo III⁷². Com a demonstração de que camundongos deficientes em C3, C4 ou C5 desenvolvem uma reação de Arthus normal⁷³, os receptores Fc devem ser vistos como suficientes e indispensáveis para que esse tipo de resposta ocorra. FcγRIIB, por sua vez, é um receptor Fc atípico, encontrado em neutrófilos humanos e ancorado à membrana celular por uma ligação glicosil-fosfatidil-inositol (GPI).

2.3.2. Receptores de IgA – A família dos receptores de IgA compreende diversos receptores, a saber, o receptor polimérico de imunoglobulinas, envolvido no transporte epitelial de IgA e IgM; o receptor específico de IgA (Fc α RI); o recém-descrito Fc α / μ R⁷⁴ e, pelo menos, mais dois receptores alternativos (o receptor de transferrina e o receptor de asialoglicoproteína)⁷⁵. Utilizamos, neste trabalho, camundongos transgênicos para o Fc α RI por ser o único receptor específico para IgA e vamos concentrar, portanto, nossa atenção neste receptor.

O Fc α RI é composto de dois domínios extra-celulares, uma região transmembrana e uma cauda intra-citoplasmática. Este receptor se encontra na forma associada ou não à cadeia gamma dos receptores Fc (FcR γ), sendo a forma não-associada, incapaz de ativar cascatas de sinalização intra-celular, tendo apenas um papel na endocitose de IgA, provavelmente relacionado à reciclagem dessa proteína. O local de ligação do Fc α RI é no domínio distal (EC1), ao contrário do que ocorre com os outros receptores “Ig-like” que apresentam dois domínios extra-celulares (Fc γ RI e Fc ϵ RI), nos quais o local de ligação se localiza no domínio proximal (EC2). Fc α RI é um receptor de baixa afinidade para IgA e apresenta glicosilação heterogênea, dependendo da célula em que se encontra expresso, o que faz seu peso molecular oscilar entre 50 e 100 kDa. Sua expressão é constitutiva⁷⁶. Se a IgA murina se liga ou não ao Fc α RI, é um assunto ainda controverso. Camundongos transgênicos para tal receptor, entretanto, desenvolvem espontaneamente nefropatia por IgA, após seis meses de vida, o que suporta a ligação da IgA desses animais ao CD89⁷⁷.

Fc α RI (CD89) é expresso em neutrófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e de Kupffer. Nenhum homólogo do Fc α RI foi encontrado no

camundongo. Esse receptor se liga tanto à IgA1, quanto à IgA2, com baixa afinidade. Ao contrário dos complexos 1:1 do Fc γ RIII com o fragmento Fc da IgG e do Fc ϵ RI com a IgE, duas moléculas do Fc α RI ligam cada dímero de Fc α , um em cada junção Ca2-Ca3^{78,79}. A IgA1 difere da IgA2, basicamente, pela ausência de 13 aminoácidos na região de forquilha da IgA2, o que acarreta diferenças de glicosilação entre as duas subclasses. Tal diferença explica a resistência da IgA2 a diversas proteases bacterianas⁸⁰. Em humanos, a IgA sérica é predominantemente monomérica produzida por linfócitos B na medula óssea e órgãos linfóides periféricos e constituída de IgA1, enquanto a IgA2 predomina nas secreções mucosas. A IgA nas mucosas é produzida localmente, por plasmócitos, quase que exclusivamente como dímeros, unidos por um peptídeo, denominado cadeia J, e ligada ao componente secretório, que é um fragmento do receptor polimérico de imunoglobulinas, o receptor responsável pelo transporte da IgA para o lúmen das mucosas. O conjunto dímero de IgA, cadeia J e componente secretório, constituem a denominada IgA secretória (SIgA). O componente secretório se estende em espiral, em torno do fragmento Fc, protegendo-o assim da ação de proteases endógenas. Em camundongos, por outro lado, a IgA sérica é predominantemente polimérica, apresenta uma única classe e não há compartimentalização tão demarcada entre o ambiente sérico e o das mucosas. Em humanos, IgA é a imunoglobulina produzida de maneira mais abundante, havendo uma produção diária de 66 mg/kg⁸¹. No soro, entretanto, IgA constitui um quinto do “pool” total de imunoglobulinas, devido ao seu alto catabolismo (meia-vida de 3 a 6 dias).

A superfície mucosa está em contato permanente com diversas cepas de bactérias e outros microrganismos. Mais de 70% das células imunes são mobilizadas diariamente

para impedir infecções sistêmicas. SIgA tem participação importante na prevenção contra a invasão de agentes e proteínas estranhas, através das superfícies mucosas, além de neutralizar toxinas e diversos microrganismos (mecanismo de exclusão bacteriana, caracterizado por aglutinação do antígeno pelo anticorpo, aumentando sua eliminação no muco, neutralizando toxinas e a fixação à parede mucosa). Ademais, outro mecanismo de defesa nas mucosas é a eliminação imune, através do qual bactérias que conseguem atravessar essa barreira são retransportadas para a luz intestinal, por um mecanismo de transcitose, do qual não participa a SIgA, mas sim IgA e IgM poliméricas antígeno-específicas. Além da transcitose, anticorpos podem se difundir do sangue para a luz intestinal, quando a permeabilidade das mucosas aumenta, em razão de uma inflamação local ou de uma simples dilatação⁸². Especificidade antigênica também é a principal responsável pela atividade antimicrobiana da SIgA, mas a glicosilação desta proteína também deve contribuir significativamente, já que fragmentos de oligossacarídeos de IgA1 e IgA2 podem se ligar a lecitinas comuns a diversas bactérias⁸³. Enquanto isso, as células de Kupffer e as células dendríticas expressando o Fc α RI, parecem ter um papel importante como segunda linha de defesa, quando a barreira mucosa foi definitivamente vencida. A inabilidade da SIgA em fixar complemento parece ser uma vantagem no lúmen, onde uma reação inflamatória iria prejudicar esse importante sistema de defesa, ou seja, a integridade das mucosas^{75, 84}. Existe, igualmente, outros isótipos de anticorpos nas secreções. Entretanto IgM é pouco abundante e muito sensível a proteases, IgG prevalece sob a forma de fragmento Fab. Tais anticorpos, conhecidos conjuntamente como anticorpos naturais⁸⁵⁻⁸⁸, existem antes de qualquer estimulação antigênica. São

moléculas pluri-específicas, cada uma capaz de reconhecer diversos epítomos, constituindo um sistema imediato de defesa.

Os experimentos que serão descritos dentro em breve, deixarão claro que um dos nossos objetivos se focalizou, reenfatizo, na tentativa de caracterização da função do Fc α RI nas infecções bacterianas, particularmente, em sepse. Tal receptor participa da defesa imune mediada por IgA, tanto no sangue, quanto nas mucosas. A função da IgA sérica, ao contrário do acima descrito para a SIgA, é praticamente desconhecida. IgG representa o componente mais importante de uma resposta imune secundária, enquanto IgA é raramente observada. Tanto um papel pró-inflamatório^{89,90}, quanto anti-inflamatório⁹¹⁻⁹³, já foram sugeridos. IgA sérica monomérica apresenta características anti-inflamatórias, sendo capaz de inibir funções como fagocitose induzida por IgG, “burst” oxidativo e produção de citocinas. Deficiência de IgA, além disso, é uma doença freqüentemente associada tanto a alergias e doenças auto-imunes, quanto a pneumonias de repetição⁹³. IgA polimérica e imunocomplexos de IgA, por outro lado, podem deflagrar resposta imune, via Fc α RI. O Fc α RI medeia fagocitose, ADCC e sua agregação em monócitos deflagra a liberação de diversas citocinas, entre elas, TNF α , IL-6, IL-1 β e IL-8, além de componentes da via do ácido araquidônico e metabólitos do oxigênio⁹⁴⁻⁹⁶. Neutrófilos humanos fagocitam *Bordetella pertussis* e tal resposta é inibida, ao se bloquear o Fc α RI⁸⁹. Células de Kupffer exprimem o Fc α RI e foram propostas como essenciais para o “clearance” de bactérias que passam a barreira mucosa, evitando, assim, o desenvolvimento de sepse⁹⁷. Estudos *in vivo* demonstraram que tais células ingerem vigorosamente *E. Coli*, quando opsonizada com IgA humana⁷⁵.

2.3.3. Cadeia gamma dos Receptores Fc (FcR γ), ITAM e ITIM - Para

avancarmos um pouco mais na estrutura dos FcR, torna-se indispensável a descrição da cadeia gamma dos FcR, assim como dos motivos ITAM e ITIM. Duas classes de FcR são reconhecidas; os receptores ativadores, caracterizados pela presença de uma sequência intra-citoplasmática ITAM associada ao receptor e o receptor inibitório, caracterizado pela sequência intra-citoplasmática ITIM. Essas duas classes de receptores funcionam de maneira orquestrada e podem ser encontradas co-expressas, com frequência, na membrana de alguns tipos celulares⁶⁵. Como ambas as classes apresentam afinidade e especificidade comparáveis, agregação entre elas é comum, assim como entre componentes da mesma classe, modulando, assim, a magnitude das respostas efetoras. Fc ϵ RI, Fc γ RIIB e Fc γ RIIIA são co-expressos em mastócitos e células de Langerhans; Fc γ RI, Fc γ RIIB e Fc γ RIIIA em macrófagos murinos e Fc γ RI, Fc γ RIIB e Fc γ RIIB em neutrófilos humanos. Importante ressaltar, agregação dos FcR e não a presença do ligante, é o fator indispensável para se ativar um FcR. FcR podem ser agregados por anticorpos ou antígenos multivalentes. Além disso, agregação de FcR que não possuem nem ITAM, nem ITIM, não deflagra ativação celular. Alguns FcR sem ITAM, utilizam FcR com ITAM para transdução de sinal. A co-agregação de FcR com ITAM e outro com ITIM, regula negativamente a ativação celular⁹⁸. Da mesma forma, a co-agregação do Fc γ RIIB com o BCR em linfócitos B, tem potente efeito inibitório sobre a ativação destas células, já que tais receptores também possuem ITAMs na sua porção intracitoplasmática, podendo co-agregar com o Fc γ RIIB e deflagrar sinal inibitório semelhante. No que se refere a linfócitos T, entretanto, que também possuem

ITAMs na porção intracitoplasmática, co-agregação com o Fc γ RIIB ocorre somente em células murinas, já que este não é constitutivo de linfócitos T humanos.

O motivo imuno-ativatório baseado em tirosina (ITAM) é caracterizado por uma sequência YxxL repetida duas vezes e separadas por sete aminoácidos variáveis. FcRs com ITAMs são de dois tipos: 1) receptores com múltiplas cadeias, compostos de uma sub-unidade FcR α , onde se conecta o ligante, associada a mais uma ou duas sub-unidades, responsáveis por transdução do sinal e em cujas porções intra-citoplasmáticas se encontram os ITAMs; 2) grupo composto por dois receptores de IgG de cadeia única e exclusivos de humanos, o Fc γ RIIA e o Fc γ RIIC. Neste segundo tipo, o ITAM é único e as sequências YxxL são separadas por 12 aminoácidos, ao invés de 7.

Os FcRs com ITAMs são quatro: Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc ϵ RI e Fc α RI. Todos se associam com uma sub-unidade dimérica, conhecida como cadeia gamma dos FcR (FcR γ) e no caso do Fc ϵ RI, com a sub-unidade β (FcR β), por intermédio da sub-unidade FcR α . Existe um ITAM no domínio intra-citoplasmático de cada cadeia gamma, assim como um ITAM no domínio carboxi-terminal do FcR β , permitindo sinalização intra-celular desses receptores. A sub-unidade β , associada ao Fc ϵ RI, contém um ITAM, mas não é capaz de deflagrar sinalização intra-celular isoladamente. Kinet *et al.* demonstraram que tal cadeia funciona como um amplificador de sinal, através de mensuração da ativação de syk e mobilização de cálcio⁹⁹. Um resíduo no domínio transmembrana da sub-unidade FcR α interage com um resíduo aspartato na região transmembrana do FcR γ (cadeia gamma). Essa interação permite a associação das duas sub-unidades. A cadeia gamma se associa aos FcRs, na forma de homodímeros ($\gamma\gamma$). A cadeia gamma é necessária para a expressão do Fc ϵ RI, do Fc γ RI e do Fc γ RIIA, na

superfície celular (Figura 2). Roedores, além disso, necessitam da cadeia β para a expressão do Fc ϵ RI¹⁰⁰. Camundongos deficientes em cadeia gamma não expressam esses receptores¹⁰¹, apesar de existirem relatos da expressão do Fc γ RI em células eucarióticas transfectadas, independentemente desta cadeia⁹⁸. A cadeia gamma, além disso, aumenta a afinidade tanto do Fc γ RI, quanto do Fc γ RIIIA ao ligante, supostamente por alteração da estrutura quaternária do receptor¹⁰². A cadeia gamma de ratos, camundongos e humanos é extremamente semelhante, 86% dos resíduos permanecendo idênticos entre as três espécies¹⁰³.

Figura 2. Receptores Fc de imunoglobulinas associados à cadeia gamma. Como exceção, o Fc γ RIIb

Um evento precoce, após a agregação dos FcR com ITAM, é a fosforilação dos receptores. Tal fosforilação desencadeia a ativação de diversas proteínas tirosina-quinases. O primeiro grupo a ser ativado é a família das src quinases, à qual pertence lyn, um dos componentes mais bem estudados desta família. Em seguida, em linhas gerais, ocorre a ativação de proteínas da família das syk quinases. Tais tirosina-quinases,

por sua vez, fosforilam diversos substratos intra-celulares, entre eles, fosfolipídeo-quinases, fosfolipases, moléculas adaptadoras e proteínas do citoesqueleto. A fosforilação de tirosinas induzida pelo FcR, por outro lado, é modulada por fosfatases de membrana e citoplasmáticas. Em última análise, os sinais gerados pelos FcRs ativam diversas vias, convergindo, por vezes, em vias ativadas também por outros receptores e que são: 1) vias que resultam no influxo celular de cálcio; 2) vias que levam à ativação da proteína-quinase C (PKC); 3) a via da ras, que atinge o núcleo celular e estimula a transcrição de diversos genes. Mais detalhadamente, uma vez ativada por syk, PLC γ gera metabólitos que ativam PKC e a via do inositol fosfato. Inositol trifosfato (IP3) deflagra a mobilização de cálcio intracelular, ligando-se a receptores de IP3 no retículo endoplasmático. Acredita-se que a elevação transitória do cálcio intra-celular abra os canais de cálcio da membrana plasmática, resultando num pico sustentado de cálcio intra-celular, o que é uma característica constante da ativação celular induzida por todos os FcRs com ITAMs (Figura 3). Conforme comentado, alguns sinais atingem o núcleo pela via da ras. Ras fosforila raf, que fosforila as MAP quinases. No núcleo, as MAP quinases ativam fatores de transcrição, levando à expressão de diversos genes. Fc γ RI e Fc γ RIIA induzem NF κ B em neutrófilos humanos. Fc γ RIIIA induz NFAT.

As respostas deflagradas pelos FcRs com ITAMs, entretanto, parecem depender mais do tipo celular do que do receptor. Diferentes receptores com ITAMs ativam as mesmas respostas, quando expressos nas mesmas células. Ao contrário, quando expressos em células diferentes, o mesmo receptor efetua respostas diversas. Agregação de receptores Fc em macrófagos e neutrófilos ativa vias de sinalização que levam a alterações no citoesqueleto e fagocitose de partículas ligadas a IgG, assim como

secreção de grânulos intra-citoplasmáticos. Sinalização mediada pelos FcRs, além disso, estimula a produção de espécies reativas do oxigênio e óxido nítrico, induz a secreção de citocinas e quimiocinas e promove a expressão de proteínas de superfície celular. Ademais, pela ingestão de patógenos, facilita a apresentação de determinantes patogênicos, estimulando resposta imune T-mediada. Em linhas gerais, portanto, a agregação de FcRs com ITAMs induz dois tipos de respostas: um resultante da ativação celular e outro de fenômenos de internalização do ligante. Todos os receptores associados à cadeia gamma medeiam endocitose, assim como fagocitose. Fagocitose depende de fosforilação dos ITAMs e syk é fosforilada, durante esse processo¹⁰⁴. Macrófagos de camundongos deficientes em cadeia gamma mostraram-se incapazes de realizar fagocitose FcR-mediada de rosetas de hemácias de carneiro¹⁰¹.

Figura 3. Agregação e sinalização celular induzida pelo FcαRI, como exemplo de ativação de FcR com ITAM. Adaptado de Monteiro et al. IgA Fc Receptors. *Ann Rev Immunol*, 2003

FcR que não deflagram ativação celular não possuem ITAM. Eles também podem ser divididos em duas categorias. A primeira categoria constitui um receptor de IgG de cadeia única, denominado FcγRIIB, cuja porção intra-celular possui um motivo que inibe a ativação celular de outros receptores, após co-agregação. Este motivo

contém uma única sequência YxxL, sendo designado ITIM, motivo imuno-inibitório baseado em tirosina. A segunda categoria é composta por receptores que nem ativam, nem inibem a ativação celular, estando envolvidos na transcitose e endocitose de imunoglobulinas. Eles são o receptor polimérico de imunoglobulinas e o FcR neonatal para IgG. Uma exceção é o FcγRIIIB, que não tem capacidade ativatória, mas contribui à sinalização, associando-se a outros FcRs.

Dentre os receptores que não possuem ITAM, tem especial relevância neste trabalho o receptor FcγRIIIB. Como já foi comentado, tal receptor tem um papel inibitório na ativação de todos os receptores Fc com ITAMs, assim como na ativação do BCR. FcγRIIIB participa, na verdade, de três respostas efetoras inibitórias. No primeiro caso, co-agregação desse receptor com um receptor que contenha ITAM leva à fosforilação do ITIM, por uma quinase da família lyn, originando um domínio de reconhecimento SH2 que é o local de ligação de SHIP (inositol polifosfatase 5-fosfatase), a qual hidrolisa PIP₃, produto da ativação do ITAM, liberando a ancoragem de proteínas como Btk e PLCγ da membrana, o que leva à inibição da mobilização de cálcio deflagrada pelo ITAM. Fosforilação do ITIM, além disso, leva também à inibição da proliferação celular, através da inativação de MAP quinases (MAPK), e do recrutamento da proteína-quinase anti-apoptótica Akt. Por fim, homo-agregação deste receptor, induz um sinal pró-apoptótico que independe da fosforilação do ITIM. Este sinal pró-apoptótico é bloqueado pelo recrutamento de SHIP, após co-agregação do FcγRIIIB ao BCR, devido à necessidade de Btk para a eficácia do mesmo¹⁰⁵⁻¹⁰⁹. FcγRIIIB, neste caso, parece agir como um receptor determinante na seleção negativa de células B, cujos BCRs tenham afinidade reduzida pelo antígeno, como resultado de hipermutação

somática. Esta resposta apoptótica é reconhecida como um sinal de stress celular e necessita de co-agregação de múltiplos Fc γ RIIB, não sendo induzida por simples dimerização deste receptor¹⁰⁹ (Figura 4). Fc γ RIIB, além disso, realiza endocitose, porém não é capaz de induzir fagocitose¹¹⁰.

Figura 4. Co-agregação do Fc γ RII ao BCR e inibição ITIM-dependente da ativação e proliferação celular (à esquerda). À direita, homo-agregação do Fc γ RII, induzindo apoptose de células B, independentemente de fosforilação do ITIM. Adaptado de Ravetch et al. IgG Fc Receptors. *Ann Rev Immunol*, 2001

2.3.4. Receptores relacionados à família dos receptores Fc – Existem evidências crescentes mostrando que as células mielóides expressam diversas famílias de receptores, contendo isoformas ativatórias e inibitórias. Recentemente, foi caracterizada

em humanos uma nova família de receptores expressos nesse tipo celular, chamados de ILT's ("immunoglobulin-like transcripts"), LIR's ("leukocyte Ig-like receptors") ou MIR's ("monocyte/macrophage Ig-like receptors"). Os receptores dessa família apresentam isoformas com diferentes domínios intra-citoplasmáticos e transmembrana, alguns mediando ativação e outros, inibição celular¹¹¹. ILT/LIR/MIR's incluem, pelo menos, 10 receptores distintos. Alguns deles (ILT-2, ILT-3, ILT-4, ILT-5 e LIR-8) contêm longas caudas citoplasmáticas com ITIM's. Estes receptores inibem ativação celular, pelo recrutamento da fosfatase SHP-1. Outros receptores (ILT-1, "ILT-1-like protein", ILT-7, ILT-8 e LIR-6a), contêm uma curta porção intra-citoplasmática, através da qual se associam à cadeia gamma dos receptores Fc (FcR γ). ILT/LIR/MIR são expressos preferencialmente em células mielóides, mas células B expressam ILT-2 e sub-grupos de células NK e T, expressam ILT-1, ILT-2 ou ILT-5.

A homologia entre ILT's e KIR's ("killer-cell Ig-like receptors"), receptores de células "natural-killer" que ligam moléculas do MHC, sugeriu originariamente que os ILT's seriam receptores de moléculas do MHC I. Entretanto, somente ILT-2 e ILT-4 foram confirmados, interagindo com tais moléculas. ILT-2, além disso, co-agrega com o TCR, o que reduz a fosforilação do CD3 ξ . Os demais receptores ILT/LIR/MIR's continuam com seus ligantes desconhecidos.

Os receptores murinos que correspondem aos ILT/MIR/LIR's são chamados de PIR's ("paired Ig-like receptors"). Tais receptores contêm 6 domínios extra-celulares "Ig-like" e são encontrados em células mielóides, dendríticas e linfócitos B. PIR-B é expresso, ademais, em plaquetas e megacariócitos murinos. Os receptores PIR foram encontrados, devido às pesquisas para se encontrar um homólogo murino do receptor

humano Fc α R¹¹². Enquanto PIR-B é um receptor inibitório com 4 ITIM's na sua porção intra-citoplasmática, PIR-A é um receptor ativatório, associado à cadeia gamma dos receptores Fc¹¹³. Na ausência desta associação, PIR-A não é expresso na superfície celular^{114,115}. O ligante dos receptores PIR permanece desconhecido. Incubação de células transfectadas com receptores PIR e hemácias revestidas com IgG1, IgM, IgE ou IgA não mostrou ligação às hemácias, enquanto que células transfectadas com receptores Fc se ligaram às mesmas, sugerindo que os receptores PIR não reconhecem imunoglobulinas¹¹⁶.

SIRP's é uma família de glicoproteínas transmembrana, expressas em neurônios e células mielóides. Alguns deles, chamados SIRP α 1 e α 2, apresentam ITIM's intra-citoplasmáticos, recrutam as fosfatases SHP-1 e SHP-2 e inibem vias de sinalização celular. O ligante do SIRP α é o CD47, uma proteína com diversas funções imunológicas e neuronais.

OSCAR é um outro receptor recém-descrito, que se associa à cadeia gamma dos receptores Fc^{117,118} e envolvido em endocitose e apresentação antigênica, através do MHC de classe II, em células dendríticas. Ao contrário do receptor humano (hOSCAR), o receptor murino (mOSCAR) é expresso somente em osteoclastos. hOSCAR está envolvido com a maturação de células dendríticas. Quando a estimulação deste receptor é associada com o estímulo de determinados receptores "Toll-like", a capacidade de células dendríticas de ativarem linfócitos T "naive" é significativamente amplificada¹¹⁹.

A glicoproteína VI, um receptor de colágeno presente em plaquetas, também se associa à cadeia gamma dos receptores Fc¹²⁰. Ademais, a interação entre o fator de von

Willebrand e a glicoproteína Ib, estimula vias de sinalização que requerem fosforilação do FcR γ para atingirem ativação máxima¹²¹.

Por fim, cabe citar uma nova família de receptores, recém-identificados tanto em humanos, quanto em camundongos, e nomeados homólogos dos receptores Fc (FcRH). Até o presente momento, foram identificados 6 homólogos dos receptores Fc (huFcRH1-6). Além disso, análise recente do genoma humano identificou um novo gene relacionado aos receptores Fc, os receptores FcRX/FcRL/FREB e FcRY. Caracterização dos FcRH murinos indica diversidade considerável, com relação a humanos. Os ligantes dos FcRH permanecem desconhecidos. Os FcRH possuem ITIMs, ITAMs ou ambos os tipos de motivos sinalizatórios em suas porções intra-citoplasmáticas. Não é descrita associação entre a cadeia gamma e os FcRH¹²²(Figura 5).

Figura 5. Receptores Fc conhecidos até o presente momento. Como se pode observar, os receptores Fc homólogos não são associados à cadeia gamma. Foram tracejados em vermelho, os receptores caracterizados em humanos, mas que não foram encontrados em camundongos. Adaptado da tese de Benoit Pasquier. «Dualité fonctionnelle du récepteur aux fragments constants des immunoglobulines A: RFcα I ou CD89» (Doutorado em Imunologia) - Université Paris V (René Descartes), 2004.

2.3.5. Receptores Fc e doenças inflamatórias - Devido ao desenvolvimento de camundongos deficientes em componentes específicos do complemento, assim como em diferentes receptores Fc, conseguiu-se estabelecer que o papel desses dois sistemas não é inter-dependente, nem tampouco redundante, no que se refere à inflamação deflagrada por anticorpos. A ativação do complemento não está envolvida em inflamação mediada por imunocomplexos, mas é essencial, na proteção mediada pelos anticorpos naturais.

Enquanto isso, os receptores Fc ligam IgG citotóxica e imunocomplexos às células efectoras, apresentando um papel dominante nas doenças auto-imunes deflagradas por auto-anticorpos¹²³.

Camundongos deficientes em cadeia gamma não apresentam anafilaxia passiva deflagrada por IgE, seja cutânea ou sistêmica, devido à ausência da expressão do FcεRI, enquanto anafilaxia ativa depende, principalmente, do FcγRIIIA.

IgG de coelho contra glóbulos vermelhos de camundongo, medeiam uma anemia aguda, quando injetados em camundongos selvagens. Injeção desses anticorpos em camundongos deficientes em cadeia gamma, C3 ou C4, demonstrou que os camundongos deficientes em complemento são igualmente susceptíveis, enquanto que os gamma-deficientes são protegidos. Análise do fígado dos animais demonstrou que as hemácias revestidas de IgG são fagocitadas pelas células de Kupffer, fenômeno ausente nos gamma-“knockout”. Situação semelhante foi demonstrada com um anticorpo monoclonal dirigido contra plaquetas murinas^{123,124}.

O modelo cutâneo para doença por imunocomplexos, a reação de Arthus, resulta do depósito de imunocomplexos na pele, após injeção de antígeno. Edema, hemorragia e infiltração neutrofílica são alterações características vistas nesta reação. Observações realizadas, relataram que camundongos deficientes em C3 ou C4 apresentam reação normal, enquanto camundongos deficientes em cadeia gamma ou FcγRIIIa não desenvolvem reação de Arthus. Baseando-se nestes resultados, pode-se vislumbrar que modelos de doenças sistêmicas causadas por depósitos de imunocomplexos, como em modelos de glomerulonefrite auto-imune, seriam, igualmente, atenuados em animais deficientes em determinados FcRs. Tais estudos também já foram relatados. Em um

modelo de glomerulonefrite, induzida pela injeção de anticorpos anti-membrana basal, observou-se que proteinúria e alterações glomerulares são atenuadas em camundongos deficientes em cadeia gamma. Depleção do complemento, por outro lado, não altera a evolução da doença. Além disso, estudos realizados com o modelo NZB/NZW, um bem caracterizado modelo de lúpus, também demonstraram proteção dos camundongos deficientes em cadeia gamma¹²⁵. Tais estudos, desta forma, suportam um papel dominante do FcγRIII, nas reações de hiperssensibilidade do tipo II e III.

No que se refere a infecções bacterianas, entretanto, o papel da cadeia gamma é controverso e pouco estudado. Alguns aspectos já foram ressaltados, mas devido ao fato de ser o tema central deste projeto, tais estudos serão abordados em maiores detalhes, mais adiante, após a exposição dos resultados que obtivemos, juntamente com a discussão final.

Contra-balanceando as propriedades ativatórias dos FcR, temos o receptor inibitório FcγRIIB. Camundongos deficientes em FcγRII apresentam níveis elevados de anticorpos em resposta a um insulto antigênico e anafilaxia mediada por IgG aumentada, o que demonstra o papel inibitório importante desse receptor na síntese de anticorpos e na regulação da resposta a imunocomplexos de IgG^{67,126,127}. FcγRIIB funciona, assim, na manutenção da tolerância periférica, regulando a amplitude das respostas ativatória e determinando o seu fim. A deleção desse tipo de resposta inibitória pode culminar em auto-imunidade, dependendo de outros fatores genéticos e ambientais. Camundongos FcγRII-“knockout” de fundo genético C57/Bl6, desenvolvem anticorpos anti-DNA e anti-cromatina e sucumbem a uma glomerulonefrite fatal, após 8 meses de vida. Tal fenótipo é ligado ao fundo genético, não sendo visto em fundo C129 ou Balb/c⁶⁸.

Camundongos deficientes em cadeia gamma, cabe ressaltar, apresentam níveis normais de Fc γ RII¹²⁸.

Por fim, caminhando na contra-corrente daquilo que parecia um consenso e demistificando o conceito de um papel exclusivamente ativatório para a cadeia gamma (FcR γ), Pasquier et al.¹²⁹ demonstraram que tratamento com um anticorpo monoclonal anti-Fc α R (A77) é capaz de induzir um sinal inibitório, FcR γ ITAM-dependente, que é capaz de suprimir asma, induzida pela inalação de metacolina, em camundongos transgênicos para tal receptor (Fc α RI ou CD89). Tal artigo abre as portas, assim, para a compreensão dos efeitos antagônicos, observados ao se estudar a IgA sérica humana. Enquanto agregação desse receptor por ligantes multiméricos estimula ativação celular pelo recrutamento de syk, a presença de IgA sérica ou A77, na ausência de ligantes multiméricos, induz recrutamento da fosfatase SHP-1 pelo Fc α RI, o que impede a fosforilação de syk, LAT e ERK, após agregação do Fc ϵ RI.

2.4. Modelos animais de endotoxemia e sepse

Os artigos de revisão que discutem os modelos laboratoriais de endotoxemia e sepse, estão invariavelmente em consenso, quanto ao fato de que a relevância de um determinado modelo está diretamente relacionada à capacidade do mesmo de reproduzir as características dessa doença, tal como ela se apresenta em humanos. Diversos outros fatores devem ser considerados, entretanto, ao se escolher um modelo animal para experimentos, dentre os quais, viabilidade do animal (animais de grande porte, por exemplo, podem ser de difícil obtenção), familiaridade do laboratório com a espécie,

custo, assim como objetivos do estudo e impecilhos, eventualmente, impostos por determinado modelo.

Sendo de fácil obtenção e criação, assim como acessíveis financeiramente, pequenos mamíferos (ratos, camundongos, porquinhos-da-índia), são escolhidos para grande parte dos estudos, particularmente, quando uma amostra grande é necessária. Além disso, devido à vasta diversidade de camundongos geneticamente modificados, atualmente à disposição, esses animais têm sido cada vez mais estudados, o que estimula ainda mais, que se continue utilizando essa espécie em estudos futuros, pelo suporte que se tem da literatura, assim como pelo conhecimento cada vez maior das particularidades do sistema imune desses animais, que assim se obtêm.

Por outro lado, variáveis como débito cardíaco e pressão de artéria pulmonar, por exemplo, são muito mais facilmente mensuradas em animais de grande porte. Devido ao seu grande volume circulante, esses animais são úteis, quando se necessita de várias amostras de sangue, tendo ainda, grande similaridade anatomo-fisiológica com relação a humanos, no que se refere aos sistemas renal, cardio-vascular e digestivo. Por suas semelhanças óbvias, estudos com primatas são valiosos. No entanto, esses animais são caros e trabalhar com eles não é tão prático, sendo, preferivelmente, deixados para estudos pré-clínicos, quando não se necessita de grandes amostras¹³⁰.

O termo endotoxemia, quando se trata de modelos experimentais de endotoxiose, é definido pela presença na circulação, seja de LPS, seja de endotoxina (LPS não purificado, com quantias variáveis de fragmentos de parede celular, lipídeos, lipoproteínas e polissacárideos). Apesar das similaridades entre endotoxemia e sepse, as diferenças existentes em diversos parâmetros clínico-laboratoriais tornam difícil a

correlação entre os dois modelos. Voluntários humanos, por exemplo, que desenvolveram tolerância a LPS, ainda manifestam febre e outros sinais sistêmicos, durante infecção com organismos viáveis¹³¹. Os estudos com os camundongos C3H/HeJ, descritos juntamente com os mecanismos de imunidade inata, é outro exemplo de que os modelos não são sobreponíveis. Caracterização da hemodinâmica dos dois modelos, mostra que as doses de LPS utilizadas foram exageradas e não reproduzem sepse. Variáveis metabólicas, citocinas e diversos outros parâmetros de infecção sistêmica, igualmente, não apresentam boa correlação. Endotoxemia, enfim, é um modelo para se estudar LPS, mas os resultados não podem ser transpostos para sepse, devido ao risco de se chegar a falsas conclusões.

O modelo mais simples de endotoxemia é a infusão intraperitoneal ou endovenosa de um *bolus* de LPS, na ausência de qualquer tratamento de suporte. Quando coelhos recebem uma dose elevada de LPS (5mg/kg), eles apresentam diminuição do débito cardíaco e aumento da resistência vascular periférica, ocorrendo o contrário, quando a dose é pequena (1-3µg/kg)^{132,133}. Resposta semelhante ocorre em ratos¹³⁴. Cães tendem a um quadro hipodinâmico.

Nosso conceito das perturbações circulatórias características do choque séptico humano (débito cardíaco elevado, diminuição da resistência vascular sistêmica e da pressão capilar pulmonar), entretanto, são baseadas em dados colhidos de pacientes, ou seja, indivíduos que estão sendo tratados, recebendo suporte intensivo, ressuscitação volêmica e drogas vasoativas. Devido a isso, alguns grupos no final da década de 80, começaram a tratar os animais em endotoxemia, com ressuscitação hídrica^{135,136}. Este modelo reflete, satisfatoriamente, as manifestações hemodinâmicas do choque séptico,

mas as críticas permanecem, com relação à transposição de dados obtidos por endotoxemia para sepse, por motivos óbvios, principalmente no que se refere a esse trabalho, que estuda em particular as características do sistema imune nesta doença. Dentre os modelos de endotoxemia, cabe ainda citar os modelos de infusão contínua de LPS e os de infecção peritoneal. Em ambos, tentou-se mimetizar o fato de que durante uma infecção, as bactérias invadem a circulação gradativamente e de maneira contínua, ao invés da sobrecarga aguda e maciça imposta por um *bolus* de bactérias, o que, na realidade, acaba se assemelhando mais a um modelo de intoxicação aguda, uma situação bastante diversa.

Wichterman *et al.*¹³⁷ reconheceram quatro modelos para se induzir sepse em animais de laboratório: 1) infusão endovenosa de bactérias vivas; 2) peritonite induzida por implante de inóculo definido de bactérias; 3) indução de abscesso de partes moles em extremidades; 4) peritonite induzida sem inóculo definido. Utilizarei essa classificação, por ser ainda atual e bastante útil, para expôr os modelos de sepse vigentes.

Apesar das críticas, muitos pesquisadores continuam a utilizar modelos de infusão endovenosa de bactérias viáveis para induzir sepse. O principal problema se deve ao fato de que a maioria dos pacientes não são acometidos por uma invasão maciça e súbita de bactérias num determinado momento, mas ao contrário, vítimas de invasão bacteriana intermitente e persistente, proveniente de um foco infeccioso definido. Apesar de o modelo de infusão intravascular ser o de mais simples reprodução, mesmo quando a infusão de bactérias é feita de maneira contínua, não se consegue reproduzir de maneira satisfatória sepse e, na minha opinião, os resultados decorrentes devem ser interpretados com cautela. Como já foi comentado, esse modelo foi vastamente utilizado

no passado, levando inúmeras vezes a resultados enganosos. A insistência no uso de largas doses de bactérias se deve em parte, provavelmente, ao fato de que as cepas de *E. Coli* mais freqüentemente usadas nesses estudos foram a O86 e a O111, ambas sorossensíveis, ou seja, facilmente mortas na circulação sanguínea, mesmo na ausência de neutrófilos, o que justifica a necessidade de altas doses para se produzir toxicidade¹³⁸. Quando doses elevadas de bactérias são utilizadas, valores elevados de citocinas pró-inflamatórias são observados e o seu antagonismo é associado a uma maior sobrevivência. Em modelos que produzem elevações menos drásticas de citocinas, entretanto, assemelhando-se mais com a apresentação dessa doença em humanos, tais resultados não são encontrados¹³⁹. Parâmetros hemodinâmicos, similarmente, não apresentam boa correlação. Injeção de *E.coli* em ratos, em *bolus*, numa dose de 10^{10} organismos/kg, resulta em débito cardíaco elevado por 90 minutos, após o que o mesmo cai para valores normais¹⁴⁰. Quando é realizada infusão contínua dessas bactérias por cinco horas, na mesma dose, também em ratos, o débito cardíaco permanece estável por três horas e depois desce para valores abaixo da normalidade¹⁴¹.

Numerosos laboratórios utilizam infusão de bactérias viáveis para induzir sepse em animais de grande porte, inclusive primatas. Alguns protocolos parecem reproduzir diversas características dessa doença e devido às dificuldades de se trabalhar com esses animais e à falta de modelos mais adequados, tornam-se, infelizmente, uma das poucas alternativas aceitáveis, quando reproduzido por pesquisadores experientes. Em 1982, por exemplo, Carrol e Snyder descreveram um modelo de bacteremia em primatas e utilizaram-no para estudar os efeitos de administração endovenosa de fluidos na hemodinâmica e no metabolismo em sepse¹⁴². Nesse modelo, macacos são anestesiados

com quetamina e recebem altas doses de *E. Coli* (9×10^{12} organismos/kg); o débito cardíaco aumenta, significativamente, quando os animais são agressivamente hidratados. Tanto esses autores, quanto outros pesquisadores, usando o mesmo modelo, demonstraram que ele reproduz diversas características de sepse, como hiperlactatemia, apesar de consumo normal de oxigênio¹⁴², baixa resistência vascular sistêmica^{143,144}, diminuição do débito urinário e da taxa de filtração glomerular¹⁴³ e hipoxemia arterial¹⁴⁴.

Mais interessantes, entretanto, são os modelos de peritonite. No que se refere aos modelos com inóculo definido de bactérias, os primeiros relatos são de 1978, quando Bartlett *et al.*¹⁴⁵ modificaram o modelo de peritonite em ratos, descrito por Onderdonk *et al.*¹⁴⁶ e Weinstein *et al.*¹⁴⁷, em que cápsulas de gelatina, contendo sulfato de bário e fezes de ratos eram implantadas na cavidade abdominal, quantificando a quantidade de bactérias prevalentes no inóculo, tentando assim, controlar melhor tal modelo. Este modelo, apesar de não ser de simples realização, apresentou resultados satisfatórios. Há, inicialmente, um quadro de peritonite aguda, bacteremia e alta mortalidade. Os animais que sobrevivem evoluem com localização da infecção e formação de abscessos, resistindo por um tempo bem mais prolongado.

Em 1980, Ahrenholz e Simmons constataram que mortalidade de 100% é obtida após 24 horas, quando *E. Coli* viáveis (2×10^8 organismos), suspensas em solução salina, são injetadas intra-peritonealmente em ratos. Outros pesquisadores, igualmente, já haviam tentado induzir peritonite em ratos, através da injeção de bactérias viáveis, mas mostraram-se insatisfeitos, afirmando já na época que os resultados “não representam um modelo de peritonite, mas de endotoxiose”¹⁴⁸. Entretanto, Ahrenholz e Simmons, modificando tal modelo, demonstraram que, quando o mesmo número de bactérias é

implantado em um coágulo de fibrina bovina, a mortalidade precoce diminui, os ratos desenvolvem abscessos e apresentam uma mortalidade em 10 dias de 90%¹⁴⁹. Portanto, o coágulo retarda a absorção sistêmica das bactérias e promove o desenvolvimento de uma infecção mais localizada. Nakatani et al., posteriormente, desenvolveram um modelo de abscesso intra-peritoneal em ratos, que permite também o controle sobre o tipo e o número de bactérias. Neste modelo, um *pellet*, consistindo de fezes autoclavadas, ágar e um número conhecido de *E. coli* ou *B. fragilis*, é implantado intra-peritonealmente¹⁵⁰.

Os modelos de peritonite com inóculo definido reproduzem de maneira muito mais fidedigna os achados clínico-laboratoriais de pacientes sépticos, do que os modelos de infusão de bactérias ou endotoxina. Ao contrário dos outros modelos de peritonite, ademais, tais modelos permitem o completo controle sobre o número de bactérias, assim como a escolha de qual agente infeccioso será implantado.

Dentre os modelos de peritonite com inóculo não definido, o mais conhecido e largamente utilizado é o modelo de punção e ligadura cecal (CLP)¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Em 1968, Clowes já havia descrito um modelo de ligadura cecal, no qual afirmava que devido à necrose e extravasamento subsequente de fezes para a cavidade abdominal, se conseguiria induzir sepse¹⁵⁵. Tal modelo, entretanto, não conseguiu ser reproduzido por diversos outros pesquisadores, inclusive Wichterman que, por fim, acaba modificando-o pela realização de punções, distalmente à ligadura do cécum. Tal modelo, descrito em ratos em 1980¹³⁷, conforme detalhado em Material e Métodos, foi validado, posteriormente, em camundongos e, inclusive, animais de grande porte como ovelhas¹⁵⁶. Resumidamente, ligadura cecal é realizada por procedimento cirúrgico, seguida de uma ou mais perfurações, distalmente à ligadura, o que permite extravasamento de fezes e

induz isquemia, seguida de necrose, do tecido ligado. As bactérias que contaminam continuamente a cavidade abdominal, causam peritonite, com rápida evolução para sepse. Apenas seis horas após a cirurgia, bactérias já podem ser detectadas na circulação sanguínea, por hemocultura, e os animais apresentam sinais clínicos nítidos de infecção. Hemoculturas realizadas por Wichterman, durante a descrição do modelo, revelaram-se positivas para *E. Coli*, *S. Bovis*, *P. Mirabilis* e *B. Fragilis*. O insulto pode ser controlado por alteração no número de perfurações, assim como alteração no calibre da agulha utilizada para a realização dos pertuitos. A principal desvantagem desse modelo é a dificuldade de se controlar a magnitude do insulto, o que pode ser solucionado pelo uso de amostras numerosas, algo viável, quando se trabalha com animais de pequeno porte. A principal vantagem é sua simplicidade e fácil reprodutibilidade, não havendo necessidade de cultura, nem quantificação do número de bactérias ou, em outras palavras, de se preparar o inóculo. Ademais, esse modelo de peritonite na presença de tecido desvitalizado, apresenta nítida semelhança com diversas situações clínicas, como apendicite perfurada e diverticulite. Quando comparado a modelos de infusão de LPS, sua maior relevância é incontestável¹⁵⁷, sendo, além disso, um modelo que reproduz, fidedignamente, os achados de apoptose sepse-induzida¹⁵⁸.

Por fim, cabe citar os modelos de infecção de partes moles. Um dos primeiros modelos de sepse com débito cardíaco elevado é o modelo de Albrecth e Clowes, de 1964¹⁵⁹. Neste modelo, um abscesso de partes moles é induzido por injeção de 10 a 20ml de cloreto de cálcio nos músculos da coxa. Este procedimento resulta em necrose local, seguida de infecção espontânea. Desde então, modificações deste modelo foram propostas, inclusive com a injeção de bactérias, ocupando o lugar do cloreto de cálcio.

O fato de existirem tantos modelos, torna evidente que nenhum deles deve ser isento de imperfeições. Sepses, como doença extremamente heterogênea, é de difícil reprodução em laboratório. Na maioria dos experimentos, os animais utilizados são saudáveis, jovens e não sofreram insultos prévios. Além disso, por ser uma doença que leva à morte, geralmente, após um certo período de tratamento em UTI, não ocorrendo, costumeiramente, de forma fulminante (com exceção de casos de meningococemia, em pacientes imunodeprimidos, dentre outros), necessita para ser fielmente reproduzida de um modelo que permita acompanhamento a longo prazo, inclusive com reprodução da assistência mantida, em geral, nesses casos (ventilação mecânica, drogas vasoativas, ressuscitação volêmica, etc), ou seja, de uma verdadeira UTI de animais.

3. Objetivos

- **Avaliar a mortalidade de camundongos deficientes em cadeia gamma ($\text{FcR}\gamma$), assim como camundongos transgênicos para o $\text{hFc}\alpha\text{RI}$ (CD89), comparativamente a camundongos selvagens de mesmo fundo genético, quando submetidos a peritonite induzida por punção e ligadura cecal (CLP)**
- **Avaliar a resposta inflamatória destes mesmos camundongos, mediante análise de citocinas pró e anti-inflamatórias e recrutamento de células inflamatórias**
- **Caracterizar a flora bacteriana pós-CLP de camundongos deficientes em cadeia gamma e selvagens**
- **Elucidar as causas que levam a possíveis diferenças de flora nesses animais**
- **Elucidar os mecanismos moleculares que explicam as possíveis causas encontradas**

4. Métodos

Análise estatística: Curvas de mortalidade foram analisadas por curvas de Kaplan-Meier e “log rank test”. Dosagens que demonstraram apresentação não-paramétrica foram analisadas por Teste U de Mann-Whitney e valores com distribuição paramétrica, através de teste t de “Student”. Foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$.

Procedimentos com animais: Todos os procedimentos com animais foram realizados, de acordo com as normas da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) e da Faculté de Médecine Xavier Bichat, Université Paris VI (França).

Obtenção de células e linhagens celulares: Os experimentos *in vitro* deste projeto, que necessitaram de células vivas, foram possíveis, através da obtenção de neutrófilos peritoneais de camundongos, mediante peritonite química, induzida pela injeção intra-peritoneal de 2,0 ml de Thioglycollate 3% (Sigma-Aldrich, USA) e lavagem peritoneal, 3 horas após. Para obtenção de macrófagos peritoneais, injetamos 3,0 ml de “Enriched Thioglycollate Broth” 3% (Sigma-Aldrich, USA) e aguardamos 7 dias, antes de realizar lavagem peritoneal. Células esplênicas e sanguíneas de camundongos foram, por vezes, necessárias. Além disso, dispusemos da linhagem celular RBL (basófilos de rato).

Produção de anticorpos monoclonais: Anticorpos monoclonais foram produzidos, através da injeção de hibridomas em camundongos “nude”. A77 é um anticorpo anti-Fc α R, resultante da fusão de células de linfonodos de camundongos *Balb/c*

hiperimunizados com Fc α R humano e células de mieloma murino Ag8.653. O hibridoma A77 foi o escolhido para o presente estudo, dentre os hibridomas com semelhante especificidade, apesar de quatro diferentes anticorpos disponíveis (A3, A59, A62 e A77), serem fortemente reativos a uma sub-população de células mononucleares e, virtualmente, a todos os granulócitos (>99%) de diferentes amostras celulares¹⁶⁰. No intuito de se produzir A77 em quantidades significativas, tal hibridoma foi multiplicado em meio de cultura contendo RPMI 1640 glutamax (GIBCO, Invitrogen, USA), com 10% de soro bovino fetal (FBS- GIBCO, Invitrogen, USA), β -mercaptoetanol (Sigma, USA) e Penicilina-Streptomicina, acrescido de macrófagos peritoneais de camundongo (“feeder’s”), previamente irradiados com 3000 rad, durante 5 minutos. Incubação foi realizada a 36°C, com 7% CO₂. A seguir, peritonite inflamatória foi induzida nos camundongos “nude”, por administração intra-peritoneal de 0,5ml de 2,6,10,14-tetrametil-pentadecano (Pristane, Sigma-Aldrich, USA) em cada animal. Sete a dez dias após, as células de hibridoma foram contadas e 5-10 x 10⁶ células de hibridoma, ressuspensas em RPMI, foram injetadas na cavidade abdominal de tais camundongos (volume máximo de 3ml por animal). Nos dez a quinze dias que se seguem, os camundongos começaram a desenvolver ascite. Punção da ascite foi realizada, a partir deste momento, com jelco 18, e o material foi coletado em tubo falcon (Becton & Dickinson, USA), contendo 10 μ l de heparina. Os camundongos foram, então, acompanhados diariamente e repuncionados, quando voltavam a apresentar ascite volumosa, sendo após algumas semanas, sacrificados por deslocamento cervical. A ascite recuperada foi mantida, após a coleta, por uma hora a temperatura ambiente,

sendo a seguir centrifugada (3000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C) e o sobrenadante estocado a -20°C, para posterior purificação dos anticorpos obtidos.

Como controle para os experimentos com A77, foi escolhido o hibridoma PY320.1, que produz um anticorpo irrelevante. Técnica idêntica à descrita para a produção de A77, foi realizada para a produção de grandes quantidades deste anticorpo controle.

2.4G2, um anticorpo monoclonal anti-Fc γ IIIa e IIb¹⁶¹, resultante da fusão de células esplênicas de rato hiperimunizadas com macrófagos P388D e macrófagos J774 (deficientes em FcRII) e células de mieloma murino P3U1 foi, de forma similar, produzido em grandes quantidades, através de purificação de ascite. Por fim, a mesma técnica foi utilizada para a produção do seu anticorpo controle, já que o anticorpo PY320.1 é um anticorpo murino e os experimentos com o 2.4G2 exigiam um anticorpo de rato, como controle.

Purificação de anticorpos: A ascite resultante da injeção dos hibridomas nos camundongos “nude” foi submetida à precipitação em solução concentrada de sulfato de amônia (pH 7,2) e, posteriormente, purificada, através de cromatografia, utilizando-se coluna de DEAE (Ciphergen Biosystems, USA). Os anticorpos resultantes foram concentrados, através de centrifugação (Amicon®Ultra Millipore, USA), e a concentração final foi quantificada por espectrofotometria. Os anticorpos foram mantidos a 4°C, em solução de ácido bórico (24,73g/4L de solução, Sigma, USA), di-sódio tetraborato decahidrato (38,14g/4L, Sigma) e NaCl (17,53g/4L, Sigma), em pH8,3, sendo dialisados contra PBS, 24 horas antes de serem utilizados.

Para o preparo de Fab, utilizado nos experimentos com A77 e PY320.1, os anticorpos são dialisados contra NaCl 0,9% a uma concentração de 1 a 10mg/ml. Em seguida, é acrescentado tampão Acetato a uma concentração final de 0,1M, pH 4,0, e pepsina, numa concentração 50 vezes menor do que a quantidade de anticorpos a serem digeridos. Aguarda-se a digestão, durante 8 horas, a 37°C. Para se interromper a reação, é realizada diálise dos anticorpos contra Tris-HCl, 0,1M, pH 7,5. Após a digestão com pepsina, os anticorpos se encontram na forma de Fab'2. Para obtenção de Fab, acrescenta-se cisteína (Sigma), 0,01M de concentração final e aguarda-se a redução, durante 2 horas, a 37°C. A cisteína reduz as pontes dissulfídicas entre as 2 cadeias pesadas, deixando intactas as pontes entre as cadeias leves. Após 2 horas, acrescenta-se iodoacetamida (Calbiochem, EMD Biosciences, USA), 0,15M de concentração final e aguarda-se a alquilação, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. A iodoacetamida estabiliza os fragmentos Fab reduzidos. Procede-se, por fim, diálise contra solução de ácido bórico, Borax e NaCl, para estocagem, após confirmação do resultado, mediante migração das amostras em gel de SDS/PAGE e coloração com solução de azul de Coomassie (0,1% de Azul de Coomassie puro – Bio-Rad laboratories; 99,9% solução de Metanol 40%, ácido acético 10%) (Figura 6). Por fim, A77 é testado, funcionalmente, através de ativação celular, caracterizada pela fosforilação de syk, visualizada por immunoblotting, conforme descrito a seguir. 2.4G2, por sua vez, é analisado, funcionalmente, por FACS (vide a seguir).

Figura 6. Coloração com Azul de Coomassie, mostrando A77 sob a forma de Fab, após digestão com pepsina e redução com cisteína

“Immunoblotting”: Foi realizado neste projeto, técnica de “immunoblotting”, a partir de células murinas sanguíneas, esplênicas e peritoneais, assim como a partir de células imortalizadas de rato (RBL – “rat basophilic leukemia”); estas últimas foram previamente transfectadas, no intuito de expressarem o hFc α R. Quando necessário, inicialmente, o material foi submetido à incubação, a temperatura ambiente, durante 10 minutos, em solução hipotônica, para lise de hemácias. Após isso, o material foi lavado com RPMI a 37°C (sem soro bovino fetal) e submetido à estimulação que se pretendia analisar ou diretamente lisado, no gelo, durante 20 minutos, através do uso de solução contendo 50mM HEPES pH 7,4, 50mM NaF, 50mM NaCl, 1mM Na₃VO₄, 30mM Na₄P₂O₇, 50U/ml aprotinin e 10 μ g/ml leupeptin (200 μ l de solução de lise/ 10⁶ células). O detergente a ser acrescentado variou, dependendo do objetivo. Os experimentos demonstrados neste trabalho foram realizados com NP-40 1% (Nonidet P40 Substitute, Fluka BioChemika, Switzerland) ou Triton 1%/SDS 0,1%. Foi realizada centrifugação a 15000rpm, 10min, a 4°C e aspirou-se o sobrenadante, ao qual foi acrescentado tampão de amostra (solução contendo Tris-HCl 1M pH6.8, glicerol, SDS e azul de bromofenol),

num volume igual ao mesmo. As amostras foram, então, aquecidas a 100°C, durante 5 minutos. As células RBL transfectadas foram utilizadas para prova funcional de anticorpos, pelo estímulo com A77 ou PY320.1, 10 µg/ml (incubação por 1 hora), antes de serem submetidas à lise.

As amostras foram submetidas, então, à migração em gel de SDS/PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecilsulfato de sódio (SDS, Bio-Rad laboratories, USA), persulfato de amônia 10%, Tris-HCl (Sigma) e N,N,N',N'-Tetrametil-etilenoamina (TEMED, Bio-Rad laboratories), sendo assim separadas por diferença de carga elétrica e identificadas pelo tamanho molecular característico, através da transferência das proteínas para membrana de PVDF (Millipore Co., USA), submersão com anticorpos específicos radiomarcados e auto-radiografia. Anticorpo de coelho anti-cadeia gamma de camundongo, assim como anticorpo anti-β-actina de camundongo e anti-fosfotirosina (4G10) de rato, foram, gentilmente, concedidos pelo Dr. Ulrich Blank, do nosso laboratório. Utilizamos como anticorpo secundário, anti-IgG de coelho, de rato ou de camundongo conjugadas à peroxidase, segundo necessário, seguidos de 5 minutos de incubação com kit de detecção “Supersignal Chemiluminescent Substrate” (PerbioScience, USA) (Figura 7).

Figura 7. “Immunoblotting” anti-fosfotirosina mostrando fosforilação de proteína de 65kDa, correspondente a Syk, após estimulação prévia de células RBL, transfectadas com o Fc α RI. Teste utilizado para análise funcional do anticorpo, após purificação. C- = controle negativo; C+ = controle positivo

Citometria de fluxo: Análise funcional do anticorpo 2.4G2, assim como de seu anticorpo controle, foram realizadas por citometria de fluxo. Células esplênicas de camundongo foram incubadas com IgG de coelho, no intuito de bloquear os receptores Fc inespecíficos, durante 20 minutos, numa concentração de 100 μ g/ml (10 μ l/tubo). Em seguida, foram acrescentados os anticorpos a serem testados, no mesmo volume e concentração e aguardou-se uma nova incubação, durante uma hora. A seguir, foram

realizadas três lavagens dos tubos, centrifugando-os com 2ml de solução de PBS/BSA4%/Azida0,1%. Ao “pellet” foi injetado 10µl/tubo de anticorpo de camundongo, anti-rato biotinilado (Southern Biotechnology, USA). Incubou-se, durante 40 minutos, novamente três lavagens e acrescentado Streptavidina-APC (Southern Technology, USA). Aguardaram-se 40 minutos, três lavagens, procedeu-se à lise das hemácias (FACS lysis solution, Becton & Dickinson, USA) e realizou-se a leitura dos tubos, através da passagem das células em aparelho FACS-Scalibur (Becton & Dickinson, USA) e análise com o “software” CellQuest (Figura 8).

Figura 8. Marcagem ao FACS do anticorpo controle usado nos experimentos, assim como de controle positivo e de amostra de 2.4G2, após purificação em coluna de DEAE

Os estudos de apoptose foram realizados pela marcação de esplenócitos e células mielóides peritoneais de camundongos KO-gamma, 24 horas pós-CLP, com Anexina V-APC (BD biosciences, USA) e iodeto de propídio, após lise das hemácias com solução hipotônica (8,3g NH₄Cl/ 1g NaHCO₃/1ml EDTA 100mM pH8 inicial/ qsp 1 litro) e bloqueio dos receptores inespecíficos com IgG de coelho. Os linfócitos B foram identificados por terceira marcação com anti CD-19-FITC (Becton & Dickinson, USA), enquanto as células mielóides peritoneais, por marcação com CD11b-FITC (Becton & Dickinson, USA). Trinta minutos antes da cirurgia, os camundongos receberam injeção intra-peritoneal de 400µg de 2.4G2 ou anticorpo controle. É descrito na literatura que dose intra-peritoneal de apenas 4µg/g de peso é suficiente para abolir, quase completamente, em camundongos, o “clearance” de partículas marcadas¹⁶².

Células peritoneais, pós-CLP, para caracterização da expressão de TLR-2, TLR-4, CR3 e PIR-A/B em camundongos selvagens e KO-gamma, foram obtidas por lavado peritoneal. Tais células foram bloqueadas com IgG de coelho (ICN biomedicals, USA), 10µg/ml, durante 40 minutos. A seguir, procedeu-se incubação com anticorpo de camundongo anti-TLR 2 (clone TL2.5), gentilmente cedido pelo Dr. Carsten J. Kirschning (Institut of Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, Munich, Germany)¹⁶³, anticorpo de rato anti-TLR 4 (Becton & Dickinson, USA) ou anticorpo de camundongo anti-PIR-A/B (Becton & Dickinson, USA), 100µg/ml, durante uma hora. Após duas lavagens com PBS/BSA1%/Azida 0,1%, iniciou-se incubação com segundo anticorpo (anti-camundongo biotinilado ou anti-rato-biotinilado – Southern Biotechnologies, USA), 10µg/ml, que dura 40 minutos. Por fim, lavaram-se novamente

as células duas vezes e, durante 30 minutos, procedeu-se a última incubação no gelo com Streptavidina-APC (Becton&Dickinson, USA), 10µg/ml. Todas as células, neste experimento, se mostraram CD 11b-FITC positivas. Marcagem para análise da expressão de CR3 (CD11b/CD18) foi realizada diretamente por marcagem com CD11b-FITC (Becton & Dickinson, USA).

Modelo de punção e ligadura cecal (CLP): O modelo de ligadura e punção cecal (CLP) foi, originariamente, descrito em ratos por Wichterman e colaboradores¹³⁷, sendo, posteriormente, validado em camundongos por Baker e colaboradores¹⁶⁴. No nosso estudo, foram utilizados camundongos com 8 a 10 semanas de idade, de ambos os sexos, fornecidos pelo biotério central da FMUSP e pelo biotério da Faculté de Médecine Xavier Bichat, Université Paris VI (Paris, França). Foram submetidos à cirurgia, camundongos de linhagens *Balb/c* e *C129* selvagens, assim como três diferentes camundongos geneticamente modificados, a saber: camundongos transgênicos para o hFcαR (CD89) de fundo *C57Bl/6* ou *Balb/c*; camundongos “knockout” -/- para a cadeia gamma dos FcR, de fundo misto *C129 X Balb/c* e um segundo grupo de camundongos transgênicos para o hFcαR de fundo *C57Bl/6*, que diferem do primeiro grupo, devido a uma mutação que substitui a arginina da posição 209 dessa proteína, por lisina, impedindo sua ligação à cadeia gamma e nomeado de camundongo *R209L*. Os camundongos “knockout” para a cadeia gamma, além disso, foram acasalados com camundongos selvagens de linhagem *C129*, dando origem a camundongos heterozigotos para esta cadeia. A transgenêse do hFcαR foi realizada sob controle do promotor do CD11b, resultando em uma expressão significativa em monócitos e macrófagos.

Para a realização de ligadura e punção cecal, os animais foram inicialmente anestesiados com cloridrato de quetamina (Ketalar®, Parker-Davis), 25mg/kg, e cloridrato de tiazina (Rompun®, Bayer), 10mg/kg, administrados por via intraperitoneal. A seguir, foram submetidos à laparotomia com incisão de aproximadamente 2 cm em linha mediana, o suficiente para se exteriorizar o ceco. Fezes do cólon ascendentes foram impelidas por compressão manual para o ceco, a fim de se encher ao máximo esta cavidade. Com fio de algodão 3.0, neste momento, realiza-se firme ligadura cecal, sem causar obstrução intestinal. Foram realizadas duas punções, distalmente à ligadura, com agulha 21 gauge, e o local foi comprimido no intuito de se testar a patência das punções. Por fim, o abdômen foi fechado por planos e os camundongos foram hidratados com 1 ml de solução salina, administrada por via subcutânea. Os camundongos foram mantidos, após o procedimento, em temperatura ambiente e receberam água e ração à vontade. Poucas horas após a cirurgia (6 a 12 horas), os animais já demonstraram sinais clínicos evidentes de infecção, tais como pêlos eriçados, prostração, vasoconstrição e má-perfusão de extremidades, além de tendência a se agruparem. Camundongos submetidos a cirurgias do tipo "sham" continuavam vivos (n=9), após sete dias do procedimento, o que demonstrou que a anestesia e o procedimento cirúrgico foram bem tolerados.

Técnica de PCR (Polymerase chain reaction): Os camundongos “knockout” foram acasalados de forma a não necessitarem de genotipagem (homozigotos entre si ou com selvagens). Os animais transgênicos, entretanto, foram sempre cruzados com

camundongos *C57Bl/6* selvagens, não havendo, assim, possibilidade de nascimento de homozigotos. As crias, neste último caso, heterozigotos ou selvagens, foram separadas pela técnica de PCR em dois grupos: transgênicos ou não. Segue a seguir, descrição de como realizamos a extração de DNA e PCR dos camundongos.

Extração do DNA - Foi realizada quando as crias completaram 4 semanas de idade. Fragmento da orelha do animal foi digerido em 30 µl de solução de proteinase K (Invitrogen, USA), diluída 1:100 em tampão (Tris 0.1M pH7.8, EDTA 0.005M, 0,5% SDS), durante duas horas a 56°C.

Técnica de PCR - Para a realização de PCR, foi calculado mix com volume final de 30µl. Compõem o mix: dNTPs 25mM (Invitrogen, Life Technologies, USA), Buffer 10x (Invitrogen, USA), MgCl₂ 50mM (Invitrogen,USA), os primers para FcαR em concentração 10mM (Gibco, USA), H₂O, DNA e Taq polymerase (Invitrogen, USA). A saber, a seqüência de bases dos primers é a seguinte:

5'-GGGGAATTCGACGCAAACAAGGCAGGGCGC-3'

5'-GGGGTCGACCTTGCAGACACTTGGTGTTCG-3'⁷⁷

Os tubos eppendorf contendo o mix foram, então, submetidos à polimerização em aparelho automatizado, com a seguinte sequência de ciclos: 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de, respectivamente, 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 62°C e 40 segundos a 72°C e, por fim, 5 minutos a 72°C. Enquanto isso, foi preparado gel de agarose 0,7% (Gibco, USA) em TBE (tampão com Tris, ácido bórico e EDTA), acrescido de 1µl de brometo de

etídio (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). O gel resultante foi colocado em cuba de eletroforese, sendo embebido em mais TBE, após solidificar. Finalizada a polimerização, cada mix foi acrescido de solução de amostra 6X (diluição 1:6), sendo aplicado 15µl do volume final de cada tubo nos poços do gel, com os controles positivo e negativo (H₂O), mais DNA ladder (3µl). Eletroforese foi iniciada a 90V, durante 40 minutos. O resultado foi visualizado mediante transiluminação do gel por raios ultravioleta (Figura 9).

Figura 9. PCR do FcαR (CD89), utilizado para identificação de camundongos transgênicos

Dosagem de citocinas: Oito horas após realização de CLP, quando os valores de citocinas pró-inflamatórias atingem seus valores máximos neste modelo^{165,166}, sangue dos camundongos foi coletado por punção ocular. Após 40 minutos em temperatura ambiente, o sangue foi centrifugado e o soro foi aspirado e estocado a -30°C. A seguir, tais animais foram sacrificados por deslocamento cervical, não sendo inclusos, portanto, nos experimentos de avaliação de sobrevida pós-CLP. Neste momento, foi realizada lavagem peritoneal, pela infusão de 2ml de PBS na cavidade abdominal, abertura de

orifício de 1,0cm na parede anterior do abdômen e aspiração com seringa. O lavado recuperado foi centrifugado e o sobrenadante, estocado a -30°C.

Através de técnica de Elisa-sanduíche, foram dosadas nessas amostras os níveis séricos de TNF α (R&D systems, USA) e IL-10 (kit doado pela Dra. Agnès Lehuen, Hôpital Saint-Vincent de Paul, Paris, França). O anticorpo primário foi diluído em solução de Borato e aguardou-se incubação, durante uma noite. No dia seguinte, realizaram-se três lavagens dos poços (placa de 96 poços) com solução de PBS/0,05% Tween 20 (Sigma, USA) e bloqueio com BSA1%, Sucrose 5% (Sigma, USA) em PBS com 0,05% de Azida. Após uma hora de bloqueio, lavaram-se novamente três vezes os poços e acrescentou-se as amostras (25 μ l de soro, diluído em mesmo volume de PBS/0,1%BSA; amostras em duplicata) e os controles. Incuba-se 2 horas, nova lavagem e acrescenta-se anticorpo secundário. Nova incubação de 2 horas, lavagens e acrescentado Streptavidina-AP (fosfatase alcalina) para as dosagens de IL-10 e Streptavidina conjugada a HRP – “horseradish-peroxidase” – para as dosagens de TNF α . Após 20 minutos, revelou-se a placa com solução de dietanolamina (Sigma, USA), MgCl₂, HCl e p-nitrofenilfosfato (Bio-Rad laboratories, USA) para as dosagens de IL-10 e tetrametilbenzidina, para as dosagens de TNF α . Interrompeu-se a reação após 20 minutos, adicionando-se HCL 1N e procedeu-se à leitura das placas, determinando-se a densidade óptica (405 nm para o protocolo de IL-10 e 450nm para o protocolo da R&D systems).

Pesquisa de opsoninas no soro de camundongos: Para sabermos se os camundongos usados nos nossos experimentos, de oito semanas de idade, já haviam desenvolvido uma resposta primária a bactérias e se já havia, portanto, a presença de opsoninas no seu sangue, incubamos uma amostra polimicrobiana de bactérias doadas pelo Laboratório de Microbiologia da Faculté de Médecine Xavier Bichat, com o soro desses camundongos (10% do volume total), durante 1 hora, a 37°C. Em seguida, lavadas as bactérias 3 vezes com RPMI (1500g, 10 minutos, 4°C), procedemos a nova incubação com 100µg/ml de anticorpo de rato anti-Ig de camundongo-FITC (Becton & Dickinson, USA). O resultado foi visualizado por microscopia fluorescente.

Fagocitose: Para os experimentos de fagocitose, camundongos selvagens e KO-gamma receberam injeção intra-peritoneal de Thioglicolato, conforme já descrito, no intuito de se produzir peritonite química e aumentar o número de neutrófilos na cavidade peritoneal. Os camundongos foram, posteriormente, sacrificados e submetidos à lavagem peritoneal com RPMI/5% soro bovino fetal. As células obtidas foram centrifugadas a 1300 rpm, 5 minutos, a 4°C, ressuspendidas num volume total de 1,0ml e contadas, ao microscópio, com auxílio de uma câmara de Malassez. Concomitantemente, *E. coli* conjugadas com Texas Red (Molecular Probes, USA) foram incubadas com anticorpos de coelho anti-E.coli (5×10^7 bactérias/ 10µl opsonina a 20mg/ml), num volume total de 20µl, durante 1 hora, a 37°C. Após esse período, as bactérias opsonizadas foram lavadas 3 vezes com RPMI/5% soro bovino fetal, a 1500g, 10 minutos, a 4°C, para se retirar o excesso de opsonina¹⁴⁷. Procedeu-se, então, à incubação das células obtidas por lavagem peritoneal (população celular confirmada por

cytopspin, seguido de coloração de May-Grunwald/Giemsa), em contato com as bactérias opsonizadas, durante 30 minutos, a 37°C. Ao final desse período, as células foram lavadas 3 vezes e incubadas durante 30 minutos, no gelo, com CD11b-FITC (Becton&Dickinson, USA), para que a membrana dos fagócitos pudesse ser visualizada e, dessa forma, certificar-se a presença de bactérias no interior das células. Por fim, lâminas contendo tais células foram aderidas a uma lamínula, por meio de Vecta Shield (Vector Laboratories, USA). Através dessa metodologia, comparamos a capacidade fagocítica de células de camundongos selvagens, quando incubadas com bactérias opsonizadas ou não, assim como células de camundongos KO-gamma deficientes. O resultado foi analisado por microscopia confocal. Fagocitose de *S. Aureus* Alexa Fluor 594 e *Zymosan* Texas Red foi avaliada de maneira idêntica (Molecular Probes Fluorescent Particles and Opsonizing Reagents, USA).

“Killing” intracelular: Para se analisar a capacidade de uma célula de matar um agente, depois de fagocitá-lo, realizamos experimentos de “killing” intracelular. Neutrófilos ou macrófagos foram obtidos, igualmente, através de peritonite química com thioglicolato. Bactérias vivas, cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Faculté de Médecine Xavier Bichat, foram opsonizadas ou não, e incubadas com células de camundongos selvagens ou KO-deficientes a 37°C, durante 30 minutos, em tubos eppendorf num volume total de 10 a 20µl. A seguir, o material foi submetido à centrifugação diferencial (110g, 4minutos, 4°C)¹⁶⁷, através da qual as células foram impelidas para o fundo do tubo, mas as bactérias não fagocitadas permaneceram no sobrenadante. O sobrenadante foi aspirado e separado para análise. O experimento deve ser realizado em duplicata. As

células foram, então, reincubadas a 37°C, durante 1 hora, com gentamicina a 100µg/ml (Panpharma, França)¹⁶⁸, para matar todas as bactérias que restaram no exterior das células. Após tal passo, as células de uma das duplicatas de cada grupo (células selvagens opsonizadas, selvagens não-opsonizadas e KO-deficientes, assim como os controles do experimento) foram lisadas através de incubação com Triton 0,5% (Sigma, USA)¹⁴⁸, durante 10 minutos, no gelo. O material foi ressuspendido em 1,0ml e separado para análise. O segundo grupo de células foi ressubmetido a incubação a 37°C, durante 30 minutos, sendo somente, então, lisado. O sobrenadante inicial, assim como o conteúdo intracelular do lisado de ambos os grupos foram, então, cultivados em meio de cultura específico em diferentes diluições. Cinéticas mais prolongadas foram, igualmente, realizadas.

O valor que melhor reflete o “killing” intracelular é a diferença existente entre o primeiro e o segundo lisado, já que no primeiro, logo após o ensaio de fagocitose, os valores são um reflexo tanto da capacidade fagocítica da célula, quanto do seu poder de “killing”. No segundo grupo, entretanto, não há mais bactérias extra-celulares durante a segunda incubação e o único mecanismo em ação é o “killing” intracelular^{167,169-174}.

Hemoculturas e cultura de lavados peritoneais: Os camundongos foram submetidos a CLP e, 24 após, sangue e lavado peritoneal foram coletados, sob fluxo laminar, com material estéril. Controles negativos, usando animais não submetidos a CLP, mostrou que tal técnica de coleta é fidedigna e isenta de contaminações. O material foi, subsequentemente, submetido a incubação em diferentes meios de cultura, específicos para diferentes bactérias, assim como em diferentes diluições, no caso dos lavados

peritoneais. Como o sangue, coletado por punção ocular, foi incubado em frascos fechados a vacuo (BD Bactec Plus aerobic/F e Plus anaerobic/F, Becton & Dickinson, USA), não foi possível, nesse caso, análise quantitativa.

5. Resultados

Camundongos deficientes em cadeia gamma, tanto homozigotos quanto heterozigotos, apresentam maior sobrevida, quando submetidos a ligadura e punção cecal (CLP), comparativamente a controles *C129* selvagens. Apesar da diferença não ser significativa existe, além disso, uma tendência dos heterozigotos a sobreviverem mais ($p=0,10$), quando comparados aos homozigotos (Figura 10).

Figura 10. Curva de mortalidade, após CLP, de camundongos “knockout” para a cadeia gamma, homozigotos (-/-) e heterozigotos (+/-), assim como dos seus controles selvagens (“wild-type”).

“Imunoblotting” da cadeia gamma, a partir de células sanguíneas (B), esplênicas (S) e macrófagos peritoneais (MØ), demonstrou que a expressão da cadeia gamma está completamente abolida nos homozigotos e significativamente diminuída nos heterozigotos (Figura 11).

Figura 11. “Immunoblotting”, mostrando expressão da cadeia gamma nos homozigotos (-/-), heterozigotos (+/-) e selvagens (wt).

Dosagem de TNF α no soro dos camundongos, assim como no lavado peritoneal, oito horas após CLP, mostrou que tanto os homozigotos quanto os heterozigotos secretam níveis significativamente reduzidos dessa citocina, com relação aos selvagens. Dosagens semelhantes de IL-10, entretanto, não demonstraram diferença entre os grupos (Figura 12).

Figura 12. Dosagens de TNF α no soro (A) e lavado peritoneal (B) de camundongos γ -KO $-/-$, $+/-$ e selvagens, oito horas pós-CLP. Dosagens de IL-10 no soro (C) e lavado peritoneal (D), nas mesmas condições

No intuito de se descartar que os resultados acima demonstrados, tanto de mortalidade, quanto de citocinas, não ocorreram devido a uma maior ativação do Fc γ RII, já que este é o único receptor de IgG cuja expressão não depende da cadeia gamma e na ausência dos outros receptores ele estaria exposto a maior co-agregação, nós decidimos inibir a ligação de IgG a este receptor, nos camundongos KO homozigotos, através da administração de um anticorpo monoclonal anti-Fc γ RII/III, conhecido como 2.4G2.

A partir desta estratégia, acompanhamos a mortalidade e dosamos os valores de TNF α de camundongos KO homozigotos que receberam, antes de serem submetidos a CLP, injeção intra-peritoneal de 2.4G2 ou de um anticorpo controle irrelevante. Não houve diferença de mortalidade, nem nos valores de TNF α entre os grupos, comprovando que o efeito protetor é diretamente relacionado a uma diminuição na expressão da cadeia gamma (Figuras 13 e 14).

Figura 13. Curva de mortalidade de camundongos KO-gamma homozigotos, submetidos a CLP (agulha 21gauge), realizada 30 minutos após injeção intra-peritoneal de 400 μ g de 2.4G2 ou anticorpo controle (CA)

Figura 14. Dosagens de TNF α de camundongos KO-gamma homozigotos submetidos a CLP (agulha 21 gauge), 30 minutos após injeção intraperitoneal de 400 μ g de 2.4G2 ou anticorpo controle (CA). O soro e o lavado foram colhidos 8 horas após a cirurgia

Para confirmarmos os resultados com 2.4G2, as curvas de mortalidade e as dosagens de TNF α foram repetidas com dose diferente deste anticorpo monoclonal, assim como com aumento no diâmetro da punção cecal, através do uso de agulha de maior calibre, o que ocasiona infecção mais severa. Em ambos os casos, não houve diferença entre os resultados do grupo que recebeu 2.4G2 e o grupo que recebeu anticorpo-controle (dados não-mostrados).

Após comprovarmos que a cadeia gamma é a responsável pela menor mortalidade dos KO-gamma, assim como pelos menores níveis de TNF α em comparação a camundongos selvagens, excluindo, assim, a possibilidade de um viés,

induzido por uma possível maior agregação do FcγRII, decidimos realizar um último experimento com 2.4G2.

Conforme já discutido, apoptose é um achado freqüente e pouco compreendido em sepse. Sabe-se que a co-agregação do FcγRII é capaz de induzir apoptose de linfócitos B. Este sinal, entretanto, ocorre somente quando há multi-agregação, induzida por imunocomplexos. Co-agregação dimérica deste receptor é insuficiente para a indução deste tipo de resposta. Tal mecanismo foi descrito, originariamente *in vitro*, e comprovado em modelos animais de melanoma¹⁷⁵, mostrando redução do tumor, quando se estimula esse tipo de resposta. A existência e importância deste fenômeno nunca foram estudadas em sepse e podem explicar em parte os achados de apoptose, característicos desta doença.

Desta forma, injetamos 400μg de 2.4G2 ou anticorpo controle em camundongos KO-gamma homozigotos e, após 30 minutos, induzimos punção e ligadura cecal (agulha 18 gauge). Tal estratégia já havia mostrado não levar a alteração de mortalidade entre os grupos (Figura 13), nem a alteração nas dosagens de TNFα (Figura 14). Desta vez, entretanto, sacrificamos os camundongos 24 horas após CLP e uma marcagem com Anexina-V (Becton&Dickinson, USA), propídio de iodo (Becton&Dickinson, USA) e anticorpo anti-CD19 (Becton& Dickinson, USA) foi realizada nas células do baço destes animais, tendo como objetivo a análise das diferenças de apoptose, induzida por sepse, nos linfócitos B desses dois grupos.

Utilizamos camundongos KO-gamma para esses experimentos, porque em camundongos selvagens o 2.4G2 se liga ao Fc γ RIII, além de se ligar ao Fc γ RII, o que inviabilizaria nossos objetivos. Entretanto, o Fc γ RIII não é expresso pelos camundongos KO-gamma, tornando o 2.4G2, neste caso, específico para o Fc γ RII.

Camundongos que receberam anticorpo controle, antes de serem submetidos a CLP, apresentaram níveis significativamente maiores de apoptose de linfócitos B, caracterizada por citometria de fluxo, com marcagem triplo-positiva. Portanto, confirmando o que já tinha sido caracterizado *in vitro*, demonstramos que multi-agregação induzida por imunocomplexos, promove apoptose de linfócitos B, Fc γ RII-mediada. Administração de 2.4G2 inibe esse sinal, porque induz dimerização desse receptor, impedindo assim multi-agregação pelos imunocomplexos (Figura 15). Tal mecanismo nunca antes havia sido sugerido em sepse. Como este achado de apoptose não tem correlação direta com os achados sobre cadeia gamma, que tornaram-se o eixo principal da minha tese, resolvemos não nos estendermos neste assunto, para o texto deste trabalho se apresentar linear e o mais claro possível. Desta forma, tecerei apenas alguns comentários sobre a importância dos achados de apoptose em sepse, no capítulo Discussão, mas a exposição completa e mais abrangente deste assunto se encontrará no final desta tese (vide Anexo I), na forma de artigo submetido à revista *Shock*.

Figura 15. Tripla marcagem de membrana (anexina-V, iodeto de propídio e anti-CD19), analisada por citometria de fluxo e mostrando maior número de células apoptóticas 24 horas pós-CLP (quadrante superior direito – UR), no grupo que previamente à cirurgia recebeu anticorpo controle (B) do que no grupo que recebeu 2.4G2 (D). A, controle sham do grupo controle; C, controle sham do grupo 2.4G2.

Paralelamente a este estudo sobre o papel do FcγRII na indução de apoptose em sepse, continuamos os experimentos sobre a cadeia gamma, na intenção de encontrar o mecanismo responsável pela proteção conferida aos camundongos KO-gamma, quando submetidos a CLP.

Para avaliar a hipótese de que os camundongos já haviam tido, espontaneamente, contato com os microrganismos da flora intestinal, previamente à indução de peritonite, já que as diferenças de TNF α foram obtidas, precocemente, após a cirurgia, o que tornava provável o desenvolvimento prévio de uma resposta primária, nós incubamos soro de camundongos saudáveis (vide Métodos) com uma amostra polimicrobiana de bactérias, isolada da hemocultura de camundongos sépticos, 24 horas pós-CLP. Logo a seguir, tais bactérias opsonizadas foram incubadas com IgG de rato anti-Ig de camundongo, marcada com FITC, e o resultado foi observado ao microscópio por fluorescência (Figura 16). Bactérias opsonizadas foram visualizadas por fluorescência, enquanto as bactérias não-opsonizadas não apresentaram marcagem positiva.

Figura 16. À esquerda, Bactérias identificadas por IgG anti-Ig de camundongo conjugada a fluoresceína (FITC), após incubação dos microrganismos com soro de camundongo saudável. À direita, bactérias submetidas ao mesmo procedimento, porém não-submetidas à incubação prévia com soro de camundongo saudável, não podem ser visualizadas, já que neste caso, deixam de ser recobertas por opsoninas, que se ligam às IgG anti-Ig de camundongo-FITC

A seguir, analisamos a população celular existente na cavidade peritoneal dos camundongos, para saber se existia ou não, diferenças quantitativas ou qualitativas entre os KO-gamma e os camundongos selvagens.

Ao realizarmos lavagem peritoneal nos camundongos KO-gamma e selvagens, antes de qualquer intervenção, constatamos que todos apresentavam, aproximadamente, 2 milhões de células na cavidade peritoneal (n=3 camundongos por grupo).

Entretanto, os camundongos KO-gamma homozigotos apresentaram um número total bastante inferior de células na cavidade peritoneal, 24 horas pós-CLP (n=3 camundongos por grupo). Todos os grupos apresentaram predomínio de neutrófilos neste momento (Coloração de May-Grunwald/Giemsa.vide abaixo, Figura 17).

Figura 17. A, “Wild-type” (selvagem) pós-CLP: $18,73 \pm 4,87 \times 10^6$ células
B, KO-gamma heterozigoto pós-CLP: $15,90 \pm 0,36 \times 10^6$ células
C, KO-gamma homozigoto pós-CLP: $9,73 \pm 0,81 \times 10^6$ células

Para sabermos se existia ou não, diferença no agente causador de sepse, entre os diferentes grupos de camundongos em estudo, realizamos hemoculturas 24 horas pós-CLP. Para nossa surpresa, enquanto *E. Coli* foi o único agente isolado na grande maioria das hemoculturas dos camundongos selvagens, as hemoculturas dos camundongos KO-gamma se mostraram positivas para inúmeros patógenos, inclusive *E. Coli*, não havendo, porém, um germe predominante (Tabela 1). Coproculturas realizadas em camundongos selvagens e KO-gamma saudáveis, demonstraram que todos tinham a mesma quantidade de *E. Coli* nas fezes (10^6 microrganismos/grama).

Resultado das hemoculturas			
Camundongo	<i>E.coli</i>	Polimicrobianas	Mortos
Selvagem (n=10)	7	2	1
KO+/- (n=10)	1	9	0
KO-/- (n=10)	1	9	0

Tabela 1. Resultado das hemoculturas de camundongos selvagens e deficientes em cadeia gamma (homozigotos), 24 horas pós-CLP

O crescimento apenas de *E. Coli* nas hemoculturas dos selvagens, mostrou-nos que a cadeia gamma estaria, de alguma forma, favorecendo o crescimento deste microrganismo em detrimento dos demais. Através da incubação de *E. Coli* marcadas com fluorescência Texas Red e neutrófilos de camundongos selvagem ou KO-gamma, procedemos, então, a um experimento de fagocitose, analisado, mediante microscopia confocal. Contrário ao que esperávamos, os neutrófilos dos camundongos deficientes para a cadeia gamma fagocitaram *E. coli* muito mais vigorosamente do que os

neutrófilos provenientes de camundongos selvagens (Figura 18). Apesar do predomínio de neutrófilos, cabe comentar que o lavado peritoneal após a peritonite inflamatória induzida com thioglicollato, para a obtenção de células utilizadas em vários experimentos, também apresentada pequena quantidade de macrófagos e linfócitos. Desta forma, muitas vezes preferimos empregar o termo células peritoneais, por ser mais abrangente. A metodologia de injeção de thioglicollato para obtenção de macrófagos, semelhantemente, também recupera pequena quantidade de outros tipos celulares.

Realizamos, além disso, cultura de lavado peritoneal dos camundongos selvagens e deficientes em cadeia gamma, 24 horas após CLP, e detectamos uma menor quantidade de *E. coli*, assim como uma menor quantidade total de bactérias, além de uma nítida tendência a uma menor quantidade de Enterococos, na cultura dos camundongos deficientes em cadeia gamma, com relação aos camundongos selvagens (10 camundongos por grupo) (Figura 19).

Figura 19. Número total de bactérias quantificadas no lavado peritoneal de camundongos selvagens e deficientes para cadeia gamma (homozigotos), assim como quantificação do número de *E. coli* e enterococos, 24 horas pós-CLP

Para sabermos se as bactérias fagocitadas pelas células KO-gamma deficientes são, além de ingeridas mais vorazmente, mortas de forma mais eficaz do que pelos camundongos selvagens ou se, ao contrário, elas permanecem vivas dentro da célula por um período mais prolongado, realizamos experimentos de “killing” intracelular. Neutrófilos e macrófagos dos camundongos deficientes para cadeia gamma mostraram-se igualmente eficazes aos selvagens, quanto à capacidade de matar bactérias no meio intra-celular (Figura 20).

Figura 20. “Killing intracelular” de neutrófilos (à esquerda) e macrófagos (à direita) peritoneais de camundongos selvagens e KO-gamma, na presença e ausência de opsoninas

Repetimos os experimentos de fagocitose, incubando as células desta vez com *Staphylococcus aureus* e *zymosan*, para sabermos se o aumento da capacidade fagocítica dos camundongos deficientes em cadeia gamma se estendia, igualmente, para bactérias gram-positivas e fungos, haja visto a tendência apresentada pelos enterococos. Fagocitose aumentada de *S. aureus*, porém, de maneira bem menos pronunciada do que o observado para *E. coli*, foi visualizada pelas células peritoneais deficientes em cadeia gamma. Não observamos nenhuma diferença, quando avaliamos a fagocitose de *zymosan* (experimentos repetidos duas vezes com resultados semelhantes, Figuras 21 e 22).

Figura 21. Fagocitose de *S. Aureus* por células peritoneais de camundongos selvagens (2A, sem opsonina; 2B, opsonisadas) e deficientes em cadeia gamma (2C, sem opsoninas; 2D, opsonisadas)

Figura 22. Fagocitose de *zymosan* por células peritoneais de camundongos selvagens (3A, sem opsonina; 3B, opsonisadas) e deficientes em cadeia gamma (3C, sem opsoninas; 3D, opsonisadas)

A única explicação para explicar o fato das células deficientes em cadeia gamma fagocitarem bactérias mais vorazmente e matarem-nas no meio intra-celular de uma maneira igualmente eficaz, nos parece ser que tal proteína INIBE alguma outra que, em sua ausência, pode agir determinando esse tipo de resposta. A primeira família de proteínas, cuja atividade julgamos que poderia estar sendo inibida pela cadeia gamma,

por seu importante papel em sepse e sua conhecida atividade na internalização de bactérias, foram os receptores “Toll-like”.

Desta forma, analisamos a expressão de TLR 2 e de TLR 4, antes e 24 horas pós-CLP, em células de lavado peritoneal de camundongos selvagens e KO-gamma. Em ambos os tipos celulares, ocorre uma queda brusca do receptor.

Não encontramos diferença de TLR 4 entre selvagens e KO-gamma pós-CLP (vide abaixo). Todas as células eram CD11b-positivas (Figura 23).

Figura 23. Expressão de TLR 4 em camundongos saudáveis e 24h após punção e ligadura cecal. Oito camundongos por grupo ($p = 0,24$)

No que se refere ao TLR 2, apesar da expressão dos KO-gamma ser um pouco menor após CLP, a diferença não nos pareceu evidente e decidimos continuar procurando, portanto, outras respostas (Figura 24).

Figura 24. Expressão de TLR 2 em células peritoneais de camundongos selvagens (WT) e KO-gamma. Oito camundongos por grupo ($p=0,046$)

Analisamos, igualmente, a expressão de CR3, outro receptor importante no processo de fagocitose de bactérias e também não encontramos uma expressão aumentada nos camundongos “knockout” para a cadeia gamma (Figura 25).

Figura 25. Expressão de CR3 em células peritoneais de camundongos selvagens e KO-gamma. Cinco camundongos por grupo, com resultados semelhantes

Continuando a investigação dos mecanismos responsáveis pela inibição da fagocitose induzida pela cadeia gamma, na tentativa de encontrar a qual receptor ela estaria associada, induzindo esse tipo de inibição deletéria em camundongos selvagens, realizamos a análise da expressão de PIR-A/B, um receptor associado à cadeia gamma e expresso por células mielóides murinas, para sabermos se este receptor é ativado, durante um processo infeccioso. A expressão de PIR caiu pela metade, após CLP (figura 26).

Figura 26. Expressão de PIR-A/B em células peritoneais de camundongos selvagens antes e após CLP. Cinco camundongos por grupo com resultados semelhantes.

Começamos, a seguir, análises de “immunobloting”. Lisado total de camundongos deficientes em cadeia gamma demonstrou fosforilação constitutiva de diversas proteínas, fato ausente no lisado total de camundongos selvagens (Figura 27).

Figura 27. “Immunobloting” de lisado total de células peritoneais de camundongos selvagens e deficientes em cadeia gamma, obtidas por peritonite química (conforme descrito em Material e Métodos), antes e após estímulo com *E. coli*

Estudos de imunoprecipitação estão em curso, mas não houve tempo hábil para serem incluídos nesta tese. Sinalização intra-celular está sendo estudada.

Por fim, intrigava-nos a possibilidade dessa resposta inibitória em sepse também poder ser deflagrada pelo receptor de IgA (CD89), um receptor que se associa à cadeia gamma e, sabidamente, capaz de induzir resposta inibitória, porém sem homólogo murino. Decidimos, então, investigar se a transgênese desse receptor em camundongos, alteraria, igualmente, o curso da infecção e do processo de fagocitose, induzido pelo modelo de ligadura e punção cecal (CLP), já que havia publicação recentemente do nosso laboratório, mostrando que a fagocitose de *E. coli* por monócitos humanos,

mediada por IgG, era inibida por estímulo com A77, um anticorpo monoclonal anti-FcR α (vide Discussão). Através do uso de camundongos transgênicos, desta forma, estudamos se *in vivo*, o FcR α seria capaz de induzir resposta semelhante à que encontramos em camundongos selvagens sépticos, mediada por um receptor desconhecido, mas igualmente associado à cadeia gamma.

Iniciamos estes estudos, realizando CLP em camundongos transgênicos para o CD89 e de fundo genético *Balb/c*, e comparamos a mortalidade desses animais a camundongos *Balb/c* selvagens. Não foi observada diferença de mortalidade entre os grupos (Figura 28).

Figura 28. Comparação entre a mortalidade de camundongos transgênicos para o CD89 de fundo *Balb/c* e seus controles selvagens

Repetimos o mesmo experimento, agora sob fundo genético *C57/Bl6*. Não foi observada diferença de mortalidade entre os grupos (Figura 29).

Figura 29. Comparação entre a mortalidade de camundongos transgênicos para o CD89 de fundo *C57Bl/6* e seus controles selvagens

Repetimos a curva de mortalidade sob fundo genético *C57/Bl6*, mas, desta vez, injetamos nos camundongos transgênicos, 30 minutos e 24 horas pós-CLP, 100µg de A77 (anti-FcαRI) ou 320 (anticorpo-controle), por via intra-peritoneal. Os camundongos selvagens receberam apenas 320. Não foi observada diferença entre os grupos. Incluímos, além disso, um novo grupo constituído por camundongos *R209L*, que são igualmente transgênicos para o FcαRI, mas apresentam mutação em tal receptor,

impedindo sua associação à cadeia gamma, conforme já discutido em Métodos (Figura 30).

Figura 30. Curva de mortalidade de camundongos transgênicos para o CD89, *R209L* e seus controles selvagens, após injeção de 100µg de A77 ou 320, conforme a legenda

Realizamos, em seguida, dosagens de TNF α no soro e no lavado peritoneal, 8 horas após CLP, na tentativa de encontrar diferença de resposta inflamatória, entre

camundongos transgênicos para o Fc α RI e seus controles selvagens. Neste estudo, entretanto, 30 minutos antes da cirurgia foi injetado intra-peritonealmente 100 μ g de A77 ou 320, no grupo constituído pelos animais transgênicos para o CD89, na tentativa de se ativar esse receptor e ressaltar uma possível diferença. Não foi observada diferença entre os grupos (Figura 31).

Figura 31. Dosagens de TNF α no soro (figura à esquerda) e lavado peritoneal (figura à direita) de camundongos transgênicos para o CD89 (fundo *C57Bl/6*) e seus controles selvagens, 8 horas após CLP, realizada 30 minutos após injeção de 100 μ g de A77 ou 320. tg = transgênico; wt = selvagem

Em seguida, para descartarmos a idéia de que não estávamos trabalhando com uma dose insuficiente de anticorpos monoclonais, resolvemos injetar 100 μ g de A77 ou 320 nos camundongos após CLP, todos os dias, durante 7 dias. Novamente, não foi observada diferença de mortalidade entre os grupos (Figura 32).

Figura 32. Curva de mortalidade de camundongos selvagens e transgênicos para o CD89 após CLP, submetidos à injeção diária de 100µg de A77 ou 320

A curva de mortalidade e as dosagens de TNF α 8 horas pós-CLP, igualmente, também não apresentaram diferença entre os grupos, quando as doses de A77 e 320 foram administradas 48, 24 e 12 horas antes da cirurgia (Figuras 33 e 34).

Figura 33. Curva de mortalidade de camundongos selvagens e transgênicos para o CD89 após CLP, submetidos à injeção de 100µg de A77 ou anticorpo controle (320.1), 48, 24 e 12 horas antes da cirurgia

Figura 34. Dosagem sérica (à esquerda) e nos fluidos peritoneais (à direita) de camundongos selvagens e transgênicos para o CD89 após CLP, submetidos a injeção de 100µg de A77 ou anticorpo controle (320.1), 48, 24 e 12 horas antes da cirurgia

6. Discussão

Quando este projeto foi iniciado, partimos do objetivo de tentar compreender a importância da cadeia gamma dos receptores Fc e dos receptores de IgG e de IgA em sepse. Como foi detalhado, usamos como estratégia principal a indução desta doença em camundongos transgênicos para o hFc α RI e “knockout” para a cadeia gamma dos FcR. Desde o início, quando comecei a compreender um pouco mais sobre a importância de tais receptores, surpreendi-me com a pobreza de informações na literatura sobre tais receptores e a desvalorização do seu papel em infecções bacterianas, já que sua função primordial é a de otimizar a defesa imune, ligando anticorpos e, desta forma, reconhecer antígenos, dentre os quais se incluem não sem destaque, as mais diversas bactérias.

Sepse continua uma doença extremamente pouco compreendida e vista como decorrente de uma desregulação severa e caótica da resposta inflamatória. Apesar da severidade, tendo a acreditar que esse desequilíbrio deve ainda ter sua lógica. Os resultados deste trabalho desvendam um pouco os erros de interpretação do sistema imune, deixando-se enganar pelo agente invasor. Talvez a dissecação de inúmeros mecanismos que devem, certamente, se entrelaçar, possibilite, no futuro, a compreensão aprofundada dos mecanismos de defesa imune frente a uma bactéria, controle da infecção e retorno à homeostase. Acredito ainda, que a cadeia gamma, devido à sua amplitude de respostas, assim como devido aos resultados apresentados, mereça atenção concentrada, por oferecer grandes perspectivas de manejo em sepse.

Os experimentos de fagocitose, realizados neste projeto, demonstraram uma capacidade surpreendente dos neutrófilos deficientes em cadeia gamma de ingerirem *E. coli*. Sabe-se que fagocitose é um processo ativo e complexo, acompanhado de sinalização intracelular que deflagra processos diversos, tais como rearranjo do

citoesqueleto, alterações no tráfego de membrana, ativação de mecanismos de morte intracelular, produção de quimiocinas e citocinas pró e anti-inflamatórias, apoptose, assim como produção de moléculas necessárias para uma apresentação antigênica eficaz¹⁷⁶ (Figura 35). Internalização de partículas opsonizadas com IgG é caracterizada por extensão da membrana ao redor destas, produção de mediadores pró-inflamatórios e requer syk. Ao contrário, fagocitose de partículas opsonizadas com complemento não requer syk e não costuma ser acompanhada de produção de mediadores inflamatórios. As vias de sinalização de fagocitose estimuladas por syk não são claramente compreendidas. Diversas moléculas, entretanto, têm sido implicadas nestas vias e serão discutidas mais adiante.

Figura 35. Receptores e sinais envolvidos na fagocitose de microrganismos. Adaptado de Underhill DM e Ozinski A. Phagocytosis of microbes: Complexity in action. *Ann Rev Immunol*, 2002

Apesar do interesse particular, neste trabalho, pelas funções deflagradas pelos receptores Fc, diversos receptores reconhecem bactérias e fagocitose, usualmente, é um processo mediado simultaneamente por diversos deles. Microrganismos patogênicos, por outro lado, desenvolveram diversos mecanismos para reduzir a eficácia da fagocitose e morte intracelular¹⁷⁷.

Dentre os receptores que participam do processo de fagocitose, os Fc γ Rs, particularmente, apresentam um receptor inibitório, o Fc γ RIIb, que quando co-agregado a um receptor ativatório, particularmente o Fc γ RIIa, inibe fagocitose mediada por este^{178,179}. Além deste receptor, praticamente nada mais existe na literatura sobre receptores inibitórios do processo de fagocitose e, desta forma, a regulação negativa deste mecanismo imune é, pobremente, compreendida. SIRP α , um receptor abundante em macrófagos e cujo ligante é o CD47, presente em hemácias, foi recentemente descrito como capaz de inibir a fagocitose destas células^{180,181}. Além disso, peptídeos fosforilados derivados de motivos ITAM's, provenientes da cadeia gamma dos receptores Fc, interagiram *in vitro* com SHIP, mostrando que esses motivos, em determinadas condições, podem recrutar também fosfatases^{182,183}.

Receptores do complemento que têm capacidade fagocítica incluem o CR1, expresso em eritrócitos, células B, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e células dendríticas; CR3 ($\alpha_M\beta_2$ integrina, CD11b/CD18 ou Mac-1), encontrado em monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e NK; e o CR4 ($\alpha_X\beta_2$ integrina, CD11c/CD18 ou gp150/95), que não está ainda tão bem caracterizado. CR1 liga C1q, C4b, C3b e lecitinas que se ligam ao receptor de manose. CR1 não é capaz de internalizar partículas, sem um sinal adicional e estimula fagocitose receptor Fc-mediada. As integrinas CR3 e CR4, igualmente, necessitam de sinal acessório. Citocinas inflamatórias, produtos microbianos e fibronectina são sinais acessórios para o CR3.

Receptores de “scavengers” ligam lipoproteínas modificadas, como LDL acetilado, LPS e partículas de sílica. O receptor de “scavengers” A (SR-A), é capaz de reconhecer bactérias, assim como alguns de seus fragmentos (LPS e ácido lipoteicoico).

É expresso em macrófagos. MARCO (“macrophage receptor with collagenous structure”)¹⁸⁴ é outro receptor de “scavengers” que reconhece bactérias, incluindo germes gram-negativos e gram-positivos. Seu ligante permanece desconhecido. Acredita-se que os receptores de “scavengers” necessitam de co-receptores para mediar a internalização.

Dentre as lecitinas, diversas são expressas pelos fagócitos de mamíferos, no intuito de diferenciar carboidratos próprios de carboidratos estranhos. Os receptores de manose (que reconhece α -mannan) e dectina-1 (que reconhece β -glucan), por exemplo, reconhecem *zymosan*, uma partícula da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, que é constituída basicamente de α -mannan e β -glucan. O receptor de manose é expresso em macrófagos e células dendríticas. Dectina-1 é expressa amplamente por células mielóides. CR3 também reconhece *zymosan*.

Fibronectina e vitronectina podem opsonizar patógenos e debris celulares. Fagócitos reconhecem essas partículas, através das integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$. Além disso, $\alpha_v\beta_3$ se associa ao CD47, cujo ligante é SIRP α , e inibe fagocitose receptor Fc e complemento-mediada. Assim, $\alpha_v\beta_3$ pode participar, tanto em respostas inflamatórias, quanto anti-inflamatórias.

Dezenas de moléculas são ativadas durante a fagocitose de partículas complexas, como bactérias opsonizadas, e devem contribuir para uma eficiente internalização. Fosfoinositídeo 3-quinase (PI 3-quinase), fofolipase C (PLC), Rho GTPases e PKC são pontos de integração para a regulação da fagocitose. Além disso, essas moléculas regulam ainda a resposta inflamatória e os mecanismos de “killing” intracelular (Figura 36).

Entre os segundo mensageiros que agem, após agregação de receptores Fc, um aumento na concentração citosólica de cálcio tem sido considerado relevante para fagocitose. Fagocitose independente de cálcio, por outro lado, é descrita como uma propriedade dos receptores associados à cadeia gamma¹⁸⁵. Sua função, de qualquer forma, é associada à depolimerização da actina ao redor dos fagossomos.

PI 3-quinase catalisa a fosforilação de PI(4,5)P₂ em PI(3,4,5)P₃¹⁸⁶, um fosfolipídio importante no recrutamento de moléculas sinalizadoras como AKT, para regiões específicas da membrana. Inibição de PI 3-quinase bloqueia fagocitose de partículas opsonizadas com IgG ou complemento, assim como *zymosan* e bactérias. PI 3-quinase age, bloqueando a extensão e fusão da membrana. Os produtos da PI 3-quinase podem ativar algumas isoformas de PKC. A principal função da PI 3-quinase, durante fagocitose, parece ser na extensão de pseudópodes, necessária para a internalização de partículas. Além disso, a PI 3-quinase deve também regular fagocitose, através da ativação de ERK.

PLC cliva PI(4,5)P₂, resultando na liberação de IP₃ e di-acil-glicerol (DAG), segundo-mensageiros que mobilizam cálcio intracelular e ativam membros da família da proteino-quinase C (PKC). Ativação da PLCγ tem sido relatada, após agregação de FcRs. PLC é recrutada para fagossomos, contendo partículas IgG-opsonizadas e sua inibição bloqueia a internalização destas partículas. Inibição da PLC ou da PKC inibe a formação de fragmentos de actina, no local de contato da partícula. PI 3-quinase e PLC, além disso, estão implicadas na indução de resposta inflamatória. Inibidores da PKC inibem internalização de partículas opsonizadas por IgG ou complemento, assim como *zymosan* não-opsonizado. PKC também é necessária para a produção de citocinas e

ativação de mecanismos de “killing” microbiano. O papel das diferentes isoformas de PKC, entretanto, permanece indefinido. ERK tem sido descrita como uma importante reguladora de fagocitose. PKC deve regular fagocitose, através da ativação de ERK e algumas isoformas de PLA2 (fosfolipase A2).

Diversas PLAs têm sido relacionadas ao processo de fagocitose. PLA2 medeia liberação de ácido araquidônico de fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina. O ácido araquidônico pode ser metabolizado em mediadores pró-inflamatórios pelas vias da cicloxigenase e lipoxigenase, mas inibição dessas vias não afeta fagocitose. PLA2 deve regular fagocitose, portanto, através do ácido araquidônico (AA), e não dos seus metabólitos. O modo como o ácido araquidônico participa nesse processo é desconhecido, mas postula-se que seja, participando na exocitose da membrana.

ERK é uma serina/treonina quinase envolvida na sinalização de diversos receptores. ERK medeia a ativação de fatores nucleares, como Elk e NF- κ B, que são importantes para a produção de citocinas. O papel de ERK em fagocitose não é claro. Inibição de ERK abole fagocitose em neutrófilos e macrófagos. Seu papel deve ser a ativação de PLA2 e a produção de AA. Além disso, deve modular também a dinâmica da actina.

Figura 36. Via de sinalização de fagocitose ativada pela agregação de receptores Fc. À esquerda, as únicas duas vias inibitórias conhecidas de fagocitose: 1) SIRP α inibe fagocitose de hemácias; 2) receptor Fc γ RIIb inibe fagocitose mediada pelo Fc γ RIIa, quando co-agregado a este.

GTPases da família Rho são reguladores-chave do citoesqueleto de actina e cooperam com as GTPases da família Ras na regulação da expressão de genes e proliferação celular¹⁸⁷. As GTPases da família Rho, incluindo Rho, Rac e Cdc42, têm um papel central em fagocitose¹⁸⁸. Rho, entretanto, apesar de ser necessária para fagocitose de partículas opsonizadas com complemento, não é necessária para fagocitose mediada por receptor Fc. Interessante, o patógeno *Yersinia pseudotuberculosis* injeta uma proteína que ativa GTPases, YopE, no citoplasma de macrófagos para inibir sua fagocitose¹⁸⁹.

Além do remodelamento da membrana para extensão dos pseudópodos, internalização de partículas requer uma força que puxe o fagossomo em formação para o

interior do citoplasma. Polimerização da actina parece ser a principal força nesse sentido, mas as miosinas parecem contribuir também significativamente para isso.

Fagócitos profissionais como macrófagos, monócitos e neutrófilos matam patógenos internalizados, em parte, pela produção de espécies reativas do oxigênio, geradas pela ação da NADPH oxidase nas membranas dos fagossomos. Receptores Fc são capazes de ativar essa enzima, enquanto a internalização via CR3 não a ativa.

Além de discriminar patógenos na superfície celular¹⁹⁰, diversos membros da família dos TLRs são recrutados, ativamente, para os fagossomos, durante internalização de microrganismos, nos quais determinam a natureza do agente que está sendo ingerido^{191,192}. Tal recrutamento parece significar um mecanismo de co-regulação da fagocitose com a resposta inflamatória. Sabe-se que internalização não é fenômeno indispensável para que ocorra sinalização pró-inflamatória, mas esses dois processos apresentam relações temporais, espaciais e funcionais, assim como moléculas sinalizadoras em comum, o que sugere que a sinalização por fagócitos deve influenciar a resposta de outros receptores pró-inflamatórios. Recentemente, foi demonstrado que os TLRs estimulam a expressão de receptores implicados em fagocitose, como SR-A e MARCO, o que nos permite começar a entender o papel desses receptores na fagocitose de bactérias¹⁹³.

Diversos patógenos desenvolveram estratégia para escapar dos mecanismos de fagocitose e morte intracelular. Já foi citado o mecanismo desenvolvido pela *Yersinia pseudotuberculosis*. Sabe-se que *E.coli* EPEC (enteropatogênica) diminui sua internalização, inibindo sinalização dependente de PI 3-quinase, via um sistema de secreção tipo III^{194,195}. Tal sistema de secreção é constituído por fatores de virulência

(EspA, EspB e EspD) e proteínas efetoras que agem no citosol da célula hospedeira. EspA forma organelas que aderem a bactéria, fortemente, à superfície celular do hospedeiro. EspB e EspD são translocadas para a célula a ser invadida e formam poros na sua membrana, através dos quais as proteínas efetoras são injetadas. *Salmonella* codifica o mesmo sistema de secreção tipo III, ativado por acidificação no vacúolo fagocítico, o que permite sua sobrevivência nesse meio, por interferência na formação de espécies reativas do oxigênio pela NADPH oxidase. *Legionella*, *Coxiella*, *Clamídia* e *Leishmania* são exemplos de outros microrganismos que desenvolveram mecanismos de evasão ao processo de fagocitose e morte intracelular, neste caso, por interferirem na maturação dos vacúolos fagocitários. Micobactérias orquestram um complexo grupo de alterações que tornam o vacúolo permissivo ao seu crescimento¹⁹⁶.

O papel dos receptores Fc e da cadeia gamma, apesar de deflagrarem essa amplidão de respostas é, até então, pouco valorizado em sepse. Quando descobrimos o potencial inibitório da cadeia gamma sobre a fagocitose de *E. coli*, nós nos perguntamos qual dos receptores acima descritos estaria sendo inibido, assim como o que estaria ocorrendo nas vias de ativação de fagocitose, dependentes dos receptores Fc. Outra pergunta que nos parecia crucial, era saber qual dos receptores associados à cadeia gamma, estaria desencadeando esse tipo de resposta inibitória. Como foi demonstrado, uma eventual hiperativação do FcR γ II foi excluída, através dos experimentos com 2.4G2, mostrando que esse efeito inibitório estava diretamente associado à presença da cadeia gamma. Nesse momento, entretanto, um interessante mecanismo de apoptose, deflagrado via FcR γ II, foi encontrado.

Apoptose é um achado comum em sepse e acomete, principalmente, células do sistema imune, particularmente linfócitos B, células dendríticas e linfócitos T CD4+. Neste projeto, descrevemos um novo mecanismo de apoptose em sepse, o qual havia sido observado previamente *in vitro* e no qual co-agregação do FcγRIIB induziu resposta pró-apoptótica *in vivo* em linfócitos B, após peritonite induzida por CLP. Originariamente, foi sugerido que esse mecanismo agiria como determinante na seleção negativa de células B, cujos BCRs tenham afinidade reduzida pelo antígeno, como resultado de hipermutação somática. Recentemente, entretanto, indução de apoptose tem sido proposta em processos infecciosos, como mais um dos mecanismos desenvolvidos pelas bactérias, para sobreviverem aos mecanismos de defesa do hospedeiro¹⁹⁷.

Apoptose é relacionada a imunossupressão em sepse. Parece-me ainda controverso, se apoptose poderia decorrer de um estado de imunossupressão, como fenômeno secundário. É relatado que LPS e citocinas Th1 inibem apoptose de macrófagos e monócitos, enquanto resposta Th2 a estimularia^{198,199}. Por outro lado, parece-me já bem estabelecido, por se encontrar largamente apoio na literatura, o fato de que apoptose é causa de imunossupressão. Estudos recentes têm relatado que fagocitose de células apoptóticas estimula tolerância imune, pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, e não induz a expressão de moléculas co-estimulatórias, necessárias para apresentação antigênica. Na presença de células apoptóticas, linfócitos e monócitos produzem significativamente menos citocinas pró-inflamatórias e mais IL-10²⁰⁰. Por outro lado, fagocitose de células necróticas causa expressão de moléculas co-estimulatórias e ativação de linfócitos T^{201,202}. Ademais, mostrando a relevância destes achados em sepse, foi observado aumento na sobrevida de camundongos *C57Bl6/J*, após

administração intravenosa de células esplênicas apoptóticas, 5 dias antes de serem submetidos a CLP. A mortalidade aumentou, entretanto, quando células necróticas foram injetadas, seguindo-se o mesmo protocolo²⁰³. No modelo de CLP, sabidamente, existe intensa morte de linfócitos B por apoptose²⁰⁴. Inibição da morte celular de linfócitos, utilizando-se um inibidor de caspase, igualmente, aumentou sobrevida de camundongos submetidos a CLP²⁰⁵.

O novo mecanismo descrito no presente trabalho, permite maior compreensão dos fenômenos que induzem apoptose em sepse e abre novas perspectivas terapêuticas, através do bloqueio do FcγRIIb. Apesar de tal bloqueio não ter alterado a mortalidade de camundongos sépticos, talvez o uso combinado com outras drogas traga algum benefício. Independentemente das possibilidades clínicas, entretanto, é inegável a importância deste mecanismo como mais uma peça na compreensão da fisiopatologia desta doença (vide Anexo I para maiores detalhes sobre os resultados obtidos, assim como sobre outros aspectos do assunto, inclusive a nossa interpretação da causa de resultados, aparentemente discrepantes do obtido por outros autores^{206,207}).

Nossa atenção, entretanto, permanecia concentrada na investigação de qual receptor associado à cadeia gamma estaria induzindo a inibição da fagocitose de *E. coli* e qual receptor estaria sendo o alvo desta resposta inibitória. Os receptores capazes de fagocitar bactérias (receptor alvo) já foram comentados. Os receptores associados à cadeia gamma que considerávamos como possíveis candidatos, foram restritos a três: FcRγI, FcRγIII e PIR-A. Todos os outros receptores conhecidos como associados à cadeia gamma, ou não são expressos por células murinas, ou não são expressos por células mielóides murinas, podendo assim, serem excluídos (figura 37).

Figura 37. Hipótese inicial do mecanismo de inibição de fagocitose deflagrado pela cadeia gamma. Ativação da cadeia gamma induziria inibição da fagocitose mediada por um outro receptor. *E. coli* seria favorecida por tal inibição, podendo induzi-la ou, simplesmente, aproveitando da ativação desencadeada por um outro ligante.

Além desses três receptores, intrigava-nos o fato de publicação recente do nosso próprio laboratório, ter demonstrado que estímulo do receptor Fc α RI (CD89) com anticorpo monoclonal Fab anti-Fc α RI, diminui a fagocitose de *E. coli* por monócitos humanos¹²⁹. Sendo o Fc α RI um receptor associado à cadeia gamma, mas sem homólogo murino, tal dado não explicava nossos resultados, mas aventava a hipótese de um possível papel do Fc α RI em sepse, em humanos. A função de tal receptor em infecções bacterianas permanece até hoje pouco clara, apesar dos inúmeros esforços na tentativa de se esclarecer esta questão. Realizamos experimentos de sepse, utilizando camundongos transgênicos para o CD89, mas não observamos nenhum tipo de

diferença, comparativamente a camundongos selvagens. Concluo, portanto, que o resultado obtido *in vitro* por Pasquier et al.¹²⁹ não deve apresentar relevância suficiente *in vivo*, a ponto de alterar parâmetros clínico-laboratoriais do modelo de ligadura e punção cecal. Talvez o receptor Fc α RI tenha uma capacidade inibitória da fagocitose de *E. coli*, via cadeia gamma, inferior à observada em camundongos selvagens. Talvez, ainda, o protocolo que utilizei tenha falhas que mascararam esse efeito inibidor. Dentre as possíveis causas que poderiam ter levado a esse resultado negativo, ressalto: 1) a possibilidade de que camundongos transgênicos para o CD89 não tenham ligante eficaz ou vias de sinalização intracelular, eficazmente acopladas a esse receptor; 2) que a introdução do CD89, via transgênese, leve a alterações na fisiologia celular que acarretem na disfunção de outras proteínas; 3) que a administração por via intra-peritoneal, neste caso, tenha atingido níveis séricos insuficientes de A77. Experimentos semelhantes, com administração de A77 por injeção intra-venosa precisam ser realizados, para termos a resposta a essa dúvida.

Termino este projeto sem ter acrescentado nada de relevante sobre o papel do Fc α RI em infecções bacterianas. Publicação do nosso laboratório evidenciou, há alguns anos, um aumento da expressão do Fc α RI em sepse, associado a infecção por germes gram-negativos²⁰⁸. Essa associação, a nosso ver, deve continuar a ser explorada. Concluo a discussão da minha tese, portanto, explorando basicamente os estudos sobre a cadeia gamma murina, nossa maior contribuição à compreensão do papel dos receptores Fc de imunoglobulinas nas bacteremias, particularmente em sepse. Como será exposto, estes estudos nos levaram, ainda, a um outro receptor recentemente descrito, cujo ligante

permanece desconhecido e que não pode, desta forma, ser incluído nesta família, apesar de, estruturalmente, associado a ela.

Depois que concentramos nossos esforços no sentido de tentar descobrir, através de estudos de “immunoblotting”, qual receptor associado à cadeia gamma estaria deflagrando tal resposta inibitória em camundongos, e aprofundarmos nossos conhecimentos sobre o que havia sido publicado até então, sobre receptores inibitórios, novas idéias começaram a ser propostas.

O conceito de receptor inibitório, na verdade, está estreitamente ligado ao de auto-tolerância. Receptores de MHC-I (Complexo maior de histocompatibilidade do tipo I), apreciados inicialmente em células “natural-killer”, previnem a lise de células autólogas sadias. Sinalização através destes receptores aborta, temporariamente, sinais ativatórios^{209,210}. Além da maior parte das células NK, dois outros receptores também são capazes, sabidamente, de ligar MHC-I (LIR-1 e LIR-2). Ligantes para diversos outros receptores semelhantes, ainda não foram identificados.

Inibição do crescimento, anergia, apoptose e “down modulation” da sinalização são parte dos mecanismos utilizados pelo sistema imune, para manter homeostase. O conceito de receptor inibitório, entretanto, foi apenas recentemente descrito. Tais receptores, caracteristicamente, agem através do recrutamento de fosfatases, em geral SHP-1, através de um motivo ITIM e necessitam co-ligação com o receptor ativatório. A superfamília dos receptores inibitórios é dividida em dois tipos de moléculas: 1) das imunoglobulinas e 2) das lecitinas tipo C. Uma característica comum desses receptores é que eles contêm isoformas com propriedades ativatórias. Diversos receptores inibitórios não foram conservados evolutivamente, de forma que receptores humanos dessa

superfamília não foram identificados em camundongos e vice-versa. Essa divergência sugere uma rápida necessidade de adaptação, possivelmente, devido à variabilidade do ligante. Co-ligação de um receptor inibitório com um receptor ativatório, contendo ITAM, aborta o sinal ativatório. Entre os receptores inibitórios que reconhecem MHC-I, em humanos, estão os receptores KIR e as ILT's. ILT's são expressas, principalmente, por células monocíticas e dendríticas, mas são também encontradas em algumas células B e NK. Dos oito componentes da família das ILT's, dois ligam HLA de classe I e seis permanecem com os ligantes não-identificados. Como a maior parte dos receptores inibitórios, as ILT's não foram conservadas evolutivamente, não sendo encontradas em camundongos. Em termos de apresentação tissular, entretanto, os receptores PIR-A e PIR-B são considerados os homólogos murinos das ILT's. Todos os componentes da superfamília dos receptores inibitórios apresentam, ao menos, 40% de identidade em um ou mais dos seus domínios Ig. O papel de tais receptores em macrófagos pode, assim, ser o de proteger células que produzem citocinas de serem fagocitadas²⁰⁸. Uma hipótese que permaneceu forte, portanto, na fase final desse trabalho, foi a de que a cadeia gamma associada a PIR-A, o qual foi recentemente descrito como capaz de ligar o MHC-I²¹¹, induziria uma resposta inibitória, que evitaria que algum outro receptor com atividade fagocítica ingerisse células próprias, controlando, assim, um mecanismo de auto-tolerância. O fato de que a fagocitose de *E. coli* se encontra aumentada pelas células deficientes em cadeia gamma, tanto na presença, quanto na ausência de opsonina, reforçava essa hipótese. As bactérias, dessa forma, e em particular *E. coli*, apenas aproveitariam da inibição desse receptor alvo, o qual seria desligado para não ingerir células próprias, tornando-se incapaz, igualmente, de ingerir bactérias. Na

ausência de cadeia gamma, tal mecanismo de inibição não se manifestaria e o receptor alvo estaria livre para fagocitar, sem esse controle do tipo negativo. Cabe ressaltar, ainda, que a pesquisa de opsonina descrita neste trabalho, evidenciou opsoninas, a partir de uma amostra de hemocultura polimicrobiana de camundongos selvagens e, desta forma, apesar do resultado positivo, não sabemos contra qual agente estas opsoninas são dirigidas.

Os mecanismos de morte celular, conforme demonstrado, permanecem eficazes na ausência de cadeia gamma, levando-nos à conclusão de que as vias de dano oxidativo^{212,213,214} se encarregam dessa função, independentemente dos receptores Fc e com eficácia.

Por outro lado, diminuição dos níveis de TNF α e do recrutamento de neutrófilos, pelos camundongos deficientes em cadeia gamma, são resultados mais difíceis de se relacionar a PIR-A. Parece-nos muito mais lógico que esses resultados refletem uma deficiência ou abolição da ativação de receptores Fc, mais provavelmente do Fc γ RIII, por ser considerado o receptor de IgG que está mais diretamente implicado na resposta inflamatória mediada por imunocomplexos⁷³, dentro da qual, evidências recentes incluem seu envolvimento, inclusive, nos mecanismos de recrutamento neutrofílico²¹⁵. Evidentemente, podemos imaginar que os resultados apresentados nesta tese, sejam reflexo das manifestações do conjunto de receptores associados à cadeia gamma em sepsis, e que seria simplista tentar justificar todas as diferenças encontradas, devido à ausência de um único receptor. Pensando dessa maneira, PIR-A poderia ser o receptor envolvido no mecanismo de inibição de fagocitose e os receptores Fc γ I²¹⁶ e III nos parecem ser os responsáveis pelas diferenças de resposta inflamatória (secreção de

anticorpos, citocinas e recrutamento de neutrófilos)^{217,218,219,215}. Mosser et al. mostraram, por outro lado, que o FcγI pode estar implicado também em respostas anti-inflamatórias^{220,221}, o que nos faz crer que a ausência do FcγIII deve ser a maior responsável pelos menores níveis de TNFα, que encontramos nos camundongos deficientes em cadeia gamma. Estudos de imunoprecipitação foram iniciados, no intuito de se responder a estas questões, porém não houve tempo hábil para serem incluídos nesta tese.

Em 1879, ao detectar bactérias na circulação sanguínea de pacientes com infecção puerperal²²², Louis Pasteur faz o primeiro relato de bacteremia. Desde então, lentamente, vem evoluindo o conhecimento em sepse^{223,224,225}. Um aspecto do nosso trabalho que chama a atenção, é a maior sobrevida por parte do grupo que apresenta infecção polimicrobiana, uma fator sabidamente de mau prognóstico^{226,227}. Cabe ressaltar que, inicialmente, ambos os grupos partem do mesmo insulto e flora, sendo somente após proliferação maciça de *E. coli* que o crescimento das demais bactérias é inibido, nos camundongos selvagens. Essa observação é interessante por si só, ajudando-nos a compreender a importância dos mecanismos de competição entre diversas bactérias neste tipo de infecção. Além disso, reênfatiza a complexidade desta doença, que não respeita algoritmos unifatoriais, os quais apresentam interesse clínico-epidemiológico, mas como foi observado, não podem ser aplicados categoricamente, quando estamos trabalhando com animais geneticamente modificados, em ambiente de Pesquisa. Neste trabalho, diversos mecanismos sobrepujaram esse fator, todos eles relacionados ao nocauteamento da cadeia gamma.

Outro aspecto que deve ser comentado, é a maior sobrevivência do grupo de camundongos heterozigotos, quando comparados aos camundongos “knockout” homozigotos para a cadeia gamma. Minha explicação para tal fato é a de que a balança inflamatória deve ter encontrado um melhor equilíbrio nesses animais, do que nos demais, já que mecanismos como, por exemplo, recrutamento de células inflamatórias, devem ter um efeito nocivo para o hospedeiro, que deve sofrer dos efeitos da inflamação, mas, por outro lado, existe, igualmente, um papel benéfico, já que leva ao local da infecção, células, cujo principal intuito é o de exterminar o agente invasor. Secreção de TNF α , além de outros mecanismos controlados pela cadeia gamma, devem ser sujeitos a um equilíbrio semelhantemente fino, corroborando a hipótese de que o controle desses mecanismos, evitando-se uma hiperatividade, assim como uma abolição dos mesmos, deva ser o caminho mais provável, a fim de se obter resultados terapêuticos animadores nesta doença, principalmente, quando se intervém em uma molécula que age sobre tão diversos mecanismos, como a cadeia gamma.

A discussão crescente na literatura sobre o importante papel dos receptores Fc em fenômenos de auto-imunidade²²⁸ e suas perspectivas no manejo de doenças auto-imunes²²⁹, assim como a recente descrição de que MHC-I é ligante de PIR-A^{230,231,232}, coloca a cadeia gamma como possível protagonista de mecanismos de auto-tolerância.

Os resultados desta tese abrem novas perspectivas para o tratamento de doenças infecciosas, propondo, para isso, o aumento da capacidade fagocítica pelo bloqueio medicamentoso da cadeia gamma. Uma fascinante relação entre auto-tolerância e infecção, conforme demonstrado, pode revelar um mecanismo inesperado de evasão bacteriana. Tal trabalho, por fim, propõe a rediscussão dos conceitos clássicos de ITIM e

ITAM, já que a capacidade inibitória deste último não condiz com a definição que se encontra em vigência na literatura.

7. Conclusões

- Camundongos deficientes em cadeia gamma apresentam mortalidade aumentada, quando submetidos a punção e ligadura cecal (CLP), com relação a controles selvagens
- Camundongos transgênicos para o hFc α RI não apresentam diferença de sobrevivência, com relação a camundongos selvagens, após CLP
- Após CLP, camundongos deficientes em cadeia gamma apresentam diminuição na secreção de TNF α e no recrutamento de células inflamatórias, mas não na secreção de IL-10, com relação a controles selvagens
- Camundongos deficientes em cadeia gamma apresentam hemoculturas e cultura de lavados peritoneais, 24 horas após CLP, com flora polimicrobiana e menor número total de bactérias do que camundongos selvagens, que apresentam na flora um forte predomínio de *E. coli*.
- Fagocitose de *E. coli* está aumentada pelas células deficientes em cadeia gamma, com relação a fagócitos selvagens
- O “killing intracelular” de *E. coli* é eficaz em células deficientes em cadeia gamma

- Não foi encontrada diferença significativa na fagocitose de *S. Aureus* e *zymosan*, quando foi comparada a capacidade fagocítica de células selvagens e deficientes em cadeia gamma
- Lisado total de células deficientes em cadeia gamma demonstraram fosforilação de diversas proteínas, antes mesmo de contato com qualquer antígeno

8. Anexos

**B lymphocytes undergo apoptosis due to FcγRIIb stress
response to infection: A novel mechanism of cell death in
sepsis**

Fabiano Pinheiro da Silva^{¶}, Murilo Chiamolera^{*}, Nicolas Charles[¶], Yutaka
Kanamaru[¶], Irineu Tadeu Velasco^{*}, Marc Benhamou[¶] and Renato C. Monteiro[¶]*

Bichat Medical School, INSERM U699, Paris, France[¶]; Emergency Medicine
Department, University of Sao Paulo, Brazil^{*}

Running head: IgG receptor-mediated apoptosis in sepsis.

Correspondence should be addressed to: Renato C. Monteiro, MD-PhD, INSERM U699,
Bichat Medical School, 16, rue Henri Huchard, 75870 Paris cedex 18. Email:
monteiro@bichat.inserm.fr

Abstract

Sepsis is predominantly characterized by pro-inflammatory signs in its initial phase, but can be also associated with immune suppression, which can be a consequence of apoptotic cell death. The role of FcRs is poorly understood in this disease and it was recently shown that, besides the promotion of opposite inflammatory responses, they are implicated in apoptosis. Using a model of peritonitis in mice that do not express activating FcRs, we tested the hypothesis that Fc γ RIIb, the only known IgG receptor capable of inducing apoptosis, would participate in the induction of this kind of cell death during serious infection. The blocking of this receptor by a monoclonal antibody significantly decreased the number of apoptotic splenic B cells demonstrating its involvement in apoptosis. Fc γ RIIb-mediated apoptosis was neither the result of increased TNF α levels nor associated with IL-10 production. Finally, the decreased apoptosis after mice treatment with Fc γ RIIb-blocking antibody was not sufficient to increase its survival. Thus, we conclude that although apoptosis is a multifactorial phenomenon in sepsis, one of these factors is the inhibitory IgG receptor Fc γ RIIb. Fc γ RIIb stress response to infection is a novel mechanism that contributes to the comprehension of apoptosis in sepsis.

Key words: inflammation; immune response; Fc receptors; bacteria; cell death

Introduction

Sepsis continues to be the leading cause of death in Intensive Care Units, despite the progress in its diagnosis and treatment (1, 2). Sepsis is believed to be, in its initial phase, the consequence of an exacerbated and uncontrolled inflammatory response to infection. An antagonistic mechanism secondary to the pro-inflammatory state and characterized by anti-inflammatory manifestations, however, is thought by many authors to be responsible for the deleterious consequences of sepsis (3, 4). This could explain recurrent findings, such as susceptibility to nosocomial infections or loss of delayed hypersensitivity. In this regard, cell death by necrosis has been considered to promote inflammation, whereas apoptosis is associated with immune suppression and could be one of the causes of this antagonistic mechanism (5-7). Both kinds of cell death are observed in the necropsies of septic patients. Apoptosis is surprising and an unexpected finding in sepsis, mostly because it targets immune cells, which are fundamental to fight severe infections. Apoptosis markedly decreases the levels of B, CD4+ and dendritic cells in sepsis, when clonal expansion might be expected (1).

Fc receptors are implicated in different aspects of immunity, in part through the activation of signaling pathways by tyrosine-based motifs in their intracellular portion. One of these motifs, known as ITAM, can be inhibited by another intracellular tyrosine-motif, called ITIM, in a similar balance of antagonistic inflammatory responses (8, 9). Some studies have already shown altered expression of Fc receptors, during the course of infection (10-12). Besides that, however, their importance in bacterial infections remains unclear. In mice, IgG Fc receptors are divided in two groups: 1) Fc γ RI and Fc γ RIII, homologous to human Fc γ RIIIa, both transmitting intracellular signaling by the association to an homodimer of gamma-chains (Fc γ Rs), which have intracellular ITAM-motifs and 2) the inhibitory receptor Fc γ RII, homologous to human Fc γ RIIb, which is not associated to the gamma-chain, and that can inhibit other Fc γ Rs, due to an ITIM in its intracellular portion.¹

Recently, Pearse et al. have shown that Fc γ RIIb induces apoptosis when aggregated in a multimeric pattern (13). Until then, Fc γ RIIb had been known as a receptor incapable of inducing activation signals being considered only as an inhibitory IgG receptor. This kind of response was considered a stress response out of Fc γ RIIb characteristic patterns and was shown to be inhibited in splenocytes by 2.4G2, a monoclonal anti-Fc γ RII/III antibody in mice (14), which induces dimerization, but not multi-aggregation, of this receptor (13).

We have made the hypothesis that this phenomenon could happen also in sepsis due to Fc γ RIIb multiaggregation by secreted IgGs and that it could partially explain the

¹ ITAM: immuno-tyrosine based activatory motif ITIM: immuno-tyrosine based inhibitory motif

findings of apoptosis in this disease. To test this hypothesis, we induced sepsis in FcR γ knockout mice. For this, we have used a well-known model of peritonitis. FcR γ is an essential subunit for the membrane expression of Fc γ RI and III (15). In its absence, Fc γ RII is the only IgG receptor expressed by mice. We compared the apoptotic response of splenocytes to infection in these animals, 24 hours after peritoneal injection of 2.4G2 or of an irrelevant control antibody. The blockade of Fc γ RII decreased the apoptotic response of these cells. Moreover, both groups showed the same levels of TNF α , a cytokine that induces apoptosis, excluding its secretion as the cause responsible for the difference observed. Both groups showed the same mortality 7 days after cecal ligation and puncture (CLP), indicating that apoptosis in sepsis results from a complex mechanism and that multiple pathways are involved. Fc γ RIIb engagement represents a novel mechanism in sepsis that partially explains the findings of apoptosis in this disease.

Material and methods

Mice. 8 to 10 weeks of age FcR γ -deficient mice in a C129xBalb/c background were used in this study. Animals were housed in the Bichat Medical School Animal Care. All experiments were performed in accordance to the protocols approved by this institution.

Monoclonal antibodies. 2.4G2 (anti-Fc γ RII and III) was produced by the injection of hybridoma cells in *nude* mice and the antibody was subsequently purified from ascites by DEAE column-chromatography and kept at 4°C in sterile conditions. A rat irrelevant monoclonal control antibody (CA) was purified by the same method. Animals received 400 μ g of 2.4G2 or irrelevant antibody, 30 minutes before CLP, by an intra-peritoneal injection. The antibodies were diluted in PBS to reach a total volume of 500 μ l / dose. No endotoxin was detected using a chemiluminescent assay--the endotoxin activity assay (EAA) (16).

Cecal ligation and Puncture (CLP) – Peritonitis was induced in mice by CLP, as described by Wichterman et al (17, 18). Briefly, animals were anesthetized with 25mg/kg ketamine (Ketalar®, Parke-Davis) and 10mg/kg xylazine (Rompun®, Bayer), the caecum was exteriorized, ligated without intestinal obstruction and two punctures were made with an 18G needle. Abdomen was closed by layers and animals were examined every 12 hours during the first three days and, subsequently, every 24 hours until death or the seventh day post-CLP, when they were sacrificed by cervical dislocation. Sham controls were submitted to the same procedure, but their cecum was neither ligated, nor punctured. For the apoptosis analysis by FACS, mice were sacrificed 24 hours after CLP.

Apoptosis analysis by FACS – Splenic cells were dispersed, submitted to a hypotonic solution to lyse red blood cells, incubated with rabbit IgG to block unspecific binding and then, with biotinylated Annexin V (B&D systems, USA), anti-CD19-FITC (B&D systems, USA) and finally, propidium iodide (PI). Annexin V positive, PI negative cells are specific of the early stages of apoptosis, whereas double-positive labeling with annexin V and PI are specific for late apoptosis (19). Anti-CD19 staining is specific for B lymphocytes. The same procedure was used to determine CD11b-positive peritoneal cells apoptosis, 24 hours after CLP, but anti-CD11b antibody (Becton& Dickinson, USA) was used instead of anti-CD19. Since CD11b recognizes neutrophils and macrophages, the neutrophil and monocyte/macrophage populations were discriminated from other cells by using forward and side light-scatter characteristics. To determine FcγRIIb membrane expression, peritoneal cells (before and after CLP) were incubated with 2.4G2, followed by anti-rat biotinylated antibody (Southern Biotechnologies, USA). Streptavidin-APC (Becton&Dickinson, USA) was used to detect biotin. Analysis was performed with a cytofluorimeter (B&D systems, USA), using the software Cellquest.

Cytokines – All serum cytokines were measured by ELISA. Mice were submitted to CLP and 8 hours later, when TNFα reaches its peak in this model (20, 21), were bled by the retroorbital plexus and sacrificed. After that, peritoneal cavity was lavaged with 2ml of PBS and this fluid was collected. Blood and peritoneal fluids were centrifuged and serum and supernatant were stored at -30°C for subsequent analysis. TNFα ELISA-kit was purchased from R&D systems and tests were performed according to manufacturer's instructions. Anti-IL-10 mouse mAbs (clones JES-5 and SXC1) for ELISA were kindly provided by Dr Agnès Lehuen (INSERM U561).

Statistical analysis. Kaplan-Meier curves and a log rank test were used to test for survival differences. The cytokine and apoptosis values were analyzed by Student t-test. Differences were considered significant if P was <0.05. Data are shown as mean ± SEM.

Results

Sepsis down-regulated FcγRIIb expression on peritoneal cells – As expected, FcγRIIb was brightly expressed on peritoneal cells from FcRγ-deficient mice (Figure 1A) that lack FcγRI and III, both of which are dependent on FcRγ to reach the cell surface. Strikingly, FcγRIIb expression was markedly decreased on the cell surface after CLP indicating that sepsis activates this receptor independently of FcRγ-associated receptors (Figure 1B).

Blocking FcγRIIb prevented bacteria-induced apoptosis of splenic B cell, but not of peritoneal macrophages or neutrophils– Apoptosis has been reported following bacterial infection by CLP (22). To evaluate the induction of apoptosis in FcRγ knockout mice following sepsis, we analyzed spleen cells (total count, table 1) and spleen B lymphocytes (CD19-positive cells, figure 2A) from these mice by double

immunofluorescence using annexin V and PI 24 h after CLP. As shown, these cells undergo apoptosis to some minimal extent following stress by sham surgery. Twenty-four hours after CLP, there was a significant increase in the number of apoptotic B lymphocytes as compared to sham operated mice. To examine the involvement of Fc γ RIIb, mice were pre-treated with the anti-Fc γ RIIb mAb 2.4G2. Dimerization of Fc γ RIIb induced by this monoclonal antibody does not result in apoptosis but blocks further multimerization and co-clustering of this receptor (14). Pre-treatment of Fc γ knockout mice with the mAb 2.4G2 significantly inhibited this increase in splenic B cells apoptosis following CLP by over 70 %. Therefore, blocking Fc γ RIIb prevented cell death demonstrating its critical involvement in this apoptotic signaling. The same protocol was used to study apoptosis in CD11b-positive peritoneal cells from Fc γ ^{-/-} mice (6 mice/group). Mice treated with 2.4G2 showed a tendency to lower cell death (6.70 ± 1.0 % of apoptotic cells) as compared to those treated with irrelevant control antibody ($9.42 \pm 1.5\%$), although not reaching significant difference ($p = 0.17$).

Blocking Fc γ RIIb did not affect TNF α or IL-10 levels in serum or in peritoneal fluid after CLP – To evaluate whether reduction of apoptosis by blocking of Fc γ RIIb was associated to reduced TNF α production, a cytokine that is a well-known inducer of apoptosis (23), or IL-10 levels, an important anti-inflammatory cytokine in bacterial infections, we determined their serum and peritoneal levels by ELISA before and after 2.4G2 treatment. Mice which received 2.4G2 or control-antibody showed similar TNF α levels (Figure 3), revealing that prevention of apoptosis by blockage of Fc γ RIIb was not due to a decrease in TNF α levels. Similarly, no significant differences were seen for IL-10 levels in serum and peritoneal fluids ($n=6$ per group, $P < 0.28$ and $P < 0.27$, respectively).

Blocking of Fc γ RIIb failed to affect survival in Fc γ KO mice – Apoptosis has been shown to increase mortality in sepsis and to affect mostly B, dendritic and CD4+ T cells (1). Fc γ RIIb blockage, although nearly abolishing sepsis-induced B cells apoptosis, did not improve survival of Fc γ KO mice that had underwent CLP (Figure 4. $p=0.54$). Therefore mortality following experimentally-induced sepsis is a complex phenomenon resulting from multiple factors.

Discussion

Apoptosis has been recently implicated during immunosuppression in sepsis (1). It is still controversial whether apoptosis could happen as a *consequence* of this state. It has been reported that LPS and Th1 cytokines inhibit macrophages and monocytes apoptosis, whereas Th2 responses would stimulate it (24, 25). However, it is well-established that apoptosis is a *cause* of immune suppression. Recent studies have reported that phagocytosis of apoptotic cells stimulate immune tolerance, by the release of anti-inflammatory cytokines and are not followed by the expression of co-stimulatory molecules implicated in antigen presentation. In the presence of apoptotic cells, lymphocytes and monocytes produce significantly less pro-inflammatory cytokines (5).

On the other hand, necrotic cells lead to the expression of co-stimulatory molecules and to T cells activation. Regarding the impact of these findings in sepsis, it was observed a decreased survival of C57Bl6/J mice after intra-peritoneal injection of apoptotic B cells before CLP. Mortality decreased, however, when necrotic splenocytes were injected instead (26). The CLP model induces extensive apoptotic death of B cells (22). This is efficiently inhibited by z-VAD (N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(0-methyl) fluoromethyl ketone), a broad-spectrum caspase inhibitor, and this compound improves the survival of septic mice (27). Bcl-2 Ig transgenic mice, that selectively overexpress the anti-apoptotic protein Bcl-2, are similarly protected (27).

Interestingly, bacteria developed strategies to induce apoptosis and avoid the release of pro-inflammatory signals by the host (28-30). Using this strategy, *P. aeruginosa* reduces leukocyte infiltration in the lungs (31). *Salmonella* and *Shigella* activate pro-apoptotic pathways, in order to inhibit their phagocytosis (32, 33).

The role of Fc receptors in sepsis is poorly understood and their relationship to apoptosis has never been reported, although indirectly suggested by others (34). The mechanism that we propose shows how an ungoverned pro-inflammatory state could lead to apoptosis and, secondarily, immune suppression. Mice deficient in FcγRIIb have an enhanced immune response (35). Indeed, Clatworthy *et al.* found increased antibody-dependent phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae in vitro* by peritoneal cells from these mice. In addition, after induction of sepsis by the intra-peritoneal injection of *Streptococcus pneumoniae*, these mice demonstrated increased bacterial clearance and survival. By contrast, previously immunized FcγRIIb-deficient mice challenged with large inocula show increased TNFα levels and reduced survival. These data support a protective role of FcγRIIb in sepsis (36). In contrast to both these reports, we have not found differences in survival, TNFα or IL-10 levels after blocking FcγRIIb with 2.4G2. A possible explanation for this apparent discrepancy is due to the fact that FcγR-knockout mice do not express FcγR-associated activating receptors (i.e. FcγRI, FcγRIII, PIR-A, etc) and, therefore, inflammation is somehow already abolished regardless of FcγRIIb inhibitory effects in these mice. However, together with our results, these data suggest that FcγRIIb may promote opposite responses in sepsis that might depend on numerous factors such as the extent of the infectious insult. Therefore, FcγRIIb targeting for therapeutic purposes will have to be carefully evaluated in each situation and downregulation of this receptor might be more appropriate than its abrogation.

A downregulation of FcγRIIb expression following CLP was clearly observed in our studies. It is noteworthy that loss of Fc receptors was also observed in hemorrhagic shock suggesting that it is a common phenomenon in critical illness (37). Whether this was due to aggregation by immune complexes, apoptosis-secondary effects or shock-related cell dysfunctions remains unclear. It is unlikely that receptor shedding might explain such findings, as in our study, apoptosis seems to depend on FcγRII transmembrane signaling which was blocked by 2.4G2 mAb. Although the pathways that lead to FcγRII-induced apoptosis remain unclear, our results indicate that it is

independent of TNF α and others have shown that it depends on SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) (13).

The novel mechanism described in this work, permits a greater comprehension of the pathways that lead to apoptosis in sepsis and opens new perspectives for the understanding of this disease. Although the specific targeting of Fc γ RIIb apoptotic response did not decrease mortality of septic mice, this approach should be kept in mind and its use, combined with other drugs, could be of interest in the future. Finally, this novel mechanism underlines the importance of FcRs in sepsis and suggests that the therapeutic blockage of this receptor can be of benefit in the management of this disease, by the decrease in B cells apoptotic death, especially in patients with a pattern characterized predominantly by immune suppression. On the other hand, this kind of response should be maintained in patients with a prevalent pro-inflammatory response. In any case, we must remember that sepsis is a dynamic disease and that, for its therapeutic to have better results, it must be guided by immunological markers. FcRs are especially interesting, because their targeting permits the regulation of many inflammatory mediators and of different inflammatory responses, circumventing the problems raised by the targeting of cytokines, most of which have redundant effects and are one, but not the only, important aspect of this complex and intriguing disease.

Acknowledgments

We thank Dr. Agnès Lehen (Saint-Vincent de Paul Hospital, Paris, France) for giving monoclonal antibodies and Dr. Jeffrey Ravetch for providing FcR γ deficient mice (Rockefeller University, New York, NY). FPS was supported by CNPq, the Brazilian National Council for Scientific Development, Ministry of Science and Technology (grant # 200739/2003-4). MC is supported by FAPESP, the State of Sao Paulo Research Foundation (grant # 03/14148-8).

References

1. **Hotchkiss RS, Karl IE.** The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348: 138-150, 2003.
2. **Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M.** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348: 1546-1554, 2003.
3. **Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA.** Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 112: 235-243, 1997.
4. **Riedemann NC, Guo RF, Ward PA.** The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 112: 460-467, 2003.
5. **Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I.** Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390: 350-351, 1997.

6. **Green DR, Beere HM.** Apoptosis. Gone but not forgotten. *Nature* 405: 28-29, 2000.
7. **Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N.** Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191: 423-434, 2000.
8. **Ravetch JV, Bolland S.** IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19: 275-290, 2001.
9. **Billadeau DD, Leibson PJ.** ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest* 109: 161-168, 2002.
10. **Chiamolera M, Launay P, Montenegro V, Rivero MC, Velasco IT, Monteiro RC.** Enhanced expression of Fc alpha receptor I on blood phagocytes of patients with gram-negative bacteremia is associated with tyrosine phosphorylation of the FcR-gamma subunit. *Shock* 16: 344-348, 2001.
11. **Leino L, Sorvajarvi K, Katajisto J, Laine M, Lilius EM, Pelliniemi TT, Rajamaki A, Silvonien P, Nikoskelainen J.** Febrile infection changes the expression of IgG Fc receptors and complement receptors in human neutrophils in vivo. *Clin Exp Immunol* 107: 37-43, 1997.
12. **Herra CM, Keane CT, Whelan A.** Increased expression of Fc gamma receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection. *J Med Microbiol* 44: 135-140, 1996.
13. **Pearse RN, Kawabe T, Bolland S, Guinamard R, Kurosaki T, Ravetch JV.** SHIP recruitment attenuates Fc gamma RIIB-induced B cell apoptosis. *Immunity* 10: 753-760, 1999.
14. **Unkeless JC.** Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* 150: 580-596, 1979.
15. **Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch JV.** FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. *Cell* 76: 519-529, 1994.
16. **Marshall JC, Walker PM, Foster DM, Harris D, Ribeiro M, Paice J, Romaschin AD, Derzko AN.** Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit Care* 6: 342-348, 2002.
17. **Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH.** Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29: 189-201, 1980.
18. **Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE.** Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 94: 331-335, 1983.

19. **van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP.** Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31: 1-9, 1998.
20. **Seki S, Osada S, Ono S, Aosasa S, Habu Y, Nishikage T, Mochizuki H, Hiraide H.** Role of liver NK cells and peritoneal macrophages in gamma interferon and interleukin-10 production in experimental bacterial peritonitis in mice. *Infect Immun* 66: 5286-5294, 1998.
21. **Kalechman Y, Gafter U, Gal R, Rushkin G, Yan D, Albeck M, Sredni B.** Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. *J Immunol* 169: 384-392, 2002.
22. **Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TG, Karl IE.** Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med* 25: 1298-1307, 1997.
23. **Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP.** Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17: 331-367, 1999.
24. **Mangan DF, Welch GR, Wahl SM.** Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 146: 1541-1546, 1991.
25. **Estaquier J, Ameisen JC.** A role for T-helper type-1 and type-2 cytokines in the regulation of human monocyte apoptosis. *Blood* 90: 1618-1625, 1997.
26. **Hotchkiss RS, Chang KC, Grayson MH, Tinsley KW, Dunne BS, Davis CG, Osborne DF, Karl IE.** Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6724-6729, 2003.
27. **Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE.** Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14541-14546, 1999.
28. **Weinrauch Y, Zychlinsky A.** The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 53: 155-187, 1999.
29. **Underhill DM, Ozinsky A.** Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20: 825-852, 2002.
30. **Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S.** Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 3: 1033-1040, 2002.

31. **Grassme H, Kirschnek S, Riethmueller J, Riehle A, von Kurthy G, Lang F, Weller M, Gulbins E.** CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 290: 527-530, 2000.
32. **Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A.** The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2396-2401, 1999.
33. **Zychlinsky A, Kenny B, Menard R, Prevost MC, Holland IB, Sansonetti PJ.** IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 11: 619-627, 1994.
34. **Matsuda T, Saito H, Inoue T, Fukatsu K, Lin MT, Han I, Furukawa S, Ikeda S, Muto T.** Ratio of bacteria to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) determines PMN fate. *Shock* 12: 365-372, 1999.
35. **Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV.** Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* 379: 346-349, 1996.
36. **Clatworthy MR, Smith KG.** FcgammaRIIb balances efficient pathogen clearance and the cytokine-mediated consequences of sepsis. *J Exp Med* 199: 717-723, 2004.
37. **Rana MW, Ayala A, Dean RE, Chaudry IH.** Decreased Fc receptor expression on macrophages following simple hemorrhage as observed by scanning immunoelectron microscopy. *J Leukoc Biol* 48: 512-518, 1990.

Table 1: Prevention of splenocyte apoptosis following FcγRIIb blocking in vivo.

<i>Treatment</i>	<i>Mean ± SEM</i>	<i>p</i>
<i>Sham – Irrelevant mAb</i> (<i>n</i> = 3)	15.53 ± 0.51	<i>NS</i>
<i>Sham – 2.4G2 (n =3)</i>	14.33 ± 1.35	
<i>CLP – Irrelevant mAb</i> (<i>n</i> =8)	25.36 ± 2.71	<i>0.016</i>
<i>CLP – 2.4G2 (n=8)</i>	16.15 ± 1.86	

Statistical analysis of apoptotic cells levels, 24 hours after CLP or sham surgery, in FcγRIIb knockout mice treated previously with intraperitoneal injections of 2.4G2 or of irrelevant antibody. Cells were labeled with Annexin-V and propidium iodide as described in Material and Methods. Results are the percent of apoptotic cells.

Figure Legends:

Figure 1. FcγRIIb membrane expression in peritoneal cells from FcRγ knockout mice. A, healthy mice; B, 24 hours after CLP. Expression was evaluated by FACS analysis with mAb 2.4G2, followed by anti-rat biotinylated antibody and streptavidin-APC.

Figure 2. Apoptosis of splenic B cells 24 hours after CLP. FcRγ-knockout mice received mAb 2.4G2 (A and B) or control antibody (C and D) by intraperitoneal injection and underwent sham surgery (A and C) or CLP (B and D). Splenic B cells were then labelled with anti-CD19-FITC and analyzed for apoptosis by cytometry with biotinylated annexin V and streptavidin-APC and with propidium iodide.

Figure 3. TNFα in FcRγ-knockout mice. Serum (A) and peritoneal lavages (B) were analyzed by ELISA for TNFα levels 8 hours after CLP. Mice received 2.4G2 or an irrelevant control antibody, as indicated, by intraperitoneal injection 30 minutes before surgery. n=10 mice/group.

Figure 4. Survival of FcRγ-deficient mice after CLP. Mice were pre-treated by intraperitoneal injection of 400μg of 2.4G2 or control antibody, as indicated, before CLP (p=0.53). The number of mice examined in each group is indicated.

Fig 2

Fig 3

Fig 4

9. Referências Bibliográficas

1. Hotchkiss RS and Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine*; 348(2): 138-150, 2003
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S and Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*; 348(16): 1546-1554, 2003
3. Bone RC, Fischer CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA and Balk RA. A controlled trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *New England Journal of Medicine*; 317: 653-658, 1987
4. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group. Effect of high-dose glucocorticoid therapy on mortality in patients with clinical signs of systemic sepsis. *New England Journal of Medicine*; 317: 659-665, 1987
5. Greenman RI, Schein RM, Martin MA, Wenzel RP, MacIntyre NR, Emmanuel G, Chmel H, Kohler RB, McCarthy M, Plouffe J et al. A controlled clinical trial of E5, murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. *JAMA*; 266: 1097-1102, 1991
6. Bone RC, Balk RA, Fein AM, Perl TM, Wenzel RP, Reines HD, Quenzer RW, Iberti TJ, Macintyre N and Schein RM. A second large controlled clinical study of E5, a

monoclonal antibody to endotoxin: results of a prospective, multicenter, randomized clinical trial. *Crit Care Med*; 23: 994-1006, 1995

7. McCloskey RV, Straube RC, Sanders C, Smith SM, Smith CR. Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A : a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*; 121:1-5, 1994

8. Ziegler EJ, Fisher CJ, Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, Wortel CH, Fink MP, Dellinger RP, Teng NN et al. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *New England Journal of Medicine*; 324: 429-436, 1991

9. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor- α in patients with sepsis syndrome. *JAMA*; 273: 931-934, 1995

10. Fisher CJ, Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, Iberti TJ, Rackow EC, Shapiro MJ, Greenman RL et al. Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome : results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JAMA*; 271: 1836-1844, 1994

11. Dhainaut JF, Tenailon A, Le Tulzo Y, Schlemmer B, Solet JP, Wolff M, Holzapfel L, Zeni F, Dreyfuss D, Mira JP et al. Platelet-activating factor receptor antagonist BN 52021 in the treatment of severe sepsis : a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial. *Crit Care Med*; 22: 1720-1728, 1994
12. Zeni F, Freeman B and Natanson C. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: A reassessment. *Crit Care Med*; 25(7): 1095-100, 1997
13. Bone RC. Why sepsis trial fail? *JAMA*; 21: 565-566, 1996
14. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS. *Crit Care Med*; 24 (7): 1125-1128, 1997
15. Bone RC, Grodzin CJ and Balk RA. Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*; 112: 235-243, 1997
16. Barton R and Cerra FB. The hypermetabolism. *Chest*; 96 (5) : 1153-60, 1989
17. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF and Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*; 330(6149): 662-664, 1987

18. Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M, Hageman R and Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature*; 348: 550-552, 1990
19. Bone RC and Jacobs ER. Research on ibuprofen for sepsis and respiratory failure. *Am J Med*; 77(1A): 114-20, 1984
20. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM and Sibbald WJ. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*; 101: 1644-55, 1992
21. Wheller AP and Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *New England Journal of Medicine*; 340(3): 207-214, 1999
22. Debets JM, Kampmeijer R, van der Linden MP, Buurman WA and van der Linden CJ. Plasma tumor factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit Care Med*; 17: 489-94, 1989
23. Oberholzer A, Oberholzer C and Moldawer LL. Cytokine signaling – regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med*; 28:Suppl:N3-N12, 2000
24. Pruitt JH, Welborn MB, Edwards PD, Harward TR, Seeger JW, Martin TD, Smith C, Kenney JA, Wesdorp RI, Meijer S, Cuesta MA, Abouhanze A, Copeland EM 3rd, Giri J,

Sims JE, Moldawer LL and Oldenburg HS. Increased soluble interleukin-1 type II receptor concentrations in postoperative patients and in patients with sepsis syndrome. *Blood* 87: 3282-8, 1996

25. Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE and Remick DG. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J Immunol*; 148: 2724-30, 1992

26. Fisher CJ, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM and Benjamin E. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein. *New England Journal of Medicine*; 334: 1697-702, 1996

27. Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med*; 24(1): 163-72, 1996

28. Riedmann NC, Guo RF and Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest*; 112 (4): 460-67, 2003

29. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR and Girkontaite I. Immunossuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390: 350-51, 1997

30. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP and Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis : a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*; 181: 176-80, 2000
31. O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, Mannick JA and Rodrick ML. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg*; 222: 482-92, 1995
32. Munford MS, Pugin J. Normal responses to injury prevents systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Resp Crit Care Med*; 163: 316-21, 2001
33. Lederer JA, Rodrick ML and Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock*; 11 (3): 153-59, 1999
34. Damas P, Canivet JL, Groote DD, Vrindts Y, Albert A, Franchimont P and Lamy M. Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit Care Med*; 25 (3): 405-12, 1997
35. Vasselon T and Detmers PA. Toll receptors: A central element in innate immune responses. *Infect. Immun.*; 70(3):1033-41, 2002
36. Oberholzer A, Oberholzer C and Moldawer M. Sepsis syndrome: Understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock*; 16(2): 83-96, 2001

37. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Castagnoli PR, Layton B and Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57Bl/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*; 282: 2085-8, 1998
38. Muzio M and Mantovani A. Toll-like receptors. *Microbes and Infect*; 2: 251-255, 2000
39. Takeda K, Kaisho T and Akira S. Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol*; 21: 335-76, 2003
40. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A and Nunez G. Human NOD1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem*; 276:2551-54, 2001
41. Fink MP. Research advances in cell biology relevant to critical illness. *Cur Op Crit Care*; 10: 279-91, 2004
42. Chiamolera, M. Expressão dos receptores Fc de imunoglobulina A em fagócitos do sangue de pacientes com bacteremia [tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.
43. Opal SM and DePalo VA. Impact of basical research on tomorrow's medicine: Anti-inflammatory cytokines. *Chest*; 117: 1162-72, 2000

44. Barton BE. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol*; 85: 16-20, 1997
45. Zurawski G and de Vries JE. Interleukin-13, an IL-4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today*; 15: 19-26, 1994
46. Mulligan MS, Warner RL, Foreback JL, Shanley TP and Ward PA. Protective effects of IL-4, IL-10, IL-12 and IL-13 in IgG-immune complex-induced lung injury: role of endogenous IL-12. *J Immunol*; 159: 3483-89, 1997
47. Lentsch AB, Czermak BJ, Jordan JA and Ward PA Regulation of acute lung injury by endogenous IL-13. *J Immunol*; 162: 1071-76, 1999
48. Litterio JJ and Roberts AB. TGF- β : a critical modulator of immune cell function. *Clin Immunol Immunopathol*; 84: 244-50, 1997
49. Aizawa Y, Akita K, Taniai M, Torigoe K, Mori T, Nishida Y, Ushio S, Nukada Y, Tanimoto T Ikegami H, Ikeda M and Kurimoto M. Cloning and expression of interleukin-18 binding protein. *FEBS Lett*; 445: 338-42, 1999
50. Yasukawa H, Sasaka and Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Ann Rev Immunol*; 18: 143-164, 2000

51. Wilson M, Seymour R and Henderson B. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect Immun*; 66: 2401-09, 1998
52. Zlotnik A and Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*; 12: 121-27, 2000
53. Rossi D and Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Ann Rev Immunol*; 18: 217-42, 2000
54. Rot A and von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host response: Basic chemokinese grammar for immune cells. *Ann Rev Immunol*; 22: 891-928, 2004
55. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*; 90: 909-28, 1997
56. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, Kunkel SL and Waltz A, Hudson LD, Martin TR. Inflammatory cytokines in patients with persistence of acute respiratory distress syndrome. *Am J Resp Crit Care Med*; 154: 602-11, 1996
57. Goodman RB, Strieter RM, Frevert CW, Cummings CJ, Tekamp-Olson P, Kunkel SL, Walz A and Martin TR. Quantitative comparison of CXC-chemokines produced by endotoxin-stimulated human alveolar macrophages. *Am J Physiol*; 275: L87-95, 1998

58. Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, Hagen TR, Steinberg KP and Goodman RB. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol*; 162: 2341-46, 1999
59. Ness TL, Hogaboam CM, Strieter RM and Kunkel SL. Immunomodulatory role of CXCR2 during experimental septic peritonitis. *J Immunol*; 175: 3775-84, 2003
60. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Strieter RM and Kunkel SL. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: Cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol*; 163: 6148-54, 1999
61. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S and Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature*; 2(10): 947-50, 2001
62. Akira S, Takeda K and Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature*; 2(8): 675-80, 2001
63. Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, van Dyke T and Banchereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induces different classes of immune responses in vivo. *J Immunol*; 167: 5067-76, 2001
64. Ravetch JV and Kinet J-P. Fc Receptors. *Annu Rev Immunol*; 9: 457-92, 1991

65. Ravetch JV and Bolland S. IgG Fc Receptors. *Ann Rev Immunol*; 19: 275-90, 2001
66. Billadeau DD and Leibson PJ. ITAMs versus ITIMs : striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest*; 109 (2): 161-68, 2002
67. Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H and Ravetch JV. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc γ RII-deficient mice. *Nature*; 379: 346-49, 1996
68. Unkeless JC, Scigliano E and Freedman VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Ann Rev Immunol*; 6:251-81, 1988
69. Fridman WH, Bonnerot C, Daeron M, Amigorena S, Teillaud JL and Sautes C. Structural bases of Fc γ receptor functions. *Immunol Rev*; 125:49-76, 1992
70. van de Winkel JG and Anderson CL. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol*; 49: 511-24, 1991
71. Van den Herik-Oudijk IE, Westerdall NA, Henriquez NV, Capel PJ and Van de Winkel. Functional analysis of human Fc γ RII (CD32) isoforms expressed in B lymphocytes. *J Immunol*; 152: 574-85, 1994
72. Sylvestre D and Ravetch JV. A dominant role for mast cell Fc receptors in the Arthus reaction. *Immunity*; 5: 1-20, 1996

73. Sylvestre D, Clynes R, Ma M, Warren H, Carroll MC and Ravetch JV. IgG mediated inflammatory responses develop normally in complement deficient mice. *J Exp Med*; 184 (6): 2385-92, 1996
74. Shibuya A, Sakamoto N, Shimizu Y, Shibuya K, Osawa M, Hiroyama T, Eyre HJ, Sutherland GR, Endo Y, Fujita T, Miyabayashi T, Sakano S, Tsuji T, Nakayama E, Phillips JH, Lanier LL and Nakauchi H. Fc α / μ receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nature*; 1(5): 441-46, 2000
75. Monteiro RC and van de Winkel JGJ. IgA Fc Receptors. *Annu Rev Immunol*; 21:177-204, 2003
76. Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. Cellular distribution, regulation and biochemical nature of an Fc α receptor in humans. *J Exp Med*; 171: 597-613, 1990
77. Launay P, Grossetête B, Arcos-Fajardo M, Gaudin E, Torres SP, Beaudoin L, de Serre NPM, Lehuen A and Monteiro RC. Fc α Receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) Nephropathy (Berger's Disease): Evidence for pathogenic soluble receptor-IgA complexes in patients and CD89 transgenic mice. *J Exp Med*, 191(11): 1999-2009, 2000

78. Herr AB, Ballister ER, Bjorkman PJ. Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human Fc α RI and its complex with IgA1-Fc. *Nat Med*; 423: 614-20, 2003
79. Herr AB, White CL, Milburn C, Wu C, Bjorkman PJ. Bivalent binding of IgA1 to Fc α RI suggests a mechanism for cytokine activation of IgA phagocytosis. *J Mol Biol*; 327: 645-57, 2003
80. Kilian M, Reinhold J, Lomholt H, Poulsen K and Frandsen EV. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *Apmis*; 104: 321-38, 1996
81. Morton HC, van Egmond M and vna de Winkel GJ. Structure and function of human IgA Fc receptors. *Crit Rev Immunol*; 16: 423-40, 1996
82. Bouvet JP. Complexité de la première barrière de défense immunitaire dans les muqueuses. *Médecine/Sciences*; 12 (15): 1395-1400, 1999
83. Schaffer FM, Monteiro RC, Volanakis JE and Cooper MD. IgA deficiency. *Immunodef Rev*; 3: 15-44, 1991
84. Conley ME and Delacroix DL. Intravascular and mucosal immunoglobulin A : Two separate but related systems of immune defense? *Ann Int Med*; 106: 892-99, 1987

85. Quan CP, Berneman A, Pires R, Avrameas S and Bouvet JP. Naturally secretory immunoglobulin A polyreactive autoantibodies as a possible immune barrier in humans. *Infect Immun*; 69: 3997-4004, 1997
86. Ochsenbein AF and Zinkernagel RM. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today*; 21 (12): 624-30, 2000
87. Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H and Zinkernagel RM. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*; 286: 2156-59, 1999
88. Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J Exp Med*; 188 (12): 2381-86, 1998
89. Hellwig SMM, van Sriel AB, Schellekens JPF, Mooi FR and van de Winkel JGJ. Immunoglobulin A-mediated protection against *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun*; 69(8): 4846-4850, 2001
90. Shen L. Receptors for IgA on phagocytic cells. *Immunol Res*; 11: 273-82, 1992

91. Wolf HM, Fischer MB, Puhlinger, Samstag A, Vogel E and Eibl MM. Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (Tumor necrosis factor- α , Interleukin-6) in human monocytes. *Blood*; 83(5): 1278-88, 1994
92. Wolf HM, Hauber I, Gulle H, Samstag A, Fischer MB, Ahmad RU and Eibl MM. Anti-inflammatory properties of human serum IgA: induction of IL-1 receptor antagonist and Fc α R (CD89)-mediated down-regulation of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and IL-6 in humans monocytes. *Clin Exp Immunol*; 105: 537-43, 1996
93. Kerr MA. The structure and function of human IgA. *Biochem J*; 271: 285-96, 1990
94. Patry C, Herbelin A, Lehuen A, Bach JF and Monteiro RC. Fc α receptors mediate release of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 by human monocytes following receptor aggregation. *Immunology*; 86: 1-5, 1995
95. Ferreri NR, Howland WC and Spiegelberg HL. Release of leukotrienes C4 and B4 and prostaglandin E2 from human monocytes stimulated with aggregated IgG, IgE and IgA. *J Immunol*; 136: 4188- 93, 1986
96. Shen L and Collins J. Monocyte superoxide secretion triggered by human IgA. *Immunology*; 80: 287-92, 1989

97. van Egmond M, van Garderen E, van Spriel AB, Damen CA, van Amersfoort ES, van Zandbergen G, van Hattum J, Kuiper J and van de Winkel JGJ. Fc α RI-positive Kupffer liver cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med*; 6: 680-85, 2000
98. Daeron M. Fc receptor biology. *Ann Rev Immunol*; 15: 203-34, 1997
99. Lin S, Cicala C, Scharenberg AM and Kinet J-P. The Fc ϵ RI β subunit functions as an amplifier of Fc ϵ RI γ -mediated cell activation signals. *Cell*; 89: 985-95, 1996
100. Kuster H, Thompson H and Kinet JP. Characterization and expression of the gene for the human Fc receptor γ subunit. *J Biol Chem*; 265 (11): 6448-52, 1990
101. Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R and Ravetch JV. FcR γ chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell*; 76: 519-29, 1994
102. Miller KL, Duchemin AM and Anderson CL. A novel role for the Fc receptor γ subunit: enhancement of Fc γ R ligand affinity. *J Exp Med*; 183: 2227-33, 1996
103. Kinet JP. The γ - ζ dimers of Fc receptors as connectors to signal transduction. *Curr Opin Immunol*; 4: 43-48, 1992

104. Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S and Pawson T. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc γ Receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol*; 18(7): 4209-20, 1998
105. Unkeless JC and Jin J. Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Cur Op Immunol*; 9: 338-43, 1997
106. Daeron M and Vivier E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today*; 18(6): 286-91, 1997
107. Scharenberg AM and Kinet JP. The emerging field of receptor-mediated inhibitory signaling: SHP or SHIP? *Cell*; 87: 961-64, 1996
108. Masao O, Bolland S, Tempst P and Ravetch JV. Role of inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc gamma RIIB. *Nature*; 383 (6597): 263-66, 1996
109. Pearse RN, Kawabe T, Bolland S, Guinamard R, Kurosaki T and Ravetch JV. SHIP recruitment attenuates Fc γ RIIB-induced B cell apoptosis. *Immunity*; 10: 753-60, 1999
110. Indik ZK, Park JG, Hunter S and Schreiber AD. The molecular dissection of Fc γ receptor mediated phagocytosis. *Blood*; 86 (12): 4389-99, 1995

111. Dietrich J, Nakajima H and Colonna M. Human inhibitory and activating Ig-like receptors which modulate the function of myeloid cells. *Microb Infect*; 2: 323-29, 2000
112. Taylor LS and McVicar DW. Functional association of FcεRIγ with Arginine⁶³² of paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A3 in murine macrophages. *Blood*; 94 (5): 1790-96, 1999
113. Maeda A, Kurosaki M and Kurosaki T. Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A is involved in activating mast cells through its association with Fc receptor γ chain. *J Exp Med*; 188: 991-95, 1998
114. Kubagawa H, Chen CC, Ho LH, Shimada TS, Gartland L, Mashburn C, Uehara T, Ravetch JV and Cooper MD. Biochemical nature and cellular distribution of the paired immunoglobulin-like receptors, PIR-A and PIR-B. *J Exp Med*; 189 (2): 309-17, 1999
115. Chen CC, Hurez V, Brockenbrough JS, Kubagawa H and Cooper MD. Paternal monoallelic expression of the paired immunoglobulin-like receptors PIR-A and PIR-B. *PNAS*; 96: 6868-72, 1999
116. Takai T and Ono M. Activating and inhibitory nature of the murine paired immunoglobulin-like receptor family. *Immunol Rev*; 181: 215-22, 2001

117. Merck E, Gaillard C, Gorman DM, Montero-Julian F, Durand I, Zurawski SM, Menetrier-Caux C, Carra G, Lebecque S, Trinchieri G and Bates EE. OSCAR is an FcRgamma-associated receptor that is expressed by myeloid cells and is involved in antigen presentation and activation of human dendritic cells. *Blood*; 104: 1386-95, 2004
118. Kim N, Takami M, Rho J, Josien R and Choi Y. A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. *J Exp Med*; 195: 201-209, 2002
119. Merck E, Saint-Vis B, Scuiller M, Gaillard C, Caux C, Trinchieri G and Bates EE. Fc receptor γ -chain activation via hOSCAR induces survival and maturation of dendritic cells and modulates Toll-like receptor responses. *Blood*; jan 13, 2005
120. Tsuji M, Ezumi Y, Arai M and Takayama H. A novel association of Fc receptor γ -chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem*; 272 (28): 23528-31, 1997
121. Wu Y, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Asazuma N, Yatomi Y, Berndt MC and Ozaki Y. Role of Fc receptor γ -chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling. *Blood*; 97 (12): 3836-45, 2001
122. Davis RS, Dennis Jr. G, Odom MR, Gibson AW, Kimberly RP, Burrows PD and Cooper MD. Fc receptor homologs: newest members of a remarkably diverse Fc receptor gene family. *Immunol Rev*; 190: 123-36, 2002

123. Ravetch JV and Clynes RA. Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Ann Rev Immunol*; 16: 421-32, 1998
124. Sylvestre D, Clynes R, Ma M, Warren H, Carroll MC and Ravetch JV. Immunoglobulin G-mediated inflammatory responses develop normally in complement-deficient mice. *J Exp Med*; 184: 2385-92, 1996
125. Clynes R, Dumitru C and Ravetch JV. Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science*; 279: 1052-54, 1998
126. Clynes R, Maizes JS, Guinnard R, Ono M, Takai T and Ravetch JV. Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J Exp Med*; 189: 179-85, 1999
127. Ravetch JV. Fc Receptors. *Curr Op Immunol*; 9: 121-25, 1997
128. Heyman B. Regulation of antibody responses via antibodies, complement and Fc receptors. *Ann Rev Immunol*; 18: 709-37, 2000
129. Pasquier B, Launay P, Kanamaru Y, Moura IC, Pfirsch S, Ruffié C, Hénin D, Benhamou M, Pretolani M, Blank U and Monteiro RC. Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: Dual role of FcR γ ITAM. *Immunity*; 22: 31-42, 2005

130. Fink MP and O'Heard S. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res*; 49:186-96, 1990
131. Greisman SE, Hornick RB, Wagner HN Jr, Woodward WE and Woodward TE. The role of endotoxin during typhoid fever and tularemia in human. IV. The integrity of the endotoxin tolerance mechanism during infection. *J Clin Invest*; 48:613, 1969
132. Wyler F, Neutze JM and Rudolph AM. The effects of endotoxin on distribution of cardiac output in unanesthetized rabbits. *Am J Physiol*; 219: 265, 1976
133. Fink MP, Morrissey PE, Stein KL, Clement RE, Fiallo V and Gardiner WR. Systemic and regional hemodynamic effects of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase inhibition in normal and hyperdynamic endotoxemic rabbits. *Circ Shock*; 26:41, 1988
134. Law WR and Ferguson JL. Naloxone alters organ perfusion during endotoxin shock in conscious rats. *Am J Physiol*; 255: H1106, 1988
135. Breslow MJ, Miller CF, Parker SD, Walman AT and Traystman RJ. Effect of vasopressors on organ blood flow during endotoxin shock in pigs. *Am J Physiol*; 252:H291, 1987

136. Cunnion RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C and Parrillo JE. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation*; 75: 533, 1987
137. Wichterman, K.A.; Baue, A.E. and Chaudry, I.H. Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal. *J.Surg.Res*;29: 189-201, 1980
138. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock : A review and lessons learned. *Shock*; 9(1): 1-11, 1998
139. Remick D, Manohar O, Bolgos G, Rodriguez J, Moldawer L and Wollenberg G. Blockade of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharyde lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture. *Shock*; 4(2): 89-95, 1995
140. Sato T, Isoyama T, Tanaka J, Jones RT, Cowley RA and Trump BF. The pathophysiology of septic shock : Changes in hemodynamics in rats following live *E.coli* injection. An application of the thermodilution method for measurement of cardiac output. *Adv Shock Res*; 7: 25, 1982
141. Pass LJ, Schloerb PR, Pearce FJ and Drucker WR. Cardiopulmonary response of the rat to gram-negative bacteremia. *Am J Physiol*; 246: H344, 1984
142. Carroll GC and Snyder JV. Hyperdynamic severe intravascular sepsis depends on fluid administration in cynomolgus monkey. *Am J Physiol*; 243: R131, 1982

143. Schaer GL, Fink MP, Chernow B, Ahmed S and Parrillo JE. Renal hemodynamics and prostaglandin E2 excretion in a non-human primate model of septic shock. *Crit Care Med*; 18: 52, 1990
144. Hangen DH, Bloom RJ, Stevens JH, O'Hanley P, Ranchod M, Collins J and Raffin TA. Adult respiratory distress syndrome: A live *E. coli* septic primate model. *Am J Pathol*; 126: 396, 1987
145. Bartlett JG, Onderdonk AB, Louie T, Kasper DL, Gorbach SL. Lessons from an abdominal model of intra-abdominal sepsis. *Arch Surg*; 113: 853, 1978
146. Onderdonk AB, Weinstein WM, Sullivan NM, Bartlett JG and Gorbach SL. Experimental intraabdominal abscesses in rats: Quantitative bacteriology of infected animals. *Infect. Immun*; 13:22, 1976
147. Weinstein WM, Onderdonk AB, Bartlett JG and Gorbach SL. Experimental intra-abdominal abscesses in rats: Development of an experimental model. *Infect Immun*; 10: 1250, 1974
148. Hau T and Simmons RL. Surgical pros and cons. *Surg Gynecol Obstet*; 144: 755, 1977

149. Ahrenholz DH and Simmons RL. Fibrin in peritonitis. I. Beneficial and adverse effects of fibrin in experimental *E. Coli* peritonitis. *Surgery*; 88:41, 1980
150. Nakatani T, Sato T, Marzella L, Hirai F, Trump FB and Siegel JH. Hepatic and systemic metabolic response to aerobic and anaerobic intra-abdominal abscesses in a high reproducible chronic rat model. *Circ Shock*; 13: 271, 1984
151. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Evanoff HL, Strieter RM and Kunkel SL. Expression and contribution of endogenous IL-13 in an experimental model of sepsis. *J Immunol*; 164: 2738-44, 2000
152. van der Poll T, Marchant, A, Buurman WA, Berman L, Keogh CV, Lazarus DD, Nguyen L, Goldman M, Moldawer LL and Lowry SF. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol*; 155: 5397-401, 1995
153. Riedemann NC, Guo RF, Bernacki KD, Reuben JS, Laudes IJ, Neff TA, Gao H, Speyer C, Sarma VJ, Zetoune FS and Ward PA. Regulation by C5a of neutrophil activation during sepsis. *Immunity*; 19: 193-202, 2003
154. Kato T, Murata A, Ishida H, Toda H, Tanaka N, Hayashida H, Monden M and Matsuura N. Interleukin 10 reduces mortality from severe peritonitis in mice. *Antimicrob Ag Chem*; 39 (6): 1336-40, 1995

155. Clowes GH, Zuschned A, Turner M, Blackburn G, Rubin J, Toala P and Green G. Observations on the pathogenesis of the pneumonitis associated with severe infection in other parts of the body. *Ann Surg*; 167: 630, 1968
156. Richmond JM, Walker JF, Avila A, Petrakis A, Finley RJ, Sibbald WJ and Linton AL. Renal and cardiovascular response to nonhypotensive sepsis in a large animal model with peritonitis. *Surgery*; 97: 205, 1985
157. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL and Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*; 13 (2): 110-16, 2000
158. Hiramatsu M, Hotchkiss RS Karl IE and Buchman TG. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock*; 7 (4): 247-253, 1997
159. Albrecht M and Clowes GH Jr. The increase of circulatory requirements in the presence of inflammation. *Surgery*; 56: 158, 1964
160. Monteiro RC, Cooper MD and Kubagawa H. Molecular heterogeneity of Fc α Receptor detected by Receptor-Specific Monoclonal Antibodies. *The Journal of Immunology*, 148: 1764-1770, 1992

161. Unkeless JC. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med*, 150: 580-96, 1979
162. Kurlander RJ and Hall J. Comparison of intravenous gamma globulin and a monoclonal anti-Fc receptor antibody as inhibitors of immune clearance in vivo in mice. *J Clin Invest*; 77: 2010-18, 1986
163. Meng G, Rutz M, Schiemann M, Metzger J, Grabiec A, Schwandner R, Lippa PB, Ebel F, Busch DH, Bauer S, Wagner H and Kirschning CJ. Antagonistic antibody prevents toll-like 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest*; 113 (10): 1473-81, 2004
164. Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO and Baue AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery*, 94: 331-335, 1983
165. Seki S, Osada SI, Ono S, Aosasa S, Habu Y, Nishikage T, Mochizuki H and Hiraide H. Role of liver NK cells and peritoneal macrophages in gamma interferon and interleukin-10 production in experimental bacterial peritonitis in mice. *Infect Immun*; 66 (11): 5286-94, 1998
166. Kalechman Y, Gafter U, Gal R, Rushkin G, Yan D, Albeck M and Sredni B. Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from

sepsis-induced death : dependence on timing of immunomodulating intervention. *J Immunol*; 169: 384-92, 2002

167. Leijh PC, van den Barselaar MT, van Zwet TL, Daha MR and van Furth R. Requirement of extracellular complement and immunoglobulin for intracellular killing of microorganisms by human monocytes. *J Clin Invest*; 63:772-84, 1979

168. Sukumaran SK, Shimada H and Prasad Rao NV. Entry and intracellular replication of *Escherichia coli* K1 in macrophages require expression of outer membrane protein A. *Infect Immun*; 71 (10): 5951-61, 2003

169. Dijkmans BAC, Leijh PCJ, Braat AGP and van Furth R. Effect of bacterial competition on the opsonisation, phagocytosis and intracellular killing of microorganisms by granulocytes. *Infect Immun*; 49: 2192-24, 1985

170. Lincoln JA, Lefkowitz DL, Cain T, Castro A, Mills KC, Lefkowitz SS, Moguilevski N and Bollen A. Exogenous myeloperoxidase enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by macrophages. *Infect Immun*; 63 (8): 3042-47, 1995

171. Finlay-Jones JJ, Hart PH, Spencer LK, Nulsen MF, Kenny PA and McDonald PJ. Bacterial killing in vitro by abscess-derived neutrophils. *J Med Microbiol*; 34: 73-81, 1991

172. Hampton MB, Vissers MCM and Winterbourn CC. A single assay for measuring the rates of phagocytosis and bacterial killing by neutrophils. *J Leuk Biol*; 55: 147-152, 1994
173. Zheng L, Nibbering PH and van Furth R. Stimulation of the intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes mediated by Fc γ receptors I and II. *Eur J Immunol*; 23: 2826-33, 1993
174. DeForge LE, Billeci KL and Kramer SM. Effect of IFN- γ on the killing of *S. aureus* in human whole blood: Assessment of bacterial viability by CFU determination and by a new method using alamarBlue. *J Immunol Methods*; 245: 79-89, 2000
175. Cassard L, Cohen-Solal JFG Galinha A, Sastre-Garau X, Mathiot C, Galon J, Dorval T, Bernheim A, Fridman WH and Sastres-Fridman C. Modulation of tumor growth by inhibitory Fc γ receptor expressed by human melanoma cells. *J Clin Invest*; 110 (10): 1549-57, 2002
176. Underhill DM and Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: Complexity in action. *Ann Rev Immunol*; 20: 825-52, 2002
177. Aderem A and Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Ann Rev Immunol*; 17: 593-623, 1999

178. Hunter S, Indik ZK, Kim M, Cauley MD, Park JG and Schreiber AD. Inhibition of Fc γ receptor-mediated phagocytosis by a nonphagocytic Fc γ receptor. *Blood*; 91 (5): 1762-68, 1998
179. Pricop L, Redecha P, Teillaud JL, Frey J, Fridman WH, Sautès-Fridman C and Salmon JE. Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc γ receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol*; 166: 531-37, 2001
180. Okazawa H, Motegi S, Ohyama N, Ohnishi H, Tomizawa T, Kaneko Y, Oldenborg PA, Ishikawa O and Matozaki T. Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-1 system. *J Immunol*; 174: 2004-11, 2005
181. Gresham HD, Dale BM, Potter JW, Chang PW, Vines CM, Lowell CA, Lagenaur CF and Willman CL. Negative regulation of phagocytosis in murine macrophages by the Src kinase family member Fgr. *J Exp Med*; 191 (3): 515-28, 2000
182. Cox D, Dale BM, Kashiwada M, Helgason CD and Greenberg S. A regulatory role for Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) in phagocytosis mediated by Fc γ receptors and complement receptor 3 ($\alpha_M\beta_2$; CD11b/CD18). *J Exp Med*; 193 (1): 61-71, 2001

183. Maresco DL, Osborne JM, Cooney D, Coggeshall KM and Anderson CL. The SH2-containing 5'-inositol phosphatase (SHIP) is tyrosine phosphorylated after Fc γ receptor clustering in monocytes. *J Immunol*; 162: 6458-65, 1999
184. Elomaa O, Sankala M, Pikkarainen T, Bergmann U, Tuuttila A, Raatikainen-Ahokas A, Sariola H and Tryggvason K. Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. *J Biol Chem*; 273 (8): 4530-38, 1998
185. Garcia-Garcia E and Rosales C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leuk Biol*; 72: 1092-1107, 2002
186. Gillooly DJ, Simonsen A and Stenmark H. Phosphoinositides and phagocytosis. *J Cell Biol*; 155 (1): 15-17, 2001
187. Etienne-Manneville S and Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*; 420 : 629-35, 2002
188. Swanson JA and Hoppe AD. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leuk Biol*; 76: 1093-1103, 2004

189. Black DS and Bliska JB. The Rho GAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol*; 37: 515-27, 2000
190. Flo TH, Halaas Ø, Lien E, Ryan L, Teti G, Golenbock DT, Sundan A and Espevik T. Human Toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B Streptococci or lipopolysaccharide. *J Immunol*; 164: 2064-69, 2000
191. Blander JM and Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from Toll-like receptors. *Science*; 304: 1014-18, 2004
192. Underhill DM, Ozinski A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti and Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*; 401: 811-15, 1999
193. Doyle SE, O'Connell RM, Miranda GA, Vaidya SA, Chow EK, Liu PT, Suzuki S, Suzuki N, Modlin RL, Yeh WC, Lane TF and Cheng G. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp Med*; 199 (1): 81-90, 2004
194. Celli J, Oliver M and Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *EMBO*; 20 (6): 1245-58, 2001

195. Goosney DL, Celli J, Kenny B and Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. *Infect Immun*; 67 (2): 490-95, 1999
196. Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2: 569-77, 2001
197. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M and Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*; 3 (11): 1033-40, 2002
198. Mangan DF, Welch GR and Wahl SM. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α and IL-1 β prevent programmed cell death in human peripheral blood monocytes. *J Immunol*; 146: 1541-6, 1991
199. Estaquier J and Ameisen JC. A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the regulation of human monocyte apoptosis. *Blood*; 90: 1618-25, 1997
200. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C and Kalden JR. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*; 390: 350-51, 1997
201. Green DR and Beere HM. Gone but not forgotten. *Nature*; 405: 28-29, 2000

202. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S and Bhardwaj N. Consequences of cell death : Exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*; 191 (3): 423-33, 2000
203. Hotchkiss RS, Chang KC, Grayson MH, Tinsley KW, Dunne BS, Davis CG, Osborne DF and Karl IE. Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *PNAS*; 100 (11): 6724-29, 2003
204. Hotchkiss RS, Swanson PE Cobb JP, Jacobson ABS, Buchman TG and Karl IE. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: Findings in normal and T and B cell deficient mice. *Crit Care Med*; 25 (8): 1298-1307, 1997
205. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ and Karl IE. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *PNAS*; 96 (25): 14541-46, 1999
206. Clatworthy MR and Smith KGC. Fc γ RIIb balances efficient pathogen clearance and the cytokine-consequences of sepsis. *J Exp Med*; 199 (5): 717-23, 2004
207. Gjertsson I, Kleinau S and Tarkowski A. The impact of Fc γ receptors on *Staphylococcus aureus* infection. *Microb Pathog*; 33: 145-52, 2002

208. Chiamolera M, Launay P, Montenegro V, Rivero MC, Velasco IT and Monteiro RC. Enhanced expression of Fc α receptor I on blood phagocytes of patients with gram-negative bacteremia is associated with tyrosine phosphorylation of the FcR- γ subunit. *Shock*; 16 (5): 344-48, 2001
209. Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Ann Rev Immunol*; 17: 875-904, 1999
210. Yokoyama WM, Kim S and French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Ann Rev Immunol*; 22: 405-29, 2004
211. Kollnberger S, Bird LA, Roddis M, Hacquard-Bouder C, Kubagawa H, Bodmer HC, Breban M, McMichael AJ and Bownes P. HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodent models of spondyloarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors. *J Immunol*; 173: 1699-710, 2004
212. Imlay JA. Pathways of oxydative damage. *Ann Rev Immunol*; 57: 395-418, 2003
213. Mayer-Scholl A, Averhoff P and Zychlinsky A. How do neutrophils and pathogens interact? *Cur Op Microbiol*; 7: 62-66, 2004
214. Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood*; 92 (9): 3007-17, 1998

215. Stokol T, O'Donnell P, Xiao L, Knight S, Stavrakis G, Botto M, von Andrian UH and Mayadas TN. C1q governs deposition of circulating immune complexes and leukocyte Fc γ receptors mediate subsequent neutrophil recruitment. *J Exp Med*; 200 (7): 835- 46, 2004
216. Wernersson S, Karlsson MCI, Dahlstron J, Mattsson R, Verbeek JS and Heyman B. IgG-mediated enhancement of antibody responses is low in Fc receptor γ chain-deficient mice and increased in Fc γ RII-deficient mice. *J Immunol*; 163: 618-22, 1999
217. Ioan-Facsinay A, Kimpe SJ, Hellwig SMM, van Lent PL, Hofhuis FMA, van Ojik HH, Sedlik C, Silveira SA, Gerber J, de Jong YF, Roozendaal R, Aarden LA, van den Berg WB, Saito T, Mosser D, Amigorena S, Izui S, van Ommen GJB, van Vugt M, van de Winkel JGJ and Verbeek JS. Fc γ RI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses and protection from bacterial infection. *Immunity*; 16: 391- 402, 2002
218. Refici ML, Metzger DW, Arulanandam BP, Lennartz MR and Leogering DJ. Fc γ -receptor signaling augments the LPS-stimulated increase in serum tumor necrosis factor- α levels. *Am J Physiol Regulatory Comp Physiol*; 280: R1037-44, 2001
219. Hussain R, Shiratsuchi H, Phillips M, Ellner J and Wallis RS. Opsonizing antibodies (IgG1) up-regulate monocyte proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and IL-6 but not anti-inflammatory cytokine IL-10 in

mycobacterial antigen-stimulated monocytes – implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol*; 123: 210-18, 2001

220. Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P and Mosser DM. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc γ receptor type I. *J Exp Med*; 188 (1): 217-22, 1998

221. Anderson CF and Mosser DM. Cutting Edge: Biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc γ receptors. *J Immunol*; 168: 3697-701, 2002

222. Annane D, Bellissant E and Cavaillon JM. Septic Shock. *Lancet* ; 365 : 63-71, 2005

223. Riedmann NC, Guo RF and Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*; 9 (5): 517-24, 2003

224. Pinsky MR. Dysregulation of the immune system in severe sepsis. *Am J Med Sci*; 328 (4): 220-29, 2004

225. Opal SM and Cross AS. Clinical Trials for severe sepsis. Past failures and future hopes. *Infect Dis Clin N Am*; 13 (2): 285-97, 1999

226. Sotto A, Lefrant JY, Fabbro-Peray P, Muller L, Tafuri J, Navarro F, Prudhomme M and La Coussaye JE. Evaluation of antimicrobial therapy management of 120 consecutive patients with secondary peritonitis. *J Antim Chem*; 50: 569-76, 2002
227. Brogden KA, Guthmiller Jm and Taylor CE. Human polymicrobial infections. *Lancet*; 365: 253-55, 2005
228. Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature Reviews*; 2: 580-92, 2002
229. Samuelsson A, Towers TL and Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science*; 291: 484-86, 2001
230. Takai T. Paired immunoglobulin-like receptors and their MHC class I recognition. *Immunology*; 115: 433-440, 2005
231. Ho LH, Uehara T, Chen C-C, Kubagawa H and Cooper MD. Constitutive tyrosine phosphorylation of the inhibitory paired Ig-like receptor PIR-B. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 86-90, 1999
232. Nakamura A, Kobayashi E and Takai T. Exacerbated graft-versus-host disease in *Pirb*^{-/-} mice. *Nat Immunol*; 5: 623-9, 2004