Mario Diego Teles Correia

**Características funcionais e potencial terapêutico dos
receptores Fc na inflamação sistêmica**

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

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos
Imunes e Infecciosos
Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pinheiro
da Silva

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de
2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Correia, Mario Diego Teles

Características funcionais e potencial
terapêutico dos receptores Fc na inflamação
sistêmica / Mario Diego Teles Correia. -- São
Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas.Área de
Concentração: Processos Imunes e Infeciosos.
Orientador: Fabiano Pinheiro da Silva.

Descritores: 1.Receptores Fc 2.Inflamação
3.Proteína wzxe 4.Sepse 5.Lupus 6.Imunidade inata
7.CD16 8.CD89 9.Escherichia coli 10.Streptococcus
pneumoniae

USP/FM/DBD-086/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Normatização Adotada

Este texto sistematizado está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa, pelo amor, incentivo, apoio incondicional e paciência nessa extenuante jornada que é a pós-graduação. Ao meu filho *Vicente* pela felicidade que me dá com seu grande sorriso de poucos dentes cotidiano. À minha filha *Olga*, prestes a nascer.

À minha querida *mãe*, *irmãos* e, principalmente, ao meu *pai*, grande incentivador da minha trajetória profissional e acadêmica.

Ao Prof. *Fabiano Pinheiro da Silva*, meu orientador, pela paciência comigo durante toda jornada de aprendizado desta pós-graduação. Com certeza não foi fácil orientar um médico intensivista durante esta imersão no mundo da ciência básica. Grande motivador, sobretudo em momentos de desalento, agradeço pela confiança e pelas oportunidades.

Ao Prof. *Renato Costa Monteiro*, por me proporcionar um intenso estágio em Paris, onde nunca pensei que trabalharia (e aprenderia) tanto.

Ao colegas, biólogos e técnicos do LIM-51, *Thaís*, especialmente *Suely* e *Hermes* pelo treinamento de técnicas de laboratório e manejo de animais, além da grande ajuda nos experimentos realizados no Brasil.

Aos meus colegas doutorandos e engenheiros do INSERM, na Faculdade de Medicina Paris VII – Diderot (USPC – Université Sorbonne Paris Cité), Hospital Bichat: *Lilian Abbad*, *Amaya Murua*, *Erwan Boedec*, *Rafael Solera* e

especialmente ao “réanimateur” Dr. *Chrystian de Tymowsky*, colega incansável e com quem colaborei e troquei profícuas idéias sobre este projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (*FAPESP*), pelo apoio financeiro, processos nº 2016/03665-1 (Bolsa de Doutorado Direto) e nº 2017/08609-5 (BEPE – Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior).

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras e Tabelas

Resumo

Summary

I Introdução	1
1.1 Receptores Fc de Imunoglobulinas.....	1
1.2 CD16 (receptor FcγRIII)	4
1.3 CD89 (FcαRI).....	6
1.4 CD16 e suas implicações no Lupus e em outras doenças autoimunes	8
1.5 Modelo de Lúpus induzido por pristane	11
1.6 CD16 como mecanismo de evasão imune na Sepses.....	13
1.7 CD89 e imunidade inata.....	15
II Objetivos	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
2.2.1 Experimentos com CD16.....	18
2.2.2 Experimentos com CD89	19
III Materiais e Métodos	20
3.1 Experimentos com CD16	20
3.1.1 Modelo de Sepses por injeção de bactérias	20
3.1.2 Modelo de lúpus induzido por pristane e tratamento com peptídeo CYWGGTEGAC	20
3.2 Experimentos com CD89	21
3.2.1 Sujeitos	21
3.2.2 Camundongos	22
3.2.3 Modelos de pneumonia e ligadura cecal.....	23
3.2.4 Células, reagentes e anticorpos.....	24

3.2.5 Citometria de fluxo	25
3.2.6 Citometria de fluxo com imagem.....	25
3.2.7 Expressão de proteínas na membrana dos BMMs	26
3.2.8 Bactérias e cultura microbiológica	26
3.2.9 Contagem de bactérias invasoras.....	27
3.2.10 Ensaio de fagocitose e ligação bacteriana.....	28
3.2.11 Morte bacteriana	28
3.2.12 Microscopia confocal a laser.....	29
3.2.13 Ensaio de produção de ROS em PMN por quimioluminescência ...	29
3.2.14 Imunoprecipitação e immunoblotting	30
3.2.15 Produção de proteínas solúveis e anticorpos	30
3.2.16 ELISA.....	30
3.2.17 PCR real-time	31
3.3 Análise Estatística.....	32
 IV Resultados.....	 33
4.1 Experimentos com CD16	33
4.1.1 Curva de mortalidade de camundongos submetidos a modelo de sepsis por injeção de bactérias	33
4.1.2 Análise da resposta inflamatória em modelo de infecção por injeção intra-peritoneal de bactérias WT e wzxe ^{-/-}	34
4.1.3 O tratamento de camundongos lúpicos usando peptídeo TEGA não alterou expressão gênica (RNA _m) ou protéica de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar.....	35
4.2 Experimentos com CD89	41
4.2.1 CD89 interage diretamente com bactérias gram-positivas e gram- negativas	41
4.2.2 Interação bactéria-CD89 em macrófagos de camundongos induz ativação celular, fagocitose de bactérias e morte bacteriana que são dependentes da cadeia FcR γ	45
4.2.3 Fagócitos de IDCV deficientes em IgA mediam fagocitose, produção de ROS e morte bacteriana através da interação com CD89.....	54
4.2.4 Papel da interação CD89-bactéria sob condições fisiológicas.....	59
4.2.5 Interação CD89-bactéria protege contra a mortalidade em dois modelos de sepsis	63
4.2.6 Proteção pelo CD89 contra a sepsis é dependente de cadeia FcR γ	67

4.2.7 CD89 protege contra sepse na ausência de CD16 durante infecções por gram-positivo.....	69
4.2.8 Proteção mediada por CD89 contra a sepse é independente de PCR e de anticorpos IgA anti-bactéria.....	70
V Discussão	75
5.1 Experimentos com CD16: lúpus, sepse e wzxe	75
5.2 Experimentos com CD89: ligação direta à bactérias e proteção do hospedeiro	79
VI Conclusões	85
VII Anexos	86
VIII Referências.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ADCC	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
BMDC	Bone Marrow Dendritic Cells (Células dendríticas da medula óssea)
BMM	Bone Marrow Macrophages (Macrófagos da medula óssea)
CD16	Receptor FcγRIII
CD16KO	Knockout para CD16
CD89 _{R209L} ^{tg}	Receptor CD89 R209L transgênico
CD89 ^{tg}	Receptor CD89 transgênico
cDNA	DNA complementar
CLP	Ligação cecal e punção
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin
DIC	Contraste diferencial de interferência
DS	Doador saudável
E. coli	Escherichia coli
ECA	Antígeno comum de enterobactérias
EPM	Erro padrão da média
Fab	Fragment antigen-binding
FAM-SE	Éster Succinimidil, carboxifluoresceína
Fc	Fragmento cristalizável
FcμR	Receptor de IgM
FcαRI	Receptor I de IgA ou CD89
FcR	Receptor Fc de Imunoglobulina
FcRL	Receptor Fc-like
FcγR	Receptores de IgG
FcγRII	Receptores de IgG tipo II ou CD32
FcγRIII	Receptores de IgG tipo III ou CD16
FcαR	Receptor de IgA
FcδR	Receptor de IgD
FcεR	Receptor de IgE

FITC	Fluoresceína isotiocianato
GM-CSF	Fator estimulante de colônia – granulócito macrófago
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HE	Corante Hematoxilina-eosina
IDCV	Imunodeficiência comum variável
IFM	Intensidade de Fluorescência média
IFN I	Interferon I
IFN α	Interferon α
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IgAh	Imunoglobulina A humana
IL	Interleucina
IP10	Proteína 10 induzida por interferon gama
IRF5	Fator 5 regulador de interferon
ITAM	Motivos de ativação de imunoreceptor baseados em tirosina
ITAMi	Motivos de ativação de imunoreceptor baseados em tirosina inibidor
IVIg	Imunoglobulina intravenosa
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeo
Lipid rafts	Microdomínios glicolipoprotéicos nas membranas celulares
Littermate	Camundongos da mesma ninhada
Lyn	Scr quinase
mAbs	Anticorpo monoclonal
MARCO	Receptor macrofágico com estrutura colagenosa
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MIP8a	Anticorpo contra CD89
RNA _m	RNA mensageiro
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NBZ/NZW F1	Camundongo New Zealand, desenvolve lúpus espontaneamente
NK	“Natural Killer”
PAMPS	“Pathogen-associated molecular pattern”
PBMC	“ <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> ”
PCR	Proteína C Reativa

PCR-KO	Knockout pra PCR
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldeído
PIGR	Receptor de imunoglobulina polimérica
PMN	Polimorfonuclear
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Meio de cultura celular, Roswell Park Memorial Institute
<i>S. p</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ou Pneumococo
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Scr	Família de tirosina quinase
SDS	Sulfato dodecil sódio
SH2	Domínio proteico das Scr quinase
SHP1	Proteína tirosina fosfatase
SJL	Linhagem de camundongo Swiss Jim Lambert, propensa a encefalomielite autoimune
STAT4	Fator de transcrição envolvido em inúmeras doenças autoimunes
Syk	Tirosina quinase citoplasmática
TEGA	Peptídeo ligante de CD16
TLR	Receptores Toll-like
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TREX1	Gene que codifica uma exonuclease de DNA humano
UFC	Unidade formadora de colônia
WGA	Wheat germ Agglutinin, lectina usada para coloração em biologia celular
WT	Wild type(selvagem)
Wzxe	Flipase do lipídio III, proteína envolvida na biossíntese do ECA(antígeno comum de enterobactérias)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Receptores Fc de IgG de humanos e camundongos e receptor Fc de IgA humano.....	5
Figura 2	Mecanismo proposto para explicar sinalização ITAM (ativatória) e ITAMi (inibitória) de receptores CD89 e CD16. Ativação multimérica causa ativação enquanto ativação monomérica inibição de mecanismos biológicos imunes como, produção de citocinas, de espécies reativas de oxigênio e fagocitose.....	8
Figura 3	Mecanismo de evasão imune de <i>E. coli</i> através de sinalização ITAMi, inibindo fagocitose e aumentando produção de TNF- α	15
Figura 4	Curvas de mortalidade de camundongos que receberam injeção intraperitoneal de <i>E. coli</i> selvagem (WT) ou <i>E. coli</i> mutada para wzxe ^{-/-} , durante 96h.....	33
Figura 5	Comparação entre os níveis de citocinas TNF, L1 β , IL-6, IL-10, MCP-1, coletadas de camundongos selvagens submetidos a modelo de sepse por injeção intraperitoneal de <i>E. coli</i> K-12 ou <i>E. coli</i> mutada wzx ^{-/-} (3.10 ⁸ UFC). O controle foi injetado com PBS.....	35
Figura 6	Expressão de RNAm das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17A em pulmões de camundongos. Dois tipos de camundongos (WT e CD16KO) divididos em 4 grupos cada (injeção com PBS, PBS + peptídeo, Pristane, Pristane + peptídeo).....	37
Figura 7	Expressão de RNAm de citocinas MCP-1 e IP-10 em pulmão de camundongos. Legenda representando as diversas intervenções no canto superior direito.....	38
Figura 8	Expressão de RNAm de IFN γ , TREX, IRF5 e STAT4 em pulmão de camundongos. Legenda representando as diversas intervenções no canto superior direito.....	39
Figura 9	Produção das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-17 ^a , em pulmão de camundongos. Legenda representando as diversas intervenções no canto superior direito.....	40

Figura 10	Produção de MCP-1 e IFN γ em pulmão de camundongos. Legenda representando as diversas intervenções no canto superior direito.....	41
Figura 11	Receptor CD89 recombinante solúvel interage diretamente com as bactérias. Ligação dose dependente do CD89 recombinante solúvel(sCD89) ao <i>S. pneumoniae</i> (A) ou <i>E. coli</i> (B) fixados. Ligação à albumina (alb) foi usada como controle.....	42
Figura 12	Comparação da ligação do sCD89 a vários tipos de bactérias fixadas imobilizadas em placas de ELISA.....	42
Figura 13	Interação do sCD89 com 10 ⁶ <i>E. coli</i> e 10 ⁶ <i>S pneumoniae</i> vivas (barras verdes) vs. fixadas (barras escuras).....	43
Figura 14	BMM coletados de camundongos CD89 ^{Tg} ou de controles (littermates) foram incubados com 100 bactérias/célula durante 2h à 4°C, lavadas e examinadas por microscopia confocal. Painéis à direita, quantificando as ligações (n=4) **p<0.01.....	44
Figura 15	BMM isolados de camundongos CD89 ^{Tg} ou de controles não-transgênicos foram incubados com 100 bactérias conjugadas/célula na presença ou ausência de anticorpo anti-CD89, MIP8a F(ab') ₂ (10 μ g/ml), ou de CD89 solúvel(sCD89, 500 μ g/ml) durante 2h à 4°C na presença de azida de sódio e subsequentemente analisados por citometria de fluxo IFM (intensidade de fluorescência média) Dados apresentados como média $\pm$ EPM; n=5. *p<0.05 **p<0.01 ns: não significativo.....	45
Figura 16	Produção de IL-6 e TNF- α no sobrenadante de BMM obtidos de camundongos transgênicos CD89 ^{Tg} e CD89 ^{R209L} ^{Tg} , e controles não transgênicos. Células foram incubadas por 16h na presença de <i>E. coli</i> ou <i>S. Pneumoniae</i> . Citocinas no sobrenadante foram medidas por ELISA.....	46
Figura 17	A ligação das bactérias <i>S. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> ao CD89 independe da cadeia y. A adição de sCD89 inibe a ligação de ambas as bactérias ao CD89.....	47
Figura 18	Quantificação da expressão de TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 normalizados para o isotipo controle em BMM de camundongos CD89 ^{Tg} ou selvagens (WT) estimulados ou não por <i>E. coli</i> ou <i>S. pneumoniae</i> (S.p) por 2 horas.....	48

Figura 19	Quantificação da expressão de CD16/32, CD64, CD16.2, CD89 e receptor de Manose normalizados para o isotipo controle, em BMM de camundongos CD89 ^{Tg} ou selvagens (WT) estimulados com <i>S. pneumoniae</i> (S.p).....	49
Figura 20	(A) Expressão de MARCO em BMM de camundongos WT e CD89 ^{Tg} . Histogramas representativos de coloração para MARCO pela citometria de fluxo em BMM de CD89 ^{Tg} (abaixo) e WT (acima), estimulados ou não com <i>E. coli</i> ou com <i>S. pneumoniae</i> . Os histogramas sombreados indicam coloração com os respectivos isotipos controles. (B) Quantificação da expressão de MARCO normalizado para o isotipo controle. ns: não significativo.....	50
Figura 21	Fagocitose de <i>E. coli</i> /pHrodo pelos BMM obtidos de camundongos CD89 ^{Tg} comparados aos controles (littermates). <i>E. coli</i> /pHrodo foram fagocitadas pelos BMM dos animais indicados na presença ou ausência de MIP8a F(ab)'2 ou CD89 recombinante solúvel (sCD89) de maneira dose dependente (100 a 800µg/ml). Células foram lavadas e analisadas por microscopia confocal a laser. À esquerda: imagens de microscopia. À direita: quantificação ***p<0.001.....	51
Figura 22	Produção de ROS após 30 min pelos BMM controles, transgênicos CD89 ^{Tg} e CD89 ^{R209L} ^{Tg} estimulados por <i>S. pneumoniae</i> (S.p) ou <i>E. coli</i> medidos por microscopia confocal (n=15). ** p<0.01.....	52
Figura 23	Quantificação de sobrevivência bacteriana após 2h de incubação com BMM de camundongos CD89 ^{Tg} , CD89 ^{R209L} ^{Tg} e controles. Dados apresentados como média ± EPM; n=3. **p<0.01, ***p<0.001.....	52
Figura 24	Indução de sinalização ITAM do CD89 pelo <i>S. pneumoniae</i> ou <i>E. coli</i> . Após incubação de BMM de camundongos não transgênicos, CD89 ^{Tg} ou CD89 ^{R209L} ^{Tg} com 10 ⁶ UFC de <i>S. pneumoniae</i> (painéis superiores) ou <i>E. coli</i> (painéis inferiores) pelos tempos indicados, proteínas co-imunoprecipitadas (IP) pelo mAb A77 anti-CD89 (acima) e proteínas totais (abaixo) foram analisadas por imunoblotting (IB) usando anticorpo policlonal de coelho anti-syk.....	53
Figura 25	(A) Após incubação de BMM de com <i>S. pneumoniae</i> (à direita) ou <i>E. coli</i> (à esquerda) durante os períodos indicados, as proteínas extraídas foram imunoprecipitadas com mAb A77 anti-CD89 e “probed” para SHP-1 co-imunoprecipitada usando anti-soro polyclonal anti-SHP-1	

	de Coelho. A quantidade total de SHP-1 na proteína extratida não precipitada correspondente é mostrada abaixo, novamente usando antisoro anti SHP-1 policlonal de Coelho para immunoblotting (IB) (B) Análise do recrutamento de syk e SHP-1 em fagócitos humanos. Em resposta a presença de <i>E. coli</i> e de <i>S. pneumoniae</i> , syk, mas não SHP-1, é recrutado para a subunidade FcRγ associada ao CD89. O recrutamento é inibido pela adição de sCD89. A quantidade total de syk e SHP-1 na proteína extraída é mostrada à direita.....	54
Figura 26	Gráficos representativos da expressão do CD89 nos monócitos isolados de doadores saudáveis (esquerda) e de pacientes com IDCV (direita) usando o anticorpo anti-CD89 com PE-conjugada e seu isotipo controle.....	55
Figura 27	Expressão aumentada de CD89 em monócitos e neutrófilos **p<0.001.....	55
Figura 28	Ligação de <i>S. pneumoniae</i> (S.p) ou de <i>E. coli</i> a monócitos sanguíneos de doadores saudáveis (DS, púrpura) ou de pacientes com IDCV (IDCV, vermelho) na presença de IgA monomérica (500 µg/ml) ou de MIP8a F(ab') ₂ (10µg/ml). Dados são apresentados como média ± EPM.....	56
Figura 29	Aumento da fagocitose de <i>E. coli</i> por monócitos de 6 indivíduos saudáveis, na ausência e após adição de IgA humana específica.....	57
Figura 30	Fagocitose de <i>E. coli</i> /pHrodo por monócitos/macrófagos humanos isolados de doadores saudáveis (DS) ou de pacientes com IDCV. Painéis esquerdos: imagens representativas Barras de escala: 200µm. Histograma à direita: quantificação (n=3). ns: não-significativo.....	58
Figura 31	Produção de espécies reativas de oxigênio em resposta à co-incubação de monócitos humanos de DS ou IDCV com <i>S. pneumoniae</i> (S.p) ou <i>E. coli</i> na presença ou ausência de anticorpo MIP8a F(ab') ₂ (n=3). *p<0.05 ns: não-significativo.....	58
Figura 32	Sobrevida bacteriana após incubação com monócitos humanos de DS ou IDCV por 2h nas presença ou ausência de anticorpo MIP-8a F(ab') ₂ . Dados são apresentados com média ± EPM. **p<0.01 ns: não-significativo.....	59
Figura 33	Ensaio com ELISA competitivo entre sCD89 e <i>S. pneumoniae</i> ou <i>E. coli</i> , e IgA humano não específico (à	

	esquerda) e com IgA humano específico com atividade de anticorpo antibacteriano (à direita).....	60
Figura 34	Fagocitose bacteriana pelos BMM de camundongos CD89 ^{Tg} comparado aos WT. Bactérias foram fagocitadas pelos BMM dos camundongos indicados na presença ou ausência de IgA não-específica em concentrações fisiológicas (2mg/ml). Células foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo. Dados apresentados como média ± EPM. *p<0.05 **p<0.01.....	61
Figura 35	Fagocitose bacteriana pelos BMDC obtidos de camundongos CD89 ^{Tg} (esquerda) comparados com WT (direita). Bactérias fagocitadas pelos BDMC dos camundongos indicados na presença ou ausência de IgA específica ou não-específica em concentrações fisiológicas(2mg/ml). Células foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo. Dados são apresentados como média ± EP. *p<0.05 ** p<0.01.....	62
Figura 36	Imagens representativas de <i>E. coli</i> (azul) e CD11c (vermelho) de BMDC de camundongos CD89 ^{Tg} ou WT capturadas por citometria de fluxo com imagem (barra de escala = 5 µm) e as percentagens do escore de fagocitose bacteriana.....	62
Figura 37	Sobrevida de CD89 ^{Tg} (linha vermelha) e controles não transgênicos (linha escura) após inoculação intranasal (momento 0) com <i>S. pneumonia</i> (n=25). Curvas de Kaplan-Meier e o log-rank test foram usados para comparar taxas de mortalidade.....	63
Figura 38	(A) Quantidades pulmonares menores de <i>S. pneumoniae</i> nos CD89 ^{Tg} quando comparados aos controles littermate. (B) Coloração de HE de cortes pulmonares de animais CD89 ^{Tg} e controles não transgênicos após infecção intranasal. Barra de escala = 200 µm. (C) Escore de alveolite por células monomórficas inflamatórias.***p<0.001.....	64
Figura 39	Expressão de RNAm de citocinas (IL-1 e TNF-α) foram avaliadas por reação em cadeia de polimerase reversa quantitativa de 5 amostras de tecidos pulmonares coletados 6 e 48h após infecção intranasal. Os níveis de RNAm foram normalizados para níveis de RNAm de β-actina. UA: Unidades arbitrárias. * p <0.05 ns: não-significante.....	65

- Figura 40 Aumento de sobrevivência de camundongos CD89^{Tg} (linha vermelha, n=26) comparado a camundongos não-transgênicos controle (linha preta, n=22) após CLP. Curvas de Kaplan-Meier log-rank test foram usados para comparar taxas de mortalidade..... 65
- Figura 41 (A) 48h após CLP, foram contadas as bactérias do fluido peritoneal nos camundongos CD89^{Tg} e controles. (B) Níveis de IL-1 e TNF- α no lavado peritoneal foram analisados por ELISA e 48h após CLP(n=3). Todos os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. *p<0.05 ***p<0.001 ns: não-significativo..... 66
- Figura 42 Aumento da sobrevivência de animais CD89^{Tg} após infecção pulmonar por inoculação intranasal com *S. pneumonia* comparado com CD89^{R209L}^{Tg} ou controles não transgênicos (gráfico à esquerda). Aumento da sobrevivência de camundongos CD89^{Tg} (n=10) em comparação com os CD89^{R209L}^{Tg} ou controles (n=10) após CLP (gráfico à direita). Curvas de Kaplan-Meier e o log-rank test foram usados para comparar as taxas de mortalidade. Dados foram apresentados como média $\pm$ EPM..... 67
- Figura 43 (A) Quantidades pulmonares diminuídas de *S. pneumoniae* nos CD89^{Tg} se comparado aos CD89^{R209L}^{Tg} ou controles (n=5). (B) Expressão de RNAm de citocinas inflamatórias IL1 e TNF- α foram avaliados por qPCR em amostras de RNA de tecido pulmonar coletadas 6h após inoculação intra-nasal de camundongos. Os níveis de mRNA das citocinas foram normalizados para os níveis de mRNA de β -actina. (C) Coloração por HE de seções pulmonares de camundongos CD89^{R209L}^{Tg} e controles não transgênicos littermates após infecção intra-nasal. Barras de escala = 200 μ m. (D) Depois de 48h de CLP, a contagem de bactérias no fluido peritoneal foi menos numerosa no líquido peritoneal de camundongos CD89^{Tg} do que nos CD89^{Tg} e controles(n=5). (E) Níveis de IL-1 e TNF- α no lavado peritoneal avaliados por ELISA 6 horas após CLP. UA: unidades arbitrárias. Dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. *p<0.05,**p<0.01, ns: não significativo..... 68
- Figura 44 Comparação da ligação do sCD16 à bactérias fixadas *E.coli* ou *S. pneumoniae* (S.p) ou albumina (Alb) imobilizadas em placa de ELISA. ns: não-significativo..... 69
- Figura 45 Taxas de sobrevivência de camundongos CD16 KO, CD16 KO-CD89^{Tg}, CD89^{Tg} ou controles após ou infecção intranasal por *S. pneumoniae* ou CLP. Curvas de Kaplan-

Meier e log-rank test foram usados para comparar taxas de mortalidade. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. ***p<0.001..... 70

Figura 46 Aumento da sobrevivência de animais CD89^{Tg}PCR-KO após infecção intranasal com *S. pneumoniae* comparado aos camundongos CRP-KO (n=12 por grupo). Aumento da sobrevivência de camundongos CD89^{Tg}PCR-KO (n=10) comparados com PCR-KO (n=10) após CLP. Curvas de Kaplan-Meier e teste log-rank foram usados para comparar taxas de mortalidade..... 71

Figura 47 (A) Contagens pulmonares menores de *S. pneumoniae* nos camundongos CD89^{Tg}PCR-KO após 48 horas quando comparado aos PCR-KO (n=4) (à esquerda). (B) Expressão de mRNA de citocinas (IL1 e TNF- α) foram avaliadas por qPCR de amostras de tecido pulmonar coletados 6 e 24h após infecção intra-nasal. Níveis de mRNA de citocinas foram normalizados para níveis de mRNA de β -actin. (C) Contagem de bactérias em fluido peritoneal 48 horas após CLP (n=4). (D) Níveis de IL-1 e TNF- α no lavado peritoneal avaliados por ELISA 6 e 48h após CLP (n=4). UA: unidades arbitrárias. * p <0.05 **p<0.01..... 72

Figura 48 (A) Quantificação da fagocitose de *S. pneumoniae* (esquerda) e *E. coli* (direita) e (B) sua inibição após incubação de 100 bactérias/BMM isolados de CD89^{Tg}PCRKO ou PCR-KO na presença de MIP8a anti-CD89 F(ab')₂. *p<0.05 ** p<0.01..... 73

Figura 49 Medida de anticorpos IgA de camundongos contra as bactérias indicadas 48 ou 168 horas após infecção com *S. pneumoniae* (esquerda) ou CLP (direita) em camundongos CD89^{Tg} ou CD89^{Tg}-PCR-KO. Dados foram apresentados como média $\pm$ EPM..... 74

.

..

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Níveis séricos de Igs de pacientes com CVID durante terapia de substituição com IgG.....	22
Tabela 2	Primers e sequências de sondas para RT-PCR. F indica o primer forward, R indica o primer reverso e P indica o probe FAM-TAMRA.....	32

RESUMO

Correia, MDT. *Características funcionais e potencial terapêutico dos receptores Fc na inflamação sistêmica* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: Os receptores Fc são proteínas de importância crucial no processo saúde-doença. São responsáveis pela ativação de mecanismos efetores e modulam a resposta imune e inflamatória. Têm papel central na patogênese de doenças autoimunes, sepse e doenças neoplásicas. O lúpus, protótipo das doenças autoimunes e a sepse, infecção grave que causa disfunção orgânica, são doenças inflamatórias nas quais o papel dos receptores Fc vêm sendo desvendados. Essas patologias têm alta morbidade e mortalidade, impondo enormes custos para sociedade. A descoberta que a *E. coli* se liga ao receptor CD16 (FcγRIII) para evadir-se do sistema imune, através da ligação com a proteína wzxe presente em sua membrana, torna esse receptor um alvo terapêutico interessante. O CD16 é um FcγR com ITAM que classicamente tem função ativadora e gera respostas inflamatórias ao se ligar a imunocomplexos. Porém, na sepse, a ligação direta com a *E. coli* induz uma ativação ITAMi, que bloqueia a produção de ROS e inibe a fagocitose e a morte desta bactéria. A manipulação dessa ativação inibitória (ITAMi), aparentemente anti-inflamatória, pode ser uma estratégia efetiva para o tratamento de doenças inflamatórias como a sepse e o lúpus. Inicialmente visamos avaliar a importância fisiológica e o papel terapêutico do peptídeo ligante do CD16, em modelo de sepse e em modelo de lúpus induzido por pristane, respectivamente. De maneira similar ao CD16, o CD89 (FcαRI) é capaz de mediar uma sinalização dual, ativatória ou inibitória, que depende da forma como se dá sua ligação às imunoglobulinas e imunocomplexos. Por isso, num segundo momento, averiguamos se o FcαRI (CD89) poderia se ligar à bactérias de maneira direta, na ausência de ligantes cognatos e mediar respostas pro ou anti-inflamatórias, protegendo ou não o hospedeiro. **Metodologia:** Camundongos C57Bl/6, WT e CD16KO com lúpus induzido por pristane, foram tratados com o peptídeo CYWGGTEGAC (IRG Bioscience, USA). A expressão gênica e proteica de diversas citocinas, assim como genes associados a assinaturas de interferon foram avaliados nos pulmões desses animais. Utilizamos também um modelo de sepse através da injeção intra-peritoneal de *E. coli* WT e *E. coli* mutante wzxe^{-/-}, no qual avaliamos mortalidade e produção de citocinas. Realizamos experimentos *in vitro* com BMM e BMDC murinos, fagócitos humanos e bactérias. A expressão de CD89 e de receptores cognatos foi avaliada através de citometria de fluxo. Empregamos a citometria de fluxo com imagem para análise da fagocitose. Foram realizados também, experimentos *in vivo* com camundongos WT e transgênicos: CD89^{tg}, CD89^{R209L} ^{tg} CD89^{tg}CD16KO, CD16KO e PCRKO. Comparamos mortalidade, produção de citocinas, quantidade de bactérias e lesão tecidual em modelos de

CLP e de pneumonia por administração nasal de *S. pneumoniae*. Produção de ROS pelos BMM foi avaliada por microscopia confocal e, nos PMN, por quimioluminescência. Immunoprecipitação e immunoblotting foram utilizados para avaliar recrutamento de syk e SHP-1. Utilizamos ELISA para ensaios de ligação de bactérias com CD89 e para quantificar TNF- α , IL-1 e IL-6. Resultados: Camundongos injetados com a bactéria mutante wzxe^{-/-} sobreviveram mais e produziram quantidade menor de citocinas reforçando o papel chave da proteína wzxe, no mecanismo de evasão imune da *E. coli*. Camundongos WT e CD16KO com lupus induzido por pristane, tratados ou não com peptídeo CYWGGTEGAC, não apresentaram diferenças na expressão gênica nem protéica de citocinas nem em genes associados a assinaturas de interferon em seus pulmões. O CD89 interage diretamente com bactérias gram-positivas e gram-negativas. A interação bactéria-CD89 em macrófagos murinos induz ativação celular, fagocitose e morte bacteriana, que são dependentes da cadeia FcR γ . Essa mesma interação protege contra a mortalidade em dois modelos de sepse (CLP e pneumonia) e é dependente da cadeia FcR γ e independente de PCR e IgA anti-bactéria. Conclusões: O CD16 e o CD89 são FcRs com ITAM que apresentam uma dualidade na forma de ativação através do ITAM, que em algumas situações pode ser inibitória (ITAMi). Nessa tese reforçamos o papel chave da proteína wzxe, ligante do CD16, como responsável pela evasão bacteriana da *E. coli* através de sinalização ITAMi. Por outro lado, falhamos em demonstrar diferenças após o tratamento de camundongos com lúpus induzido por pristane usando o peptídeo CYWGGTEGAC. Acreditamos que isso tenha ocorrido devido a dose inadequada do peptídeo ou proteólise por enzimas endógenas do camundongo, assim que o peptídeo é injetado. Novas doses ou a manipulação da estrutura do peptídeo são perspectivas futuras para este projeto. Quanto ao CD89, provamos seu papel extremamente importante na imunidade inata. Esse receptor, à semelhança do CD16, foi capaz de ligar-se diretamente a bactérias, na ausência de opsoninas e ligantes cognatos. O CD89 foi protetor tanto para infecção por gram-positivo quanto por gram-negativo enquanto o CD16 foi protetor apenas em modelo de pneumonia por gram-positivo.

Descritores: 1.Receptores Fc 2.Inflamação 3.Proteína wzxe 4.Sepse 5.Lupus 6.Imunidade inata 7.CD16 8.CD89 9.Escherichia coli 10.Streptococcus pneumoniae.

SUMMARY

Correia, MDT. *Functional characteristics and therapeutic potential of Fc receptors in systemic inflammation* [thesis] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introduction: Fc receptors are proteins of crucial importance in the health-disease process. They are responsible for the activation of effector mechanisms and modulate the immune and inflammatory responses. They play a central role in the pathogenesis of autoimmune diseases, sepsis and neoplastic diseases. Lupus, a prototype of autoimmune diseases and sepsis, a serious infection that causes organ dysfunction, are inflammatory diseases in which the role of Fc receptors has been unraveled. These pathologies have high morbidity and mortality, imposing enormous costs for society. *E. coli* has been found to bind directly to the FcγRIII(CD16) receptor to evade the immune system. This is due to the binding to the wzxe protein present in its membrane, making this receptor an interesting therapeutic target. CD16 is an FcγR with ITAM that classically has an activating function and generates inflammatory responses when binding to immunocomplexes. However, in sepsis, direct binding with *E. coli* induces an ITAMi activation, which blocks ROS production and inhibits phagocytosis and death of this bacterium. The manipulation of this apparently anti-inflammatory inhibitory signaling (ITAMi) may be an effective strategy for the treatment of inflammatory diseases such as sepsis and lupus. Initially we aimed to evaluate the physiological importance and therapeutic role of the CD16 binding peptide, in a sepsis model and pristane-induced lupus model, respectively. Similarly to CD16, CD89 (FcαRI) is capable of mediating dual, activating or inhibitory signaling, which depends on how it binds to immunoglobulins and immunocomplexes. Therefore, we assessed whether FcαRI (CD89) could bind to bacteria directly, in the absence of cognate ligands and mediate pro or anti-inflammatory responses, protecting or not the host. Methods: C57Bl/6 mice, WT and CD16KO with pristane-induced lupus were treated with the peptide CYWGGTEGAC (IRG Bioscience, USA). Gene and protein expression of cytokines, as well as genes associated to interferon signatures were evaluated in the lungs of these animals. We also used a sepsis model through the intra-peritoneal injection of *E. coli* WT and *E. coli* mutant wzxe^{-/-}, in which we evaluated mortality and production of cytokines. We performed in vitro experiments with murine BMM and BMDC, human phagocytes and bacteria. Expression of CD89 and cognate receptors was assessed by flow cytometry. Flow cytometry with imaging was employed for phagocytosis analysis. In vivo experiments were also performed on WT and transgenic mice: CD89^{tg}, CD89^{R209L} ^{tg} CD89^{tg}CD16KO, CD16KO and CRPKO. We compared the mortality, cytokine production, amount of bacteria and tissue injury in CLP and pneumonia by nasal administration of *S. pneumoniae*. ROS production by BMM was evaluated with confocal microscopy and, in PMN, by chemiluminescence. Immunoprecipitation and immunoblotting were used to evaluate recruitment of syk and SHP-1. We used ELISA for binding assays with CD89 and bacteria and quantification of TNF-α, IL-1 and IL-6. Results: Mice injected with wzxe^{-/-} mutant *E. coli* survived more and produced smaller amounts of cytokines, reinforcing the key role of the wzxe protein in the mechanism of immune evasion of *E. coli*. WT and CD16KO pristane induced

lupus mice, treated or not with the peptide CYWGGTEGAC didn't show differences in gene or protein expression of cytokines nor in interferon signature genes in their lungs. The bacterial-CD89 interaction in murine macrophages induces cellular activation, phagocytosis and bacterial death, which are dependent on the FcR γ chain. This same interaction protects against mortality in two models of sepsis (CLP and pneumonia) and is dependent on the FcR γ chain and independent of PCR and IgA anti-bacterium. Conclusions: CD16 and CD89 are ITAM-bearing FcRs that present a duality in the form of activation through ITAM, which in some situations may be inhibitory (ITAMi). In this thesis we reinforce the key role of wzxe protein, a CD16 ligand, as responsible for the bacterial evasion of *E. coli* through ITAMi signaling. On the other hand, we failed to demonstrate differences after treatment of pristane-induced lupus mice using the CYWGGTEGAC peptide. We believe that this was due to inadequate dose of the peptide or proteolysis by endogenous mouse enzymes, so the peptide is injected. New doses or manipulation of the peptide structure are future prospects for this project. As to CD89, we proved the extremely important role of CD89 in innate immunity. That receptor, similarly to CD16, was able to bind directly to bacteria, in the absence of opsonins and cognate ligands. CD89 was protective for both gram-positive and gram-negative infection while the CD16 was protective only in a model of gram-positive pneumonia.

Descriptors: 1.Fc receptors 2.Inflammation 3.Wzxe protein 4.Sepsis 5.Lupus 6.Innate Immunity 7.CD16 8.CD89 9.Escherichia coli 10.Streptococcus pneumoniae.

I INTRODUÇÃO

1.1 Receptores Fc de Imunoglobulinas

Anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas produzidas a partir de estímulo antigênico durante a resposta imune adaptativa. O conjunto de anticorpos de cada indivíduo reconhece uma ampla gama de antígenos encontrados ao longo da vida, estando envolvidos em uma imensa variedade de respostas biológicas tanto na saúde quanto na doença. Eles se ligam a antígenos específicos através de suas porções Fab com afinidades diferentes. Essa ligação é necessária para a ação do anticorpo, porém, exerce pouca ou nenhuma função por não ter atividade biológica *per se*. De tal maneira que, os anticorpos são, antes de tudo, mediadores da imunidade e suas principais atividades biológicas dependem de sua porção Fc (fragment crystallizable) (1,2).

A interação antígeno-anticorpo é reconhecida na superfície celular pelos receptores Fc de imunoglobulinas. Tais receptores foram descritos primordialmente como um grupo heterogêneo de glicoproteínas encontrados na superfície de leucócitos e posteriormente foram identificados em outros tipos celulares (células endoteliais p. ex.) e sob a forma solúvel em fluidos (3,4). Sua função precípua é unir o compartimento humoral ao celular, o que acontece no momento em que a Ig se liga ao FcR e ativa ou inibe a célula na qual está expresso. Estas funções efetoras dependem do tipo de célula (p.ex. monócitos, células dendríticas, células NK) onde esse receptor se localiza e do tipo de

receptor (de alta ou baixa afinidade, com ITAM ou ITIM, etc.) e incluem: fagocitose, “burst” oxidativo, degranulação celular, citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC) e ativação de genes para produção de citocinas e quimiocinas (5).

Os anticorpos consistem em duas cadeias leves (kappa ou lambda) e duas cadeias pesadas (alpha, delta, epsilon, gamma ou mu). A cadeia pesada determina o isotipo de anticorpo. Desta forma, classicamente são descritos receptores Fc de IgG, IgA, IgE, IgD e IgM, nomeados de acordo com sua especificidade pelos isotipos de imunoglobulinas (Ig) aos quais se ligam. FcγR para receptores IgG, FcεR para IgE, FcαR para IgA, FcδR para IgD e FcμR para IgM(6). Evolutivamente, os primeiros componentes a aparecer foram os receptores poli-Ig (PIGRs), receptores similares aos FcRs clássicos nos mamíferos, denominados FcRL (Fc receptor like), e a cadeia FcRγ. Essas moléculas aparecem inicialmente nos peixes ósseos enquanto o receptor para IgA só surge em mamíferos com placenta, indicando um aparecimento relativamente mais tardio (7).

Os FcR clássicos mais extensamente estudados são os receptores que se ligam a IgG, chamados de FcγR. Em humanos 3 classes foram identificadas: I (CD64), II (CD32) e III (CD16). O FcγRII e o FcγRIII existem sob três (A, B e C) e duas (A e B) formas, respectivamente. Os FcγRs são amplamente expressos, em graus variados, em células da linhagem hematopoiética, mas também em células não usuais como as células endoteliais (8,9). Esses receptores diferem em sua afinidade de ligação ao IgG: o FcγRI são receptores de alta afinidade enquanto o FcγRII e FcγRIII se ligam com menor afinidade. O FcγRI tem três

domínios extracelulares, enquanto os FcγRII e FcγRIII apenas dois, o que justifica a maior afinidade do primeiro (10).

O FcR específico para IgA, o FcαRI (CD89), permite a ligação de IgA monomérica ou dimérica com moderada afinidade, enquanto que imunocomplexos se ligam avidamente. A expressão desse receptor está restrita a células da linhagem mielóide, incluindo neutrófilos, a maioria dos monócitos/macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e células de Kupffer (11,12). Tanto CD89 quanto a IgA são proteínas altamente glicosiladas, o que afeta a avidez de ligação dessas moléculas (13-15).

Gradativamente novos receptores “não-clássicos” vêm sendo descritos, como por exemplo os receptores FcRn e os FcR tipo II (16). Estes últimos são representados pela família de receptores de lectina tipo-C, que incluem o CD209 (DC-SIGN) e o CD23. Juntamente com os receptores tipo I (clássicos), têm papel importante na regulação da imunidade inata e adaptativa (17).

Outra classificação dos receptores Fc é baseada em sua capacidade de estimular ou inibir mecanismos imunológicos, tais como: fagocitose, citotoxicidade, degranulação e produção de citocinas através de motivos de ativação ou inibição de imunoreceptor baseados em tirosina, conhecidos como ITAM e ITIM, respectivamente. ITAMs e ITIMs são motivos de fosforilação encontrados num grande número de receptores ou proteínas adaptadoras. Os ITAMs fosforilados servem como locais de atracamento para domínios SH2 da família Syk quinases, enquanto os ITIMs fosforilados recrutam tirosina fosfatases. A sinalização através de receptores com ITAM usualmente resulta em ativação celular, enquanto que a ligação a receptores com ITIM é geralmente

inibitória. Não obstante, exceções são descritas, como a sinalização inibitória induzida por ITAM, que será detalhada *a posteriori* (18,19).

Os FcR são amplamente expressos em células do sistema imune e parecem ter papel chave no equilíbrio saúde-doença, seja nas infecções, doenças auto-imunes ou oncológicas. A disponibilidade de linhagens de camundongo knockout para determinados receptores Fc e camundongos transgênicos com FcR humanos oferece uma enorme oportunidade para o estudo da biologia destes receptores em camundongos e humanos (20). Os FcR fazem parte de um intrincado e complexo sistema para manutenção da homeostasia imune e regulação entre respostas pro e anti-inflamatórias, que requerem uma interação coordenada entre citocinas, receptores celulares e das vias de sinalização subsequentes (21).

1.2 CD16 (receptor FcγRIII)

O CD16 é constitutivamente expresso na superfície de neutrófilos, macrófagos e células NK. Se liga a IgG1 e IgG3 com intermediária e baixa afinidade, respectivamente. Em células mielóides, a ligação ao CD16 classicamente promove ativação. Em células NK, o CD16 ativa citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (22-23).

FcγRIIIa e FcγRIIIb são as duas isoformas genéticas de FcγRIII, que são similares em sua porção extracelular mas, em virtude de um splicing alternativo, diferem bastante em seu domínio transmembrana e intracelular (Figura 1, superior). O CD16a é expresso em macrófagos, mastócitos e células NK, enquanto o CD16b está presente em neutrófilos(24,25). Nas células NK, o FcγRIIIa, medeia a morte de células-alvo, opsonizadas por IgG, por mecanismo

de ADCC. Esse mesmo receptor estimula a produção de superóxido e promove fagocitose, endocitose, apoptose e produção de citocinas como IFN γ e TNF (26).

Figura 1 - Receptores Fc de IgG de humanos e camundongos e receptor Fc de IgA humano. Adaptado de Nimmerjahn e Ravetch, 2008 (26)

As duas formas do CD16 têm extracelulares muito similares (97% idênticos), mas com âncoras de membrana diferentes. O primeiro é um receptor ativador composto de dois tipos de cadeias protéicas: uma cadeia α contendo dois domínios extracelulares (D1 e D2) e uma cadeia FcR γ que interage de maneira não-covalente com a cadeia α . Está presente em células NK, tendo um papel crítico em respostas ADCC iniciadas pela ligação ao IgG e também em monócitos e macrófagos, aumentando a fagocitose. A ativação celular desse receptor é mediada por ITAM (19). Em contraste, o receptor Fc γ RIIb é um caso atípico dentro da família de Fc γ Rs, pois seu ectodomínio não se associa à membrana plasmática usando uma âncora protéica. Ao invés disso, utiliza uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI) (27). Embora o componente sinalizatório desse último receptor não seja bem definido, sabe-se que tem papel importante

na mobilização de Ca^{2+} e degranulação de neutrófilos, auxiliando na fagocitose de patógenos opsonizados, em conjunto com o $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ (28,29).

Em camundongos existem 4 formas de $\text{Fc}\gamma\text{R}$: $\text{Fc}\gamma\text{RI}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ e $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$, este último não existindo em seres humanos. Da mesma forma, são classificados como ativadores aqueles que possuem ITAM ($\text{Fc}\gamma\text{RI}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ e $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$) ou inibidores quando portam ITIM ($\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$) (25,30). Além disso, recentemente foram descritos receptores murinos para IgG não clássicos como o $\text{Fc}\gamma\text{Rn}$ e o TRIM21 (16,31). Dentre os 10 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ de camundongos descritos até hoje, apenas metade são receptores para uma classe específica de imunoglobulinas. A outra metade possui especificidade dupla, ligando-se ao mesmo tempo a mais de um tipo de imunoglobulina (IgM e IgA, IgG e IgE) (32,33).

1.3 CD89 ($\text{Fc}\alpha\text{RI}$)

O $\text{Fc}\gamma\text{R}$ específico para IgA, o CD89, é expresso em células mielóides, incluindo PMN, monócitos, macrófagos e células dendríticas, sendo encontrado em diferentes espécies, mas não em camundongo (34). O $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ é uma proteína de 60kD composta por 2 domínios imunoglobulina-like que compartilham homologia com o $\text{Fc}\gamma\text{R}$, sendo capaz de se ligar à IgA1 e IgA2 como também à proteína C reativa (35). Outros receptores para IgA foram posteriormente descritos, como o receptor polimérico envolvido no transporte epitelial de IgA e IgM ($\text{Fc}\alpha/\mu\text{R}$), o receptor de transferrina e o receptor de asialoglicoproteína (36,27,38).

A sinalização através do $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ é feita através da cadeia $\text{Fc}\gamma\text{R}$ que contém um ITAM (Figura 2). Cross-linking de $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ com uma cadeia- γ associada resulta

na ativação de moléculas de sinalização nos “lipid rafts”, liberação de cálcio e indução da atividade da NADPH oxidase. As funções celulares de PMN que se seguem ao estímulo FcαRI são dependentes de atividade de tirosina quinase da cadeia γ associada. O crosslinking de FcαRI também induz funções efetoras como fagocitose e ADCC (39). Apesar de sinalizar através de ITAM, o qual tipicamente inicia cascatas ativadoras, o FcαRI também pode agir como receptor inibidor. Esta sinalização ITAM inibitória (ITAMi) resulta em respostas anti-inflamatórias que ajudam na homeostasia na ausência de patógenos (40,41). A interação monomérica do IgA com o FcαR desencadeia sinalização inibitória que bloqueia a ativação via outros receptores, enquanto o crosslinking de FcαRI multimérico induz fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio, apresentação de antígenos, citotoxicidade celular dependente de anticorpo e liberação de citocinas. Dessa forma, esse receptor age como um regulador entre respostas anti e pro-inflamatórias desencadeadas pela IgA (42). Também foi descrita sinalização semelhante (ITAMi) através do receptor FcγRIIIA (CD16A), que será explanada com mais detalhes nos próximos tópicos (43,44).

Figura 2 - Mecanismo proposto para explicar sinalização ITAM (ativatória) e ITAMi (inibitória) de receptores CD89 e CD16. Ativação multimérica causa ativação enquanto ativação monomérica inibição de mecanismos biológicos imunes como, produção de citocinas, de espécies reativas de oxigênio e fagocitose

Até hoje nenhum receptor homólogo ao $Fc\alpha RI$ foi descrito em camundongos. Diante disso, o modelo de camundongo transgênico é uma ferramenta bastante útil para se estudar a funcionalidade do receptor CD89 humano (h $Fc\alpha RI$) (45).

1.4 CD16 e suas implicações no Lupus e em outras doenças autoimunes

O lúpus eritematoso sistêmico (LES), protótipo das doenças autoimunes, é uma patologia multissistêmica e heterogênea, caracterizando-se pela perda da tolerância de células B e T e pela produção de autoanticorpos antinucleares (46). A causa exata é desconhecida, mas sabe-se que há uma complexa interação de fatores epigenéticos, hormonais, ambientais e imunoregulatórios envolvidos na patogênese da doença (47).

Acredita-se que esta doença autoimune complexa seja causada por perturbações na imunidade inata e adaptativa que levam a dano tecidual e disfunções orgânicas diversas (48). Entre os defeitos da imunidade inata, a fagocitose de células apoptóticas e inflamação induzida por auto-antígenos são característicos (49,50). Auto-antígenos formam complexos imunes com anticorpos possibilitando o agrupamento de receptores Fc. De acordo com a visão clássica, quando agrupados, receptores Fc com ITAM ativam a sinalização imune, enquanto receptores com ITIM são inibitórios. O balanço de receptores Fc expressos na superfície celular, dessa forma, é considerado um fator crítico para a sinalização induzida por imunoglobulinas, resultando em efeitos pró ou antiinflamatórios (51).

O papel dos FcR nas doenças auto-imunes e inflamatórias está extensamente demonstrado (52). Em modelos murinos de LES, monócitos com FcR ativadores parecem desempenhar papel chave no desenvolvimento de glomerulonefrite mediada por imunocomplexo (53). A atividade de doença e a lesão renal estão estreitamente associados com o acúmulo de monócitos CD16+ nos glomérulos (54,55). Além disso, o clearance defeituoso de imunocomplexos é um indicador de função defeituosa de monócitos e parece ter um papel importante no dano orgânico e tecidual no LES. Esta função anormal de monócitos e macrófagos se apresenta relevante na patogênese da doença (56,57). Em várias patologias com fundo auto-imune, já se demonstrou participação do CD16 como: lesão hepática, cardite auto-imune, trombocitopenia imune, esclerose múltipla, anemia hemolítica, artrite reumatóide, tireoidite de Hashimoto e até mesmo na miastenia *gravis* (58-67).

Apesar do progresso no diagnóstico precoce e avanços terapêuticos, os quais reduziram a mortalidade nos últimos 50 anos, o lúpus tem alta morbidade e mortalidade, devidas não só às lesões orgânicas da própria doença, mas também ao efeito tóxico das drogas (68,69). Dado o papel central na modulação do estado inflamatório de uma ampla gama de tecidos e células imunes, os FcγRs são um alvo atrativo para inúmeras doenças autoimunes.

Embora nenhuma terapêutica visando especificamente os FcγRs tenha sido aprovada para o tratamento de doenças autoimunes, a caracterização das bases moleculares e celulares da biologia dos FcγRs poderá promover o desenvolvimento de novas drogas de maior eficácia e com menos efeitos colaterais (70).

Um estudo colocou em evidência que a *E. coli* é capaz de se ligar de maneira independente de opsonina ao receptor FcγRIIIA (CD16), um receptor acoplado a ITAM, e induzir um sinal inibitório em neutrófilos e macrófagos para escapar da fagocitose (43). Propôs-se, assim, como ilustrado anteriormente, que a ligação monovalente ao CD16 induz uma sinalização inibitória, enquanto a ligação polivalente ativa este receptor. Mais recentemente, investigou-se o proteoma de *E. coli* e foi identificado o WzXe, um peptídeo da membrana celular dessa bactéria, como o provável ligante do CD16 capaz de induzir respostas celulares inibitórias (44). Este mecanismo de inibição celular que atenua a inflamação, ITAMi, nunca foi explorado em doenças auto-imunes.

1.5 Modelo de Lúpus induzido por pristane

Modelos animais têm sido um recurso inestimável para o estudo do LES nos últimos 40 anos. Descobertas nesses modelos proporcionaram um melhor entendimento sobre a patogênese do lupus tanto em nível celular quanto molecular. São de grande utilidade, a despeito de suas limitações, como modelos pré-clínicos para avaliarmos o possível valor terapêutico de uma intervenção farmacológica. Estudos com modelos animais também identificaram vias chaves envolvidas no desenvolvimento da autoimunidade que são relevantes para o lúpus humano (71).

Talvez o modelo de lúpus induzido mais usado tenha sido o modelo que utiliza o pristane (72). O pristane (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) é um óleo mineral que era dado intraperitonealmente em camundongos Balb/c para induzir irritação peritoneal e aumentar a produção de anticorpos monoclonais da ascite após injeção de hibridomas. Na década de 90, descobriu-se que os camundongos injetados com pristane, depois de alguns meses desenvolviam uma doença lupus-like com glomerulonefrite por imunocomplexo, artrite erosiva leve e muitos auto-anticorpos associados ao lúpus (73).

Esse modelo é capaz de produzir muitas das características clínicas do lúpus humano (artrite, proteinúria, glomerulonefrite e pneumonite) ao desencadear a produção de autoanticorpos em inúmeras linhagens independente do fundo genético (72,74). É o melhor exemplo de fator ambiental induzindo lúpus em linhagens camundongos não propensos espontaneamente à autoimunidade (75,76).

O mecanismo pelo qual esse óleo induz uma quebra na tolerância e tornam alvos intracelulares antigênicos ainda está para ser definido. Ele é um

composto ativador de membrana que interage com a dupla camada lipídica, tendo efeito citotóxico dependente da linhagem celular e de sua concentração. Uma única dose induz forte resposta no peritônio do camundongo, que leva a formação de um tecido linfóide ectópico com características morfológicas e funcionais de tecido linfóide secundário, denominado lipogranuloma (77). Várias linhagens de camundongos não propensos ao lúpus desenvolvem a doença após a injeção do pristane. Isso orienta a escolha da característica clínica que se pretende estudar, a qual, por sua vez, dependerá do fundo genético de camundongo adotado (por ex. Balb/c, B6, SJL), pois nenhum dos modelos, seja espontâneo ou induzido, é capaz de representar todo o espectro clínico encontrado em pacientes lúpicos.

Sendo assim, camundongos Balb/c desenvolvem artrite e glomerulonefrite grave, a qual que evolue entre 6 a 8 meses após injeção do óleo. Já camundongos B6, quando injetados com pristane, desenvolvem autoimunidade de baixo grau e apresentam pneumonite, vasculite e hemorragia alveolar difusa, sendo um modelo animal de grande valor para se estudar essa complicação rara, mas devastadora do lúpus em humanos (78,79). A hemorragia alveolar difusa é a mais precoce e letal manifestação clínica no modelo de lúpus induzido por pristane e parece ser fortemente dependente de macrófagos (80).

Apesar de não estarem completamente elucidados, os mecanismos implicados na geração de lúpus pelo pristane são: clearance defeituoso de células apoptóticas, sinalização exacerbada de células B e aumento na produção de interferon, característica marcante deste modelo (81-83). Camundongos injetados com o óleo desenvolvem um tipo de resposta inflamatória com forte “assinatura de interferon”, que já é evidente após cerca de 2 semanas. Esta

produção de interferon característica favorece a utilização desse modelo para o estudo do lúpus, já que grande parcela dos pacientes com LES tem um aumento da expressão de genes regulados por IFN tipo I (84-86). Algumas evidências reforçam o papel do IFN I na etiopatogenia da doença: camundongos transgênicos para IFN- γ desenvolvem auto-imunidade (87) e camundongos NBZ/NZW F1, que são propensos naturalmente ao lúpus, apresentam melhora da doença quando tratados com anticorpos anti-IFN- γ (88). Além disso, terapia com IFN- α acaba induzindo uma síndrome lúpus-like em alguns indivíduos (89).

1.6 CD16 como mecanismo de evasão imune na Seps

Seps, que passou a ser definida no último consenso internacional (SEPSIS-3), em 2016, como resposta imune desregulada a uma infecção, causando disfunção(ões) orgânica(s), é uma das doenças que mais mata no mundo. É fonte de enormes prejuízos para sociedade, devido à grande repercussão econômica advinda da morbidade e de sequelas, que se associam à perda de produtividade (90-92).

A resposta imune inata é essencial para a sobrevivência do hospedeiro diante de uma infecção, porém uma inflamação excessiva não é bem vinda (93). As bactérias evoluíram com estratégias sofisticadas para evadir dos mecanismos de defesa imune e perpetuar processos infecciosos, e o estudo desses mecanismo pode nos fornecer novas opções terapêuticas para tratar essa doença (94). A sinalização inibitória surge para limitar as respostas do hospedeiro e prevenir a inflamação. Os microorganismos desenvolveram inúmeros artifícios para explorar essas vias inibitórias e evitar a defesa do hospedeiro em benefício próprio (95-97).

Como descrito em tópico anterior, descobriu-se que a *Escherichia coli* se liga de modo independente de opsonina ao FcγRIII receptor (CD16) para escapar do sistema imune (43) (Figura 3). Anos depois, foi identificada a sequência peptídica daquela bactéria capaz de mimetizar IgG1 e, através da técnica de phage display, identificou-se e caracterizou-se o peptídeo de *E. coli* que seria o suposto ligante do CD16 (44). O peptídeo, chamado wzxe, é uma translocase que participa no movimento transbicamada de um lipídeo-trissacarídeo (Lipídio III), intermediário na montagem do Antígeno Comum de Enterobactérias (ECA) (98). Interações peptídeo-receptor induziram uma sinalização ITAMi mediada por CD16, bloqueando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a morte bacteriana. Esse sinal inibitório foi suprimido em mutantes de *E. coli* wzxe^{-/-}, restaurando a produção de ROS e a morte bacteriana (44).

Figura 3 - Mecanismo de evasão imune de *E. coli* através de sinalização ITAMi, inibindo fagocitose e aumentando produção de TNF-α. Retirado de Pinheiro da Silva, Nature 2017 (43).

Dessa forma, manipular a sinalização imune inibitória através de receptores Fc parece uma estratégia interessante para se tentar modular a resposta inflamatória e acelerar o processo de recuperação do indivíduo diante de infecções e sepse.

1.7 CD89 e imunidade inata

O sistema imune inato é a estratégia de defesa evolucionária mais antiga e representa o principal sistema de resposta imune encontrado em plantas, fungos, insetos e organismos multicelulares primitivos (99). Esse sistema é ativado após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) ou estruturas que não são normalmente encontradas no hospedeiro (100). Fagócitos, protagonistas da imunidade inata, possuem vários receptores de superfície que reconhecem patógenos diretamente. Estes receptores imunes inatos, como os receptores Toll-like (TLR), receptor de manose de macrófagos,

o receptor *scavenger* classe A MARCO ou moléculas lectina-like desencadeiam uma variedade de respostas dependendo do receptor e do tipo celular (101-103). A ativação desses receptores desencadeia fagocitose, ativa mecanismos de morte microbiana através da produção de espécies reativas de oxigênio e leva à produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, mesmo incipiente da resposta imune.

Bactérias, principais microorganismos causadores de sepse, são majoritariamente classificadas em gram-positivas e gram-negativas (104). Uma proteção mediada por anticorpos depende do complemento e de FcRs, expressos predominantemente em células mielóides, os quais, subsequentemente iniciam diferentes vias de sinalização (105). Como descrito anteriormente, esses receptores transmembrana podem conter motivos de ativação baseados em tirosina (ITAM), caracterizados pela sequência consenso YxxL/I-(x)6-8-YxxL/I. A ligação multimérica desses receptores leva à fosforilação de tirosina do ITAM pelas quinases Scr, o que recruta a tirosina quinase Syk. Esta última se liga ao ITAM fosforilado, promovendo ativação celular (106-108). Diversas funções ativadoras como fagocitose, liberação de citocinas, de superóxido e morte bacteriana, são dependentes da integridade do ITAM (106). FcRs que carregam ITAM, aparecem, desta forma, como determinantes celulares chave para imunidade mediada por anticorpos contra infecções bacterianas. Por outro lado, é digno de nota que um FcR com ITAM, o FcγRIIIA ou CD16A, pode se ligar diretamente, sem o requerimento de uma opsonina, à *Escherichia coli*. Essa ligação induz um sinal inibitório através da fosforilação de tirosina do seu ITAM e recrutamento de tirosina fosfatase SHP1, que é regulada pela quinase Lyn da família das Scr (43,109). Esta via de sinalização inibitória

através de um ITAMi resulta em bloqueio da fagocitose por *E. coli* e melhor controle da sepse (42,43,110,111).

O CD89 é um FcR com ITAM que, de maneira similar ao CD16A, media uma sinalização ativatória/inibitória dual. É um receptor multifacetado com importância primordial por equilibrar estímulos pro e anti-inflamatórios. O estudo de sua funcionalidade em uma doença com extrema letalidade e morbidade como a sepse pode nos oferecer uma possibilidade terapêutica, num mundo onde a resistência microbiana aumenta em grandes proporções.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Objetivamos averiguar as repercussões da ativação ITAMi do CD16 em modelo animal de lúpus e em modelo de infecção, além de investigar o papel do receptor CD89 como receptor inato, capaz de se ligar diretamente a bactérias e mediar proteção contra a sepse.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Experimentos com CD16

- Testar virulência de *E. coli* K12 mutante para *wzxe*^{-/-} em modelo de sepse induzida através de injeção intra-peritoneal de bactérias.
 - Comparar mortalidade e níveis séricos de citocinas em modelo de sepse por injeção intraperitoneal de *E. coli* selvagem (WT) ou mutante para *wzxe*^{-/-}.
- Avaliar os efeitos terapêuticos do peptídeo CYWGGTEGAC (TEGA) em camundongos com lúpus induzido por Pristane.
 - Comparar camundongos saudáveis e com lúpus, tratados ou não com peptídeo TEGA, quanto à expressão gênica (RNAm) e protéica de citocinas, além de genes associados à assinatura de interferon.

2.2.2 Experimentos com CD89

- Determinar se o CD89 é capaz de se ligar a bactérias de maneira direta e mediar ativação da imunidade inata
 - Realizar experimentos *in vitro* e *ex vivo* com BMM e BMDC murinos, fagócitos humanos e bactérias gram-positivas e gram-negativas.
 - Avaliar expressão celular de CD89 e de outros receptores cognatos, fagocitose, produção de citocinas, produção de ROS, recrutamento de syk e shp-1 e ligação bactéria-CD89.
- Avaliar o papel do CD89 em modelos de sepse por bactérias gram-positivas e gram-negativas, usando camundongos geneticamente modificados e controles não-transgênicos.
 - Comparar mortalidade, produção de citocinas, quantidade de bactérias e lesão tecidual em modelos de CLP e de pneumonia por administração nasal de *S. pneumoniae*, usando camundongos WT, CD89^{tg}, CD89^{R209L}^{tg}, CD89^{tg}CD16KO, CD16KO e CRPKO.

III MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Experimentos com CD16

3.1.1 Modelo de Sepse por injeção de bactérias

Dois grupos com 20 camundongos machos C57Bl/6, com 10 semanas de idade, foram submetidos a injeção de $3 \cdot 10^8$ *E. coli* K12 selvagem ou *E. coli* wzxe⁻ mutante (112).

A sobrevida foi observada durante 96h, quando então os camundongos foram sacrificados para análise de citocinas.

TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 e IL-10 foram quantificados por ELISA. Camundongos controles, injetados com salina, foram sacrificados no quarto dia para dosagem de citocinas.

3.1.2 Modelo de lúpus induzido por pristane e tratamento com peptídeo CYWGGTEGAC

Camundongos fêmeas com fundo C57Bl/6 selvagens (WT) e knockout para CD16 (CD16KO) foram submetidos a um modelo experimental de lúpus induzido por pristane, como descrito na literatura (113). Os camundongos receberam uma injeção intraperitoneal com 500 μ l de 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (Pristane, Sigma, USA) no quadrante esquerdo inferior, da porção ventral do abdome, usando seringas estéreis e agulhas 25-gauge 5/8. Dois grupos de animais (WT e CD16KO) receberam 50 μ g de CYWGGTEGAC

(IRG Bioscience, USA), porção ligante do WzXe, administrada na veia da cauda, três vezes por semana, em dias intercalados, durante três semanas. Os grupos controles receberam salina. Após três semanas, os camundongos foram sacrificados e os pulmões retirados e conservados a -80°C para análise posterior.

RNA total foi extraído usando Trizol (Invitrogen, USA). Transcrição reversa e amplificação por PCR foram realizados usando o kit One Step (11736-051 Invitrogen, USA) a 50°C por 30 minutos. Após a transcrição reversa, PCR foi realizado sob as seguintes condições: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto por 35 ciclos. Todas as reações foram realizadas em um termociclador Step One (Applied Biosystems, USA) e os produtos de amplificação foram confirmados em um gel de agarose a 1.5%.

Os níveis de citocinas nos pulmões foram medidos em camundongos WT e CD16KO, usando o Milliplex® e MAGPIX® System (Merck Millipore, USA).

Todos os experimentos foram realizados em animais com 8 a 12 semanas de idade e os protocolos seguidos estavam de acordo com os guidelines da Faculdade de Medicina de São Paulo através de protocolos aprovados pela sua comissão de ética (Protocolo de pesquisa n°: 161/15) (Anexo A).

3.2 Experimentos com CD89

3.2.1 Sujeitos

Oito pacientes com imunodeficiência comum variável (IDCV) com base nos critérios utilizados para o diagnóstico de IDCV da European Society for Immunodeficiencies/Pan-American Group for Immunodeficiency foram incluídos

neste estudo (114). Os pacientes estudados selecionados para este estudo estavam em tratamento com IgG. Os níveis de IgA estavam < 0.05 (Tabela 1).

Tabela 1 - Níveis séricos de Igs de pacientes com CVID durante terapia de substituição com IgG

Pacientes	Idade	Sexo	IgA	IgM	IgG
P1	29	Masculino	< 0.05	2.23	1.69
P2	48	Masculino	< 0.05	0.08	7.43
P3	56	Masculino	< 0.05	0.38	8.6
P4	28	Masculino	< 0.05	< 0.04	8.69
P5	52	Masculino	< 0.05	0.06	6.42
P6	41	Masculino	< 0.05	0.4	5.43
P7	20	Feminino	< 0.05	< 0.04	10.8
P8	25	Masculino	< 0.05	0.07	2.29

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética locais (Paris) e todos os participantes forneceram consentimento informado por escrito. Sangue de 7 doadores saudáveis foram obtidos do Etablissement Français du Sang (Hospital Saint Louis).

3.2.2 Camundongos

Usamos camundongos fêmeas C57Bl/6 CD89^{Tg} expressando o CD89 humano selvagem em monócitos/macrófagos e camundongos expressando CD89 com R209L mutante (CD89^{R209L}^{Tg}), todos com 8 a 12 semanas de idade, como descrito em estudos prévios (115,116). Animais não transgênicos “littermates” (da mesma ninhada) foram usados como controles. Camundongos CD16KO foram obtidos do Jackson Laboratory e o CD89^{Tg}CD16KO foram

obtidos pelo retrocruzamento de CD16KO e CD89^{Tg}. Camundongo knockout para proteína C reativa (PCR) foram anteriormente descritos (117). Todas as linhagens de camundongos foram mantidas nas instalações da escola de medicina Bichat, em Paris. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os guidelines do Conselho Francês de Cuidados de Animais e guidelines do Comitê de Cuidado de Animais Paris-Nord (número de protocolo C2EA-121).

3.2.3 Modelos de pneumonia e ligadura cecal

Pneumonia foi induzida pela administração intranasal de 5.10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. pneumoniae* Pn3 (ATCC-6303, Manassas, USA) em camundongos sob anestesia com isoflurano (Baxter, França). Cortes de pulmão embebidos em parafina foram obtidos e corados com H&E para análise morfológica. Peritonite foi induzida por CLP como descrito em estudos prévios (43,118). Os camundongos foram anestesiados usando quetamina e xilazina (Virbac, França). Após anestesia, o abdome foi raspado e o ceco exposto através de uma incisão mediana de 1cm. O ceco foi ligado entre a terceira e quarta arcada vascular com uma sutura de seda 4-0 (Ethicon, França) e puncionado 2 vezes com uma agulha 21-gauge. A recuperação anestésica foi feita colocando-se o camundongo sobre uma base aquecida. Sangue foi coletado por punção cardíaca e parâmetros hematológicos foram monitorados usando-se um analisador MS9 (Melet Schloesing, França). O tempo até a morte foi registrado durante 7 dias, quando então os camundongos sobreviventes foram eutanasiados.

3.2.4 Células, reagentes e anticorpos

Macrófagos derivados da medula óssea (BMM) foram obtidos depois de uma cultura de 7 dias de células da medula óssea de camundongos com 8 a 12 semanas, na presença de fator estimulante de colônias (R&D system, França). Em experimentos com células sanguíneas humanas *ex-vivo*, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram inicialmente isoladas usando-se gradientes de Ficoll seguido de uma seleção negativa de monócitos usando Dynabeads™ Untouched™ Human Monocytes Kit (Invitrogen, França). Monócitos foram cultivados em RPMI suplementado com glutamato (Invitrogen, França) e soro fetal bovino a 10% (Invitrogen, França) por 5 dias para gerar macrófagos. BDMC (células dendríticas derivadas da medula óssea) foram geradas de camundongos selvagens e CD89^{Tg} com 6 a 8 semanas. Uma suspensão de células foi preparada a partir da medula óssea de fêmures e tíbias. Depois de lisar células vermelhas, células da medula ($2 \cdot 10^6$ células/mL) foram cultivadas em meio RPMI 1640 em placas de 6 poços (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) à 37°C, 5% CO₂, suplementado com soro fetal de vitelo (FCS), 2mM L-glutamina, 100U/mL de penicilina G, 100mg/mL de estreptomicina, 30ng/mL de GM-CSF de camundongo (Peprotech, Rocky Hill, USA) e 20ng/mL de IL-4 (Peprotec). As células foram incubadas durante 24h. As placas foram gentilmente agitadas e o meio contendo células não-aderentes foi removido e trocado por um meio nutritivo como descrito acima. Esse meio era trocado a cada 3 dias. Diferenciação celular foi avaliada por coloração por citometria de fluxo usando anti-CD11c (N418) e anti-CD1b (M1/70) (BD Biosciences; cada um com 2 µg/ml). Anti-CD89 (clone A59)-ficoeritrina (PE) conjugada foi comprado da

Becton Dickinson. MIP8a anti-CD89 foi comprada da ABD Serotec e digerida pela pepsina para gerar fragmentos F(ab')₂ como descrito (119).

3.2.5 Citometria de fluxo

A expressão do CD89 foi quantificada em células usando-se a citometria de fluxo. As células foram pré-incubadas ou não com 100 µg de IgG humano para bloqueio dos FcγRs por 15 min antes da incubação com mAbs (anticorpos monoclonais) marcados ou mAbs irrelevantes por 30min a 4°C. Depois da lavagem, as células foram analisadas pelo citômetro de fluxo FACSfortessa (Becton Dickinson). Os resultados foram analisados usando-se o software FlowJo (Ashland, OR, USA). A expressão do receptor foi representada pela razão de intensidade de fluorescência média (IFM) do receptor / IFM do isotipo controle.

3.2.6 Citometria de fluxo com imagem

BMDCs foram geradas como descrito acima. BMDCs foram lavados e incubados, na ausência de soro fetal bovino, com *E. coli* marcada com Texas-red(Molecular Probes) por 2 horas a 37°C. As células foram fixadas com PFA 2%, então CD11c anti-mouse (BD Biosciences) foi usado para coloração de membrana. BMDC foram identificadas (gated) como Singlets cell/Focus high/CD11c high. A coloração de *E. coli* (Texas-Red) foi determinada para cada BMDC como a razão da média geométrica da intensidade da *E. coli* sobre a média da intensidade (FMO – Fluorescence Minus 1) dos BMDCs CD11c. Escores de fagocitose foram determinados usando coloração CD11c como marcador de membrana e coloração de *E. coli* como probe. Todas as análises

foram feitas usando-se o citômetro de fluxo com imagem ImageStream X Mark II e o software IDEAS v6 (AMNIS).

3.2.7 Expressão de proteínas na membrana dos BMMs

A expressão de proteína de TLRs e de MARCO foi quantificada nos BMM com citometria de fluxo. Anticorpos anti TLR foram obtidos do Imgenex (Clinisciences, Nanterre, France), incluindo ficoeritrina (PE) anti-TLR1 conjugada, Fluoresceína isotiocianato (FITC) anti-TLR2 conjugada, ficoeritrina (PE) anti-TLR3 conjugada, fluoresceína isotiocianato (FITC) anti-TLR4, ficoeritrina (PE) conjugada anti-TLR 5, ficoeritrina conjugada (PE) anti-TLR 6, ficoeritrina conjugada (PE) anti-TLR8. Anticorpos Anti-MARCO foram obtidos da Santa Cruz (Heidelberg, Alemanha). Isotipos controles foram obtidos da Becton Dickinson. BMM foram corados com anticorpos anti-extracelular por 30 minutos a 4°C. Um total de 10000 PBMC viáveis foram coletados usando o software BD FACSDiva por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, France). Os resultados foram analisados usando o software FlowJo (Ashland, OR, USA). A expressão de TLR é representada pela razão da intensidade de fluorescência média (IFM) dos TLRs/ IFM do isótipo controle.

3.2.8 Bactérias e cultura microbiológica

O *S. Pneumoniae* sorotipo 3 foi cultivado em meio Todd Hewitt Broth (Becton Dickinson, França), suplementado com extrato de levedura a 0,5% (Becton Dickinson, França) a 37°C, até a fase midlog. *E. coli* K-12 MG1655 é uma cepa comensal derivada de laboratório, pertence ao grupo filogenético A e não tem resistência a antibióticos ou fatores de virulência. Foi cultivada em caldo

de Luria Bertani (Becton Dickinson, França) à 37°C, até a fase midlog. *Streptococcus pyogenes* (CIP 56.41T, Pasteur Institute, França) cresceu em meio de Todd Hewitt suplementado com levedura a 0,5% a 37°C, até a fase midlog. As bactérias foram precipitadas por centrifugação (16000 x g por 10 min), lavadas duas vezes em PBS livre de endotoxina (Invitrogen). A concentração de bactérias foi determinada espectrofotometricamente (A600) e então confirmada pelo plaqueamento de bactérias seriadamente diluídas em placas de ágar sangue com soja (Becton Dickinson, França) e placas de ágar Luria-Bertani.

3.2.9 Contagem de bactérias invasoras

Modelo de pneumonia: pulmões foram coletados e então homogeneizados com um “blender” de tecidos (Ultra-Turrax T25, Fischer Scientific, France) em um mililitro de cloreto de sódio a 0,9% durante 1 min. A contagem de bactérias foi determinada por plaqueamento de diluições seriadas do homogenado sobre as placas de agar sangue com soja (Becton Dickinson, França).

Modelo de ligadura cecal e punção: o fluido peritoneal foi diluído seriadamente e subsequentemente espalhado em placas de Agar Luria-Bertani (Becton Dickinson) e placas de ágar seletivo para bactérias. As placas foram incubadas em condições anaeróbias por 1 dia. O meio seletivo para *E. coli* foi o agar Drigalski (Becton Dickinson). Os resultados foram expressos como log UFC/orgão.

3.2.10 Ensaios de fagocitose e ligação bacteriana

10^6 BMM foram lavados e incubados, na ausência de soro fetal bovino, com *E. coli* marcada com Texas-red (Molecular Probes) ou 10^7 UFC de *S. pneumoniae* marcado com éster succinimidil 5,6-carboxifluoresceína (FAM-SE; Molecular Probes, Thermo Fischer, France) por 30 minutos a 4°C para os ensaios de ligação ou a 37°C para os ensaios de fagocitose, respectivamente (120). A coloração de WGA ($4\mu\text{g}$ em PBS) foi realizada em células fixadas com PFA a 4% e após ensaios de fagocitose e ligação bacteriana. Os slides foram montados e examinados por microscopia confocal a laser com o microscópio CLSM-510-META (Carl Zeiss, França).

3.2.11 Morte bacteriana

Para medição da morte intracelular bacteriana, na ausência de soro fetal bovino, incubamos *E. coli* vivas (ATCC no. 25922) com células (10^7 bactérias por 5×10^5) a 37°C por 30 min. Removemos bactérias não ligadas por centrifugação diferencial e suspendemos os precipitados em solução de gentamicina (200mcg/ml da Sigma Aldrich, St. Louis, MO), que foram incubados por 2h a 37°C para matar qualquer bactéria extracelular (121). Depois de lavagem em PBS, as células foram lisadas por incubação em gelo com Triton X-100 0,5% por 10 min ou incubados a 37°C por 30 a 60 min antes de lise sob as mesmas condições (121). Nós contamos as bactérias sobreviventes em placas de agar seletivo.

3.2.12 Microscopia confocal a laser

A produção de espécies reativas de oxigênio pelo BMM foi medida por imagem de microscopia. BMM foram plaqueados em câmaras apoiadas em lâminas recobertas (Thermo Fischer Scientific, França) e preenchidas com 50µM DCFH-DA (Invitrogen, França) por 30 minutos. As células foram então lavadas e estimuladas com 10^{-8} M de fMLF. Depois de excitação a 488nm, a fluorescência verde do DCF foi medida pela microscopia confocal a laser com o microscópio CLSM-510-META (Carl Zeiss, França) equipado com câmara de cultura celular a 37°C, sob atmosfera com CO₂ a 5%.

3.2.13 Ensaio de produção de ROS em PMN por quimioluminescência

Após isolamento, PMNs foram suspensas em solução salina balanceada de Hank (Life Technologies, França) para alcançar uma concentração de 10^6 células por ml e deixadas descansar por 30 minutos em temperatura ambiente. fMLF (Sigma-Aldrich, França) e Luminol (Sigma-Aldrich, França) foram diluídos 1:100 em Solução Balanceada de Hank e mantidos em gelo. Luminol (Sigma-Aldrich, França) foi protegido da luz por papel alumínio. 500µl da solução contendo PMNs foram adicionados a cada um dos 6 tubos seguidos da adição de Luminol e 10 minutos de incubação a 37°C na câmara de um luminômetro (Berthold-Biolumat LB937, França). Mudanças na quimioluminescência foram então medidas a cada 30 minutos após estimulação com *E. coli*, *S. pneumoniae* ou com fMLF.

3.2.14 Imunoprecipitação e immunoblotting

Células foram solubilizadas em um tampão de lise contendo Nonidet P-40 a 1%, sulfato dodecil sódio (SDS) (Sigma Aldrich, França). Para imunoprecipitação, os lisatos celulares foram incubados com mAb A77 anti-CD89 e imunoprecipitados durante a noite a 4°C com beads de Proteína G-Sefarose (GE Healthcare, França) como descrito (122). Amostras foram redissolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS 10%, transferidas para membranas de nitrocelulose e “immunoblotted” com anticorpos anti-Syk de coelho (Santa Cruz Biotechnology, USA) ou anti-SHP-1 (Santa Cruz, Biotechnology, USA) seguidos de IgG anti-coelho de cabra (GE Healthcare, França) acoplado à peroxidase do rábano silvestre. Membranas foram desenvolvidas por tratamento de luminescência química melhorada (Amersham Biosciences, France).

3.2.15 Produção de proteínas solúveis e anticorpos

O CD89 solúvel foi expresso e produzido em sistemas de expressão de baculovírus/célula de inseto feito no laboratório do Dr. Renato Monteiro (Paris), como descrito previamente (123). Anticorpos monoclonais IgG1 anti-CD89 de camundongo (clones A3 e A77) também foram produzidos e purificados no mesmo laboratório francês, como descrito anteriormente (124). A3 e A77 foram usados para ELISA.

3.2.16 ELISA

Em relação aos ensaios com quimiocinas e citocinas, os níveis de TNF- α , IL-1 e IL-6 foram medidos pelo ELISA, seguindo as instruções do fabricante

(R&D Systems, França). Considerando os ensaios de ligação, as placas foram sensibilizadas durante a noite com 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 bactérias quimicamente mortas em 100µl de PBS estéril. Os poços foram bloqueados com leite a 2% por 2h. CD89 solúvel recombinante (sCD89) foi incubado por 2h. Após lavagem, o mAb anti-CD89 A3 biotilado foi adicionado seguido pela fosfatase alcalina estreptavidina (Becton Dickinson, França). A reação foi desenvolvida adicionando-se o substrato fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, França) por 1h e medida a 405nm. Como controle negativo, as placas sensibilizadas apenas com albumina foram usadas. Ensaios com ELISA competitivo entre IgA humano, bactéria e sCD89 foram realizados usando IgA humano (MP Biomedicals, France) e IgG humano (TEGELINE, LFB Biomedical, les ULIS France) como controle. 50µg/ml de sCD89 foi incubado com diferentes concentrações de IgA por 30 minutos. Então o complexo foi adicionado em placas sensibilizadas com 10^6 bactérias e incubadas por mais 2h a 37°C. Após lavagem, mAb anti-CD89 A3 biotilado foi adicionado, seguido de fosfatase alcalina estreptavidina (Becton Dickinson, France) e a reação foi desenvolvida com descrito acima.

3.2.17 PCR real-time

A purificação de RNA de pulmões homogeneizados foi feita com o uso de RNABle (Eurobio). cDNA foi obtido pela transcrição reversa usando transcriptase reversa do vírus da leucemia murínica de Moloney (MMLV) (Invitrogen, França). Amostras foram analisadas por PCR em tempo real com TaqMan® Gene Expression Master Mix (Invitrogen, França). As respectivas sequências de “probes” e primers, que foram comprados da Eurofins, são mostrados abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 - Primers e sequências de sondas para RT-PCR. F indica o primer forward, R indica o primer reverso e P indica o probe FAM-TAMRA

Gene	Número de acesso	Sonda	Sequência 5'-3'	Posição
IL-1	NM_008361	F	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	527-551
		R	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	678-658
		P	CTGTGTAATGAAAGACGGCACACCCACC	629-656
TNF- α	NM_013693	F	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	401-425
		R	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	575-553
		P	CACGTCTGTAGCAAACCACCAAGTGGA	436-461
B-actina	NM_007393	F	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	694-713
		R	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	831-811
		P	CACTGCCGCATCCTCTTCCTCCC	764-786

A quantificação gênica foi feita usando um Sistema de detecção de PCR-real time Chromo4 (Bio-Rad Laboratories, France). Dados foram normalizados para valores de RNAm de β -actina.

3.3 Análise Estatística

Tanto nos experimentos com CD89 quanto com CD16, a análise estatística foi feita usando o software GraphPad Prism v6.00 (GraphPAD Software, Inc, La Jolla, CA, USA). Variáveis contínuas foram analisadas usando a análise de variância (ANOVA). Análise post hoc foi feita usando o teste U de Mann-Whitney para comparação entre os grupos. Diferenças de sobrevida foram determinadas usando o método de Kaplan-Meier e o teste Log-Rank. Os resultados foram relatados como média $\pm$ desvio padrão. Todos os testes foram bicaudais (não significante (ns), $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

IV RESULTADOS

4.1 Experimentos com CD16

4.1.1 Curva de mortalidade de camundongos submetidos a modelo de sepse por injeção de bactérias

Os camundongos injetados com bactérias selvagens morreram proporcionalmente mais (Figura 4). Essa mortalidade foi mais expressiva nas primeiras 48h. A mortalidade dos animais injetados com *E. coli* wzxe^{-/-} mutada foi 40% e ocorreu nas primeiras 24h, enquanto os animais injetados com *E. coli* WT tiveram uma mortalidade que continuou até as 48h, chegando a 80%.

Figura 4 - Curvas de mortalidade de camundongos que receberam injeção intraperitoneal de *E. coli* selvagem (WT) ou *E. coli* mutada para wzxe^{-/-}, durante 96h

4.1.2 Análise da resposta inflamatória em modelo de infecção por injeção intra-peritoneal de bactérias WT e wzxe^{-/-}

Comparamos um painel de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1) relacionadas à sepse e os resultados abaixo descritos demonstram que os camundongos injetados com a bactéria selvagem apresentaram uma resposta inflamatória significativamente maior em relação aos injetados com bactéria mutante (figura 5). As diferenças foram bastante significativas em relação a todas as citocinas analisadas, inclusive IL-10.

Chama atenção o fato de a resposta inflamatória nos indivíduos injetados com bactérias mutantes para o wzxe^{-/-} ser semelhante à dos indivíduos controles, injetados com PBS. Esses dados, em conjunto, sugerem uma menor virulência da *E. coli* relacionada à ausência do peptídeo wzxe.

Figura 5 - Comparação entre os níveis de citocinas TNF, L1β, IL-6, IL-10, MCP-1, coletados de camundongos selvagens submetidos a modelo de sepse por injeção intraperitoneal de *E. coli* K-12 ou *E. coli* mutada *wzxE*^{-/-} (3.10⁸ UFC). O controle foi injetado com PBS

4.1.3 O tratamento de camundongos lúpicos usando peptídeo TEGA não alterou expressão gênica (RNAm) ou protéica de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar

Em modelo murino de lúpus induzido por pristane com camundongos da linhagem B6, em que a lesão pulmonar e a mortalidade acontecem em maior proporção até 4 semanas, optamos por tratar os animais por 3 semanas. Ao final deste período, foi feita análise da expressão gênica e protéica de citocinas inflamatórias e de genes associados à assinatura de interferon em tecido pulmonar (Figuras 1-3 e 4-5, respectivamente).

Avaliamos a expressão gênica de citocinas e genes relacionadas ao lúpus TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, IL17A, MCP-1, IP-10. IFN-γ, TREX-1, IRF-5,

STAT4. Quantificamos ainda TNF- α , IL-6, IL-10, IL17A, MCP-1 e IFN- γ (125-130).

Na Figura 6, após a análise de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17A, evidenciam-se os seguintes achados:

- ✓ camundongos injetados com pristane tiveram maior produção de TNF- α , tanto no grupo WT quanto CD16KO. Não houve diferença quando se comparou os animais tratados com o peptídeo ou não.
- ✓ menor produção de IL-17A em camundongos CD16KO injetados com pristane em relação aos camundongos WT também injetados com pristane.

Figura 6 - Expressão de RNAm das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17A em pulmões de camundongos. Dois tipos de camundongos (WT e CD16KO) divididos em 4 grupos cada (injeção com PBS, PBS + peptídeo, Pristane, Pristane + peptídeo)

Na Figura 7, vemos um aumento da produção de MCP-1 em camundongos CD16KO injetados com pristane em relação aos animais CD16KO não-injetados. Não se observou diferenças entre os grupos tratados com o peptídeo ou não.

Figura 7 - Expressão de RNAm das citocinas MCP-1 e IP-10 em pulmão de camundongos. Legenda representando as diversas intervenções no canto superior direito

Na Figura 8, ao se analisar a expressão de RNAm de IFN γ , TREX1, IRF5, STAT4, não encontramos diferenças significativas (131-133). Essas proteínas representam a assinatura de interferon característica do lúpus e de outras doenças auto-imunes.

Figura 8 - Expressão de RNAm de IFN γ , TREX, IRF5 e STAT4 em pulmão de camundongos. Legenda representando as diversas intervenções no canto superior direito

Na Figura 9, avaliamos a produção de citocinas TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17A. Nota-se aumento de TNF e IL-6 em camundongos WT injetados com pristane. Vemos ainda aumento de IL-6 tanto em camundongos CD16KO, injetados com pristane. Não se observou diferenças nos grupos injetados com o peptídeo ou não.

Figura 9 - Produção das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17A, em pulmão de camundongos. Legenda representando as diversas intervenções no canto superior direito

Na Figura 10 vemos menor produção de MCP-1 em camundongo WT em relação ao seu controle tratado com TEGA e em relação ao controle com lúpus não tratado com o peptídeo. Parece haver um fator aditivo em camundongos WT injetados com pristane e que são injetados com TEGA, com maior produção de MCP-1. Já os camundongos CD16KO tratados com o peptídeo produziram menos MCP-1 em relação ao controle não tratado com o TEGA.

Figura 10 - Produção de MCP-1 e IFN γ em pulmão de camundongos. Legenda representando as diversas intervenções no canto superior direito

4.2 Experimentos com CD89

4.2.1 CD89 interage diretamente com bactérias gram-positivas e gram-negativas

Sabendo que o CD16 interage diretamente com a *Escherichia coli*, investigamos se outro FcR diferente dos Fc γ Rs, o CD89, poderia de maneira similar interagir com algumas bactérias na ausência de opsoninas (42-44,134). Inicialmente, avaliamos *in vitro*, usando ELISA, se o CD89 solúvel recombinante poderia se ligar a bactérias imobilizadas. Doses crescentes de CD89 solúvel recombinante resultaram em ligação dose dependente ao *Streptococcus pneumoniae* (gram-positivo) e *Escherichia coli* (gram-negativo), respectivamente (Figura 11A e B).

Figura 11 - Receptor CD89 recombinante solúvel interage diretamente com as bactérias. Ligação dose dependente do CD89 recombinante solúvel(sCD89) ao *S. pneumoniae* (A) ou *E. coli* (B) fixados. Ligação à albumina (alb) foi usada como controle

Entretanto, só uma fraca ligação foi observada com o *Streptococcus pyogenes* (Figura 12).

Figura 12 - Comparação da ligação do sCD89 a vários tipos de bactérias fixadas imobilizadas em placas de ELISA

Esta ligação não foi devido à captura de anticorpos detectores de CD89 pelas bactérias pois não houve diferença na captura entre bactérias vivas ou mortas (Figura 13).

Figura 13 - Interação do sCD89 com 10^6 *E. coli* e 10^6 *S. pneumoniae* vivas (barras verdes) vs. fixadas (barras escuras)

Para examinar se o CD89 transmembrana é capaz de se ligar à bactéria, avaliamos a capacidade de ligação *in vitro* do *S. pneumoniae* marcado com FAM-SE ou da *E. coli* marcada com Texas red aos BMM isolados de animais transgênicos na ausência de ligantes do CD89 exógenos, IgA e PCR (116). *S. pneumoniae* ligou-se 4 vezes mais aos BMM derivados de animais CD89^{Tg} do que aos BMM de animais controles (figura 14, superior). De modo similar, *E. coli* marcada com Texas-red se ligou 2 vezes mais aos BMM CD89^{Tg} (Figura 14, inferior).

Figura 14 - BMM coletados de camundongos CD89^{Tg} ou de controles (littermates) foram incubados com 100 bactérias/célula durante 2h à 4°C, lavadas e examinadas por microscopia confocal. Painéis à direita, quantificando as ligações (n=4) **p<0.01

A ligação de ambas as bactérias aos BMM CD89+, mas não aos BMM controle, foi bastante diminuída pela adição de MIP-8a, um mAb bloqueador de CD89 anti-humano (Figura 15), demonstrando o envolvimento de um sítio de ligação no CD89 para essas interações. Além disso, CD89 recombinante solúvel bloqueou interações de *S. pneumoniae* e *E. coli* não somente em células CD89+, mas também, em algum grau, em células CD89- sugerindo que o CD89 solúvel

que se liga à bactéria pode dificultar a ligação do último a outros receptores inatos (Figura 15).

Figura 15 - BMM isolados de camundongos CD89^{Tg} ou de controles não-transgênicos foram incubados com 100 bactérias conjugadas/célula na presença ou ausência de anticorpo anti-CD89, MIP8a F(ab')₂ (10µg/ml), ou de CD89 solúvel (sCD89, 500µg/ml) durante 2h à 4°C, na presença de azida de sódio e subsequentemente analisados por citometria de fluxo IFM (intensidade de fluorescência média). Dados apresentados como média ± EPM; n=5. *p<0.05 **p<0.01 ns: não significativo

4.2.2 Interação bactéria-CD89 em macrófagos de camundongos induz ativação celular, fagocitose de bactérias e morte bacteriana que são dependentes da cadeia FcRγ.

Primeiro investigamos as consequências funcionais da interação bactéria-CD89 através da avaliação da secreção de citocinas. A interação dos BMM CD89^{Tg} com *S. pneumoniae* ou *E. coli*, na ausência de ligantes cognatos de CD89, resultou em aumento na produção de IL-6 e TNF-α (Figura 16).

Com o objetivo de determinar se a sinalização dependente de ITAM era necessária para essas respostas, usamos BMM de camundongos transgênicos que expressavam um versão geneticamente modificada do CD89, o CD89^{R209L}, que tem uma Leu ao invés de Arg na posição 209 na região transmembrana (R209L). Esse receptor mutante não pode se associar com a cadeia gama (FcRγ) acoplada a ITAM (135). Os BMM CD89^{R209L} se ligaram a ambas bactérias de maneira similar às células CD89^{Tg}, indicando que a interação CD89-FcRγ não é essencial para a ligação bacteriana. Além disso a adição de sCD89 inibe essa ligação (Figura 17).

Figura 17 - A ligação das bactérias *S. pneumoniae* e *E. coli* ao CD89 independe da cadeia y. A adição de sCD89 inibe a ligação de ambas as bactérias ao CD89

Entretanto, a produção de citocinas mediada por CD89 foi completamente dependente da cadeia gama associada a ITAM, já que os BMM CD89_{R209L}^{Tg} não aumentaram a secreção de IL-6 e TNF-alfa (Figura 16).

Para avaliar os respectivos papéis dos receptores Toll-like, FcRs, receptores de Manose e MARCO na captura diferencial de bactérias, avaliamos por citometria de fluxo a expressão na membrana dos BMM de TLRs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, CD16, CD32, CD64, receptor de Manose e MARCO (Figuras 18, 19 e 20).

Figura 18 - Quantificação da expressão de TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 normalizados para o isotipo controle em BMM de camundongos CD89^{Tg} e selvagens (WT) estimulados ou não por *E. coli* ou *S. pneumoniae* (S.p) por 2 horas

Figura 19 - Quantificação da expressão de CD16/32, CD64, CD16.2, CD89 e receptor de Manose normalizados para o isotipo controle, em BMM de camundongos CD89^{Tg} ou selvagens (WT) estimulados com *S. pneumoniae* (S.p)

Figura 20 - (A) Expressão de MARCO em BMM de camundongos WT e CD89^{Tg}. Histogramas representativos de coloração para MARCO pela citometria de fluxo em BMM de CD89^{Tg} (abaixo) e WT (acima), estimulados ou não com *E. coli* ou com *S. pneumoniae*. Os histogramas sombreados indicam coloração com os respectivos isotipos controles. (B). Quantificação da expressão de MARCO normalizado para o isotipo controle. ns: não significativo

A expressão de membrana de TLRs, FcRs, receptor de manose e MARCO não mostrou diferenças significantes entre BMM WT e CD89^{Tg}, nem antes nem depois da estimulação, mostrando que eles não são responsáveis pela diferença na captura bacteriana observada entre essas células.

Para examinar o papel fagocítico do CD89 na interação bacteriana, fizemos ensaios de fagocitose de *E. coli* usando um sistema de marcação com

pHrodo nos BMM derivados de CD89^{Tg} ou WT, na qual o marcador pHrodoTM de bactérias internalizadas aumentou a fluorescência no pH ácido encontrado em fagolisossomos, dando um bom índice quantitativo da fagocitose bacteriana. Células de camundongos CD89^{Tg} internalizaram significativamente mais *E. coli* que células obtidas dos controles e esse fenômeno foi inibido pelo MIP8a F(ab')₂ e pelo CD89 solúvel de maneira dose-dependente (Figura 21).

Figura 21 - Fagocitose de *E. coli*/pHrodo pelos BMM obtidos de camundongos CD89^{Tg} comparados aos controles (littermates). *E. coli*/pHrodo foram fagocitadas pelos BMM dos animais indicados, na presença ou ausência de MIP8a F(ab')₂ ou CD89 recombinante solúvel (sCD89) de maneira dose dependente (100 a 800 µg/ml). Células foram lavadas e analisadas por microscopia confocal a laser. À esquerda: imagens de microscopia. À direita: quantificação. *** p<0.001

Isso indica uma ligação direta da *E. coli* ao CD89, que resulta em fagocitose bacteriana e formação subsequente do fagolisossomo, na ausência de opsonina exógena IgA. Em seguida, avaliamos se isso levaria a um aumento da produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e em morte bacteriana. *S. pneumoniae* ou *E. coli* vivas induziram um aumento da produção de ROS pelos BMM CD89^{Tg}, dependente da cadeia FcRγ, já que foi totalmente inibida em

células CD89_{R209L}^{Tg}, alcançando níveis comparáveis àqueles observados em células controle (Figura 22).

Figura 22 - Produção de ROS após 30 min pelos BMM controles, transgênicos CD89^{Tg} e CD89_{R209L}^{Tg} estimulados por *S. pneumoniae* (*S.p*) ou *E. coli* medidos por microscopia confocal (n=15). ** p<0.01

A morte de *S. pneumoniae* ou *E. coli* pelos BMM CD89^{Tg} foi significativamente mais alta comparando-se com BMMs controle ou CD89_{R209L}^{Tg} (Figura 23).

Figura 23 - Quantificação de sobrevivência bacteriana após 2h de incubação com BMM de camundongos CD89^{Tg}, CD89_{R209L}^{Tg} e controles. Dados apresentados como média ± EPM; n=3. ***p<0.001.

O número de bactérias vivas diminuiu 100x em culturas de BMM CD89^{Tg} em comparação a culturas de células WT e CD89^{R209L}^{Tg}, dentro de 2h da infecção. Para explorar a via de sinalização envolvida, analisamos o recrutamento de syk para o CD89 após estimulação de BMM obtidos de camundongos CD89^{Tg} ou WT, tanto pelo *S. pneumoniae* quanto pela *E. coli*. Interação bactéria-CD89 resultou em recrutamento estável de Syk (durando no mínimo 2h) para o CD89 associado a cadeia FcRγ, enquanto os BMM CD89^{R209L}^{Tg} falharam em induzir tal recrutamento (Figura 24).

Figura 24 - Indução de sinalização ITAM do CD89 pelo *S. pneumoniae* ou *E. coli*. Após incubação de BMM de camundongos não transgênicos, CD89^{Tg} ou CD89^{R209L}^{Tg} com 10⁶ UFC de *S. pneumoniae* (painéis superiores) ou *E. coli* (painéis inferiores) pelos tempos indicados, proteínas co-imunoprecipitadas (IP) pelo mAb A77 anti-CD89 (acima) e proteínas totais (abaixo) foram analisadas por imunoblotting (IB) usando anticorpo policlonal de coelho anti-syk

Recrutamento de Syk para o CD89, mas não de SHP-1 (figura 25-A), seguido da estimulação bacteriana também foi observado em cultura de monócitos de sangue humano, o qual foi inibido pela adição de CD89 recombinante solúvel (figura 25-B).

Figura 25 - (A) Após incubação de BMM com *S. pneumoniae* (à direita) ou *E. coli* (à esquerda) durante os períodos indicados, as proteínas extraídas foram imunoprecipitadas com mAb A77 anti-CD89 e “probed” para SHP-1 co-imunoprecipitada usando anti-soro polyclonal anti-SHP-1 de coelho. A quantidade total de SHP-1 na proteína extraída não precipitada correspondente é mostrada abaixo, novamente usando antisoro anti SHP-1 policlonal de Coelho para immunoblotting (IB). (B) Análise do recrutamento de syk e SHP-1 em fagócitos humanos. Em resposta a presença de *E. coli* e de *S. pneumoniae*, syk, mas não SHP-1, é recrutado para a subunidade FcR γ associada ao CD89. O recrutamento é inibido pela adição de sCD89. A quantidade total de syk e SHP-1 na proteína extraída é mostrada à direita

Juntos, esses resultados indicam que a interação bactéria-CD89 resulta em sinalização do ITAM acoplado à cadeia FcR γ , o que leva a recrutamento estável de syk e ativação celular com fagocitose e morte bacteriana.

4.2.3 Fagócitos de IDCV deficientes em IgA mediam fagocitose, produção de ROS e morte bacteriana através da interação com CD89

Para demonstrarmos que a interação CD89-bactéria ocorre independentemente de IgA, examinamos fagócitos de células humanas de doadores saudáveis e de pacientes com IDCV que são deficientes de IgA no

plasma. A expressão de CD89 em monócitos e neutrófilos foi significativamente aumentada nos indivíduos com IDCV se comparada a indivíduos saudáveis (Figura 26 e 27).

Figura 26 - Gráficos representativos da expressão do CD89 nos monócitos isolados de doadores saudáveis (esquerda) e de pacientes com IDCV (direita) usando o anticorpo anti-CD89 com PE-conjugada e seu isotipo controle

Figura 27 - Expressão aumentada de CD89 em monócitos e neutrófilos. ** $p < 0.01$.

A ligação de *S. pneumoniae* e *E. coli* a células de indivíduos com IDCV ou saudáveis foi dependente de CD89 já que foram inibidas pelo MIP8a F(ab')₂ e por IgAh não específica (Figura 28).

Figura 28 - Ligação de *S. pneumoniae* (S. p) ou de *E. coli* a monócitos sanguíneos de doadores saudáveis (DS, púrpura) ou de pacientes com IDCV (IDCV, vermelho) na presença de IgA monomérica (500 µg/ml) ou de MIP8a F(ab')₂ (10µg/ml). Dados são apresentados com média ± EPM. ***p<0.001

Em contraste, IgAh específica aumentou significativamente a fagocitose (Figura 29).

Figura 29 – Aumento da fagocitose de *E. coli* por monócitos de 6 indivíduos saudáveis, na ausência e após adição de IgA humana específica

Assim, embora IgA específica possa servir como opsonina, a ligação de *S.p* e *E. coli* ao CD89 não requer IgA. Para confirmar a fagocitose e o papel ativador do CD89 humano nativo em relação a bactérias independentemente de IgA, realizamos ensaio de fagocitose pHrodo de *E. coli*, seguido de respostas anti-bacterianas em monócitos sanguíneos purificados de pacientes com IDCV que não tinham IgA no plasma. Macrófagos derivados de monócitos de pacientes com IDCV fagocitaram eficientemente *E. coli* marcada de maneira similar a células de doadores saudáveis (Figura 30).

Figura 30 - Fagocitose de *E. coli*/pHrodo por monócitos/macrófagos humanos isolados de doadores saudáveis (DS) ou de pacientes com IDCV. Painéis esquerdos: imagens representativas Barras de escala: 200µm. Histograma à direita: quantificação (n=3). ns: não-significativo

Além do mais, o anticorpo bloqueador MIP8a F(ab')₂ anti-CD89 diminuiu de forma drástica a fagocitose bacteriana, confirmando que a interação CD89-bactéria foi funcional mesmo na ausência de IgA humano. Isso foi associado a produção eficiente de ROS, que foi inibida pelo MIP8a F(ab')₂ (Figura 31).

Figura 31 - Produção de espécies reativas de oxigênio em resposta à co-incubação de monócitos humanos de DS ou IDCV com *S. pneumoniae* (S.p) ou *E. coli* na presença ou ausência de anticorpo MIP8a F(ab')₂ (n=3). *p<0.05. ns: não-significativo

Finalmente, macrófagos de pacientes com IDCV causaram morte bacteriana de maneira similar a macrófagos de indivíduos saudáveis (Figura 32).

Figura 32 - Sobrevida bacteriana após incubação com monócitos humanos de DS ou IDCV por 2h na presença ou ausência de anticorpo MIP-8a F(ab)'2. Dados são apresentados com média $\pm$ EPM. ** $p < 0.01$. ns: não-significativo

Juntos, esses achados indicam que as interações CD89-bactéria resultam em funções essenciais de ativação de FcRs (fagocitose, produção de citocinas e ROS e morte bacteriana) as quais são preservadas em fagócitos de sangue humano de pacientes com IDCV deficientes em IgA, sugerindo que o CD89 pode ter papel protetor direto contra infecções por *E. coli* e *S. pneumoniae* na ausência dessa imunoglobulina.

4.2.4 Papel da interação CD89-bactéria sob condições fisiológicas.

Para avaliarmos o papel fisiológico da interação CD89-bactéria, primeiro examinamos se essas interações eram diminuídas pela competição com

concentrações fisiológicas de IgA sérica desprovida de atividade de anticorpo anti-bacteriana.

Tanto a ligação do *S. pneumoniae* quanto de *E. coli* foram inibidas por IgA humana monomérica não-específica de modo dose-dependente (Figura 33), demonstrando que a ligação da bactéria no CD89 foi impedida pela ligação de IgA ao domínio CD89 D1.

Figura 33 - Ensaio com ELISA competitivo entre sCD89 e *S. pneumoniae* ou *E. coli* e IgA humano não específico (à esquerda) ou IgA humano específico com atividade de anticorpo antibacteriano (à direita)

Entretanto, a inibição foi parcial e atingiu platô de 80% de inibição na concentração de 700mcg/mL de IgA, permitindo uma proporção significativa remanescente de sCD89 para se ligar a bactéria, apesar de concentrações fisiológicas de IgA (até 2mg/ml) (Figura 33, gráfico à esquerda). Como esperado, a ligação bactéria-CD89 foi aumentada na presença de opsonina IgA humana específica (IgAh) contra bactéria (Figura 33, gráfico à direita).

Para determinarmos se a ligação remanescente da bactéria ao CD89, observada na presença de uma concentração fisiológica de IgA, poderia ser

funcionalmente relevante, exploramos a captura bacteriana na presença de 2mg/ml de IgA não-específica. A captura de bactérias observada em BMM CD89^{Tg} foi reduzida na presença de concentrações fisiológicas de soro com IgA inespecífico. Entretanto, permaneceu aumentado em 50-100% quando comparado a captura bacteriana por BMM derivado de animais WT (Figura 34), confirmando assim o CD89 como um potente receptor inato para bactérias.

Figura 34 - Fagocitose bacteriana pelos BMM de camundongos CD89^{Tg} comparado aos WT. Bactérias foram fagocitadas pelos BMM dos camundongos indicados na presença ou ausência de IgA não-específica em concentrações fisiológicas (2mg/ml). Células foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Monócitos/macrófagos não são as únicas células imunes a expressar CD89. Células dendríticas imaturas, que também expressam esse receptor, são capazes de capturar bactérias em locais com baixas concentrações de IgA (136-137). BDMC CD11c⁺ de animais CD89^{Tg} foram gerados após cultura com GM-CSF e IL4 e foram analisados em relação à fagocitose bacteriana. De maneira semelhante aos BMM, a expressão do CD89 em BMDC aumentou significativamente a fagocitose bacteriana se comparada aos BMDC WT. Essa

potencialização permaneceu forte (ao redor de 100% de aumento) mesmo sob concentrações fisiológicas de IgA sérico inespecífico (Figuras 35 e 36).

Figura 35 - Fagocitose bacteriana pelos BMDC obtidos de camundongos CD89^{Tg} (esquerda) comparados com WT (direita). Bactérias fagocitadas pelos BMDC dos camundongos indicados na presença ou ausência de IgA não-específica em concentrações fisiológicas (2mg/ml). Células foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo. Dados são apresentados como média $\pm$ EP. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Figura 36 - Imagens representativas de *E. coli* (azul) e CD11c (vermelho) de BMDC de camundongos CD89^{Tg} ou WT capturadas por citometria de fluxo com imagem (barra de escala = 5 μ m) e as percentagens do escore de fagocitose bacteriana

Juntos, esses experimentos sugerem que a interação direta CD89-bactéria pode ter um papel fisiológico protetor para o sistema imune do hospedeiro.

4.2.5 Interação CD89-bactéria protege contra a mortalidade em dois modelos de sepse

Investigamos o papel *in vivo* da interação direta entre bactérias e o CD89 no clearance bacteriano, causando pneumonia experimental através da infecção intranasal com *S. pneumoniae*, um coco gram-positivo. Camundongos CD89^{Tg} exibiram uma menor mortalidade após a infecção quando comparados aos camundongos controle (WT) (Figura 37).

Figura 37 - Sobrevivência de CD89^{Tg} (linha vermelha) e controles não transgênicos (linha escura) após inoculação intranasal (momento 0) com *S. pneumoniae* (n=25). Curvas de Kaplan-Meier e o log-rank test foram usados para comparar taxas de mortalidade

Abaixo vemos que o número de *S. pneumoniae* nos pulmões de animais transgênicos foi 100 vezes menor 48h após inoculação quando comparado aos controles (Figura 38, A), em acordo com a atividade bactericida/fagocítica

dependente de CD89 nos fagócitos dos animais descritos anteriormente. Os camundongos transgênicos exibiram menos infiltrado intersticial e peribronquiolar e menos alveolite (Figura 38, B e C). Os espaços alveolares foram infiltrados por células monomórficas, que estavam em número maior nos controles não-transgênicos.

Figura 38 - (A) Quantidades pulmonares menores de *S. pneumoniae* nos CD89^{Tg} quando comparados aos controles littermate. (B) Coloração de HE de cortes pulmonares de animais CD89^{Tg} e controles não transgênicos após infecção intranasal. Barra de escala = 200 μ m. (C) Escore de alveolite por células monomórficas inflamatórias. *** $p < 0.001$

Além do mais, camundongos transgênicos expressaram níveis locais de RNAm mais altos da citocina inflamatória IL-1, 6 horas após inoculação bacteriana. Apesar disso, a inflamação precoce se resolveu com um nível de RNAm de IL-1 mais baixo em animais transgênicos 48h após infecção se comparados aos littermates (Figura 39). Ao contrário, o nível de RNAm de TNF- α foi idêntico em nossos dois grupos às 6 e 48h.

Figura 39 - Expressão de RNAm de citocinas (IL-1 e TNF- α) foram avaliadas por reação em cadeia de polimerase reversa quantitativa de 5 amostras de tecidos pulmonares coletados 6 e 48h após infecção intranasal. Os níveis de RNAm foram normalizados para níveis de RNAm de β -actina. UA: Unidades arbitrárias
* $p < 0.05$ ns: não-significante

Exploramos também o papel protetor do CD89 em infecções polimicrobianas, avaliando as consequências da expressão de CD89 num modelo de peritonite grave induzida por CLP. Como no modelo de pneumonia, os camundongos CD89^{Tg} foram protegidos da sepse (Figura 40).

Figura 40 - Aumento de sobrevivência de camundongos CD89^{Tg} (linha vermelha, n=26) comparado a camundongos não-transgênicos controle (linha preta, n=22) após CLP. Curvas de Kaplan-Meier log-rank test foram usados para comparar taxas de mortalidade

O peritônio de animais transgênicos continham um número menor de bactérias que controles após CLP (figura 41, à esquerda). Camundongos CD89^{Tg} expressaram respostas IL-1 e TNF- α precoces e transitórias no peritônio pós-CLP em comparação com respostas tardias observadas em animais selvagens (Figura 41, à direita).

Figura 41 - (A) 48h após CLP, foram contadas as bactérias do fluido peritoneal nos camundongos CD89^{Tg} e controles. (B) Níveis de IL-1 e TNF- α no lavado peritoneal foram analisados por ELISA e 48h após CLP (n=3). Todos os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$. ns: não-significativo

É de se notar que essas respostas precoces foram associadas com uma taxa de mortalidade mais baixa. Em conjunto, esses resultados indicam que após CLP, o CD89 ativado por bactérias que residem no trato gastrointestinal induzem uma fagocitose mais eficiente juntamente com uma resposta inflamatória mais precoce e melhor controlada, resultando em um número menor de bactérias no peritônio e uma proteção mais efetiva do hospedeiro.

4.2.6 Proteção pelo CD89 contra a sepse é dependente de cadeia FcRgamma

Como a cadeia FcR γ associada ao CD89 foi mandatória para a atividade bactericida dos fagócitos (dados descritos acima), realizamos experimentos de infecção similares usando CD89_{R209L}^{Tg} para determinar se FcR γ era também necessária para proteção observada no camundongo CD89^{Tg}. Como mostrado na Figura 42, não se observou diferença de mortalidade em relação aos camundongos controle após infecção nasal com *S. pneumoniae* ou CLP, indicando que a interação bacteriana com CD89_{R209L} não é protetora.

Figura 42 - Aumento da sobrevivência de animais CD89^{Tg} após infecção pulmonar por inoculação intranasal com *S. pneumoniae* comparado com CD89_{R209L}^{Tg} ou controles não transgênicos (gráfico à esquerda). Aumento da sobrevivência de camundongos CD89^{Tg} (n=10) em comparação com os CD89_{R209L}^{Tg} ou controles (n=10) após CLP (gráfico à direita). Curvas de Kaplan-Meier e o log-rank test foram usados para comparar as taxas de mortalidade. Dados foram apresentados como média $\pm$ EPM

Isso foi confirmado pela quantidade similar de bactérias colonizando tecidos infectados, resposta de citocinas e lesão tecidual entre os camundongos controle e CD89_{R209L}^{Tg} (Figura 43).

Figura 43 - (A) Quantidades pulmonares diminuídas de *S. pneumoniae* nos CD89^{Tg} se comparado aos CD89_{R209L}^{Tg} ou controles (n=5). (B) Expressão de RNAm de citocinas inflamatórias IL1 e TNF-α foram avaliados por qPCR em amostras de RNA de tecido pulmonar coletadas 6h após inoculação intra-nasal de camundongos. Os níveis de mRNA das citocinas foram normalizados para os níveis de mRNA de β-actina. (C) Coloração por HE de seções pulmonares de camundongos CD89_{R209L}^{Tg} e controles não transgênicos littermates após infecção intra-nasal. Barras de escala = 200 μm. (D) Depois de 48h de CLP, a contagem de bactérias no fluido peritoneal foi menos numerosa no liquido peritoneal de camundongos CD89^{Tg} do que nos CD89_{R209L}^{Tg} e controles(n=5). (E) Níveis de IL-1 e TNF-α no lavado peritoneal avaliados por ELISA 6 horas após CLP. UA: unidades arbitrárias. Dados foram apresentados como média ± EPM. *p<0.05, **p<0.01, ns: não significativo

4.2.7 CD89 protege contra sepse na ausência de CD16 durante infecções por gram-positivo

Como o CD16 interage diretamente com *E. coli* e agrava a sepse num modelo de CLP através da indução de sinal ITAMi (43), examinamos se esse receptor poderia interagir também com *S. pneumoniae*. ELISA mostrou que o CD16 rapidamente interage com estas bactérias (Figura 44).

Figura 44 - Comparação da ligação do sCD16 a bactérias fixadas (*E.coli* ou *S. pneumoniae* (S.p) ou albumina (Alb) imobilizadas em placa de ELISA. ns: não-significativo

CD16 também protege os camundongos contra pneumonia por *S. pneumoniae*, opostamente a sua ação deletéria no modelo CLP (Figura 45) demonstrando que o CD16 tem papéis opostos na sepse a depender do tipo de bacteria e órgãos envolvidos. Exploramos então se o CD89 poderia proteger camundongos além do que foi observado em camundongos CD16KO. No modelo de pneumonia o CD89 foi protetor, independentemente da presença do CD16, demonstrando que sua ação não era dependente deste receptor. Na sepse induzida por CLP, o CD89 forneceu uma proteção suplementar menor,

porém sem significado estatístico, em relação àquele observado na ausência de CD16 (Figura 45).

Figura 45 - Taxas de sobrevivência de camundongos CD16 KO, CD16 KO-CD89^{Tg}, CD89^{Tg} ou controles após infecção intranasal por *S. pneumoniae* ou CLP. Curvas de Kaplan-Meier e log-rank test foram usados para comparar taxas de mortalidade. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. *** $p < 0.001$

Assim, o CD89 é um receptor importante para as defesas contra infecções e pode contrabalançar o sinal inibitório CD16-ITAMi, que é deletério para o modelo CLP de peritonite aguda.

4.2.8 Proteção mediada por CD89 contra a sepse é independente de PCR e de anticorpos IgA anti-bactéria

Já que a PCR (proteína C reativa) é um ligante conhecido de CD89 que poderia servir como opsonina, utilizamos camundongos PCR-KO e os retrocruzamos com camundongos CD89^{Tg} para explorar o envolvimento dessa proteína na proteção dependente de CD89 (117,138). Similar ao que descrevemos acima para camundongos WT e CD89^{Tg}, um aumento significativo

nas taxas de sobrevivência foram obtidas quando o gene CD89 foi introduzido em fundo PCR-KO (Figura 46).

Figura 46 - Aumento da sobrevivência de animais CD89^{Tg} PCR-KO após infecção intranasal com *S. pneumoniae* comparado aos camundongos PCR-KO (n=12 por grupo). Aumento da sobrevivência de camundongos CD89^{Tg} PCR-KO (n=10) comparados com PCR-KO (n=10) após CLP. Curvas de Kaplan-Meier e teste log-rank foram usados para comparar taxas de mortalidade

Isso foi associado com diminuição significativa nas contagens de bactérias nos pulmões e em cavidade peritoneal dos camundongos CD89^{Tg}PCR-KO quando comparados a camundongos PCR-KO (Figura 47). Esta proteção foi associada com uma inflamação precoce e robusta (em 6h) seguido de uma resolução da inflamação (em 48h), medido pelos níveis locais de RNAm e proteínas (IL-1 e TNF- α) (Figura 47).

Figura 47 – (A) Contagens pulmonares menores de *S. pneumoniae* nos camundongos CD89^{Tg}PCR-KO após 48 horas quando comparado aos PCR-KO (n=4) (à esquerda). (B) Expressão de mRNA de citocinas (IL1 e TNF-α) foram avaliadas por qPCR de amostras de tecido pulmonar coletados 6 e 24h após infecção intra-nasal. Níveis de mRNA de citocinas foram normalizados para níveis de mRNA de β-actin. (C) Contagem de bactérias em fluido peritoneal 48 horas após CLP (n=4). (D) Níveis de IL-1 e TNF-α no lavado peritoneal avaliados por ELISA 6 e 48h após CLP (n=4). UA: unidades arbitrárias. * p < 0.05 **p < 0.01

Ensaio de fagocitose mostraram aumento significativo na fagocitose de bactérias em BMM de CD89^{Tg}PCR-KO quando comparado ao PCR-KO, que foi inibido pela adição de MIP8a F(ab')₂ (Figura 48), confirmando o papel protetor do CD89 independente de PCR.

Figura 48 - (A) Quantificação da fagocitose de *S. pneumoniae* (esquerda) e *E. coli* (direita) e (B) sua inibição após incubação de 100 bactérias/BMM CD89^{Tg} PCR-KO ou PCR-KO na presença de MIP8a anti-CD89 F(ab')₂. *p <0.05 **p<0.01

Para excluir o papel de anticorpos IgA de camundongo nesta proteção através de um interação presumível com o CD89 humano (IgA de camundongo interage fracamente com CD89 humano), medimos os níveis de anticorpos IgA anti-bactéria, em 48h e no dia 7 (168h) após infecção (123). 48h após infecção, quando um aumento significativo na sobrevivência dos camundongos CD89^{Tg} PCR-KO já foi detectado (p<0,02, ver figura 46), nenhuma IgA anti-bactéria foi detectada no soro de ambos os modelos de infecção (pneumonia e CLP) (Figura 49).

Figura 49 - Medida de anticorpos IgA de camundongos contra as bactérias indicadas, 48 ou 168 horas após infecção com *S. pneumoniae* (esquerda) ou CLP (direita) em camundongos CD89^{Tg} ou CD89^{Tg} PCR-KO. Dados apresentados como média ± EPM

Em conjunto, esses resultados identificam o CD89 como um receptor imune inato que pode ter papel crucial na proteção do hospedeiro na fase precoce de infecções bacterianas.

V DISCUSSÃO

A presente tese versa sobre dois receptores imunes altamente versáteis, o CD16 e o CD89. Esses FcR podem apresentar respostas celulares ativatórias ou inibitórias, amplificando ou abreviando processos inflamatórios presentes na patogênese de doenças auto-imunes, infecção e até mesmo do câncer.

Estudamos a funcionalidade do CD16 em modelo murino de sepse e lupus, explorando a ativação do sinal ITAMi através da proteína wzxe e suas repercussões. Ao mesmo tempo, usando células humanas e camundongos transgênicos, averiguamos a capacidade do CD89 de agir como receptor inato, protegendo o indivíduo em situações de infecção.

5.1 Experimentos com CD16: lúpus, sepse e wzxe

A descoberta de peptídeos capazes de mimetizar a ligação funcional com receptores Fc humanos representa um grande desafio no desenvolvimento de drogas com a finalidade de modular funções efetoras (139).

Inicialmente nos propusemos a avaliar os efeitos biológicos e terapêuticos do peptídeo WzXe, com a intenção de investigar se este novo ligante do CD16, recém descoberto (44), seria capaz de diminuir a resposta inflamatória que causa dano tecidual, em um modelo de lúpus induzido por pristane. O peptídeo sintético CYWGGTEGAC (sequência do wzxe, ligante do CD16) é capaz de mimetizar a interação *E. coli*-CD16 impedindo o clearance bacteriano e diminuindo a produção de ROS através de sinalização inibitória ITAMi (44). Quisemos

investigar o efeito terapêutico desta interação com a hipótese de que a sinalização ITAMi (inibitória) pudesse diminuir a produção de citocinas inflamatórias e alterar a assinatura de interferon característica deste modelo (81,113).

Por outro lado, uma possível diminuição da atividade fagocítica poderia ocorrer e, sendo este um mecanismo que faz parte da patogênese do lúpus, poderíamos nos surpreender com a piora da doença com o uso do peptídeo (53). O peptídeo diminuiria o clearance fagocítico de células apoptóticas, geradas em excesso pela injeção do pristane no peritônio, e perpetuaria o estímulo antigênico. Isso amplificaria a auto-imunidade e inflamação causada pelo modelo (140).

Avaliamos diversas citocinas em tecido pulmonar, quantificando tanto a expressão gênica de RNAm quanto a efetiva tradução em proteínas (demonstrado anteriormente nas Figuras 6-8 e 9-10, respectivamente). Apesar de aumentos esporádicos em algumas citocinas em camundongos injetados com pristane (já descrito na literatura), não encontramos diferença importante entre os grupos que receberam o CYWGGTEGAC como tratamento ou não. Chama atenção o aumento de MCP-1 em camundongos selvagens tratados com o peptídeo em relação ao seu controle injetado com PBS. Essa citocina é essencialmente pró-inflamatória e conhecida por recrutar macrófagos (141). Parece haver um efeito aditivo no aumento de MCP-1 nos camundongos injetados com pristane (Figura 10A). Tal achado é pouco expressivo, porém nos permite conjecturar sobre um possível efeito proinflamatório do peptídeo.

Devido ao modelo necessitar de tempo prolongado para que os camundongos (6 a 8 meses) apresentem manifestações renais, optamos pela

linhagem C57Bl/6 que desenvolve manifestações pulmonares de forma mais precoce (80,113). Não acompanhamos as alterações clínicas associadas ao lúpus, nem dosamos anticorpos antinucleares ou fizemos avaliações histológicas do pulmão desses animais, o que fragiliza nossas conclusões.

O uso do peptídeo TEGA, pelo menos no nosso desenho experimental, não alterou a resposta inflamatória em modelo experimental de lupus induzido por pristane. Acreditamos que os resultados negativos explicam-se pela dose inadequada do peptídeo ou proteólise por enzimas endógenas do camundongo, assim que o peptídeo é injetado. Novas doses ou manipulação da estrutura do peptídeo com ajustes nas suas características farmacocinéticas podem melhorar a absorção e prolongar o tempo de ação (142). Estabilizar a estrutura do peptídeo, inibir sua degradação, usar outras vias de administração e outros modelos de camundongo com manifestações clínicas diferentes, além de tempo de tratamento maior, deveriam ser testados para se avaliar os efeitos do CYWGGTEGAC, como possível tratamento para o lúpus.

A abordagem dessas questões são perspectivas futuras para este projeto. Graças a sequência de aminoácidos mais curta, este tipo de peptídeo, caso validado para tratamento, provavelmente induziria menos efeitos colaterais e teriam um custo benefício melhor que IVIg ou outras drogas imunossupressoras e anti-inflamatórias. Além do mais, como sua produção é sintética, a contaminação por produtos sanguíneos não seria um problema (143). Enfatizo que o modelo utilizado está bem estabelecido na literatura como um dos principais modelos de lúpus induzido (72).

Ainda explorando o CD16, investigamos os efeitos biológicos, em um modelo de infecção por injeção de *E. coli*, da presença ou não do peptídeo wzxe

na membrana dessa bactéria. Demonstramos neste modelo que a mortalidade e a produção de todas as citocinas foi maior na bactéria selvagem (figuras 4 e 5). Chama atenção que não houve diferença na produção de citocinas comparando-se os animais injetados com a bactéria mutante *wzxe*^{-/-} e os controles saudáveis injetados com PBS. Esses achados demonstram uma maior virulência da *E. coli* selvagem em relação à bactéria mutante *wzxe*^{-/-} e corrobora nossa hipótese de que o *wzxe*, como ligante do CD16, tem considerável importância durante este tipo de infecção. Como foi demonstrado anteriormente (44), o engajamento da *E. coli* diretamente com o CD16 através da proteína *wzxe* permite a evasão desta bactéria, favorecendo sua proliferação e a perpetuação do processo infeccioso. Houve aumento de todas as citocinas inflamatórias e mesmo da IL-10, citocina reconhecidamente antiinflamatória (144). O excesso de produção da IL-10 está descrito como marcador de gravidade e desfechos fatais em diversas situações (145,146).

O *wzxe* é uma translocase responsável pelo movimento trans-bicamada através da membrana plasmática de substratos envolvidos na montagem de polissacarídeos da superfície celular, incluindo o polissacarídeo O (147,148). Esse polissacarídeo O, ou simplesmente antígeno O, é o componente mais externo do LPS (lipopolissacarídeo). O LPS, também conhecido como endotoxina, é o componente principal da membrana mais externa das bactérias gram-negativas (149). As subunidades do antígeno O são translocadas através da membrana celular interna (pelo *wzx*), onde são polimerizadas (pelo *wzy*, com comprimento de cadeia determinado pelo *wzz*) e finalmente ligadas ao restante dos componentes para formar o LPS (150). O *wzxe* encontrado na *E. coli* é encontrado também em outras enterobactérias como a *Salmonella*, *Shigella* sp

e a *Klebsiella pneumoniae* (151). Poderia este mecanismo de evasão da *E. coli* ser utilizada por outras bactérias gram-negativas que também apresentam essa proteína em sua membrana? Infelizmente não conseguimos ampliar o estudo sobre a sinalização ITAMi de *E. coli*, a qual poderá ser investigada em outro projeto. Porém podemos hipotetizar que o wzxe, sendo uma estrutura presente em várias enterobactérias gram-negativas, pode ser um alvo interessante para o tratamento de infecções por esses microorganismos. Além disso, os experimentos não permitem descartar que a menor virulência das bactérias wzxe^{-/-} não se deve à perturbação da síntese de uma parede celular com menor quantidade de LPS e mais frágil, e não exclusivamente à ausência de sinalização ITAMi.

5.2 Experimentos com CD89: ligação direta à bactérias e proteção do hospedeiro

Na segunda parte do projeto, realizado completamente durante meu estágio no INSERM em Paris, sob orientação do Prof. Renato Monteiro e de Sanae Ben Mkadden, em co-autoria com Christian de Tymowski, estudante de doutorado e pesquisador principal desta temática, descrevemos uma nova função para o CD89 como ligante bacteriano e possível mediador de respostas imunes inatas precoces.

Os experimentos demonstraram que o CD89 é capaz de ligar-se a bactérias diretamente, na ausência de opsoninas, IgA ou PCR. Essa ligação direta parece ter um papel no início da infecção e, num momento seguinte, ocorre a produção de IgA específica (imunidade adaptativa) que serve de opsonina. Esse receptor, além de sua dualidade funcional (pró ou antiinflamatório) a

depende do contexto, parece também ter uma função imediata (inata) e uma mais tardia (adaptativa). Evidenciamos, nos experimentos descritos, que a primeira se dá através da ligação direta a bactérias e desencadeia de respostas imunes nas primeiras horas do início da infecção.

Demonstramos que o CD89 se liga tanto a bactérias gram-negativas (*E. coli*) quanto gram-positivas (*S. pneumoniae*) e aumenta a proteção contra infecção. Sabe-se que, além de ligar-se a IgA, o CD89 também é capaz de ligar-se à PCR (35) e induzir respostas inflamatórias com papel na imunidade. Os experimentos realizados *in vitro* e *ex vivo* mostram que o CD89 liga-se a bactérias mesmo na ausência de IgA e PCR. Os experimentos *in vivo* foram na mesma direção.

O fato de que só a presença adicional do CD89 *in vitro* foi capaz de dobrar a captura da bactéria, dobrar a produção de citocinas e ROS e diminuir a contagem de bactérias sobreviventes mostra a importância que o CD89 tem na defesa contra as bactérias. Estes efeitos foram confirmados *in vivo*, onde a quantidade de bactérias coletadas nas primeiras 48h foi 100 vezes menor em camundongos CD89^{Tg} comparado aos WT, com aumento da produção de citocinas e na aumento na sobrevivência. Enquanto a IgA de camundongo se liga parcialmente ao CD89 e não compete com as bactérias pela ligação com o CD89, nos humanos, a IgA sérica inibe a ligação de bactérias ao CD89, porém de maneira incompleta (Figura 3). Assim, parece haver um papel fisiológico para o CD89 principalmente em locais com baixas concentrações de IgA. A expressão de outros receptores imunes envolvidos no reconhecimento de bactérias pelos macrófagos (TLR, MARCO, FcγRs, receptor de lectina) não foi diferente entre

BMM de camundongos CD89^{Tg} e controles, o que reforça que as diferenças entre camundongos CD89+ e CD89- são exclusivamente devidas a esse receptor.

Observamos que quase nenhuma IgA é produzida nas fases iniciais da infecção (até 48h), mesmo quando já se evidencia alguma proteção em camundongos CD89^{Tg}, sugerindo um papel importante desse receptor na resposta imune inata.

Nos modelos de sepse utilizados, o CD89 reduziu a carga bacteriana, aumentou a reação inflamatória precoce e levou a maior sobrevivência dos animais. Pode-se propor que a captura mais efetiva de bactérias e a reação inflamatória mais precoce favorecem a contenção da infecção enquanto a resposta imune adaptativa não tem início.

Acreditamos que essa ligação direta com bactérias, sem a participação de IgA ou outros ligantes, mediando imunidade inata, é mais uma função do CD89. Já é descrito que esse receptor pode mediar tanto respostas inflamatórias quanto anti-inflamatórias a depender do modo de ligação da IgA, quando na forma monomérica ou através de imunocomplexos, respectivamente (39,40) (Figura 2).

Sabemos que um aumento na frequência de infecções é característica das imunodeficiências, porém há poucos estudos comparando essa frequência entre pacientes com deficiência seletiva de IgA e IDCV. Pacientes com deficiência de IgA têm menos infecções pulmonares quando comparado a pacientes com deficiência de IgA associada a deficiência de IgG (152). Em estudo recente foi relatado que, enquanto níveis baixos de IgG e IgM estão associados com aumento do risco de infecções, a deficiência seletiva de IgA parece ser melhor tolerada (153). Evidenciamos que fagócitos de pacientes com IDCV, em reposição de IgG e IgM, tinham aumento da expressão do CD89 e

capacidade de mediar internalização e morte bacteriana. Esses achados estão de acordo com observações prévias que pacientes com deficiência de IgA têm capacidade residual para combater infecções (154,155).

Já se demonstrou que a expressão e ativação do CD89 está aumentada em fagócitos de sangue humano após infecção bacteriana (gram-negativa), juntamente com aumento da expressão e associação de FcRγ com o CD89 (156). O LPS também aumenta a expressão de CD89 em monócitos (157). O fato de bactérias ou seus produtos serem capazes de aumentar a expressão de CD89 vai ao encontro das nossas observações de que a proteção mediada por CD89 em camundongos também ocorre na ausência de IgA, já nas primeiras 48h. Isso sugere que o CD89 age como receptor inato nas primeiras horas da infecção. Numa fase mais tardia, quando já houver ocorrido produção de IgA, essa ligação direta aumentará ainda mais o crosslinking de CD89 e fornecerá sítios de ancoramento adicionais para captura de bactérias opsonizadas, aumentando a sinalização ITAM e todas as suas repercussões imunes. Essas duas formas de captura bacteriana pelo CD89, dependente de IgA e independente de IgA, reforçam a importância deste receptor na imunidade.

Em estudo anterior, observamos que a *E. coli* é capaz de induzir um sinal ITAMi potente através do CD16A, envolvendo SHP-1, e evadir do sistema imune e aumentando a mortalidade (47). Contrariamente, o CD16A foi protetor durante infecção por *S. pneumoniae*. Já o CD89 se liga a *S. pneumoniae* e *E. coli*, levando a recrutamento de Syk, fagocitose bacteriana e inflamação controlada, evidenciada pela diminuição da produção de IL-1 nas primeiras 48h na pneumonia e em CLP e no aumento da sobrevivência dos camundongos CD89^{Tg}. Apesar do CD16 e do CD89 apresentarem um adaptador FcRγ, não há

homologia entre os domínios extracelulares destes receptores (34), o que sugere que o comportamento diferente da *E. coli* pode estar relacionado a diferença destes domínios extracelulares. Enquanto camundongos CD16KO são protegidos contra a sepse induzida por CLP, camundongos CD89^{Tg} (que expressam CD16), foram tão protegidos quanto os camundongos CD16KO, o que fala a favor de diferentes locais de ligação das bactérias nestes receptores. Nossos resultados mostram que o sinal ativador gerado pelo CD89 pode compensar o sinal inibidor gerado pelo CD16 em modelo de CLP.

Resumidamente, os principais achados foram os seguintes: 1) o CD89 se liga diretamente a *S. pneumoniae* e *E. coli* independentemente de IgA e PCR e media ativação ITAM. 2) Estas interações aumentam a fagocitose bacteriana e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, produção de espécies reativas de oxigênio e morte bacteriana tanto em células humanas quanto de camundongos transgênicos CD89^{Tg}. 3) O papel desta interação na ativação celular foi comprovado em células de pacientes com IDCV deficientes em IgA. 4) A ligação direta CD89-bactéria só foi parcialmente inibida pela IgA. 5) Em camundongos transgênicos, em dois modelos diferentes de sepse, a expressão do CD89 foi associada com proteção através do controle bacteriano local, menos dano tecidual e aumento de sobrevivência do hospedeiro 6) o efeito protetor *in vivo* do CD89 na resposta imune precoce (inata) foi independente de PCR e IgA.

São resultados que mostram, pela primeira vez, que o CD89 não precisa necessariamente de opsoninas para ter efeito antibacteriano e que o mesmo é capaz de se ligar a diferentes tipos de patógenos em fases precoces da infecção, antes que respostas adaptativas aconteçam mediando a proteção do hospedeiro.

Esses resultados nos levam a indagar se esses mecanismos de ligação direta entre o CD16A e o CD89 com *S. pneumoniae* e *E. coli* acontecem em outros contextos e com outras bactérias e FcRs. Poderiam os FcRs se ligar a outros microrganismos como vírus, fungos ou parasitas? Podemos considerar os FcR como uma nova classe receptores inatos? Acreditamos que o estudo de outros FcRs e bactérias pode ampliar ainda mais o papel destes receptores na imunidade inata.

Num mundo onde a resistência bacteriana a antibióticos tradicionais vem aumentando de maneira assoladora, tratamentos visando modular essa sinalização através de FcRs poderiam ajudar a melhorar a resposta imune no combate contra patógenos.

A compreensão das características funcionais dos FcRs nos permite vislumbrar tratamentos que tenham como alvo estes receptores, com o intuito de modular a resposta inflamatória e imune e promover o controle de uma ampla gama de doenças auto-imunes, infecciosas e até mesmo oncológicas.

VI CONCLUSÕES

Os resultados apresentados anteriormente nos permitem concluir que:

- ✓ A menor virulência da *E. coli* wzxe^{-/-} mutante evidenciada em modelo de sepse por injeção de bactérias reforça a importância dessa proteína como mecanismo protetor da *E. coli*.
- ✓ O tratamento de camundongos com lúpus induzido por Pristane com peptídeo TEGA, nas doses e durante o tempo descrito, não foi capaz de modificar a expressão de RNAm e protéica de citocinas nos pulmões destes animais, nem a assinatura de interferon.
- ✓ CD89 se liga diretamente ao *Streptococcus pneumoniae* e à *Escherichia coli*, independentemente de IgA e de PCR, levando a ativação celular.
- ✓ O CD89 media resposta imune precoce através de ligação direta com bactérias e protege o hospedeiro em modelos de infecção pulmonar e de CLP.
- ✓ CD16 protege o hospedeiro em modelo de pneumonia por *Streptococcus pneumoniae*.

VII ANEXOS

Anexo A – Aprovação da Comissão de Ética

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado **“Bloqueio do receptor CD16 como nova arma terapêutica contra sepse por Escherichia coli”** protocolo nº **161/15** sob a responsabilidade de **Fabiano Pinheiro da Silva** e **Mario Diego Teles Correia**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 12.02.16.

Vigência do Projeto	Agosto/2016
Espécie/linhagem	Camundongo C57Bl/6
Nº de animais	200 selvagens e 200 Knockout
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	Macho/fêmea
Origem	Biotério Central da FMUSP

CEUA-FMUSP, 12 de Fevereiro de 2016

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

VIII REFERÊNCIAS

1. Daëron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:203–34.
2. Lewis GK, Pazgier M, Devico AL. Survivors Remorse : antibody-mediated protection against HIV-1. *Immunol Rev*. 2017;275(1):271–84.
3. Galon J, Bouchard C, Fridman WH, Sautès C. Ligands and biological activities of soluble Fc gamma receptors. *Immunol Lett*. 1995;44(2–3):175–81.
4. Tanigaki K, Sundgren N, Khera A, Vongpatanasin W, Mineo C, Shaul PW. Fcγ Receptors and ligands and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2015;71(11):3831–40.
5. Nimmerjahn F, Ravetch J V. FcγRs in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;350:105–25.
6. Daëron M. Fc receptors as adaptive immunoreceptors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;382:131–64.
7. Akula S, Mohammadamin S, Hellman L. Fc Receptors for Immunoglobulins and Their Appearance during Vertebrate Evolution. 2014;9(5).
8. Sumiyoshi K, Mokuno H, Iesaki T, Shimada K, Miyazaki T, Kume A, et al. Deletion of the Fc receptors g chain preserves endothelial function affected by hypercholesterolaemia in mice fed on a high-fat diet. 2008;463–70.
9. Devaraj S, Davis B, Simon SI, Jialal I, Davis B, Simon SI. CRP promotes monocyte-endothelial cell adhesion via Fcγ receptors in human aortic endothelial cells under static and shear flow conditions. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2006;95817:1170–6.
10. Lu J, Ellsworth JL, Hamacher N, Oak SW, Sun PD. Crystal Structure of Fcγ Receptor I and Its Implication in High Affinity γ-Immunoglobulin Binding. *J Biol Chem*. 2011;286(47):40608–13.
11. Monteiro RC, Gartland GL, Kubagawa H. Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. *J Clin Invest*. 1993;92(4):1681–5.
12. van Egmond M, van Garderen E, van Spriel AB, Damen CA, van Amersfoort ES, van Zandbergen G, et al. FcαRI-positive liver Kupffer cells: Reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med*.

-
- 2000 Jun;6:680.
13. Xue J, Zhao Q, Zhu L, Zhang W. Deglycosylation of Fc α R at N58 increases its binding to IgA. *Glycobiology*. 2010;20(7):905–15.
 14. Sun Q, Zhang Z, Zhang H, Liu X. Aberrant IgA1 Glycosylation in IgA Nephropathy : A Systematic Review. *PLoS One*. 2016;11(11):1–15.
 15. Hayes JM, Cosgrave EFJ, Struwe WB, Wormald M, Davey GP, Jefferis R, et al. Glycosylation and Fc Receptors. In: *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014. p. 165–99.
 16. Stapleton NM, Einarisdóttir HK, Stemerding AM, Vidarsson G. The multiple facets of FcRn in immunity. *Immunol Rev*. 2015 Nov;268(1):253–68.
 17. Pincetic A, Bournazos S, Dilillo DJ, Maamary J, Wang TT, Dahan R, et al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2014;15(8):707–16.
 18. Ivashkiv LB. How ITAMs Inhibit Signaling. 2011;4(169):10–2.
 19. Getahun A, Cambier JC. Of ITIMs, ITAMs, and ITAMis: revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunol Rev*. 2015 Nov;268(1):66–73.
 20. Masuda A, Yoshida M, Shiomi H, Morita Y, Kutsumi H, Inokuchi H, et al. Role of Fc Receptors as a therapeutic target. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8(1):80–6.
 21. Jovanovic V, Dai X, Lim YT, Kemeny DM, MacAry PA. Fc γ receptor biology and systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis*. 2009;12(4):293–8.
 22. Zhang Y, Boesen CC, Radaev S, Brooks AG, Fridman W, Sautes-fridman C, et al. Crystal Structure of the Extracellular Domain of a Human Fc γ RIII. *Immunity*. 2000;13:387–95.
 23. Fc H, Kimberly RP, Gibson AW, Edberg JC. Diversity and Duplicity: Human Fc γ Receptors in Host Defense and Autoimmunity. *Immunol Res*. 2002;26/1-3:177–89.
 24. Selvaraj P, Rosse WF, Silbert R, Springer TA. Natural killer cell and granulocyte Fc gamma receptor III (CD16) differ in membrane anchor and signal transduction. *J Immunol*. 1989;143:3283–8.
 25. Bruhns P. Review article Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. 2012;119(24):5640–50.
 26. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):34–47.
 27. Roberts JT, Barb AW. A single amino acid distorts the Fc γ receptor

- IIIb/CD16b structure upon binding immunoglobulin G1 and reduces affinity relative to CD16a. *J Biol Chem.* 2018;293:19899–908.
28. Kimberly BYRP, Ahlstrom JONW. The glycosylphosphatidylinositol-linked FcγRIII PMN mediates transmembrane signaling events distinct FcγRII. *J Exp Med.* 1990;171.
29. Green JM, Schreiber AD, Brown EJ. Role for a Glycan Phosphoinositol Anchor in Fc gamma Receptor Synergy. *J Cell Biol.* 1997;139(5):1209–17.
30. Gillis C, Gouel-Chéron A, Jönsson F, Bruhns P. Contribution of Human FcγRs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Front Immunol.* 2014 Jan;5:254.
31. Keeble AH, Khan Z, Forster A, James LC. TRIM21 is an IgG receptor that is structurally , thermodynamically , and kinetically conserved. 2008;105(16).
32. Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev.* 2015 Nov;268(1):25–51.
33. Smith P, Dilillo DJ, Bournazos S, Li F, Ravetch J V. Mouse model recapitulating human Fc γ receptor structural and functional diversity. 2012;2012:1–6.
34. Monteiro RC, Van De Winkel JGJ. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003 Apr;21(1):177–204.
35. Lu J, Marjon KD, Marnell LL, Wang R, Mold C, Du Clos TW, et al. Recognition and functional activation of the human IgA receptor (FcαRI) by C-reactive protein. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(12):4974–9.
36. Sakamoto N, Shibuya K, Shimizu Y, Yotsumoto K, Miyabayashi T, Sakano S, et al. A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissues. 2001;1310–6.
37. Moura IC, Centelles MN, Arcos-fajardo M, Malheiros DM, Collawn JF, Cooper MD, et al. Identification of the Transferrin Receptor as a Novel Immunoglobulin (Ig) A1 Receptor and Its Enhanced Expression on Mesangial Cells in IgA Nephropathy. 2001;194(4).
38. Morell AG, Mayer K, Concentrations BW. IgA interaction with the asialoglycoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79:6229–31.
39. Ben Mkaddem S, Rossato E, Heming N, Monteiro RC. Anti-inflammatory role of the IgA Fc receptor (CD89): From autoimmunity to therapeutic perspectives. *Autoimmun Rev.* 2013;12(6):666–9.
40. Bakema JE, Van Egmond M. The human immunoglobulin A Fc receptor FcαRI: A multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 2011;4(6):612–24.

41. Aleyd E, Heineke MH, van Egmond M. The era of the immunoglobulin A Fc receptor Fc α RI; its function and potential as target in disease. *Immunol Rev.* 2015;268(1):123–38.
42. Pasquier B, Launay P, Kanamaru Y, Moura IC, Pfirsch S, Ruffié C, et al. Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: Dual role of FcR γ ITAM. *Immunity.* 2005;22(1):31–42.
43. Da Silva FP, Aloulou M, Skurnik D, Benhamou M, Andremont A, Velasco IT, et al. CD16 promotes Escherichia coli sepsis through an FcR γ inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. *Nat Med.* 2007;13(11):1368–74.
44. Beppler J, Mkaddem S Ben, Michaloski J, Honorato RV, Velasco IT, de Oliveira PSL, et al. Negative regulation of bacterial killing and inflammation by two novel CD16 ligands. *Eur J Immunol.* 2016;46(8):1926–35.
45. van Egmond M, van Vuuren AJ, Morton HC, van Spriel AB, Shen L, Hofhuis FM, et al. Human immunoglobulin A receptor (Fc α RI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR γ chain and CR3 (CD11b/CD18). *Blood.* 1999;93(12):4387–94.
46. Moulton VR, Suarez-Fueyo A, Meidan E, Li H, Mizui M, Tsokos GC. Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective. *Trends Mol Med.* 2017;23(7):615–35.
47. Javinani A, Ashraf-ganjouei A, Aslani S, Jamshidi A, Mahmoudi M. Exploring the etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus : a genetic perspective. *Immunogenetics.* 2019;
48. Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol.* 2017;18(7):716–24.
49. Zharkova O, Celhar T, Cravens PD, Satterthwaite AB, Fairhurst AM, Davis LS. Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2017;56(1):i55–66.
50. La Cava A. Putting together the autoimmunity puzzle. *J Clin Invest.* 2015;125(6):2184–6.
51. Clynes R, Calvani N, Croker BP, Richards HB. Modulation of the immune response in pristane-induced lupus by expression of activation and inhibitory Fc receptors. *Clin Exp Immunol.* 2005;141(2):230–7.
52. Takai T. Fc Receptors and Their Role in Immune Regulation and Autoimmunity. *J Clin Immunol.* 2005;25(1):1–18.
53. Gaip US, Munoz LE, Grossmayer G, Lauber K, Franz S, Sarter K, et al. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun.* 2007;28(2–3):114–21.

54. Nakatani K, Yoshimoto S, Iwano M, Asai O, Samejima K, Sakan H, et al. Fractalkine expression and CD16+ monocyte accumulation in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2010;299(1):F207-16.
55. Fujii T, Hamano Y, Ueda S, Akikusa B, Yamasaki S, Ogawa M, et al. Predominant role of FcγRIII in the induction of accelerated nephrotoxic glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2003;64(4):1406–16.
56. Li Y, Lee PY, Reeves WH. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2010;58(5):355–64.
57. Byrne JC, Ní Gabhann J, Lazzari E, Mahony R, Smith S, Stacey K, et al. Genetics of SLE: Functional relevance for monocytes/macrophages in disease. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012.
58. Fang X, Zaman MH, Guo X, Ding H, Xie C, Zhang X, et al. Role of Hepatic Deposited Immunoglobulin G in the Pathogenesis of Liver Damage in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 2018;9(June):1–12.
59. Hobday PM, Auger JL, Schuneman GR, Haasken S, Verbeek JS, Binstadt BA. Fcγ receptor III and Fcγ receptor IV on macrophages drive autoimmune valvular carditis in mice. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(4):852–62.
60. Yu X, Menard M, Prechl J, Bhakta V, Sheffield WP, Lazarus AH. Monovalent Fc receptor blockade by an anti-Fcγ receptor/albumin fusion protein ameliorates murine ITP with abrogated toxicity. *Blood*. 2016;127(1):132–8.
61. Waschbisch A, Schröder S, Schraudner D, Sammet L, Weksler B, Melms A, et al. Pivotal Role for CD16 + Monocytes in Immune Surveillance of the Central Nervous System. *J Immunol*. 2016;196(4):1558–67.
62. Chuluundorj D, Harding SA, Abernethy D, La Flamme AC. Expansion and preferential activation of the CD14+ CD16 + monocyte subset during multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol*. 2014;92(6):509–17.
63. Meyer D, Schiller C, Westermann J, Izui S, Hazenbos WLW, Verbeek JS, et al. FcγRIII (CD16)-deficient mice show IgG isotype-dependent protection to experimental autoimmune hemolytic anemia. *Blood*. 1998;92(11):3997–4002.
64. Masuda M, Morimoto T, Kobatake S, Nishimura N, Nakamoto K, Dong XH, et al. Measurement of soluble Fcγ receptor type IIIa derived from macrophages in plasma: Increase in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2003;132(3):477–84.
65. Hendrich C, Kuipers JG, Kolanus W, Schmidt RE, Hammer M. Activation of CD16+ effector cells by rheumatoid factor complex. Role of natural killer cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1991;34(4):423–31.

66. Liu Y, Liu M, Zhang Y, Qu C, Lu G, Huang Y, et al. The expression of Fcγ receptors in Hashimoto's thyroiditis. *Cell Immunol.* 2015;294(1):33–8.
67. Tüzün E, Saini SS, Yang H, Alagappan D, Higgs S, Christadoss P. Genetic evidence for the involvement of Fcγ receptor III in experimental autoimmune myasthenia gravis pathogenesis. *J Neuroimmunol.* 2006;174(1–2):157–67.
68. Yen EY, Shaheen M, Woo JMP, Mercer N, Li N, McCurdy DK et al. 46-year trend in sistêmico lupus erythematosus mortality in the United States, 1968 to 2013: A nationwide population based study. *Ann Intern Med.* 2017;25(3):289–313.
69. Davidson JE, Fu Q, Rao S, Magder LS, Petri M. Quantifying the burden of steroid-related damage in SLE in the Hopkins Lupus Cohort. *Lupus Sci Med.* 2018;5(1):1–9.
70. Bosques CJ, Manning AM. Fc-gamma receptors: Attractive targets for autoimmune drug discovery searching for intelligent therapeutic designs. *Autoimmun Rev.* 2016;15(11):1081–8.
71. Du Y, Sanam S, Kate K, Mohan C. Animal models of lupus and lupus nephritis. *Curr Pharm Des.* 2015;21(18):2320–49.
72. Reeves WH, Lee PY, Weinstein JS, Satoh M, Lu and L. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends Immunol.* 2010;30(9):455–64.
73. Satoh M, Reeves WH. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *J Exp Med.* 1994;180(6):2341–6.
74. Rottman JB, Willis CR. Mouse models of systemic lupus erythematosus reveal a complex pathogenesis. *Vet Pathol.* 2010;47(4):664–76.
75. Li W, Titov AA, Morel L. An update on lupus animal models. *Curr Opin Rheumatol.* 2017;29(5):434–41.
76. Birmingham DJ, Rovin BH, Yung Yu C, Hebert LA. Of mice and men: The relevance of the mouse to the study of human SLE. *Immunol Res.* 2001;24(2):211–24.
77. Shaheen VM, Satoh M, Richards HB, Yoshida H, Shaw M, Jennette JC, et al. Immunopathogenesis of environmentally induced lupus in mice. *Environ Health Perspect.* 1999;107(SUPPL. 5):723–7.
78. Satoh M, Richards HB, Shaheen VM, Yoshida H, Shaw M, Naim JO. Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by pristane. *Clin Exp Immunol.* 2000;121:399–405.
79. Freitas EC, de Oliveira MS, Monticelo OA. Pristane-induced lupus:

-
- considerations on this experimental model. *Clin Rheumatol*. 2017;36(11):2403–14.
80. Zhuang H, Han S, Lee PY, Khaybullin R, Shumyak S, Lu L, et al. Pathogenesis of Diffuse Alveolar Hemorrhage in Murine Lupus. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(6):1280–93.
 81. Zhuang H, Szeto C, Han S, Yang L, Reeves WH. Animal models of interferon signature positive lupus. *Front Immunol*. 2015;6(JUN):6–11.
 82. Liu K, Mohan C. Altered B-cell signaling in lupus. *Autoimmun Rev*. 2009;8(3):214–8.
 83. Muñoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(5):280–9.
 84. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(5):2610–5.
 85. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and Granulopoiesis Signatures in Systemic Lupus Erythematosus Blood. *J Exp Med*. 2003;197(6):711–23.
 86. Zhuang H, Narain S, Sobel E, Lee PY, Nacionales DC, Kelly KM, et al. Association of anti-nucleoprotein autoantibodies with upregulation of Type I interferon-inducible gene transcripts and dendritic cell maturation in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2005;117(3):238–50.
 87. Seery BJP, Carroll JM, Cattell V, Watt FM. Antinuclear Autoantibodies and Lupus Nephritis in Transgenic Mice Expressing Interferon α in the Epidermis. *J Exp Med*. 1997;186(9).
 88. Jacob CO, Meide VD, Mc Devitt HO. In vivo treatment of (NBZ/NZW)F1 lúpus-like nephritis with monoclonal antibody to γ Interferon. *J Exp Med*. 1987;166(September).
 89. Wandl U, Nagel-Hiemke M, May D, Kreuzfelder E, Kloke O, Kranzhoff M, et al. Lupus-like autoimmune disease induced by interferon therapy for myeloproliferative disorders. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992;65(1):70–4.
 90. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc*. 2016;315(8):801–10.
 91. Hajj J, Blaine N, Salavaci J, Jacoby D. The “Centrality of Sepsis”: A Review on Incidence, Mortality, and Cost of Care. *Healthcare*. 2018;6(3):90.

92. Knoop ST, Skrede S, Langeland N, Flaatten HK. Epidemiology and impact on all-cause mortality of sepsis in Norwegian hospitals: A national retrospective study. *PLoS One*. 2017;12(11):1–13.
93. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885–91.
94. Van Avondt K, van Sorge NM, Meyaard L. Bacterial Immune Evasion through Manipulation of Host Inhibitory Immune Signaling. *PLoS Pathog*. 2015;11(3):1–8.
95. Chang YC, Olson J, Beasley FC, Tung C, Zhang J, Crocker PR, et al. Group B Streptococcus Engages an Inhibitory Siglec through Sialic Acid Mimicry to Blunt Innate Immune and Inflammatory Responses In Vivo. *PLoS Pathog*. 2014;10(1).
96. Nakayama M, Kurokawa K, Nakamura K, Lee BL, Sekimizu K, Kubagawa H, et al. Inhibitory Receptor Paired Ig-like Receptor B Is Exploited by *Staphylococcus aureus* for Virulence. *J Immunol*. 2012;189(12):5903–11.
97. Choi HW, Brooking-Dixon R, Neupane S, Lee CJ, Miao EA, Staats HF, et al. *Salmonella* Typhimurium Impedes Innate Immunity with a Mast-Cell-Suppressing Protein Tyrosine Phosphatase, SptP. *Immunity*. 2013;39(6):1108–20.
98. Rick PD, Barr K, Sankaran K, Kajimura J, Rush JS, Waechter CJ, et al. Evidence That the *wzx*E Gene of *Escherichia coli* K-12 Encodes a Protein Involved in the Transbilayer Movement of a Trisaccharide-Lipid Intermediate in the Assembly of Enterobacterial Common Antigen. *J Biol Chem*. 2003;278(19):16534–42.
99. Kimbrell DA, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet*. 2001;2(4):256–67.
100. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819–26.
101. O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):453–60.
102. Mukouhara T, Arimoto T, Cho K, Yamamoto M, Igarashi T. Surface lipoprotein PpiA of *Streptococcus mutans* suppresses scavenger receptor MARCO-dependent phagocytosis by macrophages. *Infect Immun*. 2011;79(12):4933–40.
103. Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol*. 2014;16(2):185–94.
104. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: Current dogma and new perspectives. *Immunity*. 2014;40(4):463–75.

105. Bournazos S., Wang T. T. RJ V. The Role and Function of Fcγ Receptors on Myeloid Cells. 2017;4(6).
106. Abram CL, Lowell CA. The expanding role for ITAM-based signaling pathways in immune cells. *Sci STKE*. 2007;2007(377):1–7.
107. Bezbradica JS, Medzhitov R. Role of ITAM signaling module in signal integration. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(1):58–66.
108. Humphrey MB, Lanier LL, Nakamura MC. Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev*. 2005;208:50–65.
109. Mkaddem S Ben, Murua A, Flament H, Titeca-Beauport D, Bounaix C, Danelli L, et al. Lyn and Fyn function as molecular switches that control immunoreceptors to direct homeostasis or inflammation. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00294-0>
110. Blank U, Launay P, Benhamou M, Monteiro RC. Inhibitory ITAMs as novel regulators of immunity. *Immunol Rev*. 2009;232(1):59–71.
111. Hamerman JA, Lanier LL. Inhibition of immune responses by ITAM-bearing receptors. *Sci STKE*. 2006;2006(320):1–8.
112. Hori Y, Nihei Y, Kurokawa Y, Makabe-kobayashi Y, Terui T, Doi H, et al. Accelerated Clearance of Escherichia coli in Experimental Peritonitis of Histamine-Deficient Mice. *J Immunol*. 2002;169:1978–83.
113. Chowdhary VR, Grande JP, Luthra HS, David CS. Characterization of haemorrhagic pulmonary capillaritis : another manifestation of Pristane-induced lupus. *Rheumatology*. 2007;46:1405–10.
114. Picard C, Al-herz W, Bousfiha A, Casanova J, Gaspar HB. Primary Immunodeficiency Diseases : an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol*. 2015;35:696–726.
115. Kanamaru Y, Arcos-Fajardo M, Moura IC, Tsuge T, Cohen H, Essig M, et al. Fcα receptor I activation induces leukocyte recruitment and promotes aggravation of glomerulonephritis through the FcRγ adaptor. *Eur J Immunol*. 2007;37(4):1116–28.
116. Launay P, Grossetete B, Arcos-Fajardo M, Gaudin E, Torres SP, Beaudoin L, et al. Fcα 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*. 2000;191(11):1999–2009.
117. Teupser D, Weber O, Rao TN, Sass K, Thiery J, Jörg Fehling H. No reduction of atherosclerosis in C-reactive protein (CRP)-deficient mice. *J*

-
- Biol Chem. 2011;286(8):6272–9.
118. Rittirsch D, Huber-lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc.* 2009;4(1):31–6.
 119. Aloulou M, Mkaddem S Ben, Biarnes-Pelicot M, Boussetta T, Souchet H, Rossato E, et al. IgG1 and IVIg induce inhibitory ITAM signaling through FcγRIII controlling inflammatory responses. *Blood.* 2012;119(13):3084–96.
 120. Martinez JE, Romero-steiner S, Pilishvili T, Barnard S, Schinsky J, Goldblatt D, et al. A Flow Cytometric Opsonophagocytic Assay for Measurement of Functional Antibodies Elicited after Vaccination with the 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine. *Clin diagnostic laoratory Immunol.* 1999;6(4):581–6.
 121. Leijh PC, Barselaar M Van den, van den Barselaar MT, van Zwet TL, Dubbeldeman-Rempt I, van Furth R. Kinetics of phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by human granulocytes. *Immunology.* 1979;37(2):453–65.
 122. Mkaddem S Ben, Bruhns P, Renato C, Invest JC, Mkaddem S Ben, Hayem G, et al. Shifting Fc γ RIIA-ITAM from activation to inhibitory configuration ameliorates arthritis Find the latest version : Shifting Fc γ RIIA-ITAM from activation to inhibitory configuration ameliorates arthritis. 2014;124(9):3945–59.
 123. Berthelot L, Papista C, Maciel TT, Biarnes-Pelicot M, Tissandie E, Wang PHM, et al. Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J Exp Med.* 2012;209(4):793–806.
 124. Monteiro RC, Cooper D. Molecular heterogeneity of Fc alpha receptors detected by receptor-specific monoclonal antibodies . *J Immunol.* 1992;148:1764–70.
 125. Guimarães PM, Scavuzzi BM, Stadtlober NP, Flor L, Santos F, Alysson M, et al. Cytokines in systemic lupus erythematosus: far beyond Th1 / Th2 dualism lupus: cytokine profiles. *Immunol Cell Biol.* 2017;95:824–31.
 126. Lo MS, Tsokos GC. Recent developments in systemic lupus erythematosus pathogenesis and applications for therapy. *Curr Opin Rheumatol.* 2018;30(2):222–8.
 127. Bronson PG, Chaivorapol C, Ortmann W, Behrens TW, Graham RR. The genetics of type I interferon in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(5):530–7.
 128. Fredi M, Bianchi M, Andreoli L, Greco G, Olivieri I, Orcesi S, et al. Typing TREX1 gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Reumatismo.* 2015;67(1):1–7.

129. Niewold TB, Kelly JA, Flesch MH, Espinoza LR, Harley JB, Crow MK. Association of the IRF5 risk haplotype with high serum interferon- α activity in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* 2009;58(8):2481–7.
130. Kariuki SN, Kirou KA, Macdermott EJ, Barillas-arias L, Crow K, Niewold TB. Cutting edge: Autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN- α in lupus patients in vivo. *J Immunol.* 2009;182(1):34–8.
131. Locatelli L, Cadamuro M, Spirli C, Fiorotto R, Morell CM, Popov Y, et al. Regulation of Age-associated B cells by IRF5 in systemic autoimmunity. *Nat Immunol.* 2018;63(3):965–82.
132. Barnes BJ. Genetic Versus Non-genetic Drivers of SLE: Implications of IRF5 Dysregulation in Both Roads Leading to SLE. *Curr Rheumatol Rep.* 2019;21(1):19–23.
133. Xu Z, Duan B, Croker BP, Morel L. STAT4 deficiency reduces autoantibody production and glomerulonephritis in a mouse model of lupus. *Clin Immunol.* 2006;120(2):189–98.
134. Rossato E, Ben Mkaddem S, Kanamaru Y, Hurtado-Nedelec M, Hayem G, Descatoire V, et al. Reversal of arthritis by human monomeric IgA through the receptor-mediated SH2 domain-containing phosphatase 1 inhibitory pathway. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(7):1766–77.
135. Launay P, Blank U, Monteiro RC, Patry C, Lehuen A, Pasquier B. Alternative Endocytic Pathway for Immunoglobulin A Fc Receptors (CD89) Depends on the Lack of FcR γ Association and Protects against Degradation of Bound Ligand. *J Biol Chem.* 1999;274(11):7216–25.
136. Pasquier B, Lepelletier Y, Baude C, Hermine O, Monteiro RC. Differential expression and function of IgA receptors (CD89 and CD71) during maturation of dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2004;76(6):1134–41.
137. Geissmann F, Lepelletier Y, Monteiro RC, Pasquier B, Lehuen A, Launay P, et al. A Subset of Human Dendritic Cells Expresses IgA Fc Receptor (CD89), Which Mediates Internalization and Activation Upon Cross-Linking by IgA Complexes. *J Immunol.* 2001;166(1):346–52.
138. Du Clos TW, Mold C. Pentraxins (CRP, SAP) in the process of complement activation and clearance of apoptotic bodies through Fc γ receptors. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011;16(1):15–20.
139. Bonetto S, Spadola L, Buchanan AG, Jermutus L, Lund J. Identification of cyclic peptides able to mimic the functional epitope of IgG1-Fc for human Fc gammaRI. *FASEB J.* 2009;23(2):575–85.
140. Deng Y, Tsao BP. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(12):683–92.

141. Murphy EA, Velázquez KT, Nagarkatti PS, Davis JM, Nagarkatti M, Robinson CM, et al. Role of MCP-1 on inflammatory processes and metabolic dysfunction following high-fat feedings in the FVB/N strain. *Int J Obes.* 2015;40(5):844–51.
142. Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: A formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):298–306.
143. Kareva L, Mironska K, Stavric K, Hasani A. Adverse Reactions to Intravenous Immunoglobulins - Our Experience. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018;6(12):2359–62.
144. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus Anti-inflammatory Cytokine Profile in Patients with Severe Sepsis: A Marker for Prognosis and Future Therapeutic Options. *J Infect Dis.* 2000;181(1):176–80.
145. Chaudry H., Zhou J., Zhong Y, ALI M. M., McGuire F., Nagarkatti P. S. NM. Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *In Vivo (Brooklyn).* 2015;27(6):669–84.
146. Berry PA, Antoniadou CG, Hussain MJ, McPhail MJW, Bernal W, Vergani D, et al. Admission levels and early changes in serum interleukin-10 are predictive of poor outcome in acute liver failure and decompensated cirrhosis. *Liver Int.* 2010;30(5):733–40.
147. Kajimura J, Rahman A, Rick PD. Assembly of cyclic enterobacterial common antigen in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 2005;187(20):6917–27.
148. Rick PD, Barr K, Sankaran K, Kajimura J, Rush JS, Waechter CJ. Evidence that the *wzx* gene of *Escherichia coli* K-12 encodes a protein involved in the transbilayer movement of a trisaccharide-lipid intermediate in the assembly of enterobacterial common antigen. *J Biol Chem.* 2003;278(19):16534–42.
149. Rietschel ET, Kirikae T, Schade US, Mamai UWE, Nier G, Brade H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994;8(2):217–25.
150. Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res.* 2010;49(2):97–107.
151. Hong Y, Liu MA, Reeves PR. Progress in our understanding of Wzx flippase for translocation of bacterial membrane lipid-linked oligosaccharide. *J Bacteriol.* 2018;200(1).
152. Björkander J, Bake B, Oxelius V-A, Hanson LÅ. Impaired Lung Function in Patients with IgA Deficiency and Low Levels of IgG2 or IgG3. *N Engl J Med.* 1985;313(12):720–4.

-
153. Furst DE. Serum Immunoglobulins and Risk of Infection: How Low Can You Go? *Semin Arthritis Rheum.* 2009;39(1):18–29.
 154. Welch TR. 50 Years Ago in The Journal of pediatrics: Comment on IgA Deficiency and Susceptibility to Infection. *J Pediatr.* 2018;192:104.
 155. Ludvigsson JF, Neovius M, Hammarström L. IgA deficiency & mortality: A population-based cohort study. *J Clin Immunol.* 2013;33(8):1317–24.
 156. 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.* 2001 Nov;16(5):344–8.
 157. Shen L, Collins J, Schenborn M, CR M. Lipopolysaccharide and cytokine augmentation of human monocyte IgA receptor expression and function. *J Immunol.* 1994;152:4080–6.