

Rafael Abadessa Gonçalves

**Investigação do potencial terapêutico dos
receptores Fc de imunoglobulinas no câncer e
sepse**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos
Imunes e Infeciosos

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pinheiro
da Silva



São Paulo

2022

Rafael Abadessa Gonçalves

**Investigação do potencial terapêutico dos
receptores Fc de imunoglobulinas no câncer e
sepse**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos
Imunes e Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pinheiro
da Silva

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gonçalves, Rafael Abadessa
Investigação do potencial terapêutico dos
receptores Fc de imunoglobulinas no câncer e sepse /
Rafael Abadessa Gonçalves. -- São Paulo, 2022.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Imunes e Infecciosos.
Orientador: Fabiano Pinheiro da Silva.

Descritores: 1.Receptores Fc 2.Inflamação
3.Proteína WzxE 4.Sepse 5.Leucemia 6.Imunidade inata

USP/FM/DBD-099/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Normatização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annaliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia 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.

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

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

*Para **Deus**, nosso mestre e maior cientista!*

*Para minha **família**, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus e Nossa Senhora, por sempre me fortalecerem, tornando-me, portanto, persistente em meus objetivos. Muitos foram os caminhos tortuosos, as dificuldades ao longo da pesquisa, mas a “fome” de conhecimento sempre foi maior.

Ao Prof. Dr. **Fabiano Pinheiro da Silva**, todo meu agradecimento pelo ensino exemplar, fruto de rigoroso e refinado nível científico, empenho inexcedível e saudavelmente exigente, incentivador, desafiador e por acreditar em mim, na minha experiência profissional e principalmente em me incentivar na nobre função da ciência e pesquisa, pois sem dúvida serviram para o meu crescimento educacional e profissional. Além de ser um grande orientador, demonstrou-se sempre confiante no projeto e me induzindo ao pensamento crítico, mesmo nos momentos difíceis. A ele todo meu reconhecimento.

À **Suely**, toda gratidão pela atenção, prontidão, supervisão, disponibilidade e ensinamento na orientação dos experimentos. Os dias no laboratório foram, sem dúvida, momentos de desafios e aprendizado. Obrigado!

No percurso dessa etapa acadêmica, tive a oportunidade de ser acompanhado pelo maravilhoso casal **Denise e Hermes Barbeiro**, que me orientaram e compartilharam comigo, através da visão crítica e didática impecáveis, os processos das amostras. Meus sinceros agradecimentos a esse casal, principalmente ao Hermes pelas primeiras análises estatísticas, esclarecimentos e dúvidas tiradas quanto aos métodos.

À **Thaís**, que, logo no início da pesquisa, dispôs-se incansavelmente a me orientar, organizar e ensinar a alguém que não tinha a mínima experiência com pesquisa experimental.

Ao Sr. **Geraldo** e à Sra. **Kelli Gouvea**, quero expressar o meu obrigado pelo suporte e toda a ajuda preciosa na realização dos nossos trabalhos, alunos

do LIM-51. Geraldo, obrigado por sempre se dispor a caminhar comigo até o - 80°C sempre que precisei. Obrigado.

Ao **Sr. Antônio** e todos os demais funcionários do Biotério da FMUSP, agradeço pela amizade, pelos momentos de agradável convívio, bem como pela ajuda nas orientações no cuidado com os animais.

Aos meus colegas **Alana, Ewerton, Luci, Ismael, Lucas e Neusa**, do grupo de pesquisa, agradeço a amizade, a cumplicidade, o espírito de ajuda e a simpatia de todos.

À querida **Beatriz**, obrigado por todos os momentos, convívio e pelas boas discussões durante as conversas que tivemos e sua inteira disponibilidade tão significativa e essencial para prosseguirmos à nossa atuação na linha de frente.

À **Marta Lúcia de Almeida**, quero expressar meu muito obrigado pelo incentivo, ajuda, atenção e paciência em ensinar as rotinas do laboratório que me foram extremamente úteis, em especial com os camundongos. Ela, que esteve presente logo no início da minha “caminhada”, mostrou-me a rotina do laboratório.

À querida **Mariana Serra** (Mari), agradeço a inteira disponibilidade em dividir comigo as bancadas e por colaborar, no dia a dia, sua disposição e preocupação – foram tantas mensagens e ligações para tirar dúvidas. O meu Muito Obrigado por sempre estar disponível a me ajudar.

Às minhas queridas **Angélica e Rose**, que sempre estiveram presentes me auxiliando nas solicitações, dúvidas, angústias, esclarecimentos e por me proporcionarem atenção de forma detalhada e educada. Obrigado!

Ao meu querido amigo **Lucas Andreo**, que sempre esteve pronto a me ajudar e orientar nos momentos de dificuldade. Sou grato pela nossa amizade.

Agradeço imensamente à minha querida **família (Marléa, Rafaela, Deuzimar, Andrei)** pelo amor, conselhos, apoio incondicional, compreensão,

encorajamento naqueles momentos difíceis dessa jornada e por sempre me incentivarem em todos os momentos. Desde a época em que eu era Técnico de Enfermagem e sonhava em ser médico. Sabia que poderia sonhar, mas, antes de tudo, precisava “arregaçar as mangas” para alcançar a almejada aprovação. Com muito apoio, e persistência, consegui então entrar na Universidade do Estado do Pará. Depois de formado, fui para São Paulo onde fiz a Residência Médica em Anestesiologia e, logo após o término, pude ingressar no Doutorado pela Universidade de São Paulo. E eles (a família) nunca deixaram de acreditar e me incentivar. São meus alicerces!

À **Fapesp**, pelo fomento à pesquisa tão importante e imprescindível para o crescimento e manutenção da vida. Prova disso, é possível observar as pesquisas desenvolvidas no durante a pandemia.

*“Mesmo desacreditado e ignorado por todos, não posso desistir, pois
para mim, vencer é nunca desistir.”*

Albert Einstein

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Quadro

Resumo

Abstract

1 Introdução	1
1.1 Receptores Fc de imunoglobulinas	3
1.2 Estruturas dos Receptores Fc γ	8
1.3 Respostas Biológicas Induzidas por Anticorpos Dependem da Distribuição Tecidual de FcRs	9
1.4 Ativando FcRs	10
1.5 FcRs inibitórios	11
1.6 FcRs de alta e baixa afinidade	13
1.7 A densidade de FcRs nas membranas celulares	15
1.8 FcRs como superestruturas	17
1.9 FcRs contendo ITAM geram sinais de ativação e inibição	19
1.10 Receptores Fc como Imunorreceptores Adaptativos	20
1.11 Sinalização baseada no ITAM (i).	21
1.12 FcR γ IIIa (CD16A)	23
1.13 CD16 e Sepse	26
1.14 Pontuação de gravidade SOFA	34
1.15 Papel da inflamação na Sepse	35
1.16 Manejo da sepse Grave e Choque Séptico	39
1.17 CD16 (receptor Fc γ RIII) e câncer	39

1.18 Proteína WzXe e a técnica do Phage display	45
2 Objetivos	46
2.1 Objetivo geral	46
2.2 Objetivos Específicos	46
3 Materiais e métodos	47
3.1 Local de experimentação	47
3.2 Aspectos éticos	47
3.3 Modelo de LMA	47
3.3.1 Animais de experimentação	47
3.3.2 Indução da LMA	48
3.3.3 Eutanásia	50
3.3.4 Hemograma	50
3.3.5 Pulverização de órgãos coletados	50
3.4 Modelo de Sepsis por ligadura cecal	51
3.4.1 Animais de experimentação	51
3.4.2 Indução da sepsis	52
3.3.3 Eutanásia	53
3.3.4 Dosagem de citocinas no soro (Milliplex)	54
3.5 Análise estatística	56
4 Resultados	57
4.1 Efeitos do WzXe sobre as variáveis hematológicas em modelo de LMA	57
4.2 Efeitos do TEGA sobre modelo de CLP	60
5 Discussão	64
5.1 Experimentos com CD16	66

5.2 Peptídeo TEGA e LMA	67
5.3 Peptídeo TEGA e Sepse	68
6 Conclusão	75
7 Anexos	75
8 Referências	79

Lista de Abreviaturas

ATAC-seq	Ensaio para cromatina acessível por transporase
CD	Células dendríticas
CD	Sequência de codificação
CyTOF	Espectromêtro de massa
ECA	Antígeno comum de enterobactérias
Eps	Provedores de emergência
FACS	Classificador de células ativado por fluorescência
GMP	Progenitores de granulomacrófagos
GO	Gemogonucina
HSCs	Hemocitoblastos ou células-tronco hematopoiéticas
IDH	Isocitrato desidrogenase
IL	Interleucinas
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LSD1	Demetilase específica para lisina 1
mAB	Anticorpos monoclonais
MARS-Cel	Perfil da dinâmica de transcrição de células individuais
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NK	Células <i>natural killer</i>
NY-ESO-1	Gene localizado no cromossomo xq28
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PET	Emissão de pósitrons de tumores
PPAR γ	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma
PR1	Proteína relacionada à patogênese
Rag2	Gene ativador de recombinação 2
RNA	Ácido ribonucleico
SMD	Síndrome mielodisplásica
TEGA	Peptídeo ligante de CD16
WT1	Gene codificador da proteína do tumor de Wilms
WzXe	Lipase do lipídio III, proteína desenvolvida na biosíntese do ECA

Lista de Figuras

Figura 1	Receptores Fc na membrana celular.....	7
Figura 2	Demonstração da influência da densidade de epítomos e FcRs nas ligações.....	17
Figura 3	ITAMs e ITIMs associados aos receptores Fc.....	21
Figura 4	Modelo proposto da função dual de ativação e inibição de certos receptores Fc contendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptor (ITAM).....	22
Figura 5	Receptores Fc γ consistem em múltiplos receptores.....	26
Figura 6	Distribuição dos grupos experimentais no modelo de LMA.....	48
Figura 7	Timeline com esquematização dos procedimentos realizados nos animais no modelo de LMA.....	49
Figura 8	Distribuição dos grupos experimentais no modelo de sepse.....	51
Figura 9	Timeline com esquematização dos procedimentos realizados com os animais no modelo de sepse.....	53
Figura 10	Contagem de leucócitos totais nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey)	57
Figura 11	Contagem de neutrófilos totais nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey).....	58
Figura 12	Contagem de monócitos totais nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey).....	58
Figura 13	Contagem de linfócitos totais nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey).....	59
Figura 14	Contagem de plaquetas totais nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey).....	59
Figura 15	Gráfico de mortalidade dos animais submetidos à CLP tratados com TEGA.....	60
Figura 16	Dosagem da concentração sanguínea de IL-1 β nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey).....	61

Figura 17	Dosagem da concentração sanguínea de IL-6 nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey).....	61
Figura 18	Dosagem da concentração sanguínea de IL-10 nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey).....	62
Figura 19	Dosagem da concentração sanguínea de TNF- α nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey).....	62
Figura 20	Dosagem da concentração sanguínea de MCP1 nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey).....	63

Lista de Quadro

Quadro 1	Classificação das leucemias agudas segundo (OMS).....	44
----------	---	----

Resumo

Abadessa R. *Investigação do Potencial Terapêutico dos Receptores Fc de Imunoglobulinas no Câncer e em Sepse* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: O grande polimorfismo presente nos receptores Fc de imunoglobulinas, faz deles um alvo interessante de pesquisa. Sem dúvida alguma, a descoberta de que a bactéria *Escherichia coli* consegue se ligar ao receptor CD16, através de uma proteína denominada WzxE, presente em suas camadas mais superficiais, faz deste receptor um foco terapêutico de extrema relevância. O FcγRIIIA (CD16) é um receptor Fc com motivos de ativação de baseados em tirosina (ITAM) que, de forma clássica, promove a ativação e desencadeamento da resposta inflamatória ao se ligar a imunocomplexos. Porém, foi observado que há também uma ligação direta entre a bactéria *Escherichia coli* e o CD16, induzindo sinalização ITAM inibitória, que bloqueia a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), diminuindo também a fagocitose e, conseqüentemente, a lise bacteriana. Assim, na busca de novas estratégias para o tratamento de doenças complexas, como a Leucemia e a Sepse, o manejo da ativação inibitória (ITAMi), tem um potencial importante.

Metodologia: Camundongos NOD/SCID (inoculados com células U937, modelo leucêmico) e C57Bl/6 (submetidos à ligadura cecal (CLP), modelo de sepse) foram tratados com o peptídeo CYWGGTEGAC. Foram realizadas curvas de mortalidade e análise de diversas citocinas, através da técnica de Milliplex (TNF- α , as interleucinas IL-1 β , -6, -10, -12, MCP-1, IFN γ). **Resultados:** Camundongos submetidos ao modelo de sepse por CLP e que receberam tratamento prévio com o peptídeo TEGA, sobreviveram mais e produziram menores quantidades de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , -6, -10 e MCP-1). Com o modelo de leucemia mielóide aguda, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos experimentais. **Conclusões:** O tratamento de camundongos leucêmicos com o peptídeo TEGA, nas doses e intervalos de tempo avaliados, não modificou os parâmetros investigados. No estudo com modelo experimental de sepse, a mortalidade do grupo que foi imunizado previamente com TEGA se mostrou menor, quando comparada aos controles.

Descritores: Receptores Fc ; Inflamação ;Proteína wzxe; Sepse; Leucemia; Imunidade Inata

Abstract

Abadessa R. Investigation of Therapeutic Potential of Immunoglobulins Fc receptors in Cancer and Sepsis [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Introduction: Fc receptors are an intriguing field of research. Undoubtedly, the experiments that describe how a *Escherichia coli* peptide, called WzxE, is able to bind to CD16 in an opsonin-independent manner to evade innate immunity, is an exciting avenue in the search of new treatments for septic shock and other complex diseases. FCγRIIIA (CD16) is a Fc receptor with tyrosine-based immunoreceptor activation motifs (ITAM), which classically promote activation of the inflammatory response. It was, however, observed that *Escherichia coli* can bind directly to CD16, inducing an inhibitory ITAM signaling, which blocks the production of reactive oxygen species (ROS), inhibits phagocytosis and prolongs bacterial survival in the bloodstream. The objective of our study is to investigate the potential role of this pathway as a novel therapeutic avenue for Cancer and Infection. **Methodology:** NOD/SCID mice (inoculated with U937 cells, leukemic model) and C57Bl/6 (submitted to cecal ligation (CLP), sepsis model) were treated with CYWGGTEGAC peptide. Mortality curves and the measurement of several cytokines were performed through Milliplex (TNF- α , the interleukins IL-1 β , -6, -10, -12, MCP-1, IFN γ). **Results:** Mice subjected to TEGA intraperitoneal injections followed by cecal ligation and puncture, exhibited lower mortality and produced lower amounts of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , -6, -10 and MCP-1), than mice that did not receive TEGA immunization. Using the acute myeloid leukemia model, no statistical differences were observed among the study groups. **Conclusions:** Using an experimental model of sepsis, our results pointed out a lower mortality in the TEGA group, when compared to the control group, along with decreased levels of several proinflammatory cytokines. No differences were detected using the leukemia animal model.

Descriptors: Fc Receptors; Inflammation; WzxE protein; Sepsis; Leukemia; Innate immunity.

1 Introdução

A evolução propiciou, para as imunoglobulinas, a criação de um laço na imunidade adaptativa específica do antígeno e o sistema imunológico inato dirigido por padrão molecular. Essas moléculas contêm uma região variável específica do antígeno produzida pelo rearranjo gênico nas células B. A parte variável permite a ligação específica a antígenos além dos padrões comuns reconhecidos pelo sistema imunológico inato. Após a ligação do anticorpo ao antígeno através de regiões variáveis, o padrão denominado constante das imunoglobulinas dito como parte Fc, pode ser identificado por outras células do sistema imune e, desta forma, facilitar a resposta imune. (1, 2)

Os receptores FC (FcRs) encontram-se sob um controle sem precedentes, pois o sistema imune deve acionar uma resposta equilibrada aos agentes invasores, assim como a emissão de sinais que podem desencadear a ativação de um sinal anômalo do sistema imunológico, a exemplo das doenças inflamatórias crônicas e das patologias autoimunes. (3) O exagero de ativação acarreta danos indesejáveis ao tecido do hospedeiro. Por outro lado, a mínima ativação pode ocasionar processos infecciosos.

O complexo de receptores Fc de imunoglobulinas manifesta-se em todas as células hematopoiéticas, assumindo papéis importantes nas respostas imunes mediadas por anticorpos. (4). O estabelecimento de ligações imunes com FcR ativa ligações efetoras, ocasionando a fagocitose, endocitose de partículas opsonizadas de

imunoglobulinas, soltura de mediadores inflamatórios e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). (5, 6)

Sabe-se que os receptores Fc foram descritos para todas as classes de imunoglobulinas: Fc Neonatal, Fc γ R, Fc Ômega R (IgD), Fc Alfa R (IgA) , Fc epsilon (IgE) e FC gama R (IgM). (7, 8) Dos receptores citados anteriormente, os Fc γ R e Fc ϵ R são os mais exaustivamente explorados. Em termos de estrutura, todos os receptores fc conhecidos até o momento pertencem à gigantesca família das imunoglobulinas, a exceção de FcRn e Fc ϵ RII, que são estruturalmente relacionados a Ag (antígenos) de histocompatibilidade principal de classe I e Lectinas do tipo C, nesta ordem. Ressalte-se que Fc γ RI e Fc ϵ RI são receptores que apresentam alta afinidade. (9, 10)

Todos os outros receptores de IgG, como Fc γ RII e Fc γ RIII, são receptores de baixa afinidade com constantes de dissociação na faixa de 10^{-5} a 10^{-7} M. Os receptores de alta afinidade Fc ϵ RI e Fc γ RI são ativados por imunoglobulinas monoméricas. Os receptores de baixa afinidade, Fc γ RII e Fc γ RIII, necessitam de imunocomplexos multivalentes para tornarem-se ativos. Somando-se a variações de afinidade, cada receptor Fc gama possui uma especificidade distinta de subtipo imunoglobulina G , em que se pode citar como exemplo FC gama RIII que liga -se a Imunoglobulina tipo G1 e imunoglobulina G tipo 3 e Imunoglobulina G tipo 4. (11)

Em face dessas considerações, convém destacar que o conhecimento estrutural sobre o reconhecimento de anticorpos pelos receptores Fc é de expressiva importância para a terapêuticas imunológicas mediada por anticorpos.

1.1 Receptores Fc de imunoglobulinas

O sistema imune possui uma missão primordial que é a de reconhecer e destruir os patógenos enquanto minimiza os danos ao hospedeiro. Em mamíferos, essa ação é caracterizada por uma resposta “inata” imediata envolvendo inflamação e ativação do complemento e fagócitos. Isso é seguido por uma resposta específica ao antígeno “adquirida” mediada por linfócitos T e B e caracterizada por memória imunológica que aumenta as respostas futuras ao antígeno. A imunidade humoral ou mediada por anticorpos contribui para as respostas inatas e adaptativas. Os anticorpos são sintetizados por células B diferenciadas terminalmente (células plasmáticas) e são constituídos por uma região variável que liga o antígeno a uma região constante (Fc), que pode ativar componentes do complemento ou ligar-se a células imunes por meio de receptores específicos. Como resultado, anticorpos contribuem para a proteção contra todos os tipos de antígenos e, neste contexto, incluem-se os mais diversos tipos de microrganismos (vírus, bactérias, fungos e parasitas multicelulares). Pessoas acometidas por hipogamaglobulinemia, por exemplo, são mais suscetíveis a infecções, especialmente por organismos G positivos como *Streptococcus*, *Staphylococcus* e protozoários como *Giardia*. (12)

Os efeitos protetores do anticorpo são mediados por mecanismos efetores diretos e indiretos. Os anticorpos podem neutralizar diretamente as toxinas bacterianas (por exemplo, a toxina da difteria) e os vírus ou bloquear diretamente a invasão celular (por exemplo, a invasão dos eritrócitos pelo *Plasmodium falciparum*). (13)

Os efeitos indiretos incluem a opsonização do patógeno, aumentando a absorção de bactérias extracelulares pelos fagócitos, a ativação do complemento, e a

indução de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), fornecendo proteção contra organismos intracelulares e multicelulares. As funções efetoras indiretas de um anticorpo requerem engajamento com receptores Fc de superfície celular que são expressos por células imunes e são específicos para o isotipo do anticorpo. Destaque-se, a título de exemplificação, que os receptores Fc γ (Fc γ Rs) ligam-se a IgG e os receptores Fc ϵ , por sua vez, ligam-se a IgE etc. Durante o curso de uma resposta humoral, um receptor de células B virgens (BCR) sofre uma série de alterações, incluindo o tipo de cadeia pesada utilizada (classe trocando de IgM para outros isotipos, frequentemente IgG) e a afinidade da região variável pelo antígeno, via hipermutação somática. Assim, os anticorpos IgG são geralmente efetores humorais potentes, uma vez que dizem respeito a um aspecto característico de uma resposta de memória e constituem a maioria dos anticorpos circulantes. A importância da IgG reflete-se no fato de que a família de receptores Fc necessários para seu reconhecimento por células imunes (Fc γ Rs) desempenham um papel crítico na defesa contra uma série de infecções. Os Fc γ Rs podem ser ativadores ou inibidores. (2)

A ativação da reticulação de Fc γ R pelo patógeno opsonizado com anticorpo resulta na eliminação do patógeno pelos mecanismos efetores descritos anteriormente. Este sistema de relevância expressiva acarreta a liberação de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores imunológicos potencialmente prejudiciais e requer uma regulação rígida, uma função crítica do Fc γ R inibitório, Fc γ RIIB. Portanto, não é surpreendente que, em humanos, a variação genética nos Fc γ Rs ativadores e inibitórios que alteram a expressão ou função tenha sido associada à suscetibilidade, à infecção e à autoimunidade. (14)

Receptores (Fc) de imunoglobulinas são amplamente expressos em todo o sistema imunológico. Com o entrelaçamento da região Fc do anticorpo, tem-se, então, um elo entre a particularidade do sistema imune denominado adaptativo e as vigorosas funções efetoras desencadeadas por células efetoras do sistema imune inato, decorrente da co-expressão de FcRs Ativadores e Inibidores por complexos imunes. Somando-se ao seu envolvimento na fase eferente de uma resposta imune, eles também são importantes para modular respostas imunes adaptativas, regulando a ativação de células B e células dendríticas (DC). A retirada do FcR inibitório tem, como consequência, a perda de tolerância no sistema imune humoral e o desencadeamento de doenças autoimune. O recrutamento de imunocomplexos por receptores Fc em células dendríticas juntamente com o desencadeamento de vias de sinalização ativadoras definiram o poder de expressão de células T iniciadas. O término desta sinalização balanceada, desencadeia uma resposta descontrolada que pode levar a dano de tecidos até então saudáveis e, conseqüentemente, ao início de processo oncogênico. A disparidade entre os receptores ativadores e inibidores em diferentes células do sistema imune inato fundem a atividade celular. Associado a isso, busca centrar-se em fatores externos que podem influenciar no balanço de FcRs ativadores e inibitórios, como o meio de citocinas e o papel da glicosilação diferencial de anticorpos. (15)

A relação antígeno – anticorpo acontece quando os receptores Fc ligam-se à porção FC das imunoglobulinas que se encontram na parte mais externa da célula (superfície dos macrófagos, por exemplo). Os receptores Fc foram estudados como sendo um grupo díspar de glicoproteínas encontrado na camada superficial celular (leucócitos) e, em seguida, foram identificados nas demais células, a exemplo das endoteliais e sob forma solúvel em fluidos. (16, 17) Os FcRs incumbem-se de unir dois

importantes compartimentos (humoral e celular), o que acontece justamente quando a imunoglobulina se liga ao FcR e gera uma resposta inibitória ou ativatória na célula na qual está expressa, a exemplo das células NK, macrófagos, monócitos, células dendríticas. Registre-se que a localização e o tipo de receptor são circunstâncias importantes para a geração de resposta inibitória ou de ativação, assim, gerando importantes funções como a degranulação celular, citotoxicidade celular, ADCC e expressão gênica e proteica de citocinas ou quimiocinas. (4)

Os anticorpos são compostos por cadeias leves e pesadas, sendo as leves – κ e λ - e as pesadas - μ , α , δ , ϵ , ou γ , de modo que seu isótipo é (determinante antigênico) definido pela cadeia pesada. Por isso, são classicamente descritos como receptores Fc das imunoglobulinas e nomeados IgG, -A, -E, -D e -M, conforme a especificidade de ligação, pelos isótipos das Ig. De acordo com o modelo evolutivo, os componentes iniciais foram os receptores do tipo poli-Ig (PIGRs), os quais são similares aos FcRs clássicos nos mamíferos, intitulados FcRL (Fc Receptor Like) e cadeia FcR γ . Surgiram, inicialmente, no grupo de peixes ósseos (osteíctes), e, tardiamente, os receptores de IgA desenvolveram-se em mamíferos placentários. (18)

No bojo do grupo dos FcRs, os mais sobejamente estudados são os ligantes a IgG, conhecidos como Fc γ R. Nos humanos, as classes I (CD64), II (CD32) e III (CD16) podem ser encontradas de modo que o Fc γ RII e o Fc γ RIII são identificados, de forma respectiva, sob três (A, B e C) e duas (A e B) isoformas. Estes Fc γ R são largamente manifestos, em diferentes intensidades, em células sanguíneas, porém podem também ser expressos em células não usuais como as do endotélio. Tais receptores diferem em seu grau de ligação (afinidade) quanto à junção com IgG: O Fc γ RI possui três domínios extracelulares, de outro modo, o Fc γ RII e Fc γ RIII conectam-se com menor afinidade. Em termos de domínios, tem-se

maior afinidade por Fc γ RI devido a sua apresentação de três domínios extracelulares, enquanto os Fc γ RII e Fc γ RIII exibem apenas dois (Figura 1). (19)

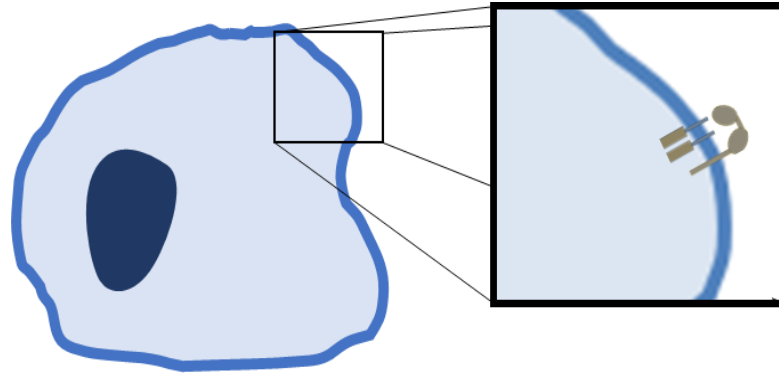


Figura 1 - Receptores Fc na membrana celular. Fonte: Adaptado de DiLillo e Ravetch. (20)

Aos poucos, novos receptores até então definidos como “não clássicos” são relatados, a exemplo dos receptores FcRn e os FcR tipo II. (21) A associação aos receptores clássicos, de tipo I, apresenta importantes funções na regulação da imunidade inata e adaptativa. (22)

Um outro ponto importante diz respeito à classificação dos receptores Fc baseada na sua capacidade de inibir ou estimular os mecanismos imunes. Estes motivos (ITAM ou ITIM) são encontrados em diversos receptores ou proteínas adaptadoras. Os motivos de ativação adequam-se como posição de ancoragem para domínios SH2 da família das enzimas quinase SyK, já os ITIMs, quando fosforilados, recrutam as enzimas tirosina fosfatases. Sinalizações por meio de ITAM comumente emitem sinais celulares de ativação, enquanto ligações a receptores ITIM geram uma resposta inibitória. Recentemente, exceções foram descritas, a exemplo da

sinalização inibitória induzida por ITAM, denominada então de ITAMi (ITAM inibitório). (23, 24) Essa sinalização ITAMi também foi descrita em CD16 (FcγRIIIA). (24, 25)

1.2 Estruturas dos Receptores Fcγ

Atualmente, sabe-se que existem três classes de receptores existentes em seres humanos, a saber: FcγRI, FcγRII e FcγRIII. Estes receptores são caracterizados como glicoproteínas de membranas do tipo 1 com a presença de uma subunidade alfa de ligação, consistindo em dois ou três domínios semelhantes à imunoglobulina do tipo C2. Os receptores Fc gama demonstram um elevado grau de identidade de sequência em sua porção extracelular (em torno de 50-96 %), porém exibem discrepâncias nos domínios citoplasmáticos. Outros (FcγRI e FcγRIIIA) requerem a associação da cadeia γ comum do receptor Fc contendo ITAM, ou da cadeia ζ do receptor de células T para sinalização. (19) Os receptores Fcγ ativadores e inibitórios são coexpressos em macrófagos, monócitos, neutrófilos e eosonófilos. Ao contrário de outros receptores, o FC gama RIIIB é expresso exclusivamente em neutrófilos. Este não contém nenhum componente de sinalização e está ancorado à membrana plasmática por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol. Acredita-se que FC gama RIIIB atue em acordo com outros receptores como, por exemplo, o Fc gama RIIA e utiliza-se de seu aparato de sinalização para realizar a transdução de sinal e ativação celular. (26–28)

Convém destacar que um modelo solúvel de FcγRIIIB foi relatado para ativar vias inflamatórias dependentes de receptor de complemento CR3. As afinidades de ligação de IgG variam consideravelmente entre os receptores Fcγ. (11, 29, 30)

Em resumo, o FcγRI humano liga-se a IgG1, a IgG3 e a IgG4 com afinidades semelhantes entre 10 e 100 nM. FcγRIIA exibe afinidades intermediárias de ligação de IgG entre 10^{-7} e 10^{-6} M. FcγRIIB e FcγRIII são receptores de IgG de baixa afinidade que, geralmente, atua em torno de 10^{-6} M. No entanto, essas afinidades também variam dependendo do alotipo de FcγR. Além disso, os FcγRs também discriminam uma subclasse individual de IgGs. Em geral, IgG1 e IgG3 apresentam afinidades semelhantes para cada isoforma de FcγR, enquanto IgG2 tem a menor afinidade para FcγRs. Essas afinidades diferenciais de ligação ao receptor sugerem que FcγRI, em leucócitos circulantes, seja provavelmente pré-ocupado por IgGs anticorpos das subclasses IgG1 e IgG3, uma vez que desencadeiam melhores respostas das células efetoras, bem como a ativação de receptores Fcγ, especialmente FcγRII e FcγRIII, que requer a formação de imunocomplexos. (4, 31, 32)

1.3 Respostas Biológicas Induzidas por Anticorpos Dependem da Distribuição Tecidual de FcRs

A forma estrutural existente na membrana celular dependerá, fundamentalmente, da disponibilidade de FcRs para os complexos imunes, isto é, depende da conformação dos FcRs nos tecidos. As células do sistema hematopoético expressarão uma combinação de FcRs específicos do tipo de célula. Os receptores FC expressos, de forma eminente, desenvolve-se por todas as células de linhagem mielóide. Existem alguns receptores que são expressos em células linfóides, como células do tipo B e células Natural Killer. Certas células não

hematopoiéticas expressam, a exemplo das células endoteliais e algumas tumorais, células dendríticas, hepatócitos e células epiteliais também expressam FcRs.

Os FcRs ativados são expressos por células mieloides e linfócitos deficientes em receptores de antígenos clássicos, ou seja, células NK (3) e células c/dT no epitélio intestinal. (33, 34) Neste cenário, os linfócitos não expressam diferentes antígenos e os FcRs ativados não prejudicam a ativação dessas células estimuladas por receptores de antígeno expressos na expansão clonal. Porém, foi possível encontrar, na literatura, que um subconjunto de células TCD8 de origem murina apresentou baixo nível de FcγRIIIA, assim incentivaram a ADCC de forma efetiva. (35)

1.4 Ativando FcRs

A característica que define um FcR ativador é a presença de um motivo de ativação baseado em tirosina de imunorreceptor (ITAM) em seu domínio intracitoplasmático. (36) A maioria das subunidades relacionadas a imunorreceptores contém esse motivo de transdução ITAM, incluindo ao TCR, cadeias Iga e Igb associadas a BCR, DAP12 e a várias moléculas transmembranares codificadas por vírus. No caso do FcRIIA humano, este motivo de sinalização também foi diretamente transportado por FcR a cadeia ou a moléculas adaptadoras transmembrana (cadeias c ou b). A reticulação de FcRs ativadores por um complexo imune inicia uma via de sinalização semelhante àquela observada com o TCR ou BCR, e começa pela ativação/desfosforilação das proteínas quinases da família Src. Estes fosforilam ambos os resíduos de tirosina do ITAM, que é o local de ancoragem para os domínios também SH2 das quinases da família Syk. Acredita-se que a fosforilação da Syk quinase seja central para a transdução do sinal FcR e leva ao recrutamento e

fosforilação de várias moléculas de sinalização, como fosfatidilinositida 3-quinases (PI3K). A produção de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) permite o recrutamento de homologia de pleckstrina e de Moléculas contendo domínio (PH), como a tirosina quinase de Bruton (Btk) e PLCc. (2, 37, 38).

1.5 FcRs inibitórios

Os receptores Fc fornecem elementos para que as células possam modular as respostas imunes, especialmente de ativação e inibição quando os receptores reconhecem ligantes análogos. Os receptores inibitórios fornecem um ótimo exemplo de como as células podem modular os sinais de ativação enquanto desencadeiam os sinais inibitórios que definem o limite para a ativação celular.

Os receptores inibitórios contêm um motivo de inibição baseado em tirosina de imunorreceptor (ITIM) em seus domínios citoplasmáticos. (39) O primeiro receptor Fc de IgG descoberto e único conhecido com este motivo inibitório é o FcγRIIB. Diga-se de passagem, que o receptor em questão é extremamente conservado entre camundongos e humanos e tem sido alvo de muitos estudos como um receptor Motivo de inibição baseado em Tirosina –ITIM. FcγRIIB é extensivamente expresso em leucócitos, exceto as células NK e T. (37–41). Este Fc e muito bem abordado em células tipo B e sua forma de emitir sinais pode ultrapassar e chegar até outros leucócitos que contenham receptor ITIM.

O envolvimento simultâneo de BCR e FcγRIIB resulta na fosforilação do resíduo de tirosina da sequência ITIM pelas proteínas tirosina quinases (PTKs) da família Src. Com efeito, isso leva ao recrutamento do SHIP de inositol 5-fosfatase contendo domínio SH2. A Sh2 possui a função de realizar a conversão do PI3K PIP3

em PIP2. Tanto Btk quanto PLCc não são mais recrutados a nível de membrana plasmática, impossibilitando, assim, a sinalização mediada por BCR. (42). Choquet *et al.* (1994) (43) preconizaram e descreveram que a co-reticulação de Igs de membrana e FcγRIIB com anticorpos anti-Ig desencadearam o efluxo transitório de Ca²⁺ dos estoques intracelulares, e, como efeito, não ocasionou o influxo de Ca²⁺ para as células B. Desta forma, tornou-se ainda mais decifrável o mecanismo do papel da quinases (Btk/Tec) na regulação da homeostase através do influxo de cálcio (Ca²⁺). Como Btk desempenha um papel fundamental na transdução de sinal em células B, a co-reticulação do BCR e FcγRIIB foi mostrada para anular a mobilização de Ca²⁺ intracelular dependente de Btk. (44)

A regulação do equilíbrio imunológico tem, em um de seus alicerces, o sinal inibitório produzido pelo receptor Fc, a exemplo de do receptor FcγRIIB. Um sinal inibitório reduzido, por exemplo, ou até mesmo ausente nas células B contribui para diminuir a “fronteira” de ativação celular e, conseqüentemente, induz a ativação mais potente das células B após reticulação BCR e acelera, desta forma, o início da doença autoimune. (2, 37–40).

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é um exemplo em que estudos realizados em humanos e animais estabeleceram forte correlação entre FcγRIIB inibitório e a suscetibilidade a doença. (45–47) Curiosamente, as células B do LES exibem uma maior elevação de Ca²⁺ mediada por BCR do que as células B de indivíduos normais ou pacientes com outras doenças reumáticas autoimunes sistêmicas. (48, 49) Porém, um importante adendo diz respeito ao fato de que o aumento dos estoques intracelulares em pacientes com LES não está relacionado a um aumento da mobilização de Ca²⁺ dos estoques intracelulares em pacientes com

LES não necessariamente ligado ao acréscimo substancial na produção de IP3 (inositol trifosfato).

O mecanismo molecular que explica o aumento da mobilização de Ca^{2+} em linfócitos de pacientes com LES permanece obscuro, e pode-se apenas especular que há uma regulação positiva ou ganho de função de STIM1 e/ou ORAI1 nesses linfócitos.(50). O FcγRIIB também apresenta a importante atribuição do desenvolvimento de linfócitos B, sendo eficaz no controle tardio da imunidade humoral. (37) . A agregação independente de BCR (homo-oligomerização) de FcγRIIB pode induzir a apoptose de células B. (51). Em células B de aves, como exemplo a galinha, que expressam o FcγRIIB de camundongo, a agregação de receptores inibitórios independente de BCR induz a ativação de caspases 3 e 9 e está associada à liberação mitocondrial de citocromo c, levando à apoptose. (52) No momento da apoptose, o citocromo C (liberado das mitocôndrias) liga-se aos receptores IP3 e interrompe o equilíbrio de Ca^{2+} , amplificando a morte celular programada por FcγRIIB. De fato, a regulação da homeostase do Ca^{2+} está intimamente relacionada à sinalização pró-apoptótica, e o controle da mobilização de Ca^{2+} por STIM1 está diretamente envolvido no destino das células B. (53, 54)

1.6 FcRs de alta e baixa afinidade

Na literatura, há relatos de que os receptores Fc de alta afinidade podem se ligar, na ausência de antígeno, às imunoglobulinas monoméricas, mas não se ligam na forma de complexos imunes. Com isso, pode ocupar parte do receptor Fc de alta afinidade *in vivo*. Porém, os anticorpos podem ser isolados de FcRs de alta afinidade, Ca^{2+} pelo STIM1 estar diretamente envolvido no destino das células B. (53, 54). Este

mecanismo torna o receptor disponível para se juntar a outros anticorpos. Desta forma, a disponibilidade de FcRs de alta afinidade determina sua disponibilidade para outros anticorpos presentes no microambiente. Como exemplo, pode-se citar a imunoglobulina G2 de alta afinidade pelo FcγRIV. Além disso, este receptor também atua com a mesma finalidade para Imunoglobulinas do tipo E, porém, exibindo baixa afinidade. De fato, espera-se que o FcγRIV seja saturado com Imunoglobulina G2 *in vivo* e, portanto, não esteja disponível para IgE. (55) No entanto, o FcεRI possui alta e constante afinidade e dissociação baixa para IgE, tendo expressão primordialmente de origem humana e murina. (56) Com isso, a imunoglobulina IgE permanece ligada ao FcεRI por longos períodos, apesar de sua concentração plasmática extremamente baixa.

A ligação de FcRs de baixa afinidade é muito reduzida para permitir que eles se liguem a anticorpos monoméricos. No entanto, os receptores FC podem atrelar-se aos anticorpos como complexos imunes com múltipla valência de alta afinidade. (29) Desta forma, quando não há a presença do antígeno, os receptores Fc de baixa afinidade mantêm-se livres mesmo com altas concentrações circulantes, a exemplo das imunoglobulinas. Assim, ainda que estejam próximos o suficiente, os receptores Fc podem ser usados para atuarem em complexos imunes.

Neste sentido, os complexos imunes ligam as células que expressam receptor Fc porque os anticorpos estão concentrados em antígenos multivalente de complexos imunes e muitos dos anticorpos podem ligar-se a vários receptores Fc de maneira simultânea na mesma superfície celular. Assim que se estabelece a ligação a um receptor Fc, os complexos imunes permanecem nas células que expressam o FcR de baixa afinidade, pois os anticorpos isolados de um único FcR são rapidamente substituídos por outros anticorpos presentes no complexo. A dissociação dos

anticorpos dos FcRs mantém-se ligada aos antígenos, sendo, também, capazes de associarem-se a diferentes receptores Fc com os quais antes não se envolveram. As interações de complexos imunes com FcRs de baixa afinidade são, conseqüentemente, ao mesmo tempo transitórias, estáveis e extremamente dinâmicas.

1.7 A densidade de FcRs nas membranas celulares

A Modulação da avidéz/afinidade de ligação com a qual os anticorpos se ligam aos FcRs, indicam complexos imunes que definem a avidéz da ligação aos FcRs de baixa afinidade, a depender de sua concentração e composição. A partir do momento em que há interação entre os receptores Fc com os complexos imunes, dois importantes fatores (concentração e composição) determinam a força com estes se ligam aos receptores.

A concentração dessas porções é resultado da densidade dos epítomos exibidos na molécula do antígeno e que são reconhecidos pelos anticorpos. Portanto, compreende-se que anticorpos com a mesma especificidade podem, portanto, ligar-se com distintas avidézes aos mesmos FcRs quando em um imunocomplexo com antígenos de alta densidade de epítomos específicos e quando em complexo com antígenos que possuem baixa densidade de epítomos semelhantes.

Um ponto interessante a ser destacado e que prende a atenção diz respeito à interação com FcRs de anticorpos contra antígeno de superfície celular. As chances de que as células-alvo possam expressar FcRs raramente são consideradas. Neste sentido, os anticorpos são vistos a partir da ligação a células-alvo através de sua porção Fab e a FcR de suas células efectoras por meio da porção do receptor Fc.

Células- alvo que expressam FcRs permitem a possibilidade de ligação a antígenos alvo mediante a suas porções Fab e a FcRs por meio de sua porção Fc na própria célula (ligação Cis). Quando ocorre a ligação entre antígenos localizados na mesma superfície que os FcRs, há um aumento importante na concentração local de anticorpos, já que eles estão concentrados em planos ao invés de dispersos em volume. A ligação dos receptores Fc são dependentes da densidade de epítopos específicos de ligação presentes na membrana. A ligação Fc-FcR cis demonstrou desencadear a ativação de mastócitos usando aloanticorpos contra antígenos MHC classe I expressos pelas mesmas células. (57, 58) Utilizado de forma extenuada o bloqueio da ativação de células B por meio de anticorpos. (6) Espera-se que ligação Cis aconteça em muitos anticorpos monoclonais utilizados para imunoterapia passiva.

A forma com que as imunoglobulinas se ligam aos receptores Fc depende da glicosilação de sua porção Fc. (59) Desta forma, cada cadeia considerada pesada de Imunoglobulina G1 contém um único N-glicano biantenário ligado, covalentemente, na região altamente resíduo N297 conservado em seu domínio CH2. Modificações de forma pontual deste sítio de glicosilação suprimem a união de IgG aos receptores FcR. Assim, os anticorpos glicosilados, se evidenciarem mutações, não compreendem mais os FcRs e podem apenas ser usados como moléculas de bloqueio (Figura 2). (60)

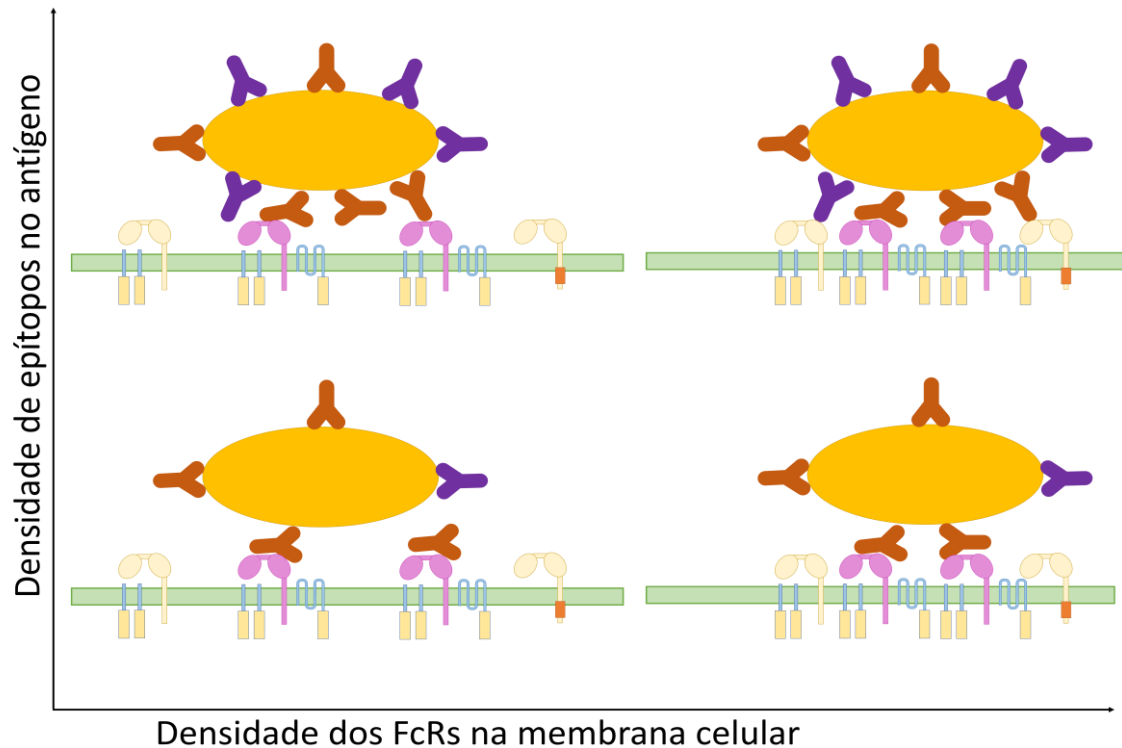


Figura 2 - Demonstração da influência da densidade de epítopos e FcRs nas ligações. Adaptado de: Daeron. (61)

1.8 FcRs como superestruturas

Os receptores Fc são agregados por ligantes plurivalentes. Os FcRs formam heteroagregados e, de forma diferente dos BCRs e TCRs (imunoglobulinas de membrana), são exclusivamente expressos em células B e T, nas quais podem formar homoagregados.

Os mecanismos de resposta imune são policlonais e pluriisotípicos, de modo que os procedimentos de imunização induzem diferentes classes de anticorpos. Com efeito, vários fatores poderão influenciar como: concentração de antígeno, dependendo do adjuvante, dependendo da via de imunização, alguns isotipos de anticorpos que podem ser favorecidos. Contudo, um fator deve ser destacado: o

padrão isotípico geral da resposta não é alterado acentuadamente. Apesar da imunização, estudos demonstram que, em camundongos com protocolos que promovem respostas Th1 predominantes, como a administração de alta concentração de proteínas no adjuvante completo de Freund e consecutivas doses repetidas de antígeno no adjuvante incompleto de Freund, os anticorpos IgG1 persistem como isotipo dominante de anticorpos de modo que níveis detectáveis de anticorpos IgE podem até ser observados no soro. (62) Assim, é possível observar que os imunocomplexos que se formam *in vivo* apresentam anticorpos de diferentes classes e subclasses. Como os FcRs com diferentes especificidades são coexpressos pela maioria das células que expressam FcR, os complexos imunes pluriisotípicos envolvem vários tipos de FcRs nas membranas celulares, haja vista que, em condições fisiológicas, os FcRs geram heteroagregados.

Os heteroagregados de FcR apresentam dependência de sua expressão celular, da concentração local de anticorpos de diversos isotipos, da natureza e concentração do antígeno e, além de que sua composição diversa, possui propriedades sinalizadora distintas. Os FcRs geram sinalização quando agregados, e não se manifestam quando ligados as Igs. (63) Contudo, a agregação ao receptor é modificada para FcRs de alta e baixa afinidade. Os monômeros ligam-se, inicialmente, aos FcRs de alta afinidade agregados e, após, antígenos plurivalentes ligam-se aos receptores. O imunocomplexo (antígeno-anticorpo) é formado primeiramente e pode agregar-se a FcRs de baixa afinidade de forma simultânea. Ressalte-se que a finalidade de forma invariável; agregação do receptor. Os cascata de sinalização dependem de forma principal, porém não exclusiva, de domínios intracelulares dos FcRs ou de suas subunidades.

1.9 FcRs contendo ITAM geram sinais de ativação e inibição

Sabe-se que os receptores FcRs contendo Motivos de Ativação em Tirosina emitem sinais ativatórios. Os receptores FcRs associados a Fc α RI, Fc ϵ RI em neutrófilos humanos, eosinófilos e monócitos, Fc γ RI, Fc γ RIIIA e Fc γ RIV) contém dois motivos de ativação. Os receptores FcRs como Fc ϵ RI e Fc γ RIIIA em mastócitos e basófilos possuem três Motivos de Ativação. O Fc γ RIIA, no entanto, contém dois ITAMs quando diméricos. (64) Ainda é pouco conhecido o porquê da presença de vários ITAMs nos imunorreceptores. A presença de um ITAM é suficiente, uma vez que a agregação de moléculas quiméricas de cadeia simples com o domínio intracitoplasmático ativou as células transfectadas nas quais foram expressas. (65), apesar de as Imunoglobulinas a e b terem desencadeado diferentes sinais de Ca²⁺ em B células. (66)

Posteriormente à agregação do receptor, as enzimas tirosina quinase (família Src) fosforilam os ITAMs. Assim, os sinais de ativação são gerados por sinalossomas intracelulares, gerando, com isso, alteração química intracelular. Os sinalossomas (microorganelas de compartimentalização da sinalização intracelular) acumulam-se em proteínas adaptadoras transmembranares ricas em tirosina que residem constitutivamente em microdomínios de membrana ricos em lipídios. (67) A propagação de sinais acontece, de forma intracelular, através de várias vias metabólicas que levam à transcrição gênica, ativação do metabolismo lipídico e alterações de membrana associadas à excitose.

1.10 Receptores Fc como Imunorreceptores Adaptativos

Receptores Fc apresentando os Motivos de Ativação em Tirosina também podem gerar sinais de inibição. Estes sinais de inibição podem ser gerados a partir da ativação de FcRs que podem ser prontamente ativados ao estimular mastócitos sensibilizados com anticorpos IgG, por exemplo, pela presença de concentrações ascendentes de antígeno específico. Há o aumento da degranulação de mastócitos de forma dose-dependente e, após, a degranulação diminui rapidamente até níveis ínfimos. A interpretação para a inibição exacerbada dos antígenos ocorre devido à capacidade reduzida do antígeno para agregar eficientemente FcεRI. (68) A fosforilação das proteínas existentes no meio intracelular, porém, continua aumentando além da concentração ideal de antígeno. Além disso, a também acentuada inibição de antígeno é desfeita em mastócitos de camundongos deficientes para o domínio SH2 contendo inositol fosfatase SHIP1. (69) Finalmente, os mastócitos de camundongos deficientes em SHIP1 exibem respostas de degranulação aprimoradas a concentrações ótimas e subótimas de antígeno. (70)

O FcγRIII, por exemplo, gera sinais de inibição dependentes de SHIP1 quando agregados de forma subótima ou ótima e quando agregados de forma supra ótima por antígeno. Efeitos similares da deficiência de SHIP1 foram observados com outros FcRs ativadores. (71) FcRs contendo ITAM ocasionam uma combinação de sinais ativadores e inibitórios. (72) Contudo, em condições fisiológicas, sinais de ativação são superiores aos inibitórios.

1.11 Sinalização baseada no ITAM (i).

A sinalização desencadeada (sejam elas ativatórias ou inibitórias) pelo Motivo de Ativação Baseado em Tirosina (ITAM) ou por Motivos de Inibição Baseados em Tirosina (ITIM), quando fosforilados após a ligação multimérica, atua em locais de promoção (ITAM) ou negativamente reguladores (ITIM) ativação de proteínas citoplasmáticas em complexos de sinalização. Porém, recentemente, a descoberta de que inúmeros ITAMs podem produzir sinais inibitórios trouxe ânimo à comunidade científica por revelar novas descobertas envolvendo este mecanismo sobre doenças autoimune ou processos infecciosos graves. Essa descoberta dos ITAM inibitórios, particularmente quando envolvidos por ligantes monovalentes, interrompeu este paradigma conveniente (Figura 3). (73)

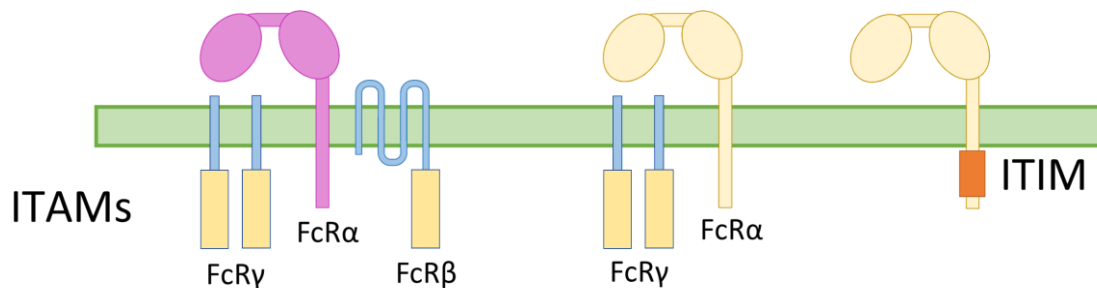


Figura 3 - ITAMs e ITIMs associados aos receptores Fc. Adaptado de: Bournazos, Gupta, Ravetch. (74)

Associado a isso, os receptores que, até então, eram considerados mediadores de sinais inteiramente negativos via ITIM, pôde recentemente demonstrar sinalização para fosforilação da tirosina, um evento até então ligado à ativação celular. (75) Pode-se citar algumas das atribuições para controle de funções celulares, como: apoptose, inibição de crescimento celular, revogação de sinais de ativação e *downregulation*. É

inegável, portanto, que tal constatação alcança expressiva relevância em relação às respostas celulares e ao controle do equilíbrio de sinais antagônicos. O equilíbrio apresenta suma importância na prevenção de danos teciduais causados na imunopatologia e para regressar as células ativadas a um estado de repouso. (76, 77)

A dualidade ITAM foi recentemente definida como ITAM inibitória ou ativatório (ITAM_i ou ITAM_a) que são controlados pelas quinases da família Src. O envolvimento de vários FcRs portadores de ITAM observados durante doenças infecciosas ou autoimunes está associado a variantes alélicas, mudanças na capacidade de ligação do ligante responsável pela perturbação da defesa do hospedeiro. No decorrer de doenças, como as autoimunes, a presença dos autoanticorpos e complexos imunes desencadeiam uma cascata inflamatória através de agregação FcR (Figura 4). (78)

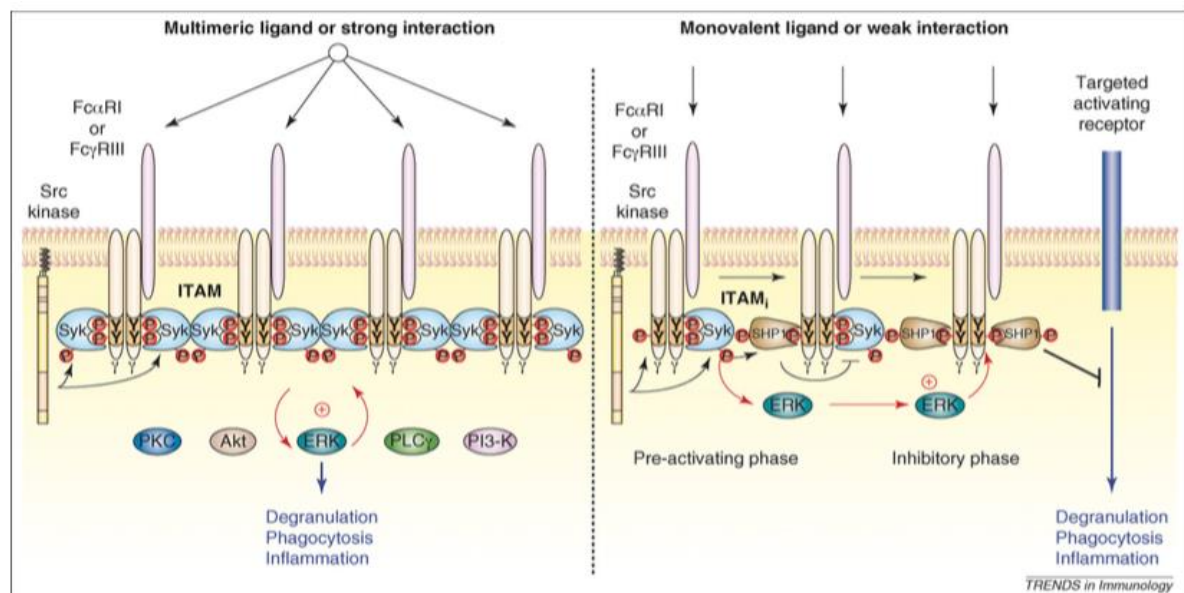


Figura 4 - Modelo proposto da função dual de ativação e inibição de certos receptores Fc contendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptor (ITAM). Corpo de informações sobre a inibição através de adaptadores portadores de ITAM_i. Retirado de: da Silva et al. (27)

Estes receptores são modulados por proteínas da família quinase Lyn e Fyn. Durante a sinalização ITAMi induzida por FcRs, Lyn é crucial no processo de fosforilação (no resíduo de tirosina 536) e na ativação de SHP-1. (79) Sinais positivos e negativos induzidos por receptores de antígenos foram relatados ser resultados de Lyn. (80, 81) Lyn exerce notável atuação na seleção negativa de linfócitos B na medula óssea, uma vez que a privação de Lyn foi associada à redução do número de células B na periferia de estudo experimental com camundongos. Na ausência de Lyn, outros SFKs, como Fyn, atuam como reguladores positivos da sinalização BCR, sugerindo o decréscimo de energia. Os papéis antagônicos de Lyn e Fyn foram recentemente demonstrados *in vivo*, haja vista que a deficiência de Lyn agrava doenças autoinflamatórias, como nefrite e artrite, enquanto a ausência de Fyn protege contra essas doenças. (79) Além disso, a ativação e recrutamento de leucócitos em pacientes com nefrite lúpica foi associada à ativação de Fyn, sugerindo, assim, que o equilíbrio entre Lyn e Fyn é inconstante na manifestação de algumas doenças.

Quando ocorre a sinalização via ITAMi, por exemplo, induzida por FcRs, Lyn mostra-se essencial em promover a fosforilação e ativação de SHP-1. (79) Foi relatado que Lyn está envolvida em sinais favoráveis e desfavoráveis quando induzidos por receptores de antígenos. (80, 81)

1.12 FcγRIIIa (CD16A)

O gene que codifica FcγRIIIa (CD16), ativador do receptor Fc e expresso principalmente em células NK, tem duas variantes polimórficas de polipeptídeos singico-nucleico (SNP), valina (V) ou fenilalanina (F). Os mecanismos imunológicos

mediados pelo receptor Fc contribuem substancialmente para os mecanismos de ação de anticorpos antitumorais. (82, 83)

Pelo motivo da ativação da FcγRIIIa sobre a atividade celular da NK e do ADCC, o interesse pela família FCγRIII tem se mostrado aumentado. Devido as suas propriedades estruturais singulares quando expressas pelas células NK, a FcγRIIIa apresenta associação inicialmente com o dímero da cadeia-c (semelhante ao FcγRI) e, posteriormente, com a cadeia-f, assim demonstrando a necessidade de associação da família desse receptor a uma cadeia acessória. (84)

Os domínios extracelulares das subunidades dos receptores FcγRIIIa e FcγRIIIb se diferem devido à sequência de seis aminoácidos, sendo praticamente homólogos. Dois dos domínios expressos pelo FcγRIIIa são do tipo C2, análogos à imunoglobulina e a FcγRII. Curiosamente, um resíduo-chave na posição 203 gera influências se a FcγRIII se torna um receptor ligado à membrana de passagem única ou associado à membrana através de uma âncora GPI. A FcγRIIIa apresenta diferentes propriedades a depender do leucócito no qual é expresso, como sua múltipla sensibilidade a tripsina. (85) Evidências demonstram que uma das causas para a progressão da esclerose múltipla ocorre pelo FcγRIIIa expresso por células CDT, mediante a ADCC dependente de meios, (86) ainda que a expressão de quaisquer isoformas de FcγR expressa por células T seja largamente estudada.

O entendimento em relação a FcγR surge a partir da ativação de FcγRIIIa por monócitos e células NK. Trata-se de uma proteína formada por 254 aminoácidos, apresentando cinco sítios de glicosilação. Edberg e Kimberly (1997), (87) preconizaram inicialmente a existência de diferentes glicofomas da FcγRIIIa, apresentando diferentes ligantes. (88)

Utilizando as experiências de ligação à lecitina, FcγRIIIa das células NK mostrou exibir N-glicanos do tipo oligomanose, enquanto o mesmo receptor expresso pelos monócitos apresentou oligossacarídeos do tipo complexo. Ademais, a transformação na ligação de IgG agregada apresenta-se como resultado da remoção de oligossacarídeos ricos em manose. (87) Além disso, a remoção de oligossacarídeos ricos em manose de FcγRIIIa resultou numa alteração na ligação de IgG agregada. Edberg e Kimberly (1997) (87) demonstraram que as células NK e monócitos apresentaram distinção na expressão dos seus receptores, sendo que apenas a primeira exibiu capacidade de ligação a IgG monomérica. (89) A FcγRIIIa encontra-se saturada quando presente no microambiente concentrações fisiológicas de IgG, porém pode ser prontamente deslocado por outros ligantes competitivos, como a Mab3G8. Assim, esses resultados sugerem que a diferença na ligação de FcγRIIIa e IgG e da ativação por monócitos e células NK devem-se devido à glicosilação.

Mais recentemente, uma enorme quantidade de informação proteômica e glicômica foram descritas para formas recombinantes de FcγRIIIa e, de um modo importante, a ocupação do receptor de sítios de glicano ligado em N. Dois sítios de FcγRIIIa ligados a N regulam diretamente a ligação de IgG. A mutação genômica apresentou dependência da glicosilação de FcγRIIIa, uma vez que o glicano ligado a N em Asn162 limitou a ligação a IgG1. Além disso, o glicano ligado a N na posição Asn45 apresentou um papel inibitório na ligação de IgG, de modo que a remoção do sítio ligado a N nesta posição melhorou significativa e expressivamente a ligação de IgG1. (88) Assim, foi apontado que, no interior do domínio D1 de FcγRIIIa, o glicano na posição 45 é capaz de gerar a estabilização do domínio D2 e protegê-lo da proteólise intracelular (Figura 5).

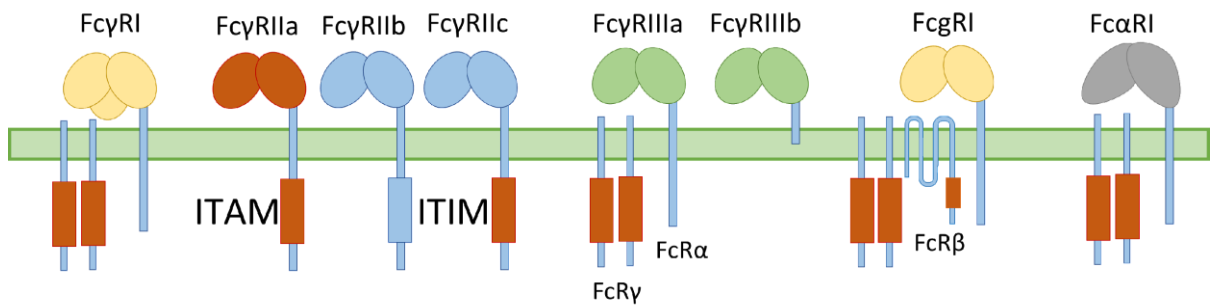


Figura 5 - Receptores Fc γ consistem em múltiplos receptores. Adaptado Bioscience and Biotechnology, 2013

Poucas células expressam apenas um único padrão de FcR. As células B e NK expressam apenas Fc γ RIIB e Fc γ RIIIA, respectivamente, em camundongos e humanos. De outro modo, a expressão de Fc γ RIIC em humanos é estabelecida por um SNP no gene FC γ R2C. (89) Todas as células têm capacidade de expressar receptores IgG e, em humanos, IgA.

Duas descobertas recentes e importantes acerca do CD16 como mecanismo de evasão imune estão ligadas à capacidade da *E. coli* realizar a ligação ao Fc γ RIII de modo independente de opsonina e desvencilhar-se do sistema imune. (90) Posteriormente, o peptídeo ligante de *E. coli* ao CD16 foi caracterizado, sendo capaz de mimetizar IgG1 por meio do mecanismo de phage display. (91)

1.13 CD16 e Sepses

O termo sepsis origina-se do grego sêpsis, eôs, do verbo sêpō, que significa putrefazer. Citado nos poemas de Homero (700 a.C.), foi descrito por Hipócrates como perigoso, odorífero decaimento biológico que poderia ocorrer no organismo. Entende-se sepsis como sendo uma resposta inflamatória exacerbada induzida por invasão de

microrganismos patogênicos, a exemplo da *E. coli*, ou toxinas no organismo, levando a uma alta taxa de mortalidade. (92) A patogênese da sepse é um processo extremamente complexo que envolve respostas pro-inflamatórias a bactérias ou a outros microrganismos.(93)

O conjunto de graves manifestações clínicas decorrentes de uma infecção causada por um microrganismo leva a uma resposta inflamatória sistêmica extremamente grave: a Sepse. (94) Dentre as manifestações clínicas presentes nesta síndrome, temos a febre, o rebaixamento do nível de consciência, a hipotensão caracterizando o choque séptico e, por fim, a falência de múltiplos órgãos (disfunção orgânica). (95) Mesmo com o progresso em termos de novos fármacos, especialmente antibióticos, o gerenciamento de protocolos voltados à ventilação mecânica, as estratégias de ressuscitação e a manutenção da glicose no sangue, a sepse grave continua a ser a principal causa de morte na terapia intensiva unidade (UTI). (96) Mais preocupante ainda diz respeito ao fator econômico envolvido em que se estima que, nos EUA, os gastos possam chegar a 17 bilhões de dólares. Dada a expansão da população idosa com senescência imune, (97) a mortalidade geral por sepse é esperada para crescer a um ritmo alarmante durante as próximas duas décadas. (98)

Apesar dos mais de 100 ensaios clínicos terapêuticos, nenhum tratamento foi aprovado pela FDA para sepse. Ainda que se destaquem importantes avanços na compreensão da fisiopatologia imunológica da sepse, as taxas de mortalidade por esta síndrome tão grave a curto e longo prazo permanecem altas, em torno de 20% a 50 %. Apesar das diversas publicações abordando a sepse e o prejuízo do metabolismo celular, a oxigenação dos tecidos e a disfunção miocárdica, um dos postulados mais aceitos descreve o processo imunológico/inflamatório complexo e ainda mal definido. (99) Historicamente, todos os recursos e pesquisas concentram-

se em melhorar a “super” resposta inflamatória, bloqueando mediadores como TNF alfa e IL-6. (100) Todavia, melhorias constantes nos protocolos de tratamento clínico (101) têm contribuído para um desfecho favorável a longo prazo, uma vez que contribuem para situações como diminuição do processo inflamatório inicial e resposta anti-inflamatória concomitante, porém não conseguem evitar os vários estados de disfunção imunológica prolongada, supressão imunológica, (102) inflamação persistente e catabolismo, (103) caracterizados por infecções nosocomiais, paralisia imunológica e eventos prolongados que levam à morte. (104)

Apesar das melhorias recentes nas taxas de mortalidade por sepse em 30 dias, vários relatórios confirmam um aumento dramático e preocupante da mortalidade associada à sepse que aumenta com o tempo e afeta particularmente a população idosa. (104, 105)

A sepse possui uma distribuição bifásica, caracterizada por um pico inicial culminando em insuficiência cardíaca e pulmonar, e em um pico tardio (ocorre após várias semanas) caracterizado como lesão de órgão persistente. Considerando a tendência recente no aumento da mortalidade a longo prazo, uma distribuição trimodal é mais indicativa da distribuição atual de óbitos. O que se objetiva explicitar é que, apesar da sobrevivência ocorrer na fase aguda da sepse, observa-se um aumento da mortalidade após 60 a 90 dias e continua a subir ao longo do tempo. (104, 106)

Essas mortes são, provavelmente, consequência de cuidados de UTI mais sofisticados que mantêm idosos e indivíduos portadores de comorbidades prolongando a vida, apesar das aberrações imunes, fisiológicas e bioquímicas em curso. (107) . Ainda que as causas de mortalidade por sepse a longo prazo ainda sejam incertas, vários relatórios sugerem que idade avançada, comorbidades e

persistência de lesões orgânicas geram um estado deletério de doença caracterizada por disfunção imunológica, supressão imunológica e catabolismo e inflamação persistentes. (102, 103, 108) Além disso, inflamação persistente, imobilidade crônica, catabolismo em decorrência do uso de drogas e paralisia prolongada, contribuem para um estado prolongado de desregulação imunológica e deterioração crônica. Assim, as pesquisas que visam reorientar o manejo dos pacientes com desarranjos imunes inatos e adaptativos que facilitam a recuperação funcional e sobrevida da sepse, principalmente em longo prazo, (109, 110) ganharam considerável atenção por destacarem várias condições patológicas, especialmente infecções como a sepse. (111)

Além disso, mudanças fenotípicas no sistema imunológico ligadas à expressão da molécula de CD16 (FcγRIII, receptor de baixa de IgG variável), a CD14 e a receptores semelhantes a toll também são observados monócitos infiltrantes. Em particular, os CD16 monócitos estão associados ao aumento da gravidade da doença e mau prognóstico, e muitos estudos anteriores demonstram serem eles essenciais à produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias ao interagir com *Escherichia coli* durante a sepse. (90) Demonstrou-se em estudos que a ativação do CD16, está funcionalmente acessível à fisiopatologia da sepse. Estudos anteriores mostraram que o CD16 pode prejudicar a fagocitose de monócitos e aumentar a expressão e produção de TNF, levando ao mau prognóstico. (27, 112)

Frequentemente trabalhando em sinergia com o sistema do complemento, a depuração mediada por FcγR de antígenos revestidos de anticorpos e a liberação de citocinas inflamatórias desencadeada por FcR são mecanismos importantes na eliminação de agentes infecciosos. (113)

A sepse é uma síndrome que abrange um conjunto de respostas fisiológicas a um agente infeccioso mediadas pelo sistema imunológico. Dentre os fatores contribuintes à evolução clínica de forma desfavorável, estão: o tipo e o perfil de resistência do organismo infeccioso, o local e o tamanho do irritante infeccioso das propriedades genéticas adquiridas ou determinantes do sistema imunológico do hospedeiro. A resposta imune inata provoca uma série complexa de respostas celulares e humorais, cada uma com etapas de amplificação. (114) Citocinas pró-inflamatórias, a exemplo do fator de necrose tumoral (TNF) do tipo alfa e as interleucinas -1 e -6 são liberadas e, por sua vez, atuam no recrutamento leucocitário. Durante a sepse, as citocinas são em grande parte de caráter pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), enquanto outras, produzidas de forma concomitante ou subsequentemente, são principalmente anti-inflamatórias (IL-10). Em resumo, a grande maioria das citocinas tem efeitos múltiplos e intrínsecos e medeiam a defesa imunológica, mas também determinam as manifestações patológicas. Nesse processo, muitos outros mediadores intervêm: sistemas de coagulação ou complemento, sistema de contato, produtos de degradação da membrana fosfolipídica, metabólitos do ácido araquidônico, radicais livres e óxido nítrico (NO). (115)

As espécies reativas de oxigênio, por exemplo, são responsáveis pela vasodilatação e pelo aumento da permeabilidade capilar, e têm sido associadas à disfunção mitocondrial induzida por sepse. (114) Não há dúvidas quanto ao papel de destaque que o endotélio vascular exerce na em relação à defesa do organismo contra o microrganismo vascular, mas não somente a isso, mas também no desenvolvimento da sepse. O endotélio ativado não apenas permite a adesão e migração de células imunológicas estimuladas, mas torna-se poroso a moléculas grandes como proteínas, causando o edema no tecido. As mudanças do sistema de coagulação incluem, por

exemplo, aumento dos fatores de coagulação (elementos pró-coagulantes), como inibidor do ativador do plasminogênio tipo I, o fator tecidual e níveis reduzidos de anticoagulantes naturais circulantes, incluindo antitrombina III e proteína C ativada (PCA), que também apresenta funções moduladoras e anti-inflamatórias. (114)

Desse modo, com a vasodilatação (redução da resistência vascular sistêmica) e o aumento da permeabilidade capilar (levando extravasamento do plasma) a sepse provoca reduções relativas e até mesmo absolutas do volume circulatório. Inúmeros fatores podem contribuir em produzir disfunções em múltiplos órgãos. Hipovolemias relativa e absoluta são causadas pela redução da contratilidade ventricular esquerda e produzem hipotensão. Em um primeiro momento, pelo aumento da frequência cardíaca, o débito cardíaco eleva-se para compensar e manter a tão importante perfusão capilar periférica. Ressalte-se que o oxigênio precisa percorrer uma distância maior para alcançar as células-alvo. Há uma redução do diâmetro capilar devido ao edema mural e o estado pró-coagulante causa a formação de microtrombos capilares.

Existem inúmeros outros fatores contribuintes como fluxo sanguíneo desordenado nos leitos capilares, resultante da combinação do desvio de sangue por canais colaterais e do aumento da viscosidade sanguínea secundária à perda da flexibilidade dos eritrócitos. (114) O resultado desses eventos no organismo causa aos órgãos a possibilidade de se tornarem hipóxicos, mesmo que o fluxo sanguíneo macroscópico possa aumentar. Esse desequilíbrio pode ocasionar a acidose láctica, a disfunção celular e a insuficiência de múltiplos órgãos. (114) Há redução da energia celular conforme a atividade metabólica excede a produção de ATP (adenosina trifosfato). Entretanto, a morte celular parece ser incomum na sepse, sugerindo que as células gerem uma resposta de autoproteção como parte da resposta sistêmica.

A definição do terceiro consenso internacional de sepse publicada em 2016 redefine-a como disfunção orgânica com risco de vida causada por uma desregulação da resposta do hospedeiro à infecção. De acordo com as definições do consenso de 2016, um aumento no escore de determinação da falência orgânica relacionada à sepse (SOFA) de 2 ou mais constitui disfunção orgânica e têm probabilidade de apresentar desfechos desfavoráveis típicos de sepse: estado mental alterado, pressão arterial sistólica ≤ 100 mmHg, frequência respiratória ≥ 22 respirações/minuto. (115)

Em 2021, houve uma atualização do documento Intitulado: "*Surviving sepsis Campaign: International guidelines for management of sepsis and shock septic*" com o objetivo de orientar médicos na condução da sepse ou do choque séptico, dada a gravidade do problema no âmbito mundial. (116)

As variáveis utilizadas pelo escore qSOFA utiliza-se de três elementos importantes para prever morte e permanência prolongada em UTI com pacientes diagnosticados com sepse ou suspeita, são eles: neurológico, um escore de coma de Glasgow < 15 , pulmonar com frequência respiratória ≥ 22 respirações/min e o cardiovascular com pressão arterial sistólica ≤ 100 mmHg. Se duas, destas três variáveis, apresentarem-se de forma concomitante, o paciente é considerado escore positivo em relação ao qSOFA. Contudo, a análise de dados usada para apoiar as recomendações da 3ª Conferência Internacional de Consenso sobre as Definições de Sepse identificou o qSOFA como um preditor de desfecho ruim em pacientes com infecção conhecida ou suspeita, mas nenhuma análise foi realizada para apoiar seu uso como ferramenta de triagem. (116) Volta-se a enfatizar que, apesar de todos os avanços em termos de estudos da fisiopatologia da sepse e estratégias terapêuticas, nenhum agente farmacológico específico, porém, foi aprovado até o momento para o tratamento da sepse. (117, 118)

O tratamento da sepse, incluindo terapias com antibióticos, controle do ventilador, manutenção da glicose no sangue e estratégias de ressuscitação, progrediu rapidamente, (119, 120) particularmente as terapias de suporte recomendadas pela *Surviving Sepsis Campaign*. (121) A inexistência de terapia específica contra a sepse gera preocupação mundial, tendo em vista o aumento significativo na incidência de sepse com aproximadamente 31,5 milhões de casos de sepse, 19,4 milhões de sepse grave e 5,3 milhões de mortes relatadas anualmente. (122) Sepse com conseqüente disfunção de múltiplos órgãos continua a ser a principal causa de mortalidade em pacientes hospitalizados e, além disso, vislumbra-se o aumento a uma taxa alarmante nas próximas duas décadas. (123) Em face a estas considerações, torna-se ainda mais preocupante o aumento da taxa de mortalidade em unidade de terapia intensiva associada à sepse, causa mais comum de morte em pacientes em UTI, sendo a sepse grave responsável por mais de 50% da mortalidade No locus referido. (124) Como dito anteriormente, não é somente a fase aguda da sepse que preocupa, mas a fase tardia, pois pacientes com sepse também ficam hospitalizados por mais tempo e têm risco oito vezes maior de morte durante a hospitalização do que outros pacientes internados. (125)

Neste contexto, os estudos precisam e devem continuar especialmente em âmbito experimental para que novas terapias surjam. O habitual modelo experimental de sepse consiste na ligadura e punção cecal (CLP) em roedores, descrita como o “padrão ouro” para seu estudo e mimetização clínica. (126) Sendo a resposta variante de “moderada” a “intensa”, a depender da padronização do número de perfurações cecais, do calibre da agulha usada e da quantidade de ceco ligado. (126) Após executado o modelo de CLP, é mediada a resposta inflamatória exacerbada inicial da sepse. Sua execução promove a incapacidade de regular e confinar a resposta

inflamatória, cujos resultados levam ao desenvolvimento de choque séptico, falência multiorgânica (MOF) e letalidade.

1.14 Pontuação de gravidade SOFA

O escore SOFA foi elaborado originalmente por meio de um estudo corte de dados coletados de 1449 pacientes internados em 40 UTIs, em 16 países ao todo, e tem, por objetivo, gerar uma sequência de avaliação da disfunção orgânica causada em pacientes acometidos pela sepse. (127)

Desde então, tem sido empregada na prevenção da mortalidade de pacientes com falências de órgãos por causas multifatoriais, sendo frequente disfunção em enfermos em estado crítico. Dentre as causas estão insuficiência hepática crônica, câncer, pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas, entre outros. (128, 129)

O modelo utilizado atualmente tem sido discutido em razão da resposta imune à sepse. (97, 130) Essa resolução foi reconhecida como uma fase hiperinflamatória capaz de evoluir ao longo dos dias para uma durável fase imunossupressora. (131, 132) Contudo, estudos recentes demonstram que as respostas pró-inflamatória e anti-inflamatória ocorrem de forma antecipada e concomitante. Assim, a fase hiperinflamatória dominante precoce é manifestada e caracterizada por choque, febre e hipermetabolismo e apresenta dependência de fatores agravantes como comorbidades pré-existentes, estado nutricional, carga de microrganismos e fatores de virulência. (132, 133)

Neste contexto, a capacidade atenuada da resposta inflamatória pelos pacientes sépticos, como a redução na síntese de citocinas pró-inflamatórias após a

exposição a endotoxina, demonstra a resposta insuficiente e ineficaz do sistema imune a repetidas ou persistentes invasões de patógenos. Os mecanismos de processo inflamatório sistêmico e resposta imunológica tende a depender do momento de recrutamento e ativação dos macrófagos, assim afetando diretamente o nível de comprometimento do hospedeiro durante a sepse e a eliminação dos microrganismos. A produção exacerbada de citocinas de caráter pro-inflamatório, apesar de possibilitar a redução de necrose tecidual, é capaz de gerar falência múltipla dos órgãos devido à citocinemias, assim como a atenuação excessiva da síntese destas ocasiona imunodeficiência tardia em pacientes com sepse grave. Conseqüentemente, o equilíbrio da síntese e liberação das citocinas pró-inflamatórias geram uma resposta eficiente e benéfica ao paciente acometido à sepse. (134)

1.15 Papel da inflamação na Sepse

Por muitos anos, a teoria prevalente tem sido a de que a disfunção orgânica induzida por infecção é o resultado de uma resposta inflamatória descontrolada. Estudos experimentais *in vivo* em modelos de sepse empregaram altas doses de endotoxinas ou alta inoculação bacteriana, gerando uma “tempestade de citocinas” e, quando inibidas, resultaram na redução da mortalidade. No entanto, a complexa resposta humana a sepse é composta de uma cascata de ativação pró-inflamatória e anti-inflamatória. A morte precoce por inflamação devastadora não costuma ser o curso da doença, pois a maioria dos pacientes falecem em decorrência de complicações relacionadas à imunossupressão, à apoptose e à falência de múltiplos órgãos posteriormente no curso da doença. A intensa relação entre as citocinas de caráter pró e anti-inflamatório e seus respectivos inibidores interferem na resposta do

hospedeiro à sepse. No princípio da sepse, as citocinas de caráter pró-inflamatório, como TNF- α e IL-1 β , têm efeitos sobrepostos e sinérgicos ao estimular ainda mais a cascata inflamatória. Atuam no recrutamento de neutrófilos, monócitos e macrófagos teciduais, além do processo de gliconeogênese, bem como por originar respostas clínicas como febre, hipotensão, extravasamento capilar com diminuição do volume intravascular e depressão miocárdica. Estudos recentes, na busca de mediadores do processo inflamatório e potenciais alvos terapêuticos, vêm abordando citocinas como MIF (fator inibidor da migração de macrófagos) e a HMG-1 (proteína do grupo 1 de alta mobilidade). Porém, o desempenho das citocinas de caráter anti-inflamatório ainda não foi estabelecido. (123, 124)

A predominância do fenótipo anti-inflamatório e o processo de apoptose das células imune chave-efetoras (macrófagos) são descritos na literatura como causa da falência de múltiplos órgãos induzidos pela sepse e, conseqüentemente, a morte. (135, 136) Essa mudança na predominância é impulsionada, em parte, pelo aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias e resulta de uma mudança nas populações de células T auxiliares (de Th1 para Th2). Devido ao processo inflamatório desempenhar importante função na resposta a sepse, estratégias terapêuticas simples são ineficazes a fim de inibir citocinas pró-inflamatórias e modular a resposta. (137, 138)

As células, de forma individual, que apresentam mínima flutuação do estado estacionário eletroquímico e metabólicos, classificam o estado de saúde. A homeostase reflete o imperativo fundamental da célula individual para responder ao estresse e sobreviver. A resposta biológica a fim de agir com barreiras e evitar invasões, infecções e doenças depende da resposta homeostática e estável frente às infecções ou lesões, é gerada pela imunidade. Desta forma, o sistema imune é capaz

de intervir diretamente sobre imunopatologias, como na exacerbação de TNF gerando choque séptico agudo ou a resposta autoimune de anticorpos sobre a insuficiência renal, sendo exemplos do lapso do reestabelecimento da homeostase capazes de ocasionar danos deletérios. Em outro extremo, a imunossupressão é capaz de gerar susceptibilidade do hospedeiro a infecções recorrentes e desenvolvimento de câncer. Assim, a homeostase gera o equilíbrio entre a imunopatologia, e imunossupressão. (100, 114, 123)

Em muitos casos, o distúrbio na homeostasia ocasiona o processo de regeneração celular natural, a autofagia, com o objetivo de remover ou recuperar proteínas e organelas comprometidas. Quando a autofagia se mostra insuficiente, a ativação da imunidade inata inicia a inflamação por meio de mecanismos recentemente descobertos. Os padrões de moléculas associadas ao perigo (DAMPs ou alarminas) derivados de produtos hospedeiros dentro das células são detectados pelos receptores do gene 1 indutíveis do ácido retinóico codificados pelo genoma (RLRs) e pelos receptores semelhantes aos do domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NLRs), um processo que leva à formação de inflamassomas, complexos citosólicos que, ao ativar a caspase-1, produzem IL-1 e IL-18 ativas para secreção no espaço extracelular.

A fosforilação da PKR (proteína quinase dependente de RNA de dupla fita), desencadeado por DAMPs ou PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), é uma fase essencial para composição do inflamassoma.(80) Os componentes intracelulares após a lesão, tal como IL-1 e IL-18, apresentam, de forma extracelular, o papel de DAMPs e, juntamente com os PAMPs presentes no microambiente, promovem a ativação de receptores do tipo Toll-like (TLRs) e de lectina tipo C (CLRs), além dos receptores de avançados produtos finais de glicação

(RAGE) e catalisam a geração de complexos de sinalização (sinalossomos) de superfície celular.

A HMGB1 (proteína de grupo de alta mobilidade B1), proteínas S100 e RNA extracelular, DNA e histonas são os DAMPs envolvidos na patogênese da sepse. O início do processo de apoptose, estresse do retículo endoplasmático (ER), proliferação celular e expansão da expressão de genes capazes de gerar citocinas pró-inflamatórias, como TNF, são mediados por meio da ativação de sinalossomos e inflamassomas. (123, 139)

Os inflamassomas estimulam a secreção extracelular de HMGB1, IL-1 β e IL-18 e potencializam a resposta imune inata. Além disso, intercorrem o processo de piroptose (morte celular programada), liberando seus conteúdos para o ambiente extracelular. Incluindo DNA mitocondrial, citocromo C e HSP (proteínas de choque térmico), ambos atuantes como DAMPs. A liberação de moléculas sinalizadoras e DAMPs em processos de lesões não infecciosas, isquemia ou trauma induzem a ação de mecanismos patogênicos de disfunção de múltiplos órgãos que não diferem as doenças ocasionadas ou não por patógenos. Assim, os processos e componentes envolvidos na resposta inata atuam na ativação da resposta imune adaptativa. (99, 140)

Dado que mais pacientes sobrevivem ao estágio inicial da sepse e têm disfunção orgânica progressiva de longo prazo, uma estratégia “pró-imune” usando imunostimuladores para aumentar a função imunológica no estágio posterior da doença pode ter algum benefício. Deste modo, o melhor entendimento das respostas do processo pró e anti-inflamatório é capaz de desenvolver mecanismos de

modulação e, conseqüentemente, na melhora clínica de pacientes com transtornos imunológicos. (139)

1.16 Manejo da sepse Grave e Choque Séptico

A *Surviving Sepsis Campaign* (SSC) publicou pela primeira vez diretrizes consensuais internacionais abrangentes para o tratamento da sepse em 2004. (141) As diretrizes SSC foram atualizadas em 2008, novamente em 2012, mais recentemente, em 2021 com as melhores evidências para o manejo da sepse, e continuam, a cada publicação, a evoluir. (119, 141) O profissional de cuidados intensivos deve estar familiarizado com os conceitos das diretrizes do SSC e deve consultar a atualização mais recente para uma revisão abrangente, incluindo a avaliação da força da evidência para cada recomendação. O comitê de redação das diretrizes do SSC constituiu representantes de várias sociedades profissionais médicas relacionadas ao cuidado do paciente séptico, endossando, de algum modo, tais diretrizes do SSC. (139)

1.17 CD16 (receptor FcγRIII) e câncer

O FcγRIII é caracteristicamente manifestado na superfície dos leucócitos. Junta-se a IgG1 de forma intermediária e a IgG3 apresentando baixa afinidade. A ligação ao FcγRIII proporciona ativação quando ocorrente em células mielocíticas. Já em células NK, o CD16 ativa o efeito citotóxico celular por meio de ADCC. (142, 143)

FcγRIII dos tipos “a” ou “b” são isoformas que manifestam similaridade na porção extracelular, e discrepâncias nos domínios transmembrana e intracelular decorrentes de um *splicing* alternativo. (78, 142) São atribuídos à presença dos

neutrófilos, no sangue ou tecido linfoide, sobre o monitoramento das terapias e na avaliação da progressão do câncer, sendo seus efeitos de forma direta e indireta sobre as células cancerosas e no microambiente tumoral, respectivamente. Estudos relatam a presença de neutrófilos na progressão tumoral, atuando como células supressoras derivadas de linhagem mieloide (MDSC). (142)

Nas células NK, o FcγRIIIa interpõe-se no processo de morte de células-alvo, opsonizadas por IgG, por intermédio de ADCC. A produção de superóxido é estimulada, desenvolvendo processos de apoptose, fagocitose, endocitose e produção de citocinas como IFN-γ e TNF. (143) Os FcRs são majoritariamente expressos pelas células mieloides, B, NK e NKT. Há a possibilidade de expressão de FcRs ainda não relatados na literatura pelas células linfoides inatas (ILCs). Células não hematopoiéticas como endoteliais e tumorais possuem capacidade de expressar FcRs. Já os FcRn são expressos por diversos leucócitos, hepatócitos e células dendríticas. (85)

FcRs de ativação são expressos por células mielóides e por células linfoides sem receptor de antígeno clássico, isto é, células NK [91] e células intraepiteliais c / dT do intestino. (144) Linfócitos T e B maduros não expressam esses receptores. Os linfócitos apresentam capacidade de expressão de um único receptor de antígeno, não interferindo na ativação de linfócitos desencadeada por receptores de antígeno clonais expressos. Estudo *in vivo* demonstrou baixa expressão de FcγRIIIA em linfócitos T CD8, sendo que estes desencadearam citotoxicidade por células anticorpos-dependente. (35)

FcγRIIB são presentes em predominância nas células mieloides e por linfócitos B. Apresenta maior restrição de sua distribuição em humanos quando

comparado a camundongos. Células NK e T expressam receptores inibitórios com envolvimento nas interações entre células e não expressam FcγRIIB. (76)

Na década de 60, Peter C. Nowell e David Hungerford registraram a translocação dos cromossomos 9 e 22 (cromossomo Filadélfia). Descrição originária de um ocasionador da evolução do câncer e importante componente no desenvolvimento da droga imatinibe, com o fim de tratar pacientes com leucemias. (145, 146)

A leucemia mieloide aguda (LMA), comumente apresentada em indivíduos adultos, sendo a média de idade em cerca de 70 anos, caracteriza-se por ser um distúrbio clonal heterogêneo de células progenitoras hematopoiéticas. Fatores genéticos, como defeitos, são considerados determinantes na resposta terapêutica à quimioterapia. Registre-se que adultos jovens apresentam melhores progressos terapêuticos e idosos apresentam média de vida de apenas alguns meses, devido, principalmente, à relação das comorbidades associadas ao envelhecimento. Buscas clínicas atuais focam nas terapias direcionadas, podendo ocasionar e relacionar as novas abordagens à taxa de cura. (147)

As leucemias agudas são desordens clonais que atingem todas as células leucêmicas por meio de um precursor comum. A clonalidade associada à leucemia foi melhor compreendida a partir de estudos de mulheres heterozigóticas para a isoenzima desidrogenase glicose-6-fosfato ligada ao X acometidas. Em mulheres heterozigóticas normais, todas as células componentes do sangue são capazes de expressar isoenzimas, devido à inativação aleatória ligada ao X. Células de leucemia em fêmeas heterozigóticas G6PD, no entanto, foram encontradas em todos os casos

como sendo todas de uma isoenzima ou outra, indicando sua origem a partir de um único precursor. (148)

Potenciais e consideráveis mutações do tipo condutoras recorrentes em todo o genoma, assim como um número maior de mutações passageiras e aleatórias, foram observadas a partir da análise característica da leucemia de forma individual. Contudo, este não é resultado de mutação única. Estudos que concernem à LMA e à leucemia linfoblástica aguda (LLA) identificaram variáveis nas mutações entre as células leucêmicas em um único indivíduo. Assim, foi identificado que a decorrência da leucemia é moldada por múltiplos ciclos de aquisição de mutação e seleção clonal, não gerada por acúmulo progressivo de mutações de forma linear. (149, 150)

Leucemias são mais comumente diagnosticadas em um esfregaço de sangue periférico demonstrando os leucócitos anormais. A característica de heterogeneidade, principalmente dada a do tipo mieloide, ocasiona a anormalidade em qualquer etapa do processo de maturação celular. A semelhança entre as diferentes formas de leucemia ocorre pelo conceito de que todas as células leucêmicas são provenientes de uma única célula progenitora. (151)

A *American Cancer Society* estimou que 13.800 casos de LMA e 6.000 casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) foram diagnosticados nos Estados Unidos em 2012. (110) Devido ao aumento do número de incidência, os serviços hospitalares tratam cada vez mais pacientes que têm ou tiveram leucemia aguda. Além disso, as complicações e complexidades que ameaçam a vida e seu tratamento tornam essencial a compreensão da leucemia. (152)

Nas últimas décadas, muito se tem estudado acerca de novas terapias no combate à Leucemia Mieloide Aguda, em que imunoglobulinas da classe G exercem

funções biológicas importantes na interação com diversos tipos celulares. A base desta interação ocorre pela ligação dos domínios Fc da IgG com receptores específicos presentes nas membranas de células imunes. (22)

Alterações genéticas causadas a uma única célula hematopoiética é capaz de desenvolver a LMA. As alterações interferem no processo de diferenciação celular, gerando muitas células mieloides anormais e imaturas ainda na medula óssea e no sangue periférico. Essas células não possuem poder de diferenciação em células hematopoiéticas maduras, mas sim apenas de proliferação. Os neutrófilos apresentam importante envolvimento na progressão do câncer e, além do monitoramento terapêutico, desempenha função ativa na progressão da doença de forma direta e indireta, ou seja, sobre as células cancerosas e sobre o ambiente tumoral. Embora em muitos casos tenha sido demonstrado que os neutrófilos promovem a progressão do tumor, por exemplo, atuam, portanto, como células supressoras derivadas de linhagem mieloide (MDSC) presentes em doenças que cursam com a hematopoese alterada (Quadro 1). (150)

Quadro 1 - Classificação das leucemias agudas segundo (OMS)

<p>Neoplasias de células plasmocitóides dendríticas blásticas</p> <p>Leucemia aguda de linhagem ambígua</p> <p>Leucemia aguda indiferenciada</p> <p>Leucemia aguda de fenótipo misto (MPAL) com t(9;22)(134.1;q11.2); BCR-ABL1</p> <p>Leucemia aguda com fenótipo misto com t(v;11q23.3); rearranjo KMT2A</p> <p>Leucemia aguda de fenótipo misto, B/mieloide, NE</p> <p>Leucemia aguda de fenótipo misto, T/mieloide, NE</p> <p>Leucemia /Linfoma linfoblástico B</p> <p>Leucemia /Linfoma linfoblástico B, NOS</p> <p>Leucemia /Linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes</p> <p>Leucemia /Linfoma linfoblástico B com t(9;22)(134.1;q11.2); BCR-ABL1</p> <p>Leucemia /Linfoma linfoblástico B com t(v;11q23.3); rearranjo KMT2A</p> <p>Leucemia /Linfoma linfoblástico B com t(22;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1</p> <p>Leucemia /Linfoma linfoblástico B com hiperploidia</p> <p>Leucemia /Linfoma linfoblástico B com hipoploidia</p> <p>Leucemia /Linfoma linfoblástico B com t(5;14)(131.1;q32.3) IL3-IGH</p> <p>Leucemia /Linfoma linfoblástico B com t(1;19)(q23;13.3); TCF3-PBX1</p> <p><i>Classe provisória: Leucemia /Linfoma linfoblástico B, BCR-ABL1-like</i></p> <p><i>Classe provisória: Leucemia /Linfoma linfoblástico B, com iAMP21</i></p> <p>Leucemia /Linfoma linfoblástico T</p> <p><i>Classe provisória: Leucemia linfoblástica precursora Early T-cell</i></p> <p><i>Classe provisória: Leucemia /Linfoma linfoblástico células Natural Killer (NK)</i></p>

A classificação morfológica e imunofenotípica gera implicações prognósticas, assim como a idade, condições clínicas e, principalmente, alterações citogenéticas. Em geral, os pacientes expõem sensações de cansaço e falta de ar durante a atividade física e apresentam palidez cutaneomucosa. A presença de hemorragia, sendo petéquias, equimoses e hematomas, assim como a manifestação de sangramento de mucosa nasal, oral e hemorragias em trato gastrointestinal, é um sinal prevalente. Além disso, a febre e infecções são menções comuns, juntamente com a sensação de dores ósseas. (153)

O diagnóstico da LMA pode ser realizado por avaliação microscópica de esfregaço de medula óssea, a fim de se identificar aumento de proliferação celular e presença de células imaturas. (154)

1.18 Proteína WzXe e a técnica do Phage display

A proteína WzXe, localizada na membrana celular, possui funções de transporte de moléculas e ações no citocromo caracterizada como translocase do antígeno-O e translocase do lipídeo III devido ao seu envolvimento no transporte de elétrons. Presente nas cepas de *E. coli* como K12_MG1655, BW2952, K12_DH108, K12_W3110, (154–157) a proteína WzXe é uma translocase inserida entre as bicamadas de um intermediário trissacarídeo-lipídeo (Lipid III) na formação do antígeno comum enterobacteriano (ECA). A combinação peptídeo-receptor sinalizam ITAMi do imunorreceptor mediada por CD16 e atuam no bloqueio de ROS e, conseqüentemente, na morte bacteriana. (156–158) O antígeno O (polissacarídeo O), elemento extrínseco do LPS (lipopolissacarídeo, conhecido como endotoxina) presente na região externa da membrana de bactérias gram-negativas. (159) Para a ligação dos componentes e formação do LPS, as subunidades do antígeno O são translocadas por meio da WzX e são polimerizadas pelo WzY, tendo comprimento de cadeia determinado pelo WzZ. (155–157)

Neste contexto, para confirmar que o peptídeo selecionado (TEGA-CYWGGTEGAC) liga-se ao CD16, foram realizados ensaios de ligação com bacteriófagos o que expressam. Neste ensaio, conhecido como técnica Phage display - Ensaio de Ligação (Binding), o CD16 (humano e murino) foi incubado com os fagos anteriormente sequenciados e titulados, para então serem testados no ensaio de ligação. Assim, com intuito de corroborar que a interação entre o peptídeo apresentado pelo fago e os receptores alvos do panning eram específicas, os resultados mostraram que ambos os fagos avaliados, ligaram-se ao CD16/Fc recombinante, referindo-se, sobretudo, à ligação mais intensa que ocorre por parte do peptídeo CYWGGTEGAC. (160)

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial Terapêutico da proteína WzXe em Doenças Sistêmicas.

2.2 Objetivos Específicos

Investigar os efeitos da proteína WzXe em um modelo de sepse por ligadura cecal no que se refere à:

- Mortalidade;
- Expressão proteica de citocinas.

Investigar os efeitos do peptídeo TEGA em um modelo de LMA por injeção de ciclofosfamida e inoculação de células U937 no que se refere à:

- Quantificação de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos, monócitos e plaquetas no sangue.

3 Materiais e Métodos

3.1 Local de experimentação

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Emergências Clínicas (LIM-51) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

3.2 Aspectos éticos

O estudo obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP sob o protocolo 083/15 (Anexo A). As orientações do guia PRESS foram seguidas (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences and National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C., 1996*).

3.3 Modelo de LMA

3.3.1 Animais de experimentação

Participaram do projeto 34 camundongos machos com sete semanas de vida, NOD/SCID, concedidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da USP. Uma vez recebidos no Laboratório de Investigação Médica (LIM 51), os animais foram mantidos em gaiolas contendo até 4 animais, temperatura controlada ($22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$), períodos de claro/escuro, acesso livre à água filtrada e a alimentados com Nuvilab

CR1 (Nuvital Nutrientes Ltda, São Paulo, Brasil). Estes animais foram agrupados em 4 grupos, cada um com 10 animais, como demonstrado na Figura 6.

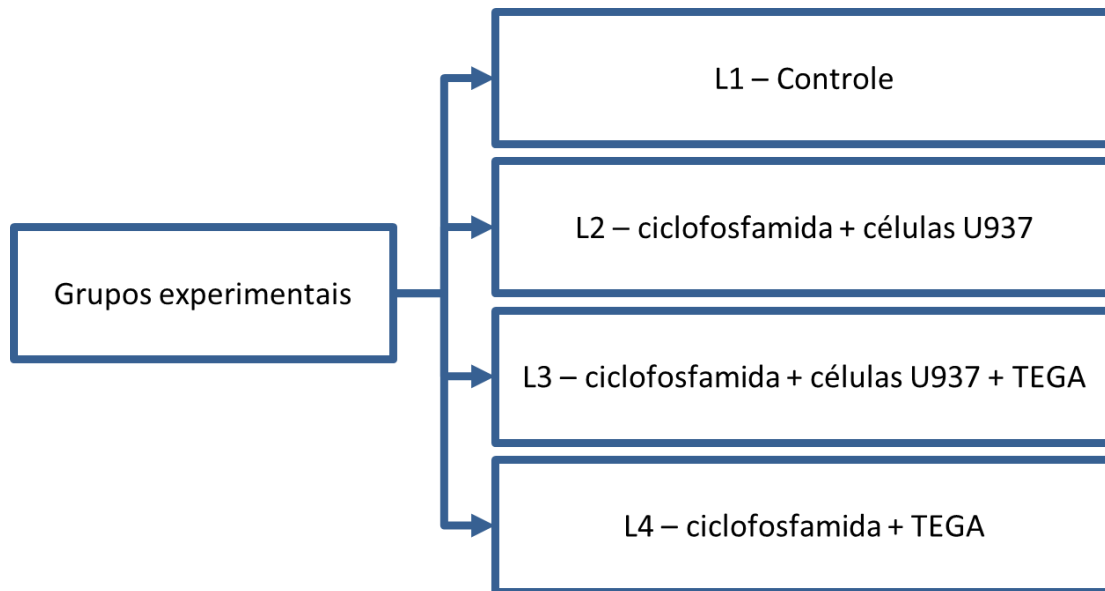


Figura 6 - Distribuição dos grupos experimentais no modelo de LMA

3.3.2 Indução da LMA

Para indução da LMA, foi realizada uma injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (100 mg/kg), alíquota de 10 μ L, realizada no primeiro dia do experimento nos camundongos, exceto no grupo controle.

Vinte e quatro horas após a injeção intraperitoneal de ciclofosfamida, realizou-se injeção de células U937 em dois grupos [Grupo injeção de ciclofosfamida + células U937 e Grupo ciclofosfamida + células U937 + WXe (TEGA)]. Neste momento, a inoculação de 50 μ L foi realizada por via intravenosa caudal.

A anestesia dos animais foi administrada por via inalatória com isoflorano a 2% mais óxido nítrico. Os camundongos foram mantidos em ventilação espontânea,

aquecidos por lâmpada halógena (45 W e 127 V) e aferida a temperatura com termômetro retal digital (YSI Precision 4000A Thermometer, USA) entre 35 °C e 37 °C. Em seguida, procedia-se a injeção de material celular com auxílio de uma lupa para visualização das veias caudais e posterior injeção do conteúdo celular. Para as aplicações injetáveis, utilizaram-se seringas com pontas ultrafinas e agulhas com tamanhos 31 gauge (6 mm x 0,25 mm), 30 gauge (8 mm x 0,3 mm) e 29 gauge (12,7 mm x 0,33 mm).

Aguardaram-se 72 horas pós-injeção de células U937, para que se pudesse injetar o peptídeo TEGA (50 µL), em dois grupos [Grupo ciclofosfamida + células U937 + WXe (TEGA) e Grupo ciclofosfamida + WXe (TEGA)] (Figura 7).

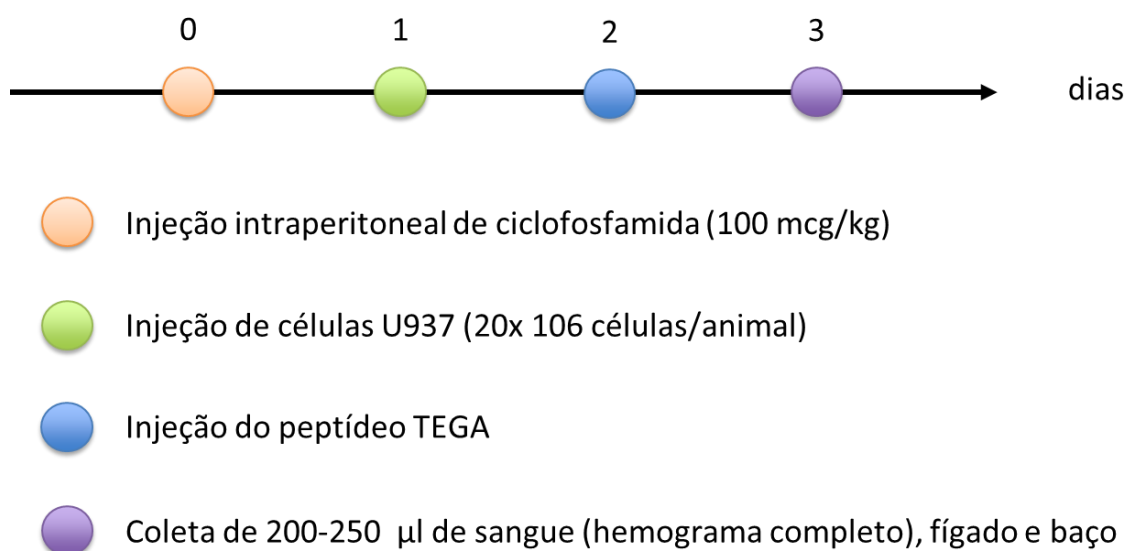


Figura 7 - Timeline com esquematização dos procedimentos realizados nos animais no modelo de LMA.

3.3.3 Eutanásia

Após seis horas da injeção do WzXe (TEGA), foi realizada a retirada de material para análise. Os animais foram submetidos à anestesia com ketamina e xilazina, sendo coletado o sangue total através de punção da veia cava, além do fígado e do baço.

3.3.4 Hemograma

O sangue coletado foi imediatamente centrifugado (Centrifuge 5804 R®, Eppendorf, Hamburg, Germany) a 2500 rpm por 15 minutos a 4 °C. O plasma foi coletado, alocado em microtubo e imerso em nitrogênio e, posteriormente, armazenado a – 80 °C. O hematócrito foi desprezado em local próprio para materiais infectantes.

A análise do sangue venoso foi realizada em colaboração com o Laboratório de Análises da FMUSP, em aparelho pocH 100iv Diff (Sysmex Europe GmbH, Hamburg, Alemanha). Além disso, foram confeccionados esfregaços sanguíneo e corado com corantes panópticos para avaliação morfológica e diferencial dos leucócitos, complementando o exame.

3.3.5 Pulverização de órgãos coletados

Fragmentos de baço e fígado foram lavados em solução salina, sendo que as primeiras amostras foram armazenadas em refrigeração a – 80 °C para posteriores processamentos e as amostras destinadas a patologia separadas para processamento adequado, conforme descrito nos próximos itens. Após este processo,

as amostras de fígado e baço foram retiradas do *freezer* (-80 °C) e mantidas em nitrogênio líquido para pulverização de forma individual.

3.4 Modelo de Sepses por ligadura cecal

3.4.1 Animais de experimentação

Participaram do projeto 40 camundongos machos com sete semanas de vida, C57Bl/6, concedidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da USP (Anexo B). Recebidos no LIM 51, os animais foram acondicionados em gaiolas contendo até 4 animais, temperatura controlada (22 °C ± 1 °C), períodos de claro/escuro, acesso livre à água filtrada e alimentados com Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes Ltda, São Paulo, Brasil). Estes animais foram agrupados em 4 grupos, cada um com 10 animais, como demonstrado na Figura 8.

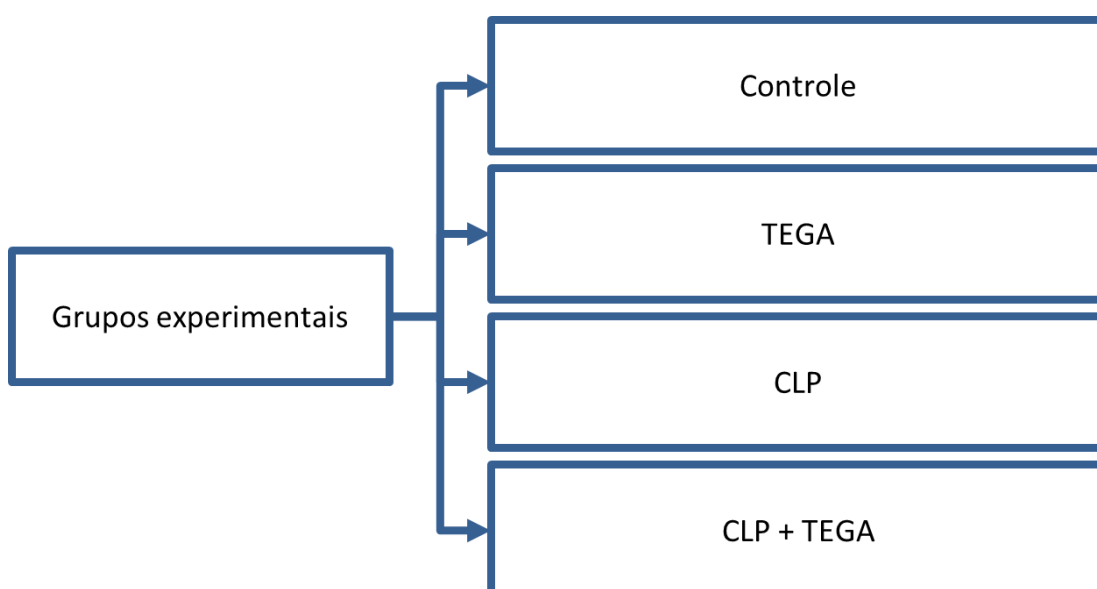


Figura 8 - Distribuição dos grupos experimentais no modelo de sepses

3.4.2 Indução da sepse

Inicialmente, os camundongos do grupo foram submetidos a injeções de duas substâncias adjuvantes CFA - complete Freund Adjuvant e IFA - Incomplete Freund Adjuvants) ao longo de trinta e cinco dias, visando ao aumento de resposta imunológica. A palavra "adjuvante" derivada do latim, *adjuvare*, que significa "ajudar". Um adjuvante incorporado ao antígeno é capaz de auxiliar no aumento da taxa e na formação de anticorpos no processo de imunização, sendo o de Freund o mais popularmente utilizado, consistindo na suspensão do antígeno inativado em um agente emulsificante estável. Assim, o conteúdo injetado nos animais de maneira subcutânea, forma um depósito que é absorvido lentamente para que, em níveis sustentáveis, os anticorpos sejam produzidos. A forma induzida apresenta resposta dos anticorpos de maneira alta e sustentada. Neste sentido, as micobactérias no adjuvante Complete Freund atrai macrófagos e outras células para o local da aplicação, o que aumenta a resposta imunológica. Por esta razão, o Adjuvante Completo de Freund é usado para as injeções iniciais e o Adjuvante Incompleto de Freund para aumentos subsequentes. No trigésimo oitavo dia do experimento, os camundongos dos grupos CLP e CLP+TEGA foram submetidos ao modelo de CLP.

A peritonite foi induzida por CLP como relatado em estudos prévios (90, 161) Os camundongos foram primeiramente anestesiados (quetamina e xilazina — Virbac, França). Após este processo, foi realizada tricotomia do abdômen, incisão mediana de 1 cm e a exposição do ceco. O ceco foi ligado entre a terceira e quarta arcada vascular com fio de sutura de seda 3-0 (Ethicon, França) e puncionado três vezes com uma agulha vinte e um gauge. Os camundongos foram colocados sobre uma base aquecida para recuperação pós-anestésica e, posteriormente, colocados de volta às suas gaiolas e acompanhados ao longo de dez dias, a fim de observarmos o grau de

mortalidade entre os grupos ao longo das horas. Assim, foi realizada a curva de mortalidade de ambos os grupos (Figura 9).

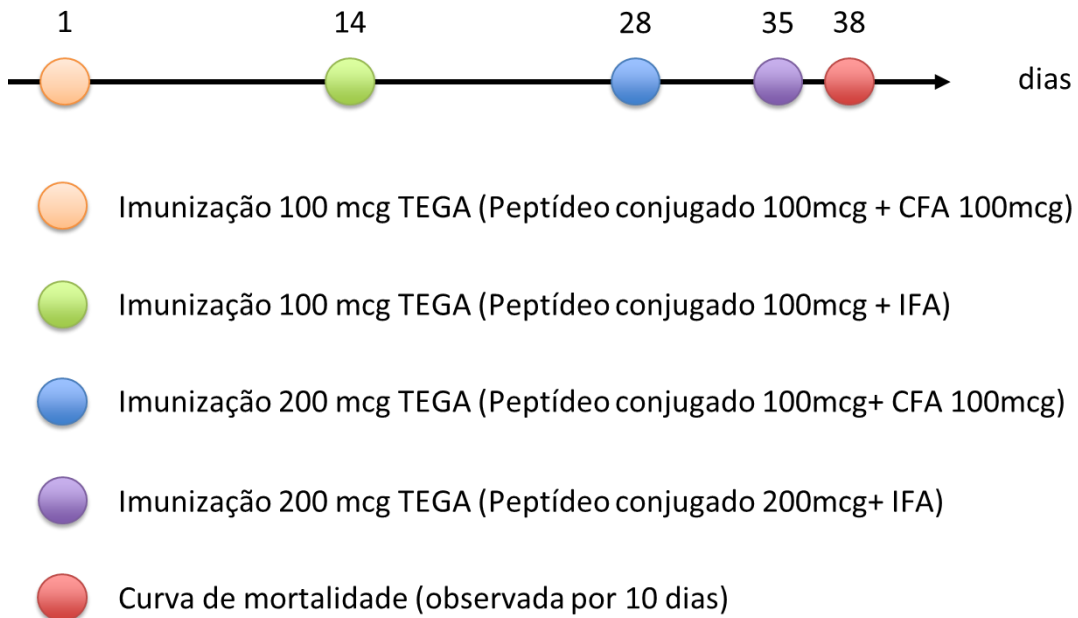


Figura 9 - Timeline com esquematização dos procedimentos realizados com os animais no modelo de sepse

3.3.3 Eutanásia

Após 24 horas da finalização das intervenções, foi realizada a eutanásia dos animais, sendo que os alocados no grupo controle foram eutanasiados simultaneamente. Outrossim, foi administrada a solução de 240 mg/kg de cloridrato de cetamina 5% (Cristália, São Paulo, Brasil) e 30 mg/kg de cloridrato de xilazina 2% (Cristália, São Paulo, Brasil).

A coleta dos tecidos foi realizada por uma incisão tóraco-abdominal, aspiração da veia cava inferior para coleta de sangue total do animal em seringa heparinizada,

e posterior centrifugação e obtenção do soro. As amostras de sangue foram alocadas em microtubos heparinizado, sendo mantidas em gelo.

Em seguida, foi realizada a extração dos órgãos: pulmão direito e esquerdo, fígado e baço. Os tecidos foram colocados separadamente em tubos com tampa de rosca, e imersos em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram armazenados em refrigerador (-80°C) para processamento de todas as amostras, ao término do experimento.

3.3.4 Dosagem de citocinas no soro (Milliplex)

A centrifugação das amostras de sangue foi realizada a 2500 rpm, 15 minutos, 4°C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), coletado o sobrenadante, obtendo-se cerca de 300 a 350 µL de soro por amostra. O soro foi armazenado em tubos com tampa de rosca, sendo imersos em nitrogênio líquido e, posteriormente, mantidos à temperatura de -80°C. Amostras de soro foram submetidas ao método Milliplex® (Merck Millipore Co., Alemanha) para dosagem de TNF- α , das interleucinas IL-6, -10, -1 β e MCP-1.

Com efeito, temos que, no método Milliplex®, microesferas de polietileno (beads) foram coradas. A partir de então, diferentes conjuntos de esferas coloridas podem ser produzidos, sendo que cada um deles foi revestido com um anticorpo de captura específico. Ao longo do período de incubação, o analito da amostra foi então capturado pelas esferas, ocorrendo a ligação do anticorpo biotilado. A partir daí, realizou-se a incubação com o conjugado estreptoavidina-ficoeritrina, uma molécula que emite um sinal fluorescente (molécula repórter). Por fim, houve uma excitação dos

corantes internos de microesferas através de um laser, seguido por um segundo laser que provocou a excitação do corante da molécula repórter.

É imperativo destacar que processadores digitais de sinais de alta velocidade identificaram o código de cor específico para cada analito. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com um programa específico de análise, o Luminex™ 100/200 System (Luminex, Texas, EUA).

As citocinas de IL-1 β , -6, -10, TNF- α e MCP1 foram submetidas à dosagem proteica pela técnica de ELISA com os kits Duo Set (R&D Systems®) IL-6 (DY406). Para isso, foram adicionados 50 μ l de anticorpo primário em tampão de cobertura (coating buffer) em placas de 96 poços e incubadas overnight (18 horas) a 4 °C. Após isto, foi realizada a lavagem das placas quatro vezes com Tween 0,05% em solução fosfato-salina tamponada (PBS) e realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com 200 μ l/poço de BSA 1% (albumina sérica bovina) em PBS, durante uma hora em temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas e as amostras e a citocina padrão recombinante, diluída em concentrações definidas conforme indicado pelo fabricante, adicionado 100 μ l/poço e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. O conteúdo foi desprezado e realizada nova lavagem das placas. Assim, 50 μ l de anticorpo de detecção para cada citocina foram acrescentados por 1 hora a 37 °C. Após a lavagem, as placas foram incubadas com conjugado streptoavidina-peroxidase por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este processo, realizou-se a incubação com solução de tetrametilbenzidina (TMB) durante 20 minutos. O bloqueio da reação ocorreu com o acréscimo de ácido sulfúrico 2N por poço.

A densidade óptica das amostras foi determinada em leitor de ELISA (Versa Max Molecular device®) com filtro de 450 nm. As concentrações das citocinas (pg/mL) encontradas nas amostras de baço e fígado foram normalizadas pelas concentrações de proteína total dosadas pelo método de Bradford (Bio Rad®).

3.5 Análise estatística

O n de animais por grupo foi determinado com referência em estudos já publicados. Os dados foram demonstrados por meio de gráficos, utilizando mediana, intervalo interquartil e valores máximos e mínimos para as variáveis. O software GraphPad Prism® foi utilizado, considerando-se a diferença estatística dos valores de p menores ou iguais a 0,05 ($\alpha = 5\%$). A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade para definição e emprego de testes paramétricos ou não-paramétricos. Para as análises de comparação entre os grupos, foi verificada também a homogeneidade das variâncias. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para dados não-paramétricos. Para comparações entre os grupos, comprovadas a distribuição normal e a homogeneidade das variâncias, foi utilizado o teste paramétrico para análise de múltiplos grupos – ANOVA (análise de variância) de uma via.

4 Resultados

4.1 Efeitos do WzXe sobre a variáveis hematológicas em modelo de LMA

Após a realização das análises de hemograma, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais sobre a quantificação de leucócitos totais (Figura 10), neutrófilos (Figura 11), linfócitos (Figura 12), monócitos (Figura 13) e plaquetas (Figura 14).

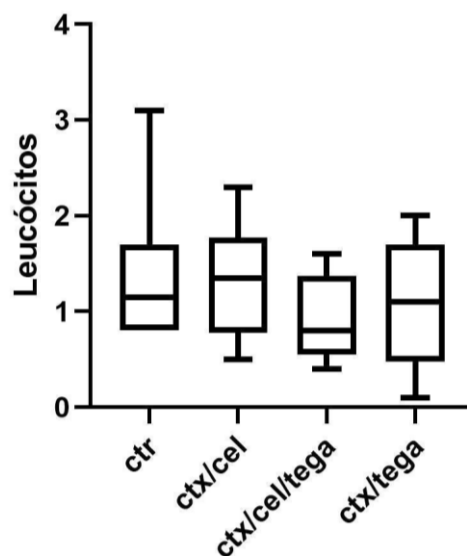


Figura 10 - Contagem de leucócitos totais nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey)

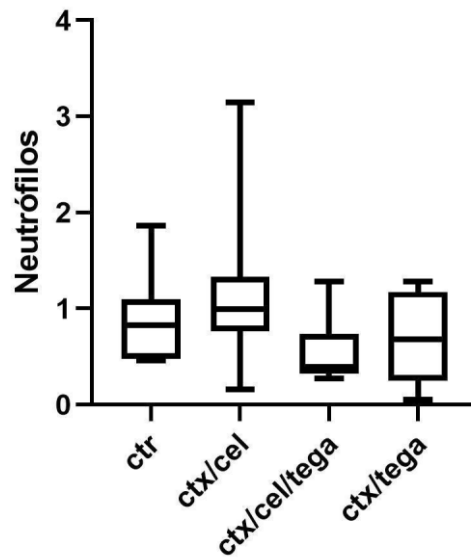


Figura 11 - Contagem de neutrófilos totais nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey)

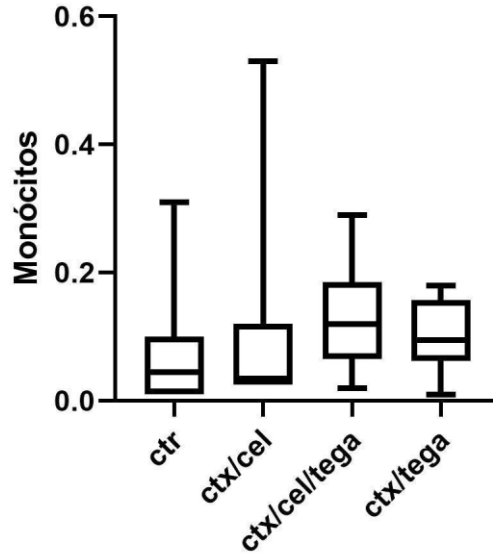


Figura 12 - Contagem de monócitos totais nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey)

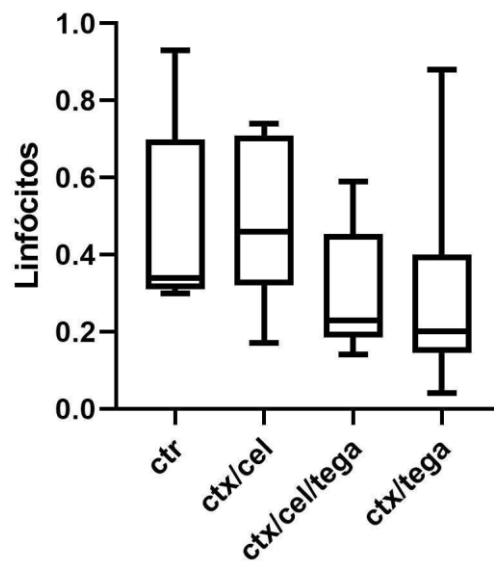


Figura 13 - Contagem de linfócitos totais nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey).

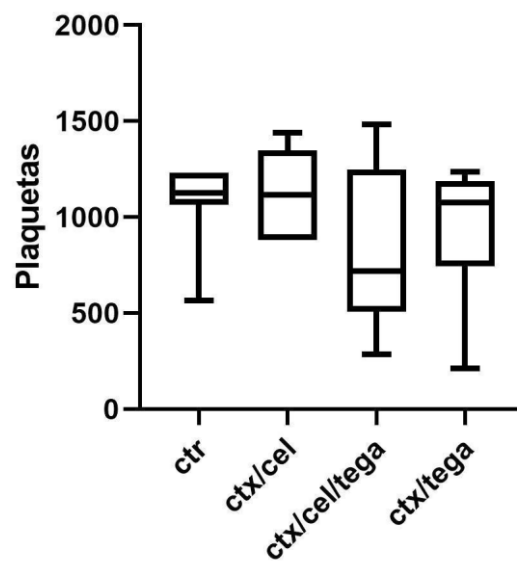


Figura 14 - Contagem de plaquetas totais nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey).

4.2 Efeitos do TEGA sobre modelo de CLP

Os animais submetidos à CLP demonstraram um declínio em sua população, sobrevivendo apenas 20% dos animais em 48h, porém, nos animais que foram tratados com o TEGA, 60% sobreviveram até o término dos períodos experimentais (p: 0.0387 (teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon), Figura 15).

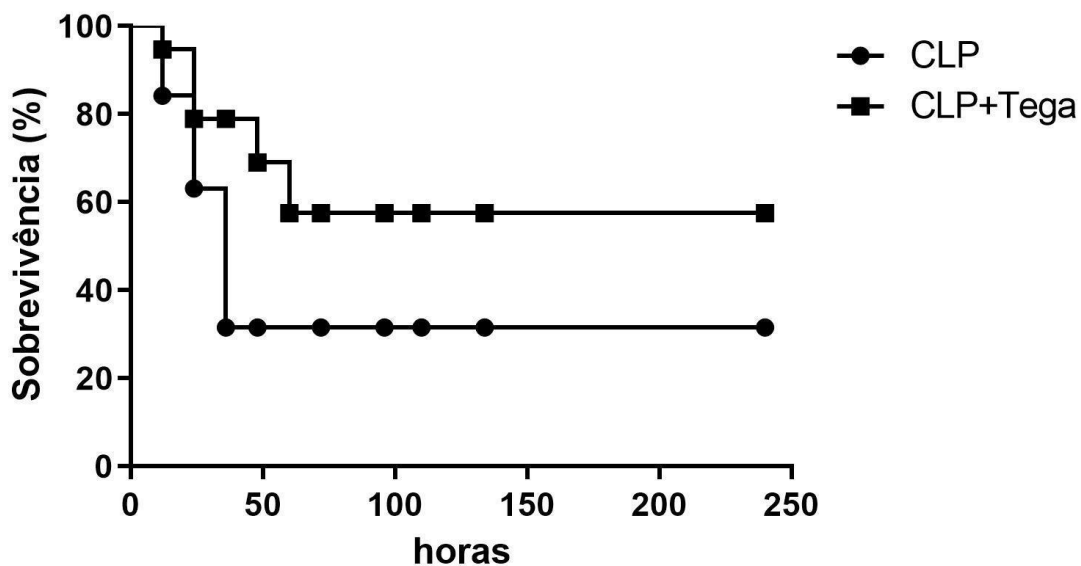


Figura 15 - Gráfico de mortalidade dos animais submetidos à CLP tratados com TEGA

Com relação à expressão proteica de citocinas, foi observado um aumento de todas as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF-a e MCP1) investigadas no grupo CLP, porém, no grupo CLP+TEGA, foi observada uma diminuição na sua concentração (Figuras 16, 17, 18,19 e 20).

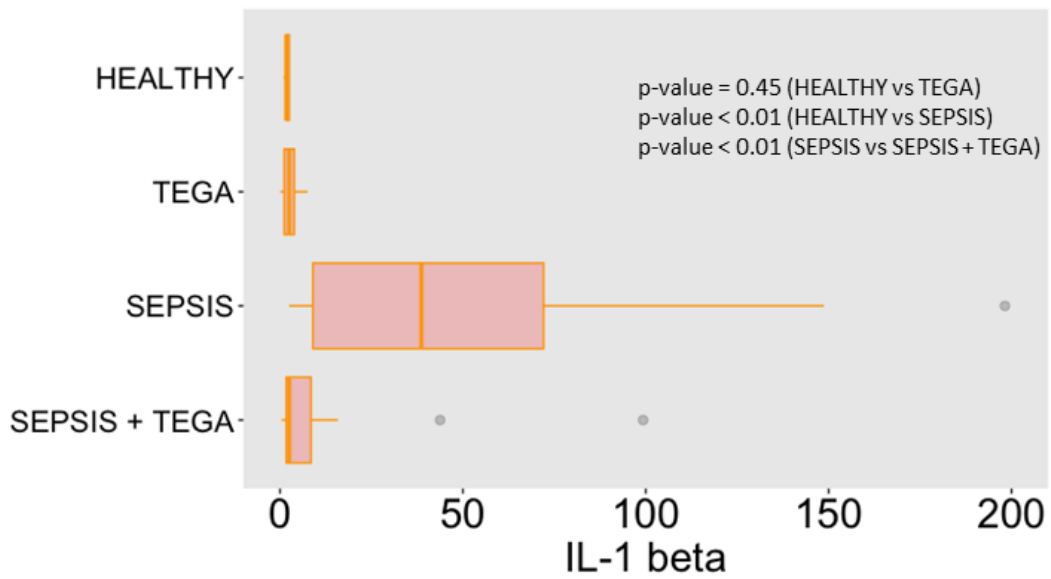


Figura 16 - Dosagem da concentração sanguínea de IL-1 β nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey)

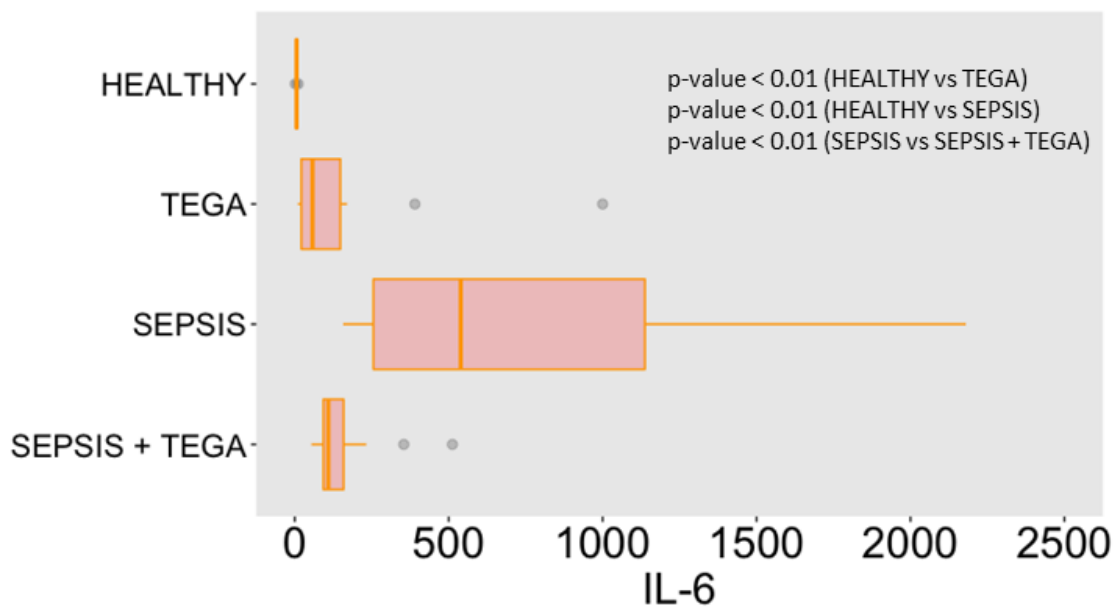


Figura 17 - Dosagem da concentração sanguínea de IL-6 nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey)

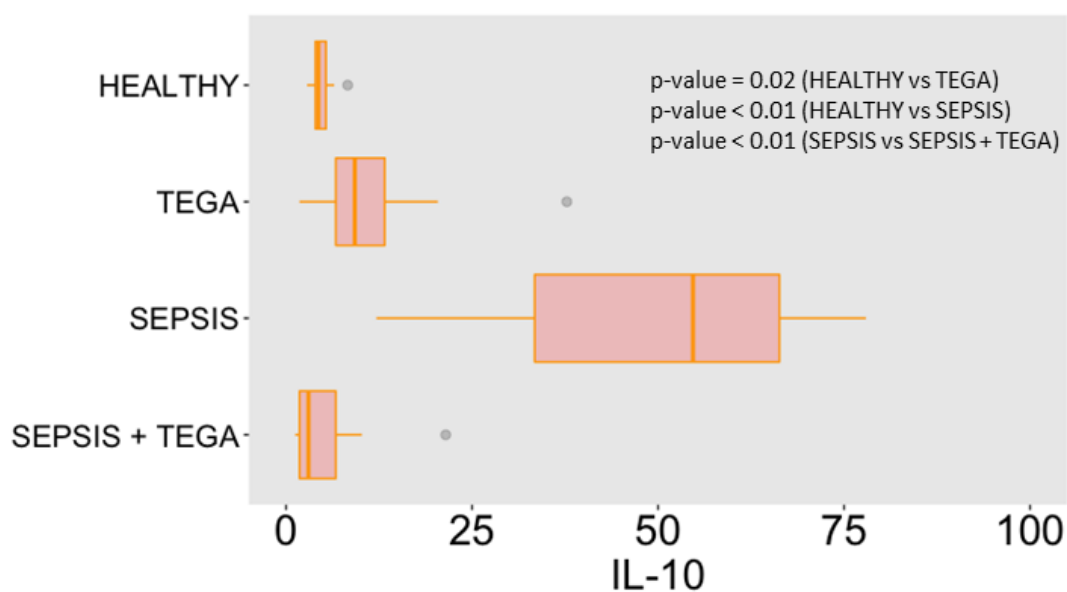


Figura 18 - Dosagem da concentração sanguínea de IL-10 nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey)

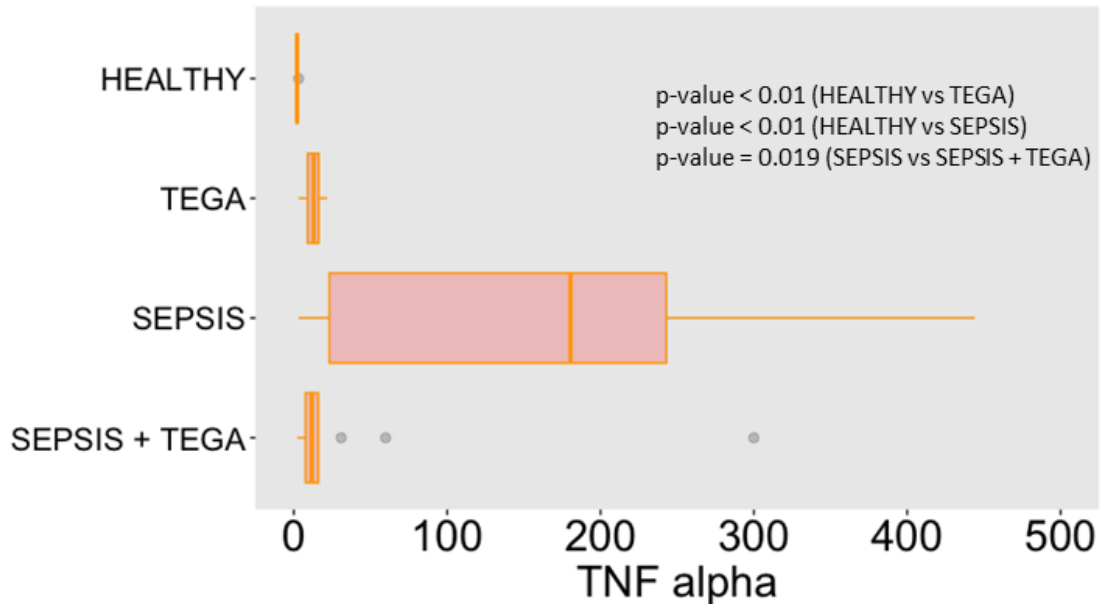


Figura 19 - Dosagem da concentração sanguínea de TNF- α nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey)

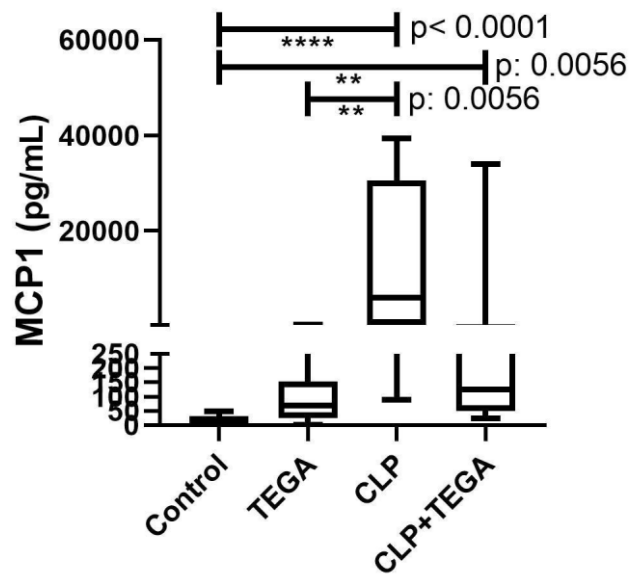


Figura 20 - Dosagem da concentração sanguínea de MCP1 nos grupos experimentais (ANOVA/Tukey)

5 Discussão

Indubitavelmente, aceitar o desafio, no que diz respeito ao estudo de duas doenças tão complexas do ponto de vista fisiopatológico e imunológico, trouxe, ao longo do estudo, um aprendizado sem precedentes e, ao que se tem conhecimento, este é o primeiro estudo em que se almeja buscar mecanismos de inibição de processos deletérios ao hospedeiro, a exemplo da inflamação.

As próximas décadas serão marcadas por um avanço ainda maior concernente às pesquisas voltadas para o Câncer e Sepsis. Especificamente em relação à LMA, estes avanços prometem ser ainda maiores. Por isso, este estudo buscou um caminho de respostas imunes e atuação de receptores nesta complexa rede de mecanismos de imunoterápicos.

Os FcγRs são expressos por diferentes células imunes e tornam-se ativadas após agregação por complexos multivalentes antígeno-anticorpo. Neste contexto, é importante salientar a relevância dos polimorfismos funcionais nas regiões codificantes dos diferentes FcγRs, uma vez que impactam a afinidade por IgG. Este polimorfismo instiga o desenvolvimento de pesquisas que propiciem respostas imunes favoráveis no contexto clínico.

O impacto dos polimorfismos FcγR na eficácia clínica pode ser modulado por vários fatores, como expressão alvo, indicação, população de pacientes, regime de dosagem, disponibilidade de células efetoras e terapia concomitante, resultando em mais ou efeitos menos pronunciados. Os estudos sugerem que inúmeros fatores

envolvidos e que precisam ser minuciosamente estudados no intuito de respostas satisfatórias e descobertas que beneficiem a sociedade como um todo.

No estudo de Mkadden et al. (78) essa capacidade de controle dos FcRs quanto à imunidade humoral e inata é explorada, demonstrando o papel essencial para respostas adequadas a infecções e prevenção de inflamação crônica ou doenças autoimunes, de tal modo que os FcRs exercem diferentes funções, atuando na modulação da resposta imunológica mediada pela presença de citocinas ou no processo de fagocitose.

Neste contexto, buscamos “explorar”, na execução deste projeto, um receptor imune altamente versátil, o CD16. O FcR pode amplificar ou abreviar o processo inflamatório presente na patogênese da LMA, apresentando resposta celular de modo a ativar ou inibir.

Com base em experimentos que concernem à funcionalidade do CD16 em modelo murino de LMA sobre a ativação de sinalização de ITAMi por intermédio da proteína WzXe e seus impactos. Não foram observados resultados significantes em uma análise preliminar, dada a complexidade e heterogeneidade da LMA. Este tipo de Câncer não é um tipo de tumor sólido e sim um tumor hematogênico, o que dificulta a análise laboratorial e pesquisas concernente a terapias. Contudo, a instrução e direcionamento para cada uma das variantes genótípicas da LMA são tidos como um intenso desafio para os estudos.

Ambas as classes de anticorpos terapêuticos apresentam comumente suas importâncias dadas ao domínio Fc de IgG, que conecta a especificidade fina de um anticorpo com células imunes que atuam mediando as funções efetoras desencadeadas por anticorpos através de seu envolvimento de membros da família

do receptor Fc (FcR). Os estudos tornaram compreensíveis suas múltiplas variáveis, incluindo a natureza das moléculas alvo, a presença local de células efectoras e os padrões de expressão de FcRs, estabelecendo como um anticorpo necessitará de interações com FcRs para mediar os efeitos terapêuticos de forma ideal. Assim, por meio de análises mecânicas *in vivo* cuidadosas de anticorpos terapêuticos individuais, os domínios Fc projetados para o envolvimento ideal dos FcRs celulares apropriados devem ser projetados para maximizar o sucesso clínico.

5.1 Experimentos com CD16

Inegavelmente, a exploração de peptídeos que mimetizam a ligação com receptores Fc instigam a procura por drogas que possuem atividade na modulação de funções efectoras. (118) A princípio, foi proposta a avaliação dos efeitos biológicos e terapêuticos do peptídeo WzXe, com a finalidade de pesquisar se este ligante do CD16, há pouco descoberto, possuiria a capacidade de bloquear a apoptose, em um modelo Leucêmico. O impedimento do clearance bacteriano e a redução da produção de ROS por meio da sinalização de ITAMi são ocasionados pelo peptídeo sintético CYWGGTEGAC (sequência do WzXe, ligante do CD16) que possui capacidade de “imitar” a ligação de *E. coli* com CD16. (160) Assim, gerou-se a intenção de investigar o efeito terapêutico desta interação, com a hipótese de que a sinalização poderia ser mediada por ITAMi (anti-inflamatória). (160, 161)

Certamente, há pontos que precisam ser aprimorados com o objetivo de alcançar resultados mais concretos. Por exemplo, este estudo não encontrou diferença estatística entre os grupos e uma alternativa a esta questão seria aumentar o número de camundongos de cada grupo para buscarmos obter diferença estatística.

Ainda sobre o questionamento do parágrafo anterior, buscou-se estabelecer pontos que pudessem estar contribuindo para que o estudo tivesse uma significância do ponto de vista estatístico. O primeiro questionamento efetivado deveu-se ao tipo celular envolvido. Neste estudo, o tipo celular utilizado são células U937, mas, tendo em vista o desfecho atual, não seria melhor que se fizesse a troca por um modelo celular mais específico. Por exemplo, as células HL60, que compreendem células com maturação cujas propriedades são semelhantes às dos mieloblastos e promielócitos. Além disso, estas células exibem características morfológicas e outras características de células mielóides mais maduras. Uma característica importante deste tipo de celular e de células HL60 é a capacidade de uma variedade de agentes para aumentar a proporção de células que se diferenciam *in vitro* até 90% e a capacidade de populações celulares clonadas para diferenciar seja a granulócitos ou a monócitos / macrófagos células dependendo da natureza do agente indutor.

O modelo experimental em discussão também levou a um outro questionamento acerca da expressão de receptores de membrana. Sabe-se que tanto os monócitos quanto os macrófagos expressam o CD16. No entanto, observou-se, através dos resultados, que há uma tendência na morte celular ou diminuição na diferenciação da linhagem neutrofílica.

5.2 Peptídeo TEGA e LMA

A princípio, o TEGA não alterou o desenho experimental em modelo experimental leucêmico. Os resultados desfavoráveis do presente estudo, podem estar relacionados a dose insuficiente do peptídeo ou mesmo pela proteólise por enzimas endógenas dos animais, assim que o peptídeo é administrado. A execução

de novos estudos que considerem diferentes doses ou a manipulação da estrutura peptídica, a fim de promover ajustes nas suas características farmacocinéticas, podem ser estratégias relevantes para otimizar a absorção e prolongar seu tempo de meia-vida (concentração eficaz). (162) Equilibrar a estrutura peptídica, tal como inibir sua degradação, diferentes vias de administração, observar alterações nas manifestações clínicas, além de um maior tempo de tratamento, podem ser analisados para investigar e avaliar os efeitos do CYWGGTEGAC, como um viável tratamento para a LMA.

As características dos peptídeos de baixa toxicidade, elevada especificidade, facilidade de sua modificação estrutural, regulação da farmacodinâmica e melhor custo-benefício, comparado a anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes, apresentam vantagens na busca e persistência de seus efeitos para o tratamento de doenças como LMA. Certamente, seria interessante que testes *in vivo* e *in vitro* para melhor compreensão do mecanismo e validar o TEGA como opção terapêutica nesta doença.

Por fim, é importante salientar que os resultados incipientes apresentados no presente estudo poderão ser futuramente uma nova opção de tratamento para a LMA. Com o avanço da imunoterapia, o tratamento da LMA será de forma individual, a depender do estágio em que a doença se encontra, de características genéticas e do perfil clínico do paciente.

5.3 Peptídeo TEGA e Sepsis

Num segundo momento da pesquisa, optou-se por buscar estabelecer, através de um protocolo, conforme descrito em materiais e métodos, se o peptídeo

TEGA possui algum fator de proteção no grupo TEGA. Foram 38 dias de injeções em duas etapas, o que possibilitou evidenciar que há um maior número de mortes de camundongos no grupo que não recebeu TEGA logo nos primeiros dias após a realização da CLP. Estes resultados permitem concluir, portanto, que o TEGA induzia menor resposta inflamatória nestes animais.

A alteração da curva de mortalidade foi bem evidente, após a realização do CLP e, com o acompanhamento destes animais ao longo das horas e dias, foi possível observar que os camundongos do grupo TEGA mantinham-se ativos e alimentavam-se naturalmente e que os óbitos vieram alguns dias depois. Em contrapartida, os animais do grupo CLP, apresentavam-se, logo nas primeiras horas, prostrados e com tremores expressivos. De início, já era possível observar a morte precoce dos camundongos que não tiveram a inoculação do peptídeo TEGA.

Esta constatação ratificou-se ao ser realizada a análise estatística da curva de mortalidade e, posteriormente, ao ser analisado e comparado com a resposta inflamatória seguindo o mesmo protocolo instituído para análise da curva de mortalidade, só que desta vez realizando a eutanásia vinte quatro horas após a realização do modelo de CLP.

É interessante observar a quase equivalência do grupo controle, que não passou por nenhum tipo de procedimento, com o grupo CLP+TEGA, uma vez que se manteve estável quando observados os resultados comparativos no que se refere ao perfil da resposta inflamatória.

O controle na produção de mediadores como a IL-6 propicia uma queda acentuada na resposta inflamatória exacerbada e pode contribuir para a melhora da sobrevivência. A IL-6 produzida rápida e transitoriamente em resposta a infecções e

lesões teciduais contribui para a defesa do hospedeiro por meio da estimulação das respostas de fase aguda, hematopoiese e reações imunológicas. Registre-se que, apesar de a expressão de IL-6 ser completamente coordenada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, a continuidade de sua síntese de forma exacerbada estimula o processo inflamatório de forma crônica e na autoimunidade. (163)

Um outro potente inibidor das citocinas e que também ganhou destaque no presente estudo foi a IL-10. Quando comparados os quatro grupos, observou-se uma baixa expressão de IL-10 no modelo CLP + TEGA. Esta expressão não demonstrou diferença estatística quando comparado ao grupo controle, demonstrando uma similaridade nestes grupos.

A resposta imune se mostra aumentada a fim de proteger o hospedeiro de patógenos, assim como há necessidade de mecanismos paralelos para o equilíbrio dessa resposta exacerbada a fim de prevenir e limitar danos ao indivíduo. A citocina IL-10 apresenta-se aumentada na fase anti-inflamatória e apresenta efeitos potenciais na prevenção de patologias que envolvem o processo inflamatório e doenças autoimunes. (164–166) Estudos mostram que a produção ininterrupta de IL-10 pode contribuir no agravamento da imunossupressão induzida pela sepse e, por consequência, pode aumentar a vulnerabilidade a infecções microbianas secundárias. (167, 168)

A sepse permanece apresentando riscos de morbidade e mortalidade em pacientes acometidos. Estudos clínicos e *in vivo* descrevem que as mudanças na resposta imune exercem importantes efeitos na condução da infecção. Usando um modelo clinicamente relevante de sepse através da CLP, caracterizamos a resposta

imune do hospedeiro. O impedimento do *clearance* bacteriano e a redução da produção de ROS por meio da sinalização de ITAMi é ocasionado pelo peptídeo sintético CYWGGTEGAC que possui capacidade de mimetizar a interação *E. coli* com CD16. Os camundongos submetidos a CLP apresentaram diferenças nas taxas de sobrevivência, quando analisamos a curva de mortalidade em relação ao tempo. Essa melhora na sobrevida pode estar associada à diminuição na produção de ROS, à redução da resposta inflamatória e, conseqüentemente, ao choque séptico ligado a esta resposta inflamatória exacerbada. Esse modelo pode também estar envolvido em queda importante do número de antígenos na corrente sanguínea, propiciando, desta forma, melhor desfecho clínico e melhora na sobrevida. É importante ressaltar que o TEGA melhorou a sobrevida após SEPSE induzida por modelo de CLP. Estes ensaios são importantes para direcionar novos estudos sobre os mecanismos de ação com o intuito do desenvolvimento de uma terapia realmente eficaz contra a sepse, tendo em vista que, até o presente momento, o que há disponível são medidas paliativas no controle desta síndrome tão complexa. Neste contexto, o aumento na sobrevida e na modulação da resposta imunológica pode ser um determinante no controle da infecção.

De acordo com os tópicos já elucidados na literatura, a sepse grave condiciona o paciente a condições altamente associadas à morbidade e à mortalidade. Destaque-se que, para o desenvolvimento de terapias e estratégias eficazes de forma eminente para seu tratamento, as mudanças da resposta imune do hospedeiro tornam-se um empecilho e necessitam ser explanadas. Sabendo-se, portanto, que a sepse manifesta uma cascata de ativações, incluindo a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e que estão diretamente ligadas ao aumento da mortalidade.

A produção sistêmica de citocinas de caráter pró-inflamatório, como IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ caracterizam a fase inicial da sepse, causando efeitos prejudiciais ao hospedeiro e resistência na erradicação do estado hiper inflamatório. (169–171) Esta “tempestade de citocinas” hiper inflamatória pode levar a danos significativos ao órgão-alvo e morte em um subconjunto de pacientes. Concomitante a resposta inicial, a coprodução simultânea de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, atua no equilíbrio do processo inflamatório. Assim, como resultado, grande parte dos pacientes sobrevivem ao estado hiper inflamatório inicial e progridem para um período prolongado de supressão. (169–171)

Estudos *in vivo*, assim como recentes estudos clínicos, têm demonstrado a gravidade da imunossupressão induzida por sepse tardia e sua contribuição para a mortalidade da síndrome. (172) Pesquisadores apresentaram que os níveis da presença citocinas pró e anti-inflamatórias podem ser associadas com o agravamento da enfermidade. (173–175) Como exemplo, destacamos a IL-10 caracterizada como uma eficiente citocina anti-inflamatória, uma vez que a sua baixa concentração acarretou o prognóstico negativo em pacientes com sepse, e a modulação positiva de IL-10 em modelos animais induzidos à sepse apresentou melhora na sobrevida. (176–178) A sepse e a falha multiorgânica resultante. Infelizmente, as modalidades terapêuticas disponíveis apresentam falhas, incluindo terapias que se mostraram promissoras em estudos experimentais. Devido à duradoura fase de imunossupressão, os pacientes com sepse confrontam ao risco de apresentar infecções secundárias. Os estudos demonstraram este risco aumentado em pacientes sépticos e modelos animais de sepse. Sendo este estudo o primeiro experimento afim de observar as respostas do hospedeiro em relação a sepse, nosso primeiro objetivo

foi caracterizar ainda mais a extensão e a duração da sobrevida após a infamação induzida em modelo de (CLP).

As pesquisas envolvendo experimentos do peptídeo TEGA no que diz respeito à busca de uma terapêutica eficaz contra doenças altamente complexas como LMA e Sepse são promissoras e podem revolucionar a terapia contra estas patologias responsáveis por milhares de mortes no mundo inteiro. Neste contexto, torna-se imprescindível a manutenção de pesquisas envolvendo experimentos com peptídeo TEGA no que diz respeito à busca de uma terapêutica eficaz contra doenças altamente complexas como LMA e Sepse por serem promissoras e poderem revolucionar a terapia contra estas patologias responsáveis por milhares de mortes no mundo inteiro. A relação de seu melhor custo-benefício, redução de efeitos colaterais comparados às terapias convencionais, decorrentes de sua sequência de aminoácidos mais curta, torna ainda mais vantajosa a possibilidade de sua validação terapêutica. Além disso, devido a sua produção ser de forma sintética, a contaminação por produtos sanguíneos seria menos preocupante. (179)

Logo, a ciência, a pesquisa científica é, sem dúvida alguma, a mola propulsora que impulsiona e permite que a humanidade possa ultrapassar grandes desafios como os que temos vivido nos últimos dois anos. Neste contexto, poder estudar, pesquisar e contribuir para encontrar propostas terapêuticas para duas doenças tão complexas e tão desafiadoras como Câncer e Sepse, torna-se, inegavelmente, algo prazeroso para qualquer pesquisador. Câncer e sepse são graves problemas de saúde pública responsáveis por altas taxas de mortalidade e custos elevador para a saúde pública. Portanto, acreditar que estudos como estes, ainda que em fase inicial e caráter experimental possam (a longo prazo) contribuir para reduzir tempo de internação, reduzir os efeitos deletérios inerentes aos processos inflamatórios e

consequentemente a imunossupressão, além de reduzir mortalidade como mostramos anteriormente nos resultados, nos levam a acreditar que, em alguns anos, teremos mais opções terapêuticas em nosso arsenal para tratarmos estas graves patologias que acometem a humanidade.

6 Conclusões

De acordo com os resultados apresentados, concluímos, portanto, que:

- Em camundongos com leucemia, o tratamento com peptídeo TEGA, com as doses e tempo avaliados, não modulou os parâmetros investigados.
- Em modelo experimental de choque séptico, a mortalidade em modelos TEGA mostrou-se menor quando comparado ao grupo controle.
- CD16 protege o hospedeiro em modelo de choque séptico modificando o perfil inflamatório.
- Conclui-se que há uma redução significativa de mediadores inflamatórios no grupo de sepse com TEGA. Valores comparáveis ao grupo saudável
- O modelo experimental de choque séptico mostrou-se, portanto, ser capaz de reduzir a mortalidade e os desfechos inflamatórios desfavoráveis através do protocolo de infusão do peptídeo TEGA.
- O estudo em questão, abre novas portas para o avanço em pesquisas contra uma síndrome com alta mortalidade, reduzindo a evolução desfavorável e alterando o curso da mortalidade .
- Não há dúvidas quanto ao envolvimento dos FcRs, especialmente ao CD16, em respostas regulatórias do organismo e o quanto estudos

como este podem mudar a dinâmica e o desfecho de uma doença até então sem um tratamento específico.

- Concluo a tese certo de que pudemos demonstrar o quão importante foram os experimentos e a pesquisa ao longo destes anos, uma vez que, com este estudo, obtivemos resultados de significativa e considerável relevância, como o aumento da sobrevida, caracterizando o expressivo potencial terapêutico da proteína WzxE.

7 Anexos

ANEXO A - Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais



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 a proposta intitulada “**Potencial terapêutico da proteína WzXe no microambiente tumoral**”, registrada com o nº **933/2017**, sob a responsabilidade de **Fabiano Pinheiro da Silva e Rafael Abadessa Goncalves**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 11.10.2017

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 15-01-2018 Término: 15-01-2019
Espécie/linhagem/raça	CAMUNDONGO SPF - NOD/SCID
Nº de animais	150
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério da FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 11 de Outubro de 2017

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

ANEXO B - Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais

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 a proposta intitulada “**Investigação do potencial terapêutico da proteína WzXe na em modelo experimental de choque séptico**”, registrada com o nº **1372/2019**, sob a responsabilidade de **Fabiano Pinheiro da Silva e Rafael Abadessa Goncalves**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 04.09.19

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 14-09-2019 Término: 14-08-2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6
Nº de animais	40
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 04 de Setembro de 2019

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

8 Referências

1. Mkaddem S ben, Christou I, Rossato E, Berthelot L, Lehuen A, Monteiro RC. IgA, IgA receptors, and their anti-inflammatory properties. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2014;382:221–35.
2. Ravetch J v., Bolland S. IgG Fc Receptors. *Annual Review of Immunology*. 2001;19(1):275–90.
3. Karsten CM, Köhl J. The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiology*. 2012;217(11):1067–79.
4. Nimmerjahn F, Ravetch J. Fc gamma Rs in health and disease. In: Ahmed R, Honjo T, editors. *Negative Co-Receptors and Ligands*. Berlin: Springer-Verlag Berlin; 2011. p. 105–25.
5. Ding-E Young J, Ko SS, Cohn ZA. The increase in intracellular free calcium associated with IgG_{2b}/yl Fc receptor-ligand interactions: Role in phagocytosis (receptor aggregation/quin-2/monoclonal antibody/transmembrane ion flux/ion channel). *Cell Biology*. 1984;81:5430–4.
6. Phillips NE, Parker DC. Fc-dependent inhibition of mouse B cell activation by whole anti-mu antibodies. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1983;130(2):602–6.
7. Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH. Structure and Function of Human and Murine Receptors for IgG. *Annual Review of Immunology*. 1988;6(1):251–81.
8. Kubagawa H, Oka S, Kubagawa Y, et al. Identity of the elusive IgM Fc receptor (Fc μ R) in humans. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(12):2779–93.
9. Ravetch J v, Kinet JP. Fc Receptors. *Annual Review of Immunology*. 1991;9(1):457–92.
10. Hulett MD, Witort E, Brinkworth RI, McKenzie IFC, Hogarth PM. Identification of the IgG binding site of the human low affinity receptor for IgG Fc γ RII. Enhancement and ablation of binding by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(21):15287–93.
11. Tamm A, Schmidt RE. IgG Binding Sites on Human Fc γ Receptors. *International Reviews of Immunology*. 1997;16(1–2):57–85.

12. Ballou M. Primary immunodeficiency disorders: Antibody deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002;109(4):581–91.
13. Guevara Patiño JA, Holder AA, McBride JS, Blackman MJ. *Antibodies that Inhibit Malaria Merozoite Surface Protein-1 Processing and Erythrocyte Invasion Are Blocked by Naturally Acquired Human Antibodies*. 1997. 1689–1699 p. Available from: <http://www.jem.org>.
14. Smith KGC, Clatworthy MR. FcγRIIB in autoimmunity and infection: Evolutionary and therapeutic implications. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(5):328–43.
15. Dahan R, Segal E, Engelhardt J, Selby M, Korman AJ, Ravetch JV. FcγRs Modulate the Anti-tumor Activity of Antibodies Targeting the PD-1/PD-L1 Axis. *Cancer Cell*. 2015;28(3):285–95.
16. Galon J, Bouchard C, Fridman WH, Sauts C. Ligands and biological activities of soluble Fcγ receptors. *Immunol Lett*. 1995. 175–181 p.
17. Tanigaki K, Sundgren N, Khera A, Vongpatanasin W, Mineo C, Shaul PW. Fcγ receptors and ligands and cardiovascular disease. *Circulation Research*. 2015;116(2):368–84.
18. Akula S, Mohammadamin S, Hellman L. Fc receptors for immunoglobulins and their appearance during vertebrate evolution. *PLoS ONE* [Internet]. 2014;9(5) doi:10.1371/journal.pone.0096903.
19. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(47):40608–13.
20. Dilillo DJ, Ravetch J v. Fc-receptor interactions regulate both cytotoxic and immunomodulatory therapeutic antibody effector functions. *Cancer Immunology Research*. 2015;3(7):704–13.
21. Stapleton NM, Einarisdóttir HK, Stemerding AM, Vidarsson G. The multiple facets of FcRn in immunity. *Immunological Reviews*. 2015;268(1):253–68.
22. Pincetic A, Bournazos S, Dilillo DJ, et al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*. 2014;15(8):707–16.
23. Ivashkiv LB. How ITAMs inhibit signaling. *Science Signaling*. 2011;4(169).
24. Getahun A, Cambier JC. Of ITIMs, ITAMs, and ITAMis: Revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunological Reviews*. 2015;268(1):66–73.

25. Kimberly RP, Wu J, Gibson AW, et al. Diversity and Duplicity: Human Fcγ Receptors in Host Defense and Autoimmunity. *Immunologic Research*. 2002;26(1–3):177–90.
26. Zhang Y, Boesen CC, Radaev S, et al. Crystal Structure of the Extracellular Domain of a Human FcRIII to 10. *Immunity*. 2000. 387–395 p.
27. da Silva FP, Aloulou M, Benhamou M, Monteiro RC. Inhibitory ITAMs: a matter of life and death. *Trends in Immunology*. 2008;29(8):366–73.
28. Galon J, Gauchat J, Mazières N, et al. Soluble Fcγ receptor type III (FcγRIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors. *J Immunol*. 1996;157(3):1184–92.
29. Bruhns P, Iannascoli B, England P, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009;113(16):3716–25.
30. Hulett MD, Hogarth PM. Molecular Basis of Fc Receptor Function. *Advances in immunology*. 1994;57:1–127.
31. Powell MS, Hogarth PM. Fc Receptors. *Multichain Immune Recognition Receptor Signaling*. New York, NY: Springer New York; 2008. p. 22–34. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-09789-3_3.
32. Daëron M. *FC receptor biology*. 1997. 203–237 p. Available from: www.annualreviews.org.
33. Deusch K, Pfeffer K, Reich K, et al. Phenotypic and functional characterization of human TCR gamma delta+ intestinal intraepithelial lymphocytes. *Current topics in microbiology and immunology*. 1991;173:279–83.
34. Woodward J, Jenkinson E. Identification and characterization of lymphoid precursors in the murine intestinal epithelium. *European Journal of Immunology*. 2001;31(11):3329–38.
35. Dhanji S, Tse K, Teh H-S. The Low Affinity Fc Receptor for IgG Functions as an Effective Cytolytic Receptor for Self-Specific CD8 T Cells. *The Journal of Immunology*. 2005;174(3):1253–8.
36. RETH M. Antigen receptor tail clue. *Nature*. 1989;338(6214):383–4.
37. Nimmerjahn F, Ravetch J v. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(1):34–47.
38. Billadeau DD, Leibson PJ. ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *Journal of Clinical Investigation*. 2002;109(2):161–8.

39. Ravetch J v., Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science*. 2000;290(5489):84–9.
40. Mackay M, Stanevsky A, Wang T, et al. Selective dysregulation of the FcγIIb receptor on memory B cells in SLE. *Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(9):2157–64.
41. Nunes P, Demaurex N. The role of calcium signaling in phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010;88(1):57–68.
42. Scharenberg AM, Humphries LA, Rawlings DJ. Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(10):778–89.
43. Choquet D, Partiseti M, Amigorena S, Bonnerot C, Fridman WH, Korn H. Cross-linking of IgG receptors inhibits membrane immunoglobulin-stimulated calcium influx in B lymphocytes. *Journal of Cell Biology*. 1993;121(2):355–63.
44. Fluckiger A-C, Li Z, Kato RM, et al. Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation. *The EMBO Journal*. 1998;17(7):1973–85.
45. Yuasa T, Kubo S, Yoshino T, et al. *Deletion of Fc Receptor IIB Renders H-2 b Mice Susceptible to Collagen-induced Arthritis*. 1999. 187–194 p. Available from: <http://www.jem.org>.
46. Bolland S, Ravetch J v. Spontaneous Autoimmune Disease in FcγRIIB-Deficient Mice Results from Strain-Specific Epistasis. *Immunity*. 2000;13(2):277–85.
47. Nakamura A, Yuasa T, Ujike A, et al. Fcγ Receptor Iib–Deficient Mice Develop Goodpasture’s Syndrome upon Immunization with Type IV Collagen. *Journal of Experimental Medicine*. 2000;191(5):899–906.
48. Liossis S-NC, Kovacs B, Dennis G, Kammer GM, Tsokos GC. Signal Transduction in SLE B Cells B Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Display Abnormal Antigen Receptor-mediated Early Signal Transduction Events. *J Clin Invest* 1996. 2549–2557 p.
49. Enyedy EJ, Nambiar MP, Liossis S-NC, Dennis G, Kammer GM, Tsokos GC. *Fc Receptor Type I Chain Replaces the Deficient T Cell Receptor Chain in T Cells of Patients With Systemic Lupus Erythematosus*. 2001. 1114–1121 p.
50. Tsokos GC. Calcium signaling in systemic lupus erythematosus lymphocytes and its therapeutic exploitation. *Arthritis & Rheumatism*. 2008;58(5):1216–9.
51. Pearse RN, Kawabe T, Bolland S, Guinamard R, Kurosaki T, Ravetch J v. SHIP Recruitment Attenuates FcγRIIB-Induced B Cell Apoptosis. *Immunity*. 1999;10(6):753–60.

52. Tzeng SJ, Bolland S, Inabe K, Kurosaki T, Pierce SK. The B cell inhibitory Fc receptor triggers apoptosis by a novel c-Abl family kinase-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(42):35247–54.
53. Melamed D, Benschop RJ, Cambier JC, Nemazee D. Developmental Regulation of B Lymphocyte Immune Tolerance Compartmentalizes Clonal Selection from Receptor Selection. *Cell*. 1998;92(2):173–82.
54. Limnander A, Depeille P, Freedman TS, et al. *Stim1, PKC δ and RasGRP proteins set a threshold for pro-apoptotic Erk signaling during B cell development*. 2011. 425–433 p. Available from: http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms.
55. Mancardi DA, Iannascoli B, Hoos S, England P, Daëron M, Bruhns P. Fc γ RIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage Fc ϵ RI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(11):3738–50.
56. Kulczycki A, Metzger H. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1974;140(6):1676–95.
57. Daëron M, Duc HT, Kanellopoulos J, le Bouteiller Ph, Kinsky R, Voisin GA. Allogeneic mast cell degranulation induced by histocompatibility antibodies: An in vitro model of transplantation anaphylaxis. *Cellular Immunology*. 1975;20(2):133–55.
58. Daëron M, Jaeger S, du Pasquier L, Vivier E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunological Reviews*. 2008;224(1):11–43.
59. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual Review of Immunology*. 2007;25:21–50.
60. Veri MC, Gorlatov S, Li H, et al. Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fc γ -receptor IIB (CD32B) from the activating Fc γ -receptor IIA (CD32A): Biochemical, biological and functional characterization. *Immunology*. 2007;121(3):392–404.
61. Daëron M. *Fc Receptors as Adaptive Immunoreceptors In: Fc Receptors*. Cham: Springer International Publishing; 2014. 131–164 p.
62. Jönsson F, Mancardi DA, Kita Y, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(4):1484–96.

63. Metzger H. Transmembrane signaling: the joy of aggregation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1992;149(5):1477–87.
64. Powell MS, Barnes NC, Bradford TM, et al. Alteration of the FcγRIIa Dimer Interface Affects Receptor Signaling but Not Ligand Binding. *The Journal of Immunology*. 2006;176(12):7489–94.
65. Daëron M, Latour S, Malbec O, et al. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intra-cytoplasmic domain of FcγRIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity*. 1995;3(5):635–46.
66. Choquet D, Ku G, Cassard S, et al. Different patterns of calcium signaling triggered through two components of the B lymphocyte antigen receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(9):6491–7.
67. Bezman N, Koretzky GA. *Compartmentalization of ITAM and integrin signaling by adapter molecules*. *Immunol Rev* 2007. 9–28 p.
68. Wofsy C, Goldstein B, Dembo M. Theory of equilibrium binding of asymmetric bivalent haptens to cell surface antibody: application to histamine release from basophils. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1978;121(2):593–601.
69. Gimborn K, Lessmann E, Kuppig S, Krystal G, Huber M. SHIP Down-Regulates FcεR1-Induced Degranulation at Supraoptimal IgE or Antigen Levels. *The Journal of Immunology*. 2005;174(1):507–16.
70. Huber M, Helgason CD, Damen JE, Liu L, Humphries RK, Krystal G. The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(19):11330–5.
71. Nakamura K, Malykhin A, Coggeshall KM. The Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase negatively regulates Fcγ receptor-mediated phagocytosis through immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing phagocytic receptors. *Blood*. 2002;100(9):3374–82.
72. Malbec O, Malissen M, Isnardi I, et al. Linker for Activation of T Cells Integrates Positive and Negative Signaling in Mast Cells. *The Journal of Immunology*. 2004;173(8):5086–94.
73. Underhill DM, Goodridge HS. The many faces of ITAMs. *Trends in Immunology*. 2007;28(2):66–73.
74. Bournazos S, Gupta A, Ravetch J v. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nature Reviews Immunology*. 2020;20(10):633–43.

75. Peterson ME, Long EO. Inhibitory Receptor Signaling via Tyrosine Phosphorylation of the Adaptor Crk. *Immunity*. 2008;29(4):578–88.
76. Long EO. *Regulation of immune responses through inhibitory receptors*. 1999. 875–904 p. Available from: www.annualreviews.org.
77. Vivier E, Daëron M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunology Today*. 1997;18(6):286–91.
78. Mkaddem S ben, Benhamou M, Monteiro RC. Understanding Fc receptor involvement in inflammatory diseases: From mechanisms to new therapeutic tools. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(APR).
79. Mkaddem S ben, Murua A, Flament H, et al. Lyn and Fyn function as molecular switches that control immunoreceptors to direct homeostasis or inflammation. *Nature Communications* [Internet]. 2017;8(1) doi:10.1038/s41467-017-00294-0.
80. Chan VWF, Lowell CA, DeFranco AL. Defective negative regulation of antigen receptor signaling in Lyn-deficient B lymphocytes. *Current Biology*. 1998;8(10):545–53.
81. Lowell CA. Src-family kinases: Rheostats of immune cell signaling. *Molecular Immunology*. 2004;41(6–7):631–43.
82. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch J v. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine*. 2000;6(4):443–6.
83. Hernandez-Ilizaliturri FJ, Reddy N, Holkova B, Ottman E, Czuczman MS. Immunomodulatory drug CC-5013 or CC-4047 and rituximab enhance antitumor activity in a severe combined immunodeficient mouse lymphoma model. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(16):5984–92.
84. Kinet J-P, Blank U, Ra C, White K, Metzger H, Kochanf J. *Isolation and characterization of cDNAs coding for the j3 subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E (basophilic leukemia cells/Fc receptor/monoclonal/cloning)*. 1988. 6483–6487 p.
85. Perussia B, Tutt MM, Qiu WQ, et al. Murine natural killer cells express functional Fc gamma receptor II encoded by the Fc gamma R alpha gene. *Journal of Experimental Medicine*. 1989;170(1):73–86.
86. Davis RS. Definition of an Fc receptor-related gene (FcRX) expressed in human and mouse B cells. *International Immunology*. 2002;14(9):1075–83.
87. Edberg JC, Kimberly RP. Cell type-specific glycoforms of Fc gamma RIIa (CD16): differential ligand binding. *Journal of immunology* (Baltimore, Md: 1950). 1997;159(8):3849–57.

88. Kimberly RP, Tappe NJ, Merriam LT, et al. Carbohydrates on human Fc gamma receptors. Interdependence of the classical IgG and nonclassical lectin-binding sites on human Fc gamma RIII expressed on neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1989;142(11):3923–30.
89. van der Heijden J, Breunis WB, Geissler J, de Boer M, van den Berg TK, Kuijpers TW. Phenotypic Variation in IgG Receptors by Nonclassical FCGR2C Alleles. *The Journal of Immunology*. 2012;188(3):1318–24.
90. da Silva FP, Aloulou M, Skurnik D, et al. CD16 promotes Escherichia coli sepsis through an FcRγ inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. *Nature Medicine*. 2007;13(11):1368–74.
91. Beppler J, Mkaddem S ben, Michaloski J, et al. Negative regulation of bacterial killing and inflammation by two novel CD16 ligands. *European Journal of Immunology*. 2016;46(8):1926–35.
92. Dueñas-Castell C, Ortiz-Ruiz G, Borré-Naranjo D. Sepsis: A definition under construction. *Sepsis, Third Edition*. Springer New York; 2017. p. 1–9.
93. Williams DL, Li C, Ha T, et al. Modulation of the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway Alters Innate Resistance to Polymicrobial Sepsis. *The Journal of Immunology*. 2004;172(1):449–56.
94. Kaukonen K-M, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(17):1629–38.
95. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical care medicine*. 1992;20(6):864–74.
96. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):4–11.
97. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Critical Care Medicine*. 2006;34(1):15–21.
98. Kahn JM, Le T, Angus DC, et al. The epidemiology of chronic critical illness in the United States. *Critical Care Medicine*. 2015;43(2):282–7.
99. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: Current dogma and new perspectives. *Immunity*. 2014;40(4):463–75.

100. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987;330(6149):662–4.
101. Schorr CA, Dellinger RP. The Surviving Sepsis Campaign: Past, present and future. *Trends in Molecular Medicine*. 2014;20(4):192–4.
102. Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2011;306(23):2594–605.
103. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: A common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2012;72(6):1491–501.
104. Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. Long-term mortality and quality of life in sepsis: A systematic review. *Critical Care Medicine*. 2010;38(5):1276–83.
105. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the Incidence and Mortality of Severe Sepsis in the United States*. *Critical Care Medicine*. 2013;41(5):1167–74.
106. Needham DM, Davidson J, Cohen H, et al. Improving long-term outcomes after discharge from intensive care unit: Report from a stakeholders' conference. *Critical Care Medicine*. 2012;40(2):502–9.
107. Yende S, D'Angelo G, Kellum JA, et al. Inflammatory markers at hospital discharge predict subsequent mortality after pneumonia and sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2008;177(11):1242–7.
108. Elliott D, Davidson JE, Harvey MA, et al. Exploring the scope of post-intensive care syndrome therapy and care: Engagement of non-critical care providers and survivors in a second stakeholders meeting. *Critical Care Medicine*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014. p. 2518–26.
109. Hotchkiss RS, Moldawer LL. *Parallels between cancer and infectious disease CORE View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk provided by Digital Commons@Becker*. 2014. Available from: http://digitalcommons.wustl.edu/open_access_pubs/3141.
110. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: From cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(12):862–74.

111. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood*. 1993;82(10):3170–6.
112. Daëron M, Lesourne R. Negative Signaling in Fc Receptor Complexes. *Advances in Immunology*. 2006;89:39–86.
113. Endeman H, Cornips MCA, Grutters JC, et al. The Fcγ receptor IIA-R/R131 genotype is associated with severe sepsis in community-acquired pneumonia. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009;16(7):1087–90.
114. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2.
115. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2016;315(8):801–10.
116. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Medicine*. 2021;47(11):1181–247.
117. Marshall JC. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends in Molecular Medicine*. 2014;20(4):195–203.
118. Fink MP, Shaw Warren H. Strategies to improve drug development for sepsis. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014;13(10):741–58.
119. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Medicine*. 2017;43(3):304–77.
120. Marik PE, Linde-Zwirble WT, Bittner EA, Sahatjian J, Hansell D. Fluid administration in severe sepsis and septic shock, patterns and outcomes: an analysis of a large national database. *Intensive Care Medicine*. 2017;43(5):625–32.
121. Dellinger RP, Vincent JL. The surviving sepsis campaign sepsis change bundles and clinical practice. *Critical Care*. 2005;9(6):653–4.
122. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2016;193(3):259–72.

123. van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology*. 2017;17(7):407–20.
124. Langley RJ, Tsalik EL, van Velkinburgh JC, et al. Sepsis: An integrated clinico-metabolomic model improves prediction of death in sepsis. *Science Translational Medicine* [Internet]. 2013;5(195) doi:10.1126/scitranslmed.3005893.
125. Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS data brief*. 2011;(62):1–8.
126. Ruiz S, Vardon-Bounes F, Merlet-Dupuy V, et al. Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. *Intensive Care Medicine Experimental* [Internet]. 2016;4(1) doi:10.1186/s40635-016-0096-z.
127. Vincent J-L, de Mendonca A, Cantraine F, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units. *Critical Care Medicine*. 1998;26(11):1793–800.
128. Gilli K, Remberger M, Hjelmqvist H, Ringden O, Mattsson J. Sequential Organ Failure Assessment predicts the outcome of SCT recipients admitted to intensive care unit. *Bone Marrow Transplantation*. 2010;45(4):682–8.
129. French-O'Carroll R, Frohlich S, Murphy N, Conlon N. Predictors of outcome in decompensated liver disease: validation of the SOFA-L score. *Irish medical journal*. 2015;108(4):114–6.
130. Ward PA. New approaches to the study of sepsis. *EMBO Molecular Medicine*. 2012;4(12):1234–43.
131. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: A novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013;13(3):260–8.
132. Munford RS, Pugin J. *Critical Care Perspective Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive*. 2001. 316–321 p. Available from: www.atsjournals.org.
133. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, et al. A genomic storm in critically injured humans. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(13):2581–90.
134. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood*. 1995;85(5):1341–7.

135. Czura CJ, Tracey KJ. Targeting high mobility group box 1 as a late-acting mediator of inflammation. *Critical Care Medicine*. 2003;31(Supplement):S46–50.
136. Yang H, Ochani M, Li J, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(1):296–301.
137. Li J, Carr B, Goyal M, Gaieski DF. Sepsis: The Inflammatory Foundation of Pathophysiology and Therapy. *Hospital Practice*. 2011;39(3):99–112.
138. Hotchkiss RS, Opal S. Immunotherapy for Sepsis — A New Approach against an Ancient Foe. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(1):87–9.
139. Parrillo J, Dellinger RP. *Critical Care Medicine: Principles of Diagnosis and Management in the Adult*. 5th ed. Elsevier; 2018. 1132–1133 p.
140. Denk S, Perl M, Huber-Lang M. Damage- and pathogen-associated molecular patterns and alarmins: Keys to sepsis? *European Surgical Research*. 2012;48(4):171–9.
141. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Critical Care Medicine*. 2004;32(3):858–73.
142. Cassard L, Jönsson F, Arnaud S, Daëron M. Fcγ Receptors Inhibit Mouse and Human Basophil Activation. *The Journal of Immunology*. 2012;189(6):2995–3006.
143. Ghetie V, Ward ES. Multiple Roles for the Major Histocompatibility Complex Class I–Related Receptor FcRn. *Annual Review of Immunology*. 2000;18(1):739–66.
144. Deusch K, Pfeffer K, Reich K, et al. Phenotypic and functional characterization of human TCR gamma delta+ intestinal intraepithelial lymphocytes. *Current topics in microbiology and immunology*. 1991;173:279–83.
145. Hamerschlak N. Leukemia: genetics and prognostic factors. *Jornal de Pediatria*. 2008;0(0):S52-7.
146. NOWELL PC, HUNGERFORD DA. Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. *Journal of the National Cancer Institute*. 1961;27:1013–35.
147. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;368(9550):1894–907.
148. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000;96(13):4075–83.

149. Kayser S, Döhner K, Krauter J, et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood*. 2011;117(7):2137–45.
150. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*. 2011;469(7330):356–61.
151. Sameer A. Parikh, Jabbour E, Koller CA. Adult Acute Myeloid Leukemia. In: Kantarjian HM, Wolff RA, Koller CA, editors. *Manual of Medical Oncology*. 2011.
152. Ahn YH, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS, Choi Y, Kang HG. Tumour lysis syndrome in children: Experience of last decade. *Hematological Oncology*. 2011;29(4):196–201.
153. Usvasalo A, Rätty R, Harila-Saari A, et al. Acute lymphoblastic leukemias with normal karyotypes are not without genomic aberrations. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2009;192(1):10–7.
154. Hutchison R, Schexneider K. Leukocyte disorder. In: McPherson R, Pincus M, editors. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Elsevier; 2016. p. 632–3.
155. Marolda CL, Tatar LD, Alaimo C, Aebi M, Valvano MA. Interplay of the Wzx translocase and the corresponding polymerase and chain length regulator proteins in the translocation and periplasmic assembly of lipopolysaccharide O antigen. *Journal of Bacteriology*. 2006;188(14):5124–35.
156. Rick PD, Barr K, Sankaran K, Kajimura J, Rush JS, Waechter CJ. Evidence that the wzxE 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. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(19):16534–42.
157. Kajimura J, Rahman A, Rick PD. Assembly of cyclic enterobacterial common antigen in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 2005;187(20):6917–27.
158. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *The FASEB Journal*. 1994;8(2):217–25.
159. Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research*. 2010;49(2):97–107.
160. Bonetto S, Spadola L, Buchanan AG, Jerminus L, Lund J. Identification of cyclic peptides able to mimic the functional epitope of IgG1-Fc for human FcγRI. *The FASEB Journal*. 2009;23(2):575–85.

161. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature Protocols*. 2009;4(1):31–6.
162. Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: A formulation challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005;4(4):298–306.
163. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology [Internet]. 2014;6(10) doi:10.1101/cshperspect.a016295.
164. Hawrylowicz CM, O’Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(4):271–83.
165. O’Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunological Reviews*. 2008;223(1):114–31.
166. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O’Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual Review of Immunology*. 2001;19(1):683–765.
167. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Critical care medicine*. 2002;30(1 Suppl):S58-63.
168. Muehlstedt SG, Lyte M, Rodriguez JL. Increased IL-10 Production and HLA-DR Suppression in the Lungs of Injured Patients Precede the Development of Nosocomial Pneumonia. *Shock*. 2002;17(6):443–50.
169. Döcke W-D, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: Restoration by IFN- γ treatment. *Nature Medicine*. 1997;3(6):678–81.
170. Heidecke C-D, Hensler T, Weighardt H, et al. Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. *The American Journal of Surgery*. 1999;178(4):288–92.
171. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(10):776–87.
172. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: Tilting toward immunosuppression. *Nature Medicine*. 2009;15(5):496–7.
173. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating Cytokine/Inhibitor Profiles Reshape the Understanding of the SIRS/CARS Continuum in Sepsis and Predict Mortality. *The Journal of Immunology*. 2006;177(3):1967–74.

174. Osuchowski MF, Connett J, Welch K, Granger J, Remick DG. Stratification is the key: Inflammatory biomarkers accurately direct immunomodulatory therapy in experimental sepsis. *Critical Care Medicine*. 2009;37(5):1567–73.
175. Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J, Nemzek JA. Six at Six: Interleukin-6 Measured 6 H After the Initiation of Sepsis Predicts Mortality Over 3 Days. *Shock*. 2002;17(6):463–7.
176. Kahlke V, Dohm C, Mees T, Br??tzmann K, Schreiber S, Schr??der J. Early Interleukin-10 Treatment Improves Survival and Enhances Immune Function Only in Males After Hemorrhage and Subsequent Sepsis. *Shock*. 2002;18(1):24–8.
177. Kalechman Y, Gafter U, Gal R, et al. Anti-IL-10 Therapeutic Strategy Using the Immunomodulator AS101 in Protecting Mice from Sepsis-Induced Death: Dependence on Timing of Immunomodulating Intervention. *The Journal of Immunology*. 2002;169(1):384–92.
178. Ariefdjohan M, e, Queensland K, Weitzel L, Heyland D, Wischmeyer P. . 32^a *Conferência Anual sobre Choque*. San Antonio: 2009.
179. Kareva L, Mironska K, Stavric K, Hasani A. Adverse reactions to intravenous immunoglobulins-our experience. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2018;6(12):2359–62.