

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós- Graduação em Bioquímica e Imunologia

Vivian Louise Soares De Oliveira

**Papeis opostos de Fc γ RIIb e Fc γ RIII no controle da inflamação articular e do
clearance bacteriano em modelo de artrite séptica**

Belo Horizonte

2018

Vívian Louise Soares de Oliveira

**PAPEIS OPOSTOS DE FcγRIIb E FcγRIII NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO
ARTICULAR E DO *CLEARANCE* BACTERIANO EM MODELO DE ARTRITE
SÉPTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral

Co-orientadora: Dra. Daiane Boff

Belo Horizonte

2018

043 Oliveira, Vívian Louise Soares de.

Papeis opostos de FcγRIIb e FcγRIII no controle da inflamação articular e do clearance bacteriano em modelo de artrite séptica [manuscrito] / Vívian Louise Soares de Oliveira. – 2018.

81 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral. Coorientador: Dra. Daiane Boff
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica. 2. Artrite Infeciosa. 3. Staphylococcus aureus. 4. Receptores Fc. 5. Receptores de IgG. I. Amaral, Flávio Almeida. II. Boff, Daiane. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



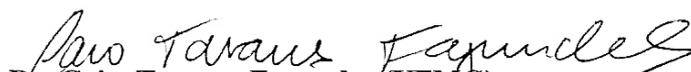
Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

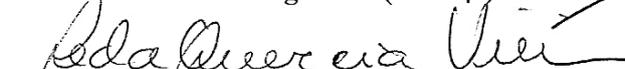


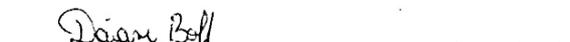
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VIVIAN LOUISE SOARES DE OLIVEIRA. Aos dezesseis dias do mês de julho de 2018 às 14.00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Papeis opostos dos receptores FcyRIIb e FcyRIII na inflamação articular e no clearance bacteriano na artrite séptica induzida por *Staphylococcus aureus*""", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Almeida Amaral, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Caio Tavares Fagundes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Leda Quercia Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Daiane Boff - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Flávio Almeida Amaral - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

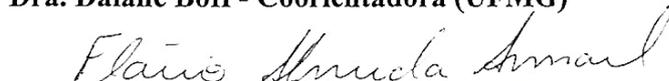
APROVADA
 REPROVADA

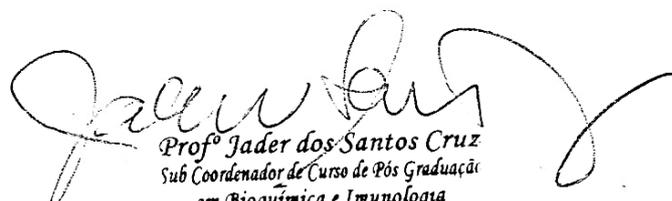
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de julho de 2018.


 Dr. Caio Tavares Fagundes (UFMG)


 Dra. Leda Quercia Vieira (UFMG)


 Dra. Daiane Boff - Coorientadora (UFMG)


 Dr. Flávio Almeida Amaral - Orientador (UFMG)


 Profº Jader dos Santos Cruz
 Sub Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Cláudia e Vinícius, aos meus irmãos, Hugo e Lílian, e ao meu sobrinho, Otávio, por serem meus companheiros e grandes incentivadores de toda essa jornada, me dando ferramentas e acreditando no meu potencial. Aos meus familiares de forma geral, que constroem a cada dia essa família admirável que tenho orgulho de fazer parte e me espelho sempre.

Ao Anderson, que me acompanha e me incentiva em todos os momentos, sonhando os meus sonhos e vivendo-os comigo. Obrigada por ser meu melhor amigo e me mostrar o quanto posso amar e ser amada.

Ao Flávio e ao Mauro, por me darem a oportunidade de desenvolver este projeto no Laboratório de Imunofarmacologia e me oferecerem todo o suporte necessário para que estes anos de laboratório fossem de amplo aprendizado e crescimento. Ao Flávio e à Daiane, por serem mais do que orientadores, mas grandes exemplos e inspirações. Obrigada por toda paciência, dedicação, incentivo e, principalmente, por depositarem tanta confiança em mim e no meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunofarmacologia e do grupo Imunofar, por nunca deixarem os momentos de trabalho monótonos e me socorrerem sempre que precisei de ajuda. Obrigada por serem ótimos companheiros de experimentos, almoços, escritas e contribuírem tanto para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Aos amigos do CEFET, do CETAP, do CsF e da Farmácia, vocês me impulsionaram a chegar até aqui e me acompanham até hoje. Obrigada por tantos momentos de alegria (mesmo que eu esteja sempre ocupada/cansada demais hahaha), cada um de vocês me marcou de forma especial e contribuiu de forma significativa para o encerramento de mais um ciclo. À Yasmin, que me faz enxergar o quanto sou capaz e ao mesmo tempo falha, e a beleza de tudo isso.

Às agências de fomento Capes, CNPQ e FAPEMIG pelo suporte financeiro neste projeto e em outros desenvolvidos no Laboratório de Imunofarmacologia.

A todos que de alguma forma também foram responsáveis pelas conquistas que me conduziram até aqui, sintam meu agradecimento e meu carinho.

RESUMO

A artrite séptica é uma doença articular causada por um microrganismo. Diversos vírus, fungos e bactérias podem causar tal doença, mas *Staphylococcus aureus* é o principal causador, devido aos seus inúmeros fatores de virulência e de evasão do sistema imune. A manifestação clássica de artrite séptica inclui dor intensa, mesmo em repouso, edema, aumento da temperatura no local e redução da mobilidade da articulação. A presença de microrganismos desencadeia uma resposta inflamatória na articulação que cria condições para a chegada de células como os neutrófilos, importantes para o controle de microrganismos. Os receptores da porção Fc de anticorpos desempenham papel importante em doenças infecciosas, desencadeando cascatas pró e anti-inflamatórias, com liberação de diversas citocinas, auxiliando no controle da doença e da inflamação gerada. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel dos receptores FcγRIIb e FcγRIII no controle bacteriano e na resposta inflamatória articular após a infecção por *Staphylococcus aureus* em camundongos. Para isto, animais deficientes para estes receptores foram infectados com *S. aureus* e a resposta inflamatória desencadeada foi comparada à de animais selvagens. Os animais FcγRIIb^{-/-} apresentaram pico de acúmulo de leucócitos antecipado e redução da carga bacteriana na cavidade articular, associado a um aumento de apoptose de neutrófilos e maior expressão de CXCR2. Ainda, animais FcγRIIb^{-/-} tem uma maior quantidade da citocina IL-1β na articulação já no primeiro dia de infecção em relação aos animais selvagens. Dados similares foram obtidos em cultura de macrófagos estimulados com *S. aureus*. Essa maior inflamação articular nos animais FcγRIIb^{-/-} no início da resposta pode ser devido à uma maior sinalização por receptores FcγR estimulatórios, uma vez que há um aumento da molécula Syk em macrófagos deficientes para FcγRIIb. Por outro lado, os animais FcγRIII^{-/-} apresentaram aumento no acúmulo de leucócitos e de carga bacteriana em tempos mais tardios de infecção, associado ao aumento da expressão de PD1 em linfócitos, um marcador de exaustão clonal. Conclui-se, portanto, que os receptores FcγR participam ativamente da inflamação articular causada por *S. aureus*, sendo que a ausência do FcγRIIb, receptor inibitório, potencializa a resposta inflamatória nos primeiros momentos de infecção, facilitando uma melhor eliminação da bactéria. Essa resposta pode ocorrer em função do receptor estimulatório FcγRIII, uma vez que sua ausência prejudica o controle bacteriano articular, mantendo uma inflamação intensa e persistente, possivelmente alterando as funções de linfócitos específicos.

Palavras chave: Artrite séptica, *Staphylococcus aureus*, FcγRIIb, FcγRIII, FcγR.

ABSTRACT

Septic arthritis is an articular disease caused by a microorganism. Several viruses, fungi and bacteria can cause this disease, but *Staphylococcus aureus* is the most common cause, due to its numerous virulence factors and to its ability to evade the immune system. The classic manifestation of septic arthritis includes severe pain, even at rest, edema, increased temperature on site and reduced mobility of the joint. Microorganisms trigger an inflammatory response in the joint that creates the conditions for the recruitment of cells such neutrophils that are granulocytes specialized in the control of microorganisms. Receptors for the Fc portion of immunoglobulin play an important role triggering pro and anti-inflammatory cascades with the release of many cytokines, in order to control the disease and the inflammation. This study aimed to evaluate the role of FcγRIIb and FcγRIII in the bacterial clearance and the inflammatory response in the experimental model of septic arthritis. To this end, mice deficient for these receptors were infected with *S. aureus* and compared to wild type animals at times determined by preliminary experiments. FcγRIIb^{-/-} animals had an anticipated leukocyte accumulation peak and a reduction of the bacterial load in the joint cavity, associated with increased neutrophil apoptosis and CXCR2 expression. Furthermore, FcγRIIb^{-/-} animals had a greater amount of IL-1 cytokine in the joint on the first day of infection in relation to wild animals. Similar data were obtained on culture of macrophages stimulated with *S. aureus*. Such increased joint inflammation in the FcγRIIb^{-/-} animals at the beginning of the response may be due to increased signaling by stimulatory FcγR receptors, since there is an increase in the Syk molecule in FcγRIIb deficient macrophages. On the other hand, the animals FcγRIII^{-/-} showed an increase in leukocyte accumulation and bacterial load at later times of infection associated with increased expression of PD1, an exhaust clonal marker. It is concluded, therefore, that FcγR receptors are very important in *S. aureus* induced septic arthritis, and the absence of the inhibitory receptor FcγRIIb potentiates the inflammatory response in the first moments of infection, facilitating a better elimination of the bacteria. This response may occur as a function of the FcγRIII stimulatory receptor, since its absence impairs the bacterial joint control, maintaining an intense and persistent inflammation, possibly altering the functions of specific lymphocytes.

Keywords: Septic arthritis, *Staphylococcus aureus*, FcγRIIb, FcγRIII, FcγR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rotas de acesso da bactéria à articulação	18
Figura 2 – Processo de recrutamento de neutrófilos seguido de fagocitose e eliminação bacteriana	24
Figura 3 – Receptores FcγR em camundongos e humanos	27
Figura 4 – Sinalização de receptores FcγR	30
Figura 5 – Padronização do modelo experimental de artrite séptica em camundongos por meio de inóculo-resposta e cinética	35
Figura 6 – Neutrófilo normal (seta) e neutrófilos apoptóticos	37
Figura 7 – Estratégia de gate para análise de citometria de fluxo de linfócitos	40
Figura 8 – Estratégia de gate para análise de citometria de fluxo de medula	41
Figura 9 – Recrutamento celular e recuperação bacteriana no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para FcγRIIb (FcγRIIb ^{-/-}).	44
Figura 10 – Recrutamento celular e recuperação bacteriana na articulação no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagem (WT) e deficientes para FcγRIII (FcγRIII ^{-/-})	45
Figura 11 – Recrutamento celular no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para FcγRIIb (FcγRIIb ^{-/-})	46
Figura 12 – Carga bacteriana no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para FcγRIIb (FcγRIIb ^{-/-})	47
Figura 13 – Limiar de retirada de pata em modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para FcγRIIb (FcγRIIb ^{-/-})	48
Figura 14 – Níveis de CXCL1 e CXCL6 em modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para FcγRIIb (FcγRIIb ^{-/-})	49
Figura 15 – Animais deficientes em FcγRIIb (FcγRIIb ^{-/-}) têm maior quantidade de neutrófilos expressando CXCR2 e neutrófilos em apoptose	50

Figura 16 – Níveis de IL-1 β em modelo experimental de artrite séptica e em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos selvagens (WT) e deficientes para Fc γ RIIb (Fc γ RIIb ^{-/-})	51
Figura 17– Recrutamento celular no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para Fc γ RIIb (Fc γ RIIb ^{-/-})	52
Figura 18 – Recrutamento celular no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagem (WT) e deficientes para Fc γ RIII (Fc γ RIII ^{-/-})	53
Figura 19 – Carga bacteriana no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens(WT) e deficientes para Fc γ RIII (Fc γ RIII ^{-/-})	54
Figura 20 – Limiar de retirada de pata em modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para Fc γ RIII (Fc γ RIII ^{-/-})	55
Figura 21 – Escore e cortes histopatológicos no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para Fc γ RIII (Fc γ RIII ^{-/-})	56
Figura 22 - Níveis de CXCL1 e IL-1 β em modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para Fc γ RIII (Fc γ RIII ^{-/-})	58
Figura 23 – Animais deficientes em Fc γ RIII (Fc γ RIII ^{-/-}) têm maior quantidade de linfócitos CD4 e CD8 no linfonodo poplíteo expressando PD1	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microrganismos associados à artrite séptica	17
Tabela 2 – Principais fatores de virulência da bactéria <i>S. aureus</i>	19
Tabela 3 – Receptores Fc γ e as células em que são expressos em camundongos	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> – Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos
AKT	<i>Protein kinase B</i> – Cinase anti-apoptótica
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> – Coleção de cultura Americana
BHI	<i>Brain heart infusion</i> – infusão de coração e cérebro
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> – albumina sérica bovina
BTK	<i>Bruton's tyrosine kinase</i> – Tirosina cinase de Bruton
CCL()	Quimiocina ligante com motivo CC
CD()	<i>Cluster of differentiation</i> - agrupamento de diferenciação
CT scans	<i>Computerized tomography scan</i> – Tomografia computadorizada
CTLA-4	Antígeno associado a linfócito T citotóxico 4
CXCL()	Quimiocina ligante com motivo CXC
DAG	Diacilglicerol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> – Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima
EPM	Erro padrão da média
FasL	Ligante Faz
FcR	Receptores Fc
FcγR	Receptores FcγR
FcγR()^{-/-}	Animais deficientes para os receptores Fcγ()
FcγR()	Receptores FcγR()

g	Grama
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC	Imunocomplexo
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> – moléculas de adesão intracelulares
Ig()	Imunoglobulina ()
IL()	Interleucina ()
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> – Motivo de Ativação do Imunorreceptor Baseado em Tirosina
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i> – Motivo de Inibição do Imunorreceptor Baseado em Tirosina
M	Molar
mABS	Anticorpo monoclonal
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> – Proteínas cinases ativadas por mitógenos
Mg	Miligrama
MPO	Mieloperoxidase
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> – <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i> - armadilhas extracelulares de neutrófilos
NLRP3	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i> – Proteína contendo os domínios NACHT, LRR e PYD 3
NK	<i>Natural killer</i> – exterminadoras naturais
OPD	<i>Ortfo-phenylenediamine</i> – ortofenildiamina
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – tampão fosfato salino
PD-1	Proteína de morte celular programada 1

PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i> – fosfatidilinositol-3-cinase
PKC	<i>Protein kinase C</i> – Proteína cinase C
PLCγ	Fosfolipase C γ
PtdIns(3,4,5)P3	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i> – fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> – espécies reativas de oxigênio
SHIP	<i>SH2-containing Inositol 5'-Phosphatase</i> – Inositol 5 fosfatase contendo o domínio SH2
SHP	Proteínas tirosina fosfatases contendo o domínio SH2
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i> – Tirosina cinase do baço
TLR()	<i>Toll-like receptor</i> – receptor semelhante do Toll tipo ()
UFC	Unidade formadora de colônia
VRSA	<i>Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus</i> – <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina
WT	Animal selvagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Artrite séptica	16
1.1.1	Agente etiológico	17
1.1.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	18
1.1.3	Diagnóstico e tratamento	20
1.1.4	Resposta imunológica a bactéria <i>S. aureus</i>	22
1.2	Receptores de anticorpos	26
1.2.1	Distribuição dos receptores FcγR	27
1.2.2	Funções dos receptores FcγR	28
1.2.3	Impacto dos FcγR na artrite séptica e em outras doenças	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Animais	34
3.2	Bactéria	34
3.3	Modelo experimental de artrite séptica induzido por <i>S. aureus</i> em camundongos	34
3.4	Estratégia experimental	36
3.5	Contagem total e diferencial de células inflamatórias e apoptose	36

3.6 Recuperação de <i>S. aureus</i> do tecido articular	37
3.7 Medida de Nocicepção	37
3.8 Processamento de tecido articular, ensaio de ELISA	38
3.9 Histopatologia	39
3.10 Citometria de fluxo de linfonodo poplíteo	39
3.11 Citometria de fluxo de medula óssea	40
3.12 Diferenciação de macrófagos derivados de medula	41
3.13 Western Blot	42
3.14 Análise estatística	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Animais deficientes para FcγRIIb ou FcγRIII possuem diferenças no controle no bacteriano e no acúmulo de células na articulação após infecção por <i>S. aureus</i>	43
4.2 Papel do receptor FcγRIIb na resposta inflamatória e controle bacteriano na artrite induzida por <i>S. aureus</i>	46
4.3 Papel do receptor FcγRIII na resposta inflamatória e controle bacteriano na artrite induzida por <i>S. aureus</i>	53
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO 1	80
ANEXO 2	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Artrite séptica

A artrite séptica é uma doença articular causada pela presença de microrganismos na articulação desencadeando a inflamação. Geralmente, a artrite séptica atinge uma única articulação de grande porte como o joelho ou o quadril, sendo a primeira a mais frequentemente acometida (mais de 50% dos casos) (1,2). Trata-se de uma doença de importância mundial devido às complicações graves, evoluindo à sequelas permanentes e inclusive está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade (3,4). Os dados epidemiológicos de artrite séptica não são muito precisos, principalmente no Brasil, mas estima-se que a incidência seja de 6 a 12 pessoas a cada 100.000 habitantes por ano, sendo que estes valores podem aumentar muito quando populações de risco são observadas isoladamente (4–6). A manifestação clínica clássica de artrite séptica inclui dor intensa, mesmo em repouso, edema, aumento da temperatura no local e dano articular com redução da funcionalidade da articulação. Se a via de infecção for hematogênica, o paciente também apresenta sintomas sistêmicos, como febre e intenso mal-estar (1,2).

A principal população de risco é constituída pelos extremos de idade. Crianças muito novas e idosos são os principais acometidos e caracterizam o grupo com a forma mais grave da doença. (7,8). Além da idade, existem outros fatores de risco para o desenvolvimento da artrite séptica, sendo que o principal é a existência de doenças articulares prévias como artrite reumatoide e osteoartrite, que podem aumentar a incidência de artrite séptica para até 70 casos a cada 100.000 pessoas por ano (8). Fatores que favorecem a entrada e permanência da bactéria na articulação também requerem atenção, como bacteremia, grandes cirurgias articulares e utilização de próteses. O uso de drogas injetáveis também está associado ao desenvolvimento de artrite séptica assim como a infecção pelo vírus HIV e utilização de drogas imunossupressoras. A artrite séptica, neste caso, ocorre em função da infecção de microrganismos oportunistas como fungos, devido à imunossupressão destes pacientes (9). Existem outros fatores menos decisivos, mas ainda assim importantes para a predisposição à artrite séptica, sendo que os mais citados na literatura são: diabetes, doença renal, câncer (quimioterapia), doenças granulomatosas e alcoolismo (10,11).

1.1.1 Agente etiológico

Muitos microrganismos podem causar artrite séptica. Dentre vírus, fungos, parasitas e bactérias, estas últimas pertencem à classe de microrganismos mais frequente em tal doença. A artrite bacteriana pode ser dividida em dois grupos principais: as gonocócicas e as não-gonocócicas. A artrite séptica gonocócica é causada pela bactéria diplococo Gram-negativo *Neisseria gonorrhoeae*. Dentre as não-gonocócicas, os cocos Gram-positivo (estafilococos, estreptococo e pneumococo) ocasionam até 85 % dos casos, sendo que *Staphylococcus aureus* é o agente etiológico mais importante deste tipo de artrite séptica. Os principais microrganismos relacionados de forma direta ou indireta à artrite séptica estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Microrganismos associados à artrite séptica (12)

Classe	Microrganismos associados à artrite séptica
Vírus	<i>Parvovirus B19</i> HBV (Vírus da hepatite B) HCV (Vírus da hepatite C) <i>Rubella virus</i> HIV (Vírus da Imunodeficiência humana)
Fungos	<i>Coccidioides</i> <i>Blastomyces</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Histoplasma</i> <i>Candida</i>
Parasitas	<i>Filaria</i> <i>Trichinella</i> <i>Schistosoma</i>
Bactérias	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Outras espécies de <i>Neisseria</i>

O microrganismo pode utilizar diferentes vias para acessar a articulação, sendo as principais: (1) hematogênica durante bacteremia; (2) infecção de tecido adjacente; (3) infecção óssea; (4) inoculação direta durante um trauma e (5) inoculação direta durante cirurgias articulares, coleta de aspirado articular para diagnóstico, aplicação local de corticosteroides ou uso de drogas injetáveis (5,13,14) (Figura 1).

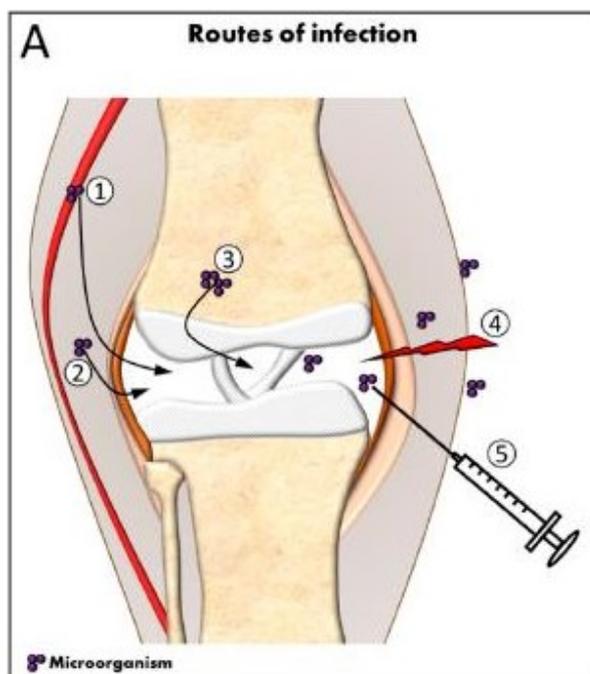


Figura 1 – Rotas de acesso da bactéria à articulação. (1) hematogênica; (2) infecção de tecido adjacente (3) infecção óssea; (4) inoculação direta durante trauma e (5) inoculação direta em procedimentos médico-hospitalares (14).

1.1.2. *Staphylococcus aureus*

Dentre os microrganismos causadores da artrite séptica, *S. aureus* é o mais frequente, portanto é considerado como agente etiológico da artrite séptica “típica”. *S. aureus* é um coco Gram-positivo que coloniza 30 % da população, frequentemente encontrado na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Trata-se de um microrganismo oportunista importante do ponto de vista de saúde pública, uma vez que demonstra grande capacidade de se adaptar em diferentes ambientes e infectar tecidos, causando doenças em humanos e outras espécies. Essa capacidade ocorre pois *S. aureus* apresenta muitos fatores de virulência que propiciam grande evasão das diferentes etapas da resposta imune do hospedeiro (15,16). Além da sua capacidade de evasão, *S. aureus*

produz moléculas especializadas em adesão e é capaz de formar biofilmes, o que a torna uma bactéria muito bem sucedida na colonização de tecido ósseo e a principal causadora de artrite séptica. Os fatores de virulência visam facilitar a colonização do hospedeiro, reduzir ou dificultar o recrutamento de leucócitos e sua atividade fagocítica, inativar moléculas do complemento e imunoglobulinas e reduzir a atividade de peptídeos antimicrobianos (15,17). As moléculas que exercem essas funções são diversas e alguns exemplos são brevemente sintetizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Principais fatores de virulência da bactéria *S. aureus* (12,15,17,18)

Fatores de patogenicidade	Função
Adesinas	Permitem a adesão da bactéria ao tecido, facilitando a colonização.
Proteína A	Se liga à porção Fc da IgG, diminuindo sua atividade e reduzindo a opsonização.
Cápsula polissacarídica	Dificulta a fagocitose e aumenta a sobrevivência intracelular da bactéria.
Coagulase	Inibe a fagocitose ao coagular o plasma.
Hialuronidase	Causa lesão tecidual.
Toxinas (ex: citotoxinas, toxinas esfoliativas, enterotocinas, toxina-1 da síndrome do choque tóxico)	Aumentam a ativação e recrutamento de leucócitos pela indução da produção de mediadores inflamatórios. Também podem ser citotóxicas.
Ácido teicoico	Liga à fibronectina.
Fibrinolisinase	Dissolve os coágulos de fibrina.
Lipase	Hidrolisa lipídeos.
Nuclease	Hidrolisa DNA.
Superantígenos	Induzem resposta imune exacerbada podendo causar choque séptico.

1.1.3 Diagnóstico e tratamento

Os sinais e sintomas da artrite séptica são apenas um indício, sendo que o diagnóstico definitivo ocorre apenas quando há demonstração direta da presença de microrganismos na articulação. Para isto, o mais indicado é a cultura do líquido sinovial, uma vez que a coloração de Gram não é muito sensível e pode apresentar falsos negativos em até 50 % dos casos (2). Uma análise detalhada do líquido sinovial também é recomendada, apesar de não ser suficiente para afirmar a presença ou ausência de microrganismos. Na artrite séptica, o líquido sinovial encontra-se opaco, com grande população de leucócitos (frequentemente > 100.000) e predomínio de polimorfonucleares (> 85 %). O líquido sinovial deve ser então cultivado em meios de cultura específicos para diferentes tipos de microrganismos e, em caso de cultura positiva, deve-se investigar o possível agente causador para direcionar o tratamento (19–21). Outra forma de diagnóstico recentemente incorporada é a técnica de PCR quantitativo. Apesar de ainda não ser a forma mais utilizada, é uma maneira muito eficiente, rápida e promissora de diagnosticar da doença, podendo inclusive determinar se a bactéria é resistente a determinados antibióticos. A grande vantagem deste método é que não é necessário realizar a cultura do líquido sinovial, acelerando a identificação da bactéria e o início do tratamento (22,23)

Exames de imagens podem ser utilizados como ferramentas auxiliares para a detecção de comprometimento ósseo e de tecidos moles adjacentes. Podem também guiar a punção em articulações mais profundas, como o quadril, ou em articulações pequenas em que ocorre edema difuso, dificultando a precisão do local principal da inflamação, como nas articulações de mãos e pés. Cintilografias, *CT scans* e ressonâncias magnéticas podem indicar a presença de um processo infeccioso, podendo ser úteis no diagnóstico diferencial de artrite séptica. Apesar de pouco precisos, os exames por imagem estão sendo aprimorados e apresentam uma alternativa indolor, podendo ser úteis em casos especiais para detectar o grau de comprometimento da articulação, além de permitir a avaliação da terapia (1,2,19,21,24).

O tratamento da artrite séptica tem início imediato após o diagnóstico e consiste na prescrição de antimicrobianos associados à retirada de material purulento da articulação (drenagem), mantendo-a sempre limpa. Não há fortes evidências disponíveis na literatura quanto à escolha do antibiótico e duração do tratamento, mas sabe-se que

esta escolha deve considerar o microrganismo causador, a gravidade do quadro clínico, a idade do paciente, presença de comorbidades e os fatores de risco associados (2,20).

A decisão médica também deve ser baseada em testes de susceptibilidade, uma vez que *S. aureus* possui diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos mais utilizados. Para garantir rapidez do tratamento independente do resultado da cultura e dos testes de resistência, propõe-se a realização da coloração de Gram apenas como um guia inicial, apesar de sua baixa sensibilidade. Em casos de cocos Gram-positivo, recomenda-se o início imediato no tratamento com vancomicina ou oxacilina (12,25). Apesar de a vancomicina ser bastante efetiva contra *S. aureus*, a presença de mecanismos de resistência é um fator muito preocupante, uma vez que já são encontradas cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA). A combinação de mecanismos de resistências pode resultar na falta de antimicrobianos capazes de eliminar tal bactéria (26,27). Além disso, a vancomicina possui efeitos adversos limitantes, como a nefrotoxicidade, ressaltando a importância de avaliação de comorbidades. Quando o agente etiológico é uma bactéria Gram-negativa, recomenda-se tratamento com uma cefalosporina de terceira geração. A duração do tratamento varia de 2 a 4 semanas, sendo que o paciente geralmente permanece internado devido aos antimicrobianos administrados por via intravenosa e às aspirações do líquido purulento da articulação sempre que necessário (12,28). Além da terapia antimicrobiana, analgésicos e anti-inflamatórios são utilizados para controle da dor (20,25).

A evolução clínica da artrite séptica varia de acordo com a duração dos sintomas antes do tratamento adequado, o número de articulações acometidas e a idade e o grau de imunocompetência do paciente. De forma geral, se o diagnóstico é feito precocemente e o tratamento adequado é prontamente introduzido, a artrite séptica evolui para cura sem sequelas. Entretanto, o atraso em alguma dessas etapas pode levar ao dano da cartilagem articular, resultando em consequências graves que podem comprometer a articulação envolvida. O paciente pode sofrer perda da mobilidade articular, dor intensa, claudicação, discrepância do comprometimento dos membros e, em casos mais graves, septicemia e óbito (29,30).

1.1.4 Resposta imunológica à bactéria *S. aureus*

Assim que o microrganismo entra no espaço articular, uma inflamação aguda da sinóvia é desencadeada. A sinóvia é uma membrana fina formada por uma a três camadas de células especializadas chamadas de sinoviócitos do tipo A (macrófagos-símiles) e sinoviócitos do tipo B (fibroblastos-símiles). A membrana sinovial reage à presença do microrganismo com aumento da proliferação, levando à hiperplasia, e influxo e ativação de leucócitos, culminando na liberação de uma grande quantidade de citocinas e moléculas quimioatraentes. Além destas moléculas, proteases e outras enzimas são liberadas e podem causar degradação da cartilagem e perda óssea dentro de poucos dias (24). A primeira linha de defesa contra os microrganismos é o sistema imune inato, que consiste em três principais mecanismos: (1) peptídeos e enzimas antimicrobianos; (2) sistema do complemento e (3) fagócitos. A eficiência destes três mecanismos é muito importante e varia de acordo com o local da infecção e o tipo de bactéria (15).

O início da resposta imune inata depende do reconhecimento dos padrões moleculares associados aos microrganismos (PAMPs), função desempenhada principalmente pelos receptores do tipo *Toll* (TLR), especialmente TLR1, 2 e 6 no caso de *S. aureus* (16,31). Assim que este reconhecimento ocorre, fatores de transcrição são ativados e induzem a produção de muitos mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas da família CXC (CXCL1, CXCL2, CXCL6), a quimiocina CCL2, da família CC, e citocinas (IL-6 e IL-1 β). Além dos TLRs, os receptores associados a NOD (NLR) também são muito importantes no reconhecimento de PAMPs. Alguns NLR são capazes de se oligomerizar em um complexo de macromoléculas chamado de inflamassoma. Os inflamassomas são ativados por diversos PAMPs e desencadeiam várias respostas pró-inflamatórias, levando à ativação de caspases inflamatórias, como caspase-1, culminando a ativação e secreção das citocinas IL-1 β e IL-18 (32,33). Os mediadores inflamatórios produzidos após o reconhecimento dos PAMPs promovem um rápido influxo de células do sistema imune inato, principalmente neutrófilos e monócitos, além da própria ativação das células residentes (32,33). O receptor CXCR2 tem um papel muito importante no recrutamento de neutrófilos. Em humanos, ele é um receptor para sete quimiocinas, CXCL1-3 e CXCL5-8, enquanto em roedores ele apresenta cinco quimiocinas ligantes, especialmente CXCL1, CXCL2 e CXCL6, além de outros ligantes que não são quimiocinas (4,34,35).

A primeira célula a chegar no sítio da inflamação para o controle do microrganismo é o neutrófilo. Os neutrófilos são granulócitos de vida curta derivados de células tronco hematopoiéticas na medula óssea e muito importantes na resposta imune inata contra microrganismos. Após sua maturação, os neutrófilos são liberados para a corrente sanguínea, circulando por 10 a 24 horas antes de migrarem para o tecido, onde permanecem por um a dois dias, sofrendo, então, apoptose (34). A migração dos neutrófilos envolve a ligação da célula ao endotélio, seu rolamento, adesão, rastejamento e, finalmente, transmigração. Este processo se inicia nos primeiros momentos de uma resposta inflamatória, quando ocorrem alterações teciduais, por exemplo, a presença de agentes invasores. Nestas situações, uma variedade de células, tais como monócitos, macrófagos, e, no caso da artrite, células sinoviais são estimuladas por componentes bacterianos, como o ácido lipoteicóico de *S. aureus*, a produzirem e secretarem potentes mediadores inflamatórios e quimioatraentes de neutrófilos. Diferentes interleucinas, quimiocinas e leucotrienos se ligam a receptores específicos presentes na superfície dos neutrófilos e os direcionam no sentido de seu gradiente de concentração, levando-os para o local da inflamação e gerando um rápido influxo e acúmulo de neutrófilos na cavidade articular. As células endoteliais também são estimuladas e produzem moléculas de adesão intercelulares (ICAMs) como P selectinas, E selectinas e integrinas, enquanto os neutrófilos expressam proteínas que reconhecem os estímulos do endotélio, se ligando às ICAMs (34,35). Após a ligação ao endotélio, os neutrófilos iniciam o rolamento. O contato com quimiocinas da família CXC durante esta etapa também induz a ativação dos neutrófilos (36).

Já ativados, os neutrófilos se ligam a integrinas $\beta 2$ do endotélio, aderindo-se fortemente e iniciam o rastejamento, ou seja, a procura por um sítio adequado para transmigração. Quando o neutrófilo encontra uma junção de células endoteliais ocorre a transmigração, que é dependente de integrinas (35,36). Ao atingir o sítio da inflamação, os neutrófilos desgranulam, liberando vesículas, enzimas, espécies reativas, mediadores inflamatórios e NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos). Tais grânulos podem ser primários, secundários ou terciários. Os primários ou azurofílicos contêm mieloperoxidase (MPO), enzimas proteolíticas (catepsinas, proteinase-3 e elastase) e defensinas. Os componentes dos grânulos secundários incluem flavocitocromo, lactoferrina, colagenase, citocinas, opsoninas e proteínas de adesão. Os grânulos de gelatinase ou terciários contêm alguns antimicrobianos, gelatinase e leucolisina. Estes

grânulos liberam seu conteúdo ao se fundirem com a membrana plasmática (36,37). No caso da artrite séptica, os antimicrobianos secretados pelos neutrófilos são muito importantes. Estes podem ser de três tipos: (1) proteínas que se ligam à membrana do microrganismo; (2) proteínas capazes de privar os microrganismos de nutrientes e (3) enzimas. Além disso, os neutrófilos podem produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) em um processo chamado de explosão respiratória (34,35).

Além dos antimicrobianos, os neutrófilos produzem diversos mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , aumentando o recrutamento, ativação e proliferação celular e atuam em um processo central na eliminação de bactéria, a fagocitose (38). A fagocitose é um mecanismo de remoção de patógenos e *debris* celulares, que pode ser dividida em três etapas: (1) ligação/reconhecimento da superfície celular à partícula por meio de opsoninas e receptores específicos, (2) extensão de pseudopodes ao redor da partícula ligada e (3) engolfamento da partícula e formação do fagossomo. Para a eliminação do microrganismos, grânulos com conteúdo antimicrobiano se unem ao fagossomo e se inicia a produção de ROS (35,39) (Figura 2).

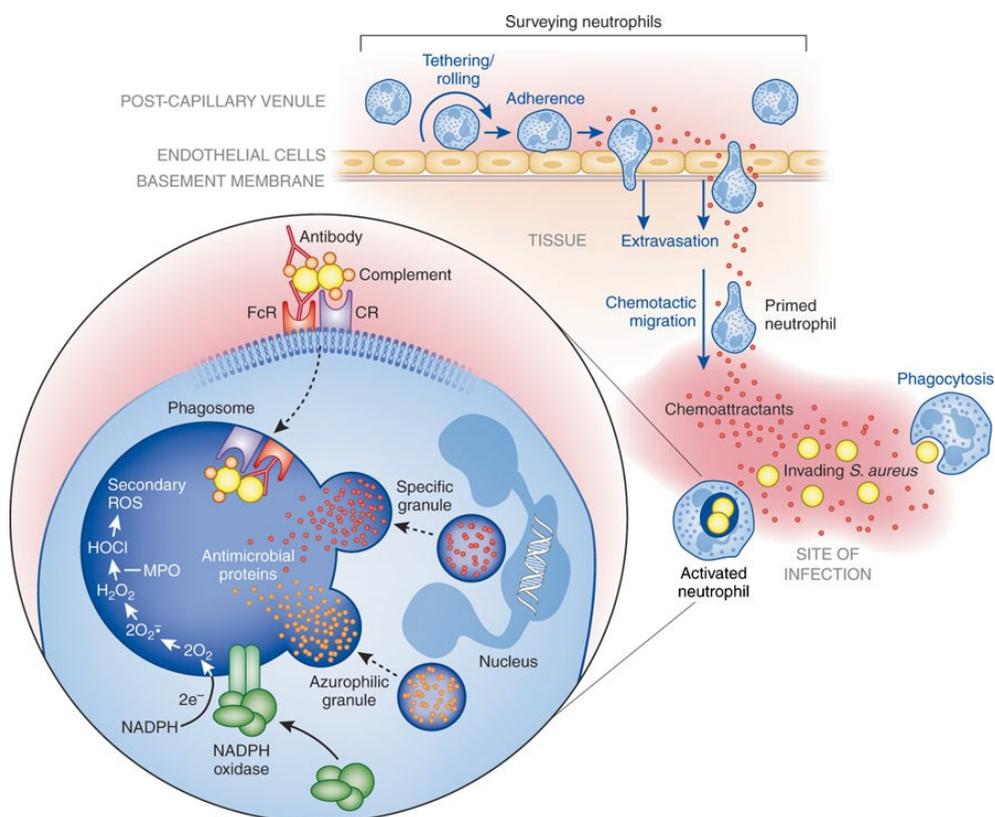


Figura 2 – Processo de recrutamento de neutrófilos seguido de fagocitose e eliminação bacteriana. Após as etapas de rolamento e adesão ao endotélio, os neutrófilos migram dos

capilares para o tecido infectado atraídos pelos quimioatraentes e, após sua ativação, fagocitam a bactéria. Dentro do fagossoma, a bactéria sofre a ação de antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio, importante para a sua eliminação (34).

O recrutamento de neutrófilos para os tecidos é essencial para o sucesso da resposta do hospedeiro a microrganismos, mas o acúmulo excessivo de tais neutrófilos nestes locais pode causar danos ou destruição do tecido. Já no local da inflamação, os neutrófilos desgranulam e liberam enzimas, proteases, cromatina, histonas e proteínas capazes de causar a morte do microrganismo, mas também lesão tecidual. Por isso é essencial encontrar o equilíbrio entre estímulos pró e anti-inflamatórios, gerando uma resposta imune adequada (14,36). No caso da artrite séptica, muitas vezes o cenário encontrado é característico de uma resposta imune exacerbada, capaz de causar grandes danos à articulação, portanto o tratamento rápido e eficiente é essencial (10,34). Para minimizar o dano causado pela inflamação, é importante que esta seja controlada após a eliminação do microrganismo e que a resposta imuno-inflamatória assuma um perfil de resolução. Um dos principais fatores que desencadeiam a resolução da inflamação é a própria apoptose de neutrófilos, os quais são fagocitados por macrófagos. Esse fenômeno, chamado de eferocitose, altera profundamente as características desses macrófagos, tornando-os fundamentais para o término da resposta inflamatória e para o reparo tecidual. Esta etapa envolve diversas moléculas, mediadores e processos que não levam à imunossupressão do indivíduo, mas sim ao retorno da normalidade do tecido e suas funções fisiológicas (40,41).

Além de neutrófilos, outras células do sistema imune também são muito importantes na eliminação da bactéria. O macrófago é responsável por produzir diversos mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , e garantir o recrutamento e ativação de leucócitos no início da inflamação. Além disso, ele participa ativamente na eliminação do microrganismo por meio de fagocitose e morte. Macrófagos e neutrófilos atuam forma complementar, sendo as principais células efetoras e moduladoras das respostas antimicrobianas do sistema imune inato (42). Quando necessário, o macrófago é capaz de assumir um papel diferente e mais relacionado à resolução, sendo responsável pela eferocitose e limpeza da região inflamada (43,44). Linfócitos B e T também fazem parte da resposta imune à bactéria, sendo a produção de anticorpos uma importante etapa para sua eliminação. Os linfócitos B são os responsáveis pela produção de anticorpos, que

possuem papel essencial na neutralização e eliminação do microrganismo, bloqueando sua atividade e facilitando sua fagocitose. Além de anticorpos, linfócitos são importantes produtores de citocinas que atuam diretamente na proliferação, ativação e no recrutamento de células como neutrófilos. Os linfócitos responsáveis pela produção de citocinas são os linfócitos T CD4⁺, conhecidos como linfócitos auxiliares. Por meio destas moléculas, tais células são capazes de otimizar a resposta imune frente à infecção, tornando-a mais efetiva na eliminação dos microrganismos. Além disso, os linfócitos T CD4⁺ também podem fornecer sinais secundários para a ativação de linfócitos T CD8⁺. Os linfócitos T CD8⁺ se proliferam e diferenciam em linfócitos T citotóxicos, que expressam grânulos citotóxicos e podem matar células infectadas por microrganismos intracelulares. Em algumas situações de exposição exacerbada e/ou prolongada a antígenos, os linfócitos T iniciam uma resposta, mas passam a expressar proteínas inibitórias que suprimem tal resposta, um processo chamado de exaustão. O Antígeno associado a linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4) e a Proteína de morte celular programada 1 (PD-1) são exemplos de proteínas que regulam negativamente a atividade dos linfócitos, sendo frequentemente utilizados como marcadores de exaustão (42,45–47).

1.2 Receptores de anticorpos

Os receptores que se ligam a porção Fc das imunoglobulinas são chamados de receptores Fc (FcR) e são importantes conexões entre a imunidade humoral e a imunidade celular. Estes receptores são classificados de acordo com a imunoglobulina pelo qual possuem afinidade. Os receptores para a imunoglobulina G (IgG) são chamados de receptores Fc γ (Fc γ R) e os receptores Fc neonatal (FcRn). Há também os que se ligam à imunoglobulina A (IgA), Fc α R, à imunoglobulina E (IgE), Fc ϵ R, e à imunoglobulina M (IgM) (48–50). Os receptores Fc γ R em humanos são: Fc γ RIA (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIC (CD32C), Fc γ RIIIA (CD16A), Fc γ RIIIB (CD16B) e FcRn. Em camundongos, os receptores de IgG são: Fc γ RI, Fc γ RIIb, Fc γ RIII, Fc γ RIV e FcRn (Figura 3) (51). É importante ressaltar que há diferenças na expressão desses receptores em diferentes espécies. Estes se diferem quanto à estrutura e, conseqüentemente, possuem diferentes afinidades com os anticorpos. As interações da IgG com os receptores podem ser de alta afinidade, como o Fc γ RI, em que os receptores se ligam à IgG monomérica antes que esta tenha se ligado ao antígeno; de baixa afinidade, como os Fc γ RII e Fc γ RIII, em que os receptores se ligam à IgG complexada ao antígeno

multivalente, ou seja, na forma de imunocomplexo (IC) ou de média afinidade como o Fc γ RIV (50,52,53).

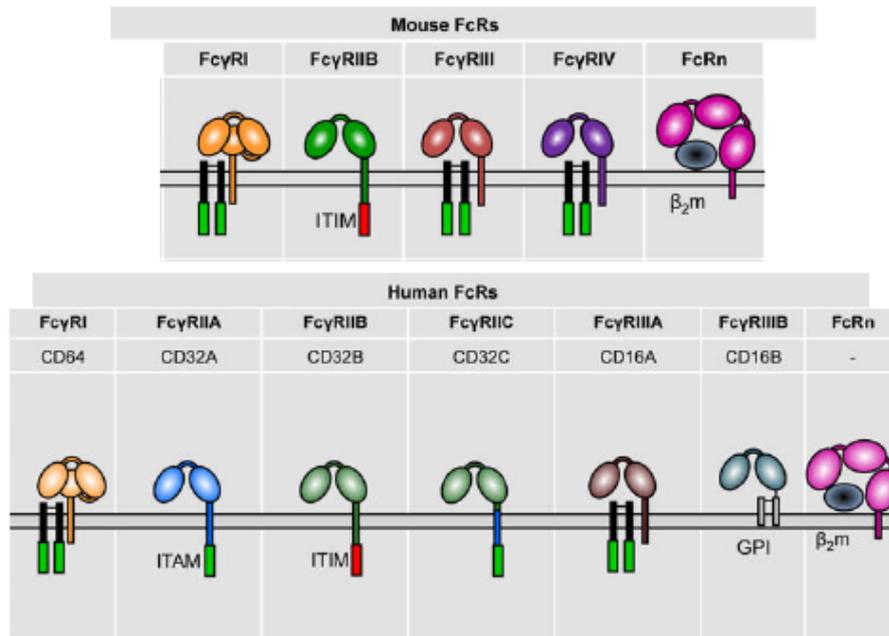


Figura 3 – Receptores Fc γ R em camundongos e humanos (51)

1.2.1 Distribuição dos receptores Fc γ R

Os Fc γ R são bastante disseminados entre as células do sistema imune, sendo expressos principalmente em células mielóides. Alguns receptores são expressos em células linfoides como linfócitos B e células NK, mas nenhum deles é encontrado em linfócitos T. Células endoteliais e tumorais também podem expressar Fc γ R, mas o número de células não hematopoiéticas expressando tais receptores é reduzido (50,51,54). A tabela 3 sumariza as principais células que expressam cada Fc γ R em camundongos.

Tabela 3 – Receptores Fc γ e as células em que são expressos em camundongos (50,54,55)

Receptor	Células
Fc γ RI	Macrófagos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, células de Langerhans.
Fc γ RIIb	Linfócitos B, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, células de Langerhans, basófilos.
Fc γ RIII	Macrófagos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, células de Langerhans, células <i>Natural killer</i> , mastócitos.
Fc γ RIV	Macrófagos e neutrófilos.
FcRn	Macrófagos, monócitos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais.

1.2.2 Funções dos receptores Fc γ R

Em seres humanos e camundongos, as classes de Fc γ R mais estudadas e descritas na literatura são as três primeiras, sendo que tais receptores são capazes de ativar (Fc γ RI e Fc γ RIII) ou desativar (Fc γ RIIb) vias de sinalização intracelular (56). Cabe ressaltar que o receptor Fc neonatal é um transportador, isso é, sua principal função é internalizar, transportar e reciclar imunoglobulinas (55).

Os receptores Fc γ R podem desencadear diversas funções biológicas ao se ligarem ao seus ligantes, principalmente em seu estado multimérico (imunocomplexo, opsonizado ou agregado), mas também no caso de imunoglobulinas monoméricas. A regulação positiva e negativa da resposta imune celular é a tarefa central dos Fc γ R. Estes receptores são os principais no reconhecimento de partículas opsonizadas por IgG e na promoção de respostas pró e anti-inflamatórias (52). Estas respostas biológicas dependem do tipo celular, do tipo do receptor e da natureza do ligante, incluindo processos extremamente importantes para a eliminação de microrganismos (55,57,58). A importância dos Fc γ R na ativação, proliferação e diferenciação celular, e também na inibição de tais processos, foi

descrita e demonstrada há muitos anos (59–62). Outros processos também são essenciais, como a neutralização de moléculas e microrganismos, principalmente vírus (54,55), fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, geração de ROS, liberação de enzimas lisossomais, regulação da produção de anticorpos, produção de quimiocinas e citocinas, desgranulação de neutrófilos e produção de mediadores que ativam ou interrompem cascatas inflamatórias (49,55,57,63).

As atividades dos Fc γ R são reguladas pelo Motivo de Ativação do Imunorreceptor Baseado em Tirosina (ITAM) ou Motivo de Inibição do Imunorreceptor Baseado em Tirosina (ITIM), que ativa e inibe a atividade celular, respectivamente. Tais motivos de sinalização localizam-se na região citoplasmática das cadeias que formam os Fc γ R (48,64). Quando os Fc γ R possuindo ITAM são ativados, ativa-se a família SCR de tirosina cinase (*SRC-family protein tyrosine kinases*) que fosforilam os resíduos de tirosina no ITAM. Isso leva ao acoplamento do domínio SCR-homologia 2 (SH2) de proteínas cinase citosólicas SYK, que leva à produção de moléculas importantes nos eventos *downstream*, como fosfolipase C γ (PLC γ), que aumentam os níveis de cálcio intracelular. O aumento dos níveis de cálcio leva à ativação da via de cinases MAPK, que culmina em uma explosão oxidativa, liberação de citocinas, fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e desgranulação. Outras moléculas produzidas após a ativação de SYK são fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), paxilina e GTPases das famílias RHO e RAC que são responsáveis pela reorganização da actina do citoesqueleto (Figura 4A). A resposta inflamatória consequente é muito importante para a eliminação do antígeno, mas também pode acarretar em respostas destrutivas, o que é considerado crucial para o desenvolvimento de doenças autoimunes (48,50,59).

A sinalização negativa desencadeada por Fc γ R contendo ITIM reduz a ativação por IC e pode, também, reduzir a autoimunidade por meio de inibição de linfócitos B e de células efectoras, impedindo atividades como a fagocitose. A cascata de sinalização intracelular se inicia com a fosforilação do domínio ITIM por cinases da família SRC, que leva ao recrutamento de fosfatases contendo o domínio SH2, principalmente proteínas tirosina fosfatases contendo o domínio SH2 1 e 2 (SHP1 e SHP 2) e inositol polifosfato 5 fosfatases contendo o domínio SH2 (SHIP). Estas fosfatases desfosforilam a molécula fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P3), impossibilitando a ancoragem de moléculas da sinalização na membrana, como a tirosina cinase de Bruton (BTK) e PLC γ . BTK é importante para a ativação de PLC γ e para a hidrólise de

fosfatidilinsitol-4,5-difosfato (PtdIns(4,5)P₂), que gera inositol-1,4,5-trifosfato (Ins(1,4,5)P₃) e diacilglicerol (DAG). Dessa maneira, SHIP inibe a produção dos mensageiros secundários Ins(1,4,5)P₃ e DAG, responsáveis pela mobilização de cálcio e ativação de proteína cinase C (PKC), respectivamente (Figura 4B). A ausência da ativação de PKC e de Ins(1,4,5)P₃ impede a ativação de MAPK cinases e o recrutamento de cinase anti-apoptótica (AKT), reduzindo a proliferação e a sobrevivência celular. Por fim, a ligação de SHIP fosforilado a SHC, uma molécula da sinalização de RAS, inibe a ativação de RAS, impedindo a progressão do ciclo celular e, assim, sua proliferação (48,65,66).

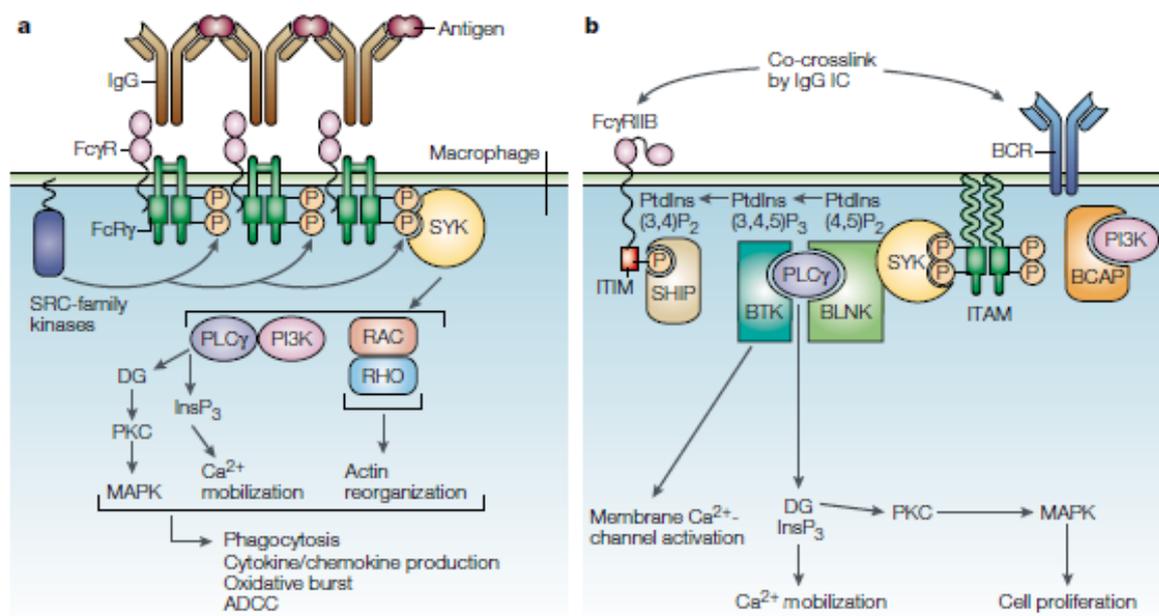


Figura 4 – Sinalização de receptores FcγR. (A) Sinalização de receptores ativadores contendo ITAM. Proteína cinases da família SCR fosforilam ITAM que levam ao acoplamento e ativação de SYK e ativação de PLCγ, PI3K, GTPases das famílias RHO e RAC. Tais moléculas resultam nos processos de fagocitose, produção de quimiocinas, explosão oxidativa e ADCC. (B) Sinalização de receptores inibidores contendo ITIM em células B. Proteína cinases da família SCR fosforilam ITIM, levando à inibição de BTK e da via de PLCγ, bloqueando produção de mensageiros secundários, influxo de cálcio e ativação de PKC (48).

Outra função dos FcγR é a internalização de IC. Esta não é uma função exclusiva dos receptores FcγR, mas é realizada de maneira mais eficiente, quando comparada à

internalização por mecanismos não específicos. Já no interior da célula, os imunocomplexos podem ser degradados e direcionados aos MHC de classe I ou II para que ocorra a apresentação do antígeno. A partir desta apresentação, ocorre ativação de células e inicia-se intensa proliferação e diferenciação celular, desencadeando resposta imune específica para tal antígeno. Além disso, nesta etapa há degradação e eliminação dos antígenos, o que contribui para o controle da invasão (52,64).

1.2.3 Impacto dos Fc γ R na artrite séptica e em outras doenças

Os neutrófilos, células importantes na inflamação da artrite séptica, expressam os principais tipos de Fc γ R, indicando uma possível relação entre Fc γ R e os mecanismos de doença na artrite séptica, antes mesmo da produção de anticorpos específicos para o microrganismo. Sabe-se que IgGs circulantes não-específicas também são capazes de ativar os Fc γ R, assim como opsoninas inatas, como a proteína C reativa (PCR) (67). Existem relatos de outras moléculas, como a Pentraxina 3 (PTX3), que se liga aos Fc γ R e desencadeia respostas biológicas, incluindo ativação celular e aumento de fagocitose de microrganismos opsonizados (38,68,69). Por se ligarem a proteínas características do sistema imune inato e adaptativo, desse modo sendo específicos ou não para o patógeno, os receptores Fc γ R podem ser considerados um link importante entre os dois tipos de resposta, possuindo papéis importantes em diferentes fases da doença (70).

Em relação à artrite reumatoide, os receptores Fc γ R são importantes moduladores da produção de anticorpos e a ativação destes receptores por imunocomplexos pode levar à inflamação articular e grave destruição da cartilagem, sendo os receptores ativadores cruciais para a lesão óssea e da cartilagem (56,71). Além disso, há uma relação bem estabelecida entre os receptores Fc γ R e receptores do tipo Toll 2 e 4 (TLR2 e TLR4), que são importantes na fisiopatologia da artrite reumatoide (72). Por meio desta relação entre TLR e Fc γ R ativadores, ocorre o aumento da produção de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, além do aumento da resposta por linfócitos Th17, que têm papel importante na artrite reumatoide (73). Reconhece-se também que TLRs possuem grande impacto na artrite séptica, portanto, os Fc γ R podem ser receptores importantes para induzir, regular e direcionar a resposta inflamatória neste contexto (31,72,74).

Os receptores Fc γ R são muito importantes em infecções de forma geral, sendo muito estudados em infecções virais como HIV, infecção do Vírus Sincial Respiratório

(75), síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (53), dengue (76) e outras, uma vez que atuam na neutralização de vírus, ADCC, liberação de citocinas, ativação de neutrófilos e indução de linfócitos T. Nesse cenário, os receptores Fc γ RIIb são capazes de regular negativamente todas essas respostas e também reduzir as mutações somáticas na produção de anticorpos (75). No caso do vírus da Dengue, além das atividades citadas, o receptor Fc γ RIIA é capaz de aumentar a infecção causada pelo vírus por um processo chamado de aumento da infecção causado por anticorpos (ADE) (76), o mesmo é observado na síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos, sendo que nessa doença o receptor responsável pela ADE é o receptor suíno Fc γ RIII (53).

O controle de bactérias é extremamente dependente de anticorpos e *clearance* por meio de Fc γ R, por isso seu papel é estudado em doenças como a sepse. A sepse é uma doença causada por microrganismos e agravada pela intensa resposta imune aos patógenos, com a produção de mediadores inflamatórios em excesso, levando ao choque séptico e a desinfecção de órgãos. Como na maioria das infecções, o sistema imune deve, então, controlar a resposta à infecção otimizando efeitos benéficos e minimizando os maléficos. Nesse processo de equilíbrio, os receptores Fc γ R são muito importantes, pois desempenham papéis ativadores e essenciais na eliminação do patógeno, mas também funções inibitórias que auxiliam no controle da produção de citocinas e ativação de células (77). Além disso, Fc γ RIIb é considerado um receptor essencial para o balanço entre o controle do *clearance* do patógeno e os danos mediados por citocinas, estando relacionado à apoptose de linfócitos B, um importante processo para conter a inflamação exacerbada desta doença, mas que pode impedir a eliminação do microrganismo caso não seja bem regulado (77,78). Em outras infecções bacterianas, como infecção por *Bordetella pertussis* e *Borrelia burgdorferi*, a ausência de receptores Fc γ RI ou receptores Fc γ R de forma geral compromete a eliminação do microrganismo (79,80). Apesar de serem receptores tão importantes em doenças infecciosas de forma geral, não existem muitos estudos correlacionando receptores Fc γ R e artrite séptica ou infecções similares causadas por *S. aureus*, sendo que os mecanismos por trás desta complexa relação não são claros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel dos receptores Fc γ RIIb e Fc γ RIII no controle bacteriano e na resposta inflamatória articular após a infecção por *Staphylococcus aureus* em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar a influência dos receptores Fc γ RIIb e Fc γ RIII no recrutamento celular e controle de *S. aureus* articular no pico da resposta inflamatória (7 dpi – baseado na resposta em animais do tipo selvagem);

2.2.2 Investigar os mecanismos associados com a resposta inflamatória e controle de *S. aureus* na articulação em animais deficientes para os receptores Fc γ RIIb;

2.2.3 Investigar os mecanismos associados com a resposta inflamatória e controle de *S. aureus* na articulação em animais deficientes para os receptores Fc γ RIII.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos da linhagem C57BL/6 machos com idade de 7 a 9 semanas. Os animais selvagens foram adquiridos junto ao Biotério Central da UFMG, mantidos em condições adequadas com livre acesso à água e comida e ciclo claro-escuro de 12 horas e controle de temperatura. Animais deficientes para os receptores FcγRIIb ou FcγRIII, ambos com o mesmo *background* genético dos animais selvagens, foram criados e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Todos os experimentos realizados com os animais foram feitos dentro das normas do Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG (CEUA) conforme protocolos nº. 236/2012 (Anexo 1) e 118/2018 (Anexo 2).

3.2 Bactéria

Utilizou-se cepa ATCC®6538 de *Staphylococcus aureus* cedida pelo Professor Waldiceu Verri Jr da Universidade Estadual de Londrina. A bactéria foi cultivada em caldo BHI (infusão de coração e cérebro) e armazenada em alíquotas de 100 µL com 20% de glicerol a -80°C. Para a inoculação, uma alíquota foi semeada em placa com ágar sangue (ágar BHI com 5% de sangue de carneiro) com tempo de cultivo de 24 horas a 37°C. O inóculo foi preparado com diluição da bactéria em tampão salina fosfato (PBS) estéril e a absorbância lida em espectrofotômetro a 625 nm. Para que a concentração do inóculo fosse adequada, a leitura de absorbância foi próxima a 0,840. A solução foi diluída 10 vezes para se obter 10⁷ unidades formadoras de colônia por mililitro de solução (UFC/mL).

3.3 Modelo experimental de artrite séptica induzido por *S. aureus* em camundongos

O modelo murino de artrite séptica foi padronizado como descrito por BOFF (2013 e 2018) (4,81). Para esta padronização foram utilizados os inóculos 10⁴, 10⁵, 10⁶,

10^7 e 10^8 UFC/mL de *S. aureus*. Sete dias após a injeção intra-articular de *S. aureus*, houve a eutanásia dos animais para a avaliação dos parâmetros inflamatórios. Tal padronização demonstrou que em todos os inóculos houve um aumento no número de neutrófilos quando comparados aos animais não infectados (Figura 5A). Destes, o inóculo de 10^7 UFC/mL foi aquele que apresentou melhores resultados, portanto foi utilizado em uma cinética para escolher os tempos a serem posteriormente avaliados. Em todos os tempos avaliados, houve um aumento significativo no número de neutrófilos na cavidade articular em relação aos animais não infectados, sendo que o pico de acúmulo de neutrófilos foi entre o primeiro e o sétimo dia após a infecção (Figura 5B). O escore histopatológico também foi avaliado e observou-se aumento nos tempos de 1, 7 e 28 dias de infecção (Figura 5C). Por fim, em todos os dias avaliados foi possível recuperar bactérias da articulação (Figura 5D) dos animais infectados com *S. aureus*. Neste caso, no primeiro dia após a infecção houve uma maior recuperação da carga bacteriana, a qual decresceu nos dias subsequentes.

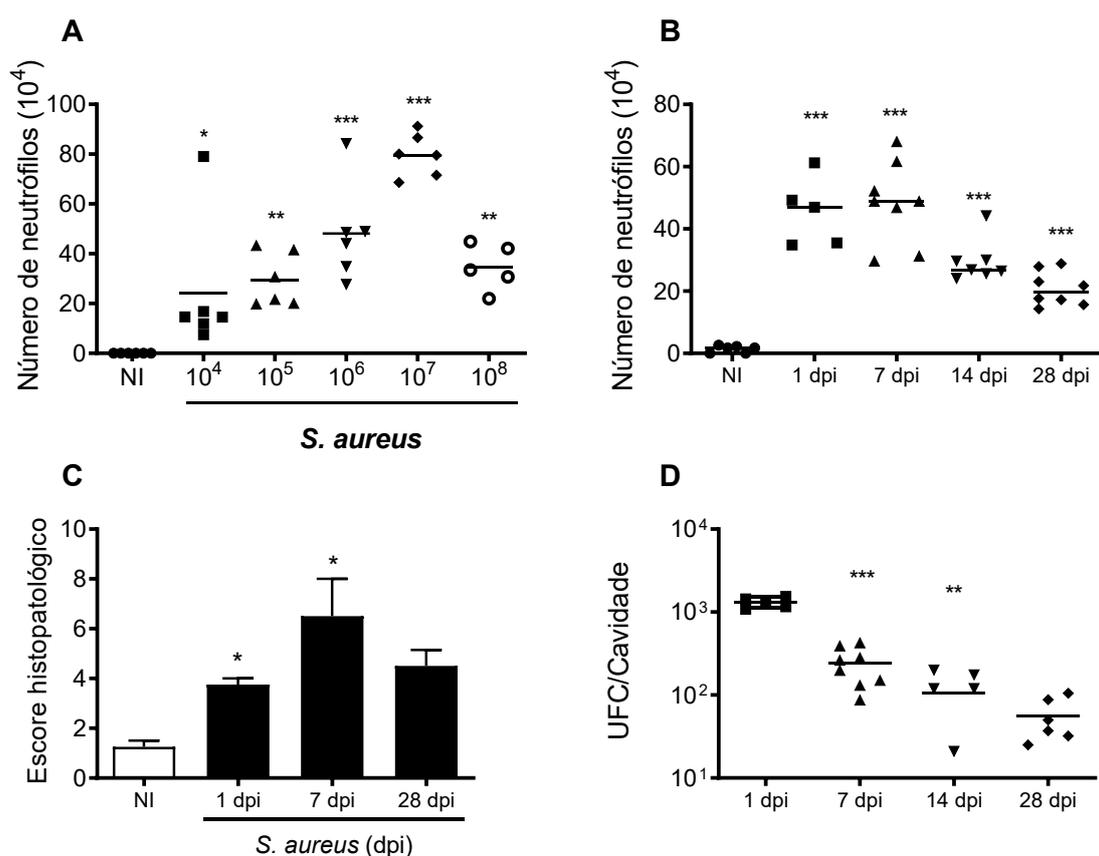


Figura 5 – Padronização do modelo experimental de artrite séptica em camundongos por meio de inóculo-resposta e cinética. Foi realizado um inóculo resposta (UFC/mL 10^4 - 10^8) com a inoculação intra-articular de *S. aureus* (10 μ L). Sete dias após a inoculação, os animais foram

eutanasiados para a recuperação de neutrófilos (A) recrutados para a cavidade articular. A cinética de recrutamento de neutrófilos, escore histopatológico e carga bacteriana foi realizada a partir do inóculo de 10^7 UFC com a injeção intra-articular de *S. aureus* (10 μ L). Os animais foram eutanasiados em vários tempos (1, 7, 14 e 28 dias) após a infecção, para a recuperação de neutrófilos (B), avaliação de escore histopatológico (C) e carga bacteriana presente na articulação (D). ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado com teste One-Way ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls. Foram utilizados de 6 a 8 animais por grupo. UFC: unidades formadoras de colônia (4,81).

3.4 Estratégia experimental

Inicialmente os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 80 mg/kg de Cetamina e 15 mg/kg de Xilazina. Em condições estéreis uma das articulações inferiores foi depilada e foi feita uma injeção intra-articular do inóculo de 10^5 UFC/10 μ L de *S. aureus*. Os animais controle receberam a injeção com PBS estéril (10 μ L).

Em diferentes tempos (1, 4, 7, 14, 28 ou 42 dias após a infecção), os animais foram eutanasiados e a cavidade articular foi lavada 3 vezes com 3,5 μ L de uma solução de PBS contendo 3% p/v de albumina bovina (aqui denominado apenas BSA 3%). O lavado foi armazenado em tubo contendo 90 μ L de BSA 3% e, posteriormente, foi feita a contagem total e diferencial de leucócitos presentes no lavado. O tecido articular foi removido e conservado a -20 °C para posterior processamento para Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima (ELISA) e Western Blot (WB).

Animais destinados à análise histopatológica foram infectados da mesma forma, eutanasiados 28 dias após a infecção e submetidos à retirada da articulação completa, cujo processamento será descrito a diante. No tempo mais tardio, 42 dias após a infecção, os animais também foram submetidos à retirada do linfonodo poplíteo, localizado na região anterior à cavidade articular do joelho para a realização de citometria de fluxo.

3.5 Contagem total e diferencial de células inflamatórias e apoptose

Para a contagem total, 10 μ L do lavado articular foi diluído 3 vezes em solução de lise de hemácias de Turk (RenyLab[®]) e a contagem foi feita em câmara de Neubauer utilizando-se microscópio óptico com aumento de 400 vezes. Ao restante do lavado, foi acrescido 50 μ L de BSA 3% e citocentrifugado para confeccionar as lâminas para a contagem diferencial. As lâminas foram coradas em corante panótico (Laborclin, Paraná)

e a contagem diferencial de células (mononucleares e neutrófilos) foi feita em microscópio óptico em aumento de 1000 vezes. Foram contadas 300 células utilizando-se um contador diferencial de células (Benfer[®], São Paulo) e feita a porcentagem dos tipos celulares estudados baseando-se na contagem total utilizando-se uma regra de três simples. O número de células foi obtido como o valor obtido multiplicado pela diluição (3 vezes) e pelo fator de correção da câmara de Neubauer (10^4). Com as mesmas lâminas utilizadas para a contagem diferencial, realizou-se a contagem de neutrófilos apoptóticos a partir da morfologia características destas células (Figura 6).

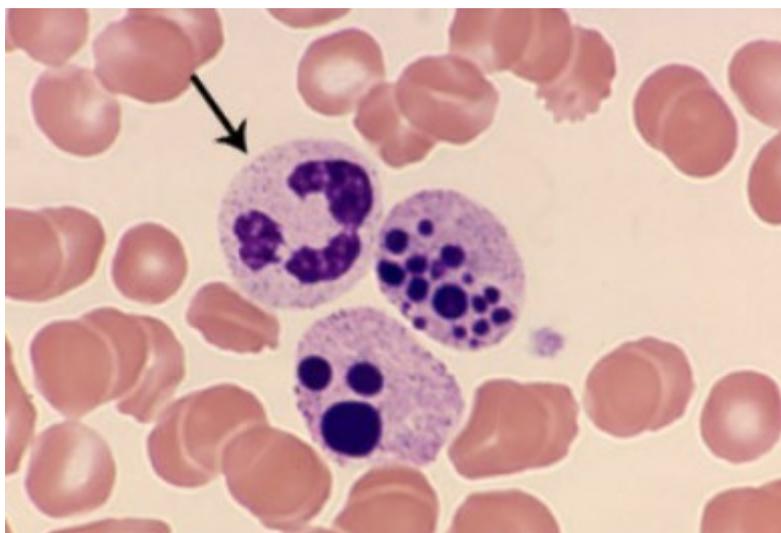


Figura 6 – Neutrófilo normal (seta) e neutrófilos apoptóticos (82).

3.6 Recuperação de *S. aureus* do tecido articular

O tecido articular de cada animal foi retirado de forma estéril e macerado em cadinho com 1000 μ L de PBS estéril. Em seguida 100 μ L desse homogenato foi semeado em placa de Petri contendo ágar sangue (ágar BHI com 5% de sangue de carneiro) e incubado em estufa a 37°C por 24 horas. Após este período foi feita a contagem das colônias. O resultado foi expresso UFC/articulação tibiofemoral.

3.7 Medida de Nocicepção

Para esta avaliação utilizou-se o teste de pressão crescente na pata, conhecido como método de von Frey eletrônico (83). Os animais são distribuídos em caixas de acrílico que são acomodadas sobre uma estante cujo assoalho é composto por uma rede

de malha que permite a utilização de um espelho acoplado 25 cm abaixo das caixas com inclinação de aproximadamente 35 graus possibilitando a visualização das patas dos animais.

Para a leitura da pressão realizada, foi utilizado um analgesímetro digital Insight®, modelo EFF302, que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expresso em gramas (g), com precisão de 0,1g. Para o contato do transdutor de pressão com a pata dos animais, foi adaptada uma ponteira descartável de polipropileno com aproximadamente 2 mm de diâmetro. Antes da realização do teste, os animais foram acomodados nas caixas de acrílico para se ambientarem por 30 minutos e permitirem a medida correta da nocicepção. Estes são, então, submetidos a uma pressão manual e crescente, realizada na região plantar da pata, de maneira a produzir uma resposta característica de retirada da pata estimulada.

3.8 Processamento de tecido articular, ensaio de ELISA

O tecido articular removido foi pesado e acrescentado solução de extração de citocinas (NaCl 0,4 M, Na₃PO₄ 10 mM, PMSF 0,1 mM, Cloreto de Benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, Tween 20 0,05%, 0,5% de BSA, 20 µL de Aprotinina, pH 5,0) na proporção de 1 mL para 100 mg de tecido. O tecido foi processado em homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific®, EUA) e centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi mantido a -20 °C até o dia do ensaio de ELISA.

O ensaio de ELISA foi realizado utilizando-se os kits comerciais e seguindo-se as informações do fabricante (R&D Systems®, EUA). O anticorpo de captura para IL-1β, CXCL6 e CXCL1 foi adicionado à placa de 96 poços e incubado por 24 horas a 4 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS contendo 0,05 % de Tween-20 e bloqueadas por 2 horas com PBS contendo 1 % de BSA à temperatura ambiente. As amostras e o padrão de interesse foram diluídos 3 vezes (em PBS contendo 0,1 % BSA) e incubados por 24 horas a 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 4 vezes (com PBS contendo 0,05 % Tween-20) e a placa foi incubada na presença do respectivo anticorpo de detecção. Após 2 horas, foi adicionada a placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase. Após 20 minutos, as placas foram novamente lavadas e foi adicionado tampão contendo ortofenildiamina (OPD). A reação foi interrompida adicionando-se H₂SO₄ 1 M. A densidade óptica foi obtida com o uso de espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

3.9 Histopatologia

O tecido articular foi coletado e acondicionado em cassetes para histologia que permaneceram por 48 horas em solução de formol 10% tamponado. Em seguida os cassetes foram transferidos para solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) 14% para descalcificação óssea por 30 dias. Neste período foi feita a troca da solução de EDTA a cada 48 horas. O processamento foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Odontologia da UFMG onde o tecido foi submetido a passagens subsequentes em etanol em diferentes concentrações (80 % v/v, 90 % v/v, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada), xilol (1 e 2 – 20 a 30 minutos cada) e incluído em parafina. Foram realizados cortes de 5µm em micrótomo e confecção de uma lâmina por corte, posteriormente corado com Hematoxilina de Harris (20 segundos) e Eosina (8 segundos). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico e foram observados os seguintes parâmetros: gravidade da hiperplasia sinovial (0-2), intensidade e extensão do infiltrado inflamatório (0-5) e reabsorção óssea (0-4).

3.10 Citometria de fluxo de linfonodo poplíteo

Após 42 dias de infecção, os linfonodos poplíteos foram cuidadosamente retirados e macerados para a realização da citometria de fluxo. As células destes linfonodos foram contadas em câmara de Neubauer e igualmente distribuídas ($1,0 \times 10^6$ células/amostra) para marcação de superfície com anticorpos: anti CD3 (APC-Cy7, BD Pharmingen[®], diluição 1:100), CD4 (PE-Cy7, BD Pharmingen[®], diluição 1:100), CD8 (PerCP, BD Pharmingen[®], diluição 1:20) e PD1 (FITC, Biolegend[®], diluição 1:50). Após a marcação, as amostras foram adquiridas no citômetro FACSCanto II (BD Bioscience[®]). Foram adquiridos 30.000 eventos por amostra e a estratégia de *gate* utilizada para CD3⁺/CD4⁺ (1), CD3⁺/CD4⁺/PD1⁺ (2), CD3⁺/CD8⁺ (3), CD3⁺/CD8⁺/PD1⁺ (4) (Figura 7). A análise das leituras foi realizada no software FlowJo (Tree Star[®]).

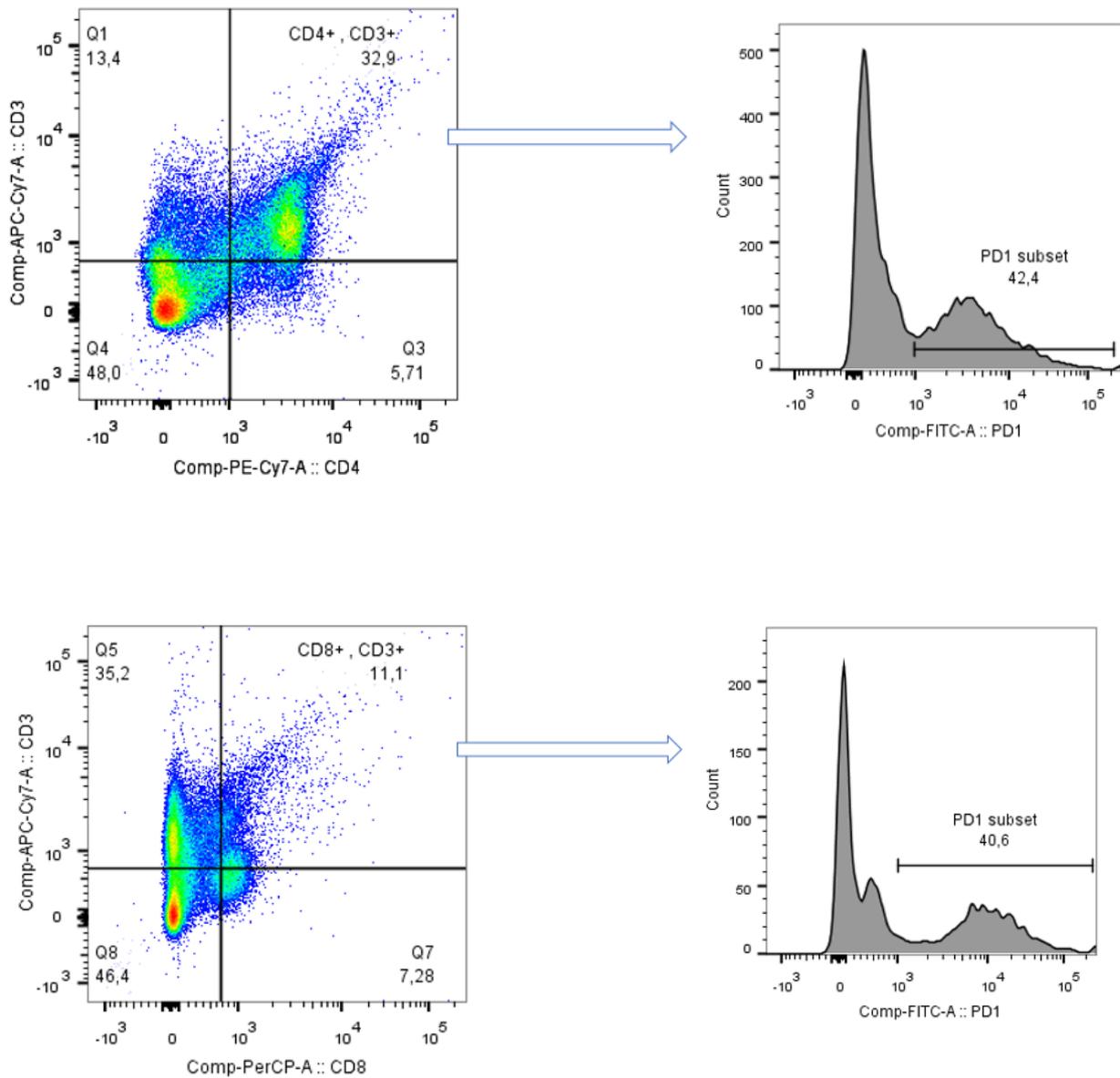


Figura 7 – Estratégia de *gate* para análise de citometria de fluxo de linfócitos.

3.11 Citometria de fluxo de medula óssea

Animais não infectados foram eutanasiados e tiveram a medula óssea tíbio-femoral retirada para a realização de citometria de fluxo. Após a lise de hemácias com PBS 10X e água, tais células foram contadas e igualmente distribuídas ($5,0 \times 10^6$ células/amostra) para marcação de superfície com os seguintes anticorpos: anti Ly6G (APC, eBioscience®, diluição 1:200), CD11b (V500, BD Pharmingen®, diluição 1:100) e CXCR2 (PE, R&D Systems®, diluição 1:50). Após a marcação, as amostras foram lidas no citômetro FACSCanto II (BD Bioscience®). Foram adquiridos 100.000 eventos por

amostra e a estratégia de *gate* utilizada para Ly6G⁺/CD11b⁺(1) e Ly6G⁺/CD11b⁺/CXCR2⁺ (2) (Figura 8). A análise das leituras foi realizada no software FlowJo™ (Tree Star®).

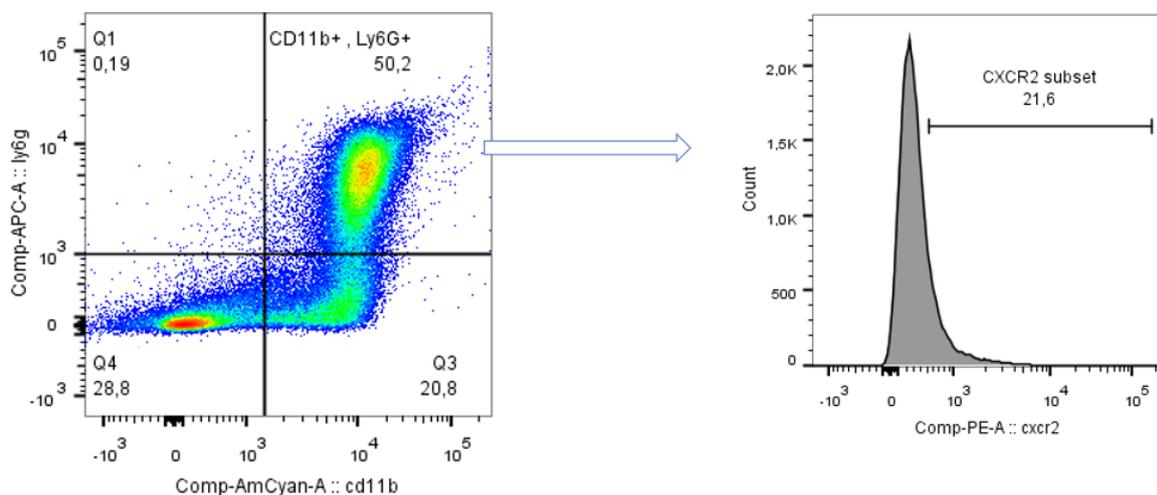


Figura 8 – Estratégia de *gate* para análise de citometria de fluxo de medula.

3.12 Diferenciação de macrófagos derivados de medula

Animais não infectados foram eutanasiados e tiveram a medula óssea tíbio-femoral retirada para a diferenciação de monócitos em macrófagos. Para isto, as células foram mantidas em placas de Petri com meio condicionado de L929 (LCCM) por sete dias. O LCCM é utilizado devido à produção e liberação de M-CSF (fator estimulante de colônias de macrófagos), que é essencial para que os monócitos da medula óssea se diferenciem em macrófagos. Após sete dias de diferenciação, os macrófagos foram retirados das placas de Petri, contados em câmara de Neubauer e igualmente distribuídos ($1,0 \times 10^6$ células/poço) em placas de cultura de 24 poços. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado e parte das células foram primadas com LPS e então incubadas com *S. aureus* (MOI = 10 bactérias para cada célula) ou PBS (controle). Após 6 horas, o sobrenadante foi retirado e mantido a -20°C para ELISA, assim como o pellet (WB). As células não primadas também foram incubadas com bactéria ou PBS por 6 horas, tendo seu sobrenadante descartado e o *pellet* mantido a -20°C para Western blot.

3.13 Western Blot

A técnica de Western blot foi aplicada para o tecido periarticular e também para o *pellet* do cultivo de macrófagos derivados de medula. O tecido (aproximadamente 20 mg) foi homogeneizado com 500 μ L de solução de lise (Triton X100 1,0%, Tris/HCl 100 mM, Glicerol 20% e EDTA 0,2 mM), em homogeneizador elétrico (Power Gen 125 - Fisher Scientific[®]). Para o *pellet*, utilizou-se 100 μ L de solução de lise por poço para retirar as células da placa. A fim de se utilizar a mesma quantidade de proteína por amostra, procedeu-se à quantificação por ensaio de Bradford (Bio-Rad[®]). Amostras com 30 μ g de proteína contendo o *loading buffer* (Tris-HCl 0,5 mM, Glicerol 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% e bromofenol 1%) foram separadas por eletroforese em gel desnaturante de 10% poliacrilamida-SDS e posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpo primário específico *overnight* (anti-SYK, diluição 1:1000, Santa Cruz[®]) e então incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário conjugado à enzima HRP (anticorpo anti-mouse, diluição 1:3000, Santa Cruz[®]). As bandas imunorreativas foram visualizadas por revelação com ECL, segundo as instruções do fabricante (GE Healthcare[®]). Como controle, as bandas de β -actina (Sigma[®]) foram utilizadas.

3.14 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre as médias foram comparadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t não pareado. Os resultados foram considerados significativos quando valor de $p < 0,05$. Diferenças entre o grupo infectado e seu controle não infectado com $p < 0,05$ foram representadas graficamente com um asterisco (*), ** para $p < 0,01$, *** para $p < 0,001$ e **** para $p < 0,0001$. Diferenças entre os grupos infectados com $p < 0,05$ foram representadas graficamente com um sinal de soma (+), ++ para $p < 0,01$, +++ para $p < 0,001$ e ++++ para $p < 0,0001$.

4 RESULTADOS

4.1 Animais deficientes para Fc γ RIIb ou Fc γ RIII possuem diferenças no controle bacteriano e no acúmulo de células na articulação após infecção por *S. aureus*

A fim de se compreender a importância dos receptores Fc γ RIIb no contexto da artrite séptica experimental, animais deficientes para tais receptores foram utilizados e sua resposta frente à injeção intra-articular de *S. aureus* comparada à resposta de animais selvagens (WT) Para isso, o tempo de infecção utilizado foi o tempo com melhores resultados na padronização do modelo, sete dias, tempo considerado o pico da inflamação. A contagem de leucócitos totais, mononucleares e neutrófilos presentes na cavidade articular demonstra que, após sete dias de infecção, somente o grupo de animais selvagens apresenta aumento no acúmulo de leucócitos frente aos animais não infectados. Observa-se que os animais deficientes em receptores Fc γ RIIb possuem redução estatisticamente significativa do recrutamento de células inflamatórias, especialmente neutrófilos, sete dias após a injeção de *S. aureus*, quando comparados aos animais selvagens (Figura 9A, 9B e 9C).

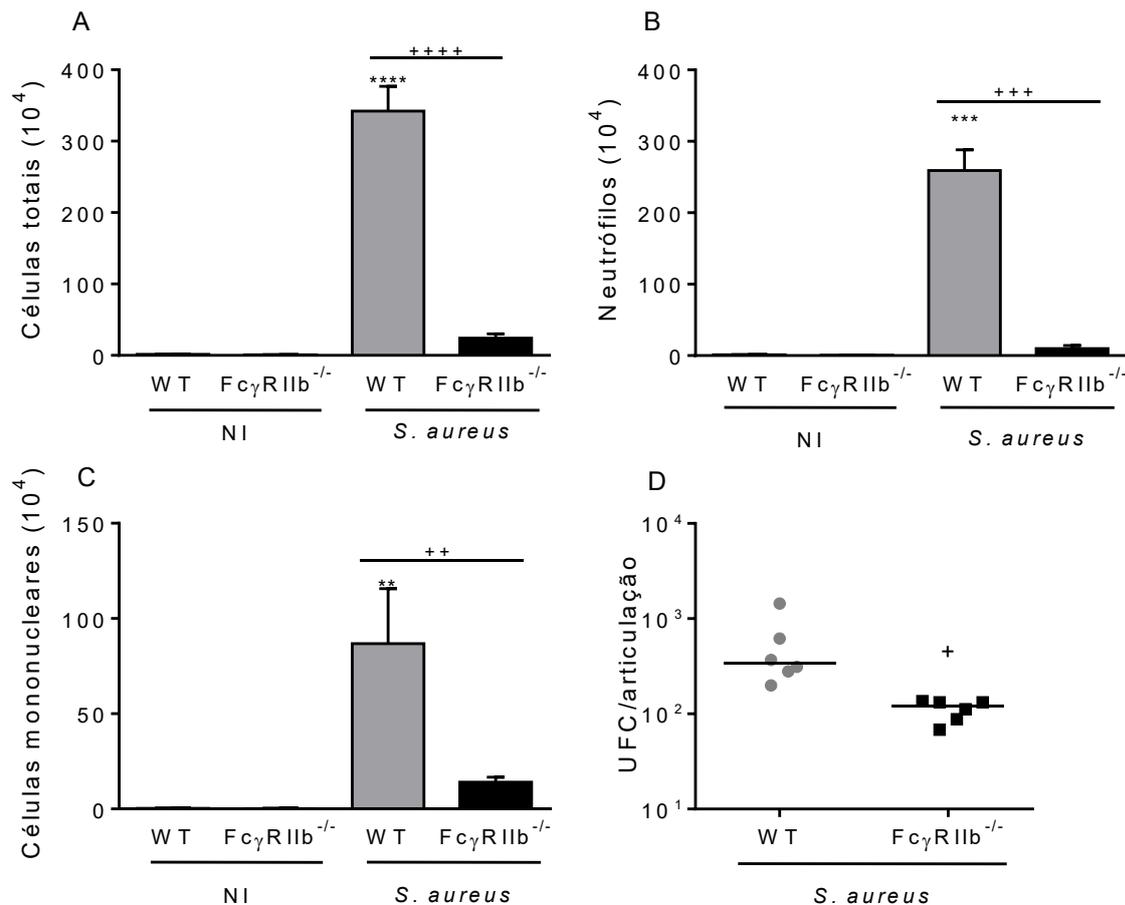


Figura 9 – Recrutamento celular e recuperação bacteriana no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para $Fc\gamma RIIb$ ($Fc\gamma RIIb^{-/-}$). O modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes de receptores $Fc\gamma RIIb$ e selvagens foi realizado a partir do inóculo de 10^5 UFC/ $10\mu L$ com injeção intra-articular de $10\mu L$. Sete dias após a infecção, os animais foram eutanasiados para a recuperação de leucócitos totais (A), de neutrófilos (B), de mononucleares (C) e de bactérias acumulados para a cavidade articular (D). Valores expressos em média de número de células ou bactérias por cavidade + EPM. ** para $p < 0,01$, *** para $p < 0,001$ e **** para $p < 0,0001$ em relação ao grupo não infectado. + para $p < 0,05$, ++ para $p < 0,01$, +++ para $p < 0,001$ e ++++ para $p < 0,0001$ em relação aos grupos infectados. Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey para células totais, neutrófilos e células mononucleares e teste t não pareado para recuperação de bactéria. Foram utilizados 6 animais por grupo.

Assim como o realizado para os receptores $Fc\gamma RIIb$, animais deficientes para receptores $Fc\gamma RIII$ foram utilizados e sua resposta frente à injeção intra-articular de *S. aureus* foi comparada à resposta de animais selvagens (WT). A contagem de leucócitos totais, mononucleares e neutrófilos presentes na cavidade articular demonstra que, após

sete dias de infecção, os dois grupos infectados apresentaram aumento no acúmulo de células na articulação, sendo que os animais sem receptores FcγRIII possuem número de leucócitos totais comparável ao animal selvagem, mas apresentam aumento estatisticamente significativo no recrutamento de neutrófilos (Figura 10).

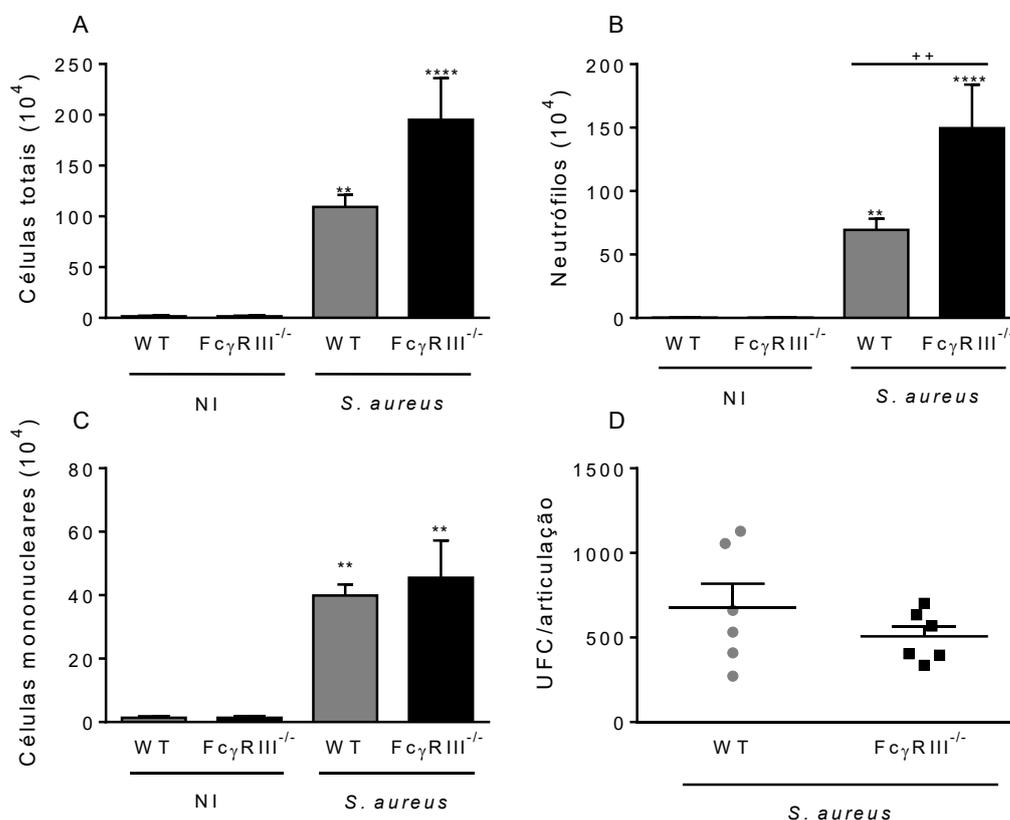


Figura 10 – Recrutamento celular e recuperação bacteriana na articulação no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagem (WT) e deficientes para FcγRIII (FcγRIII^{-/-}). O modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes de receptores FcγRIII e selvagens foi realizado a partir do inóculo de 10⁵ UFC/10μL com injeção intra-articular de 10 μL. Sete dias após a infecção, os animais foram eutanasiados para a recuperação de leucócitos totais (A), de neutrófilos (B), de mononucleares (C) e de bactérias acumulados para a cavidade articular (D). Valores expressos em média de número de células ou bactérias por cavidade + EPM. ** para p < 0,01 e **** para p < 0,0001 em relação ao grupo não infectado e ++ para p < 0,01 em relação aos grupos infectados com teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey para células totais, neutrófilos e células mononucleares e teste t não pareado para recuperação de bactéria. Foram utilizados 6 animais por grupo.

4.2 Papel do receptor FcγRIIb na resposta inflamatória e controle bacteriano na artrite induzida por *S. aureus*

A partir dos resultados iniciais, foi realizada uma cinética da infecção para avaliar as diferenças entre o acúmulo celular e controle bacteriano na articulação dos animais selvagens e deficientes para o receptor FcγRIIb, com análises realizadas nos tempos de 1, 4 e 7 dias após a infecção. A contagem de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares mostra um aumento significativo já no primeiro dia em ambos os animais quando comparados com os animais não infectados. Porém, enquanto nos animais selvagens a quantidade de células aumenta ao longo do tempo, animais deficientes para FcγRIIb têm o pico de acúmulo de células totais e de neutrófilos no dia 1, apresentando maior acúmulo de células totais e de neutrófilos neste ponto da cinética e redução significativa no acúmulo de células após sete dias de infecção em relação aos animais selvagens (Figura 11).

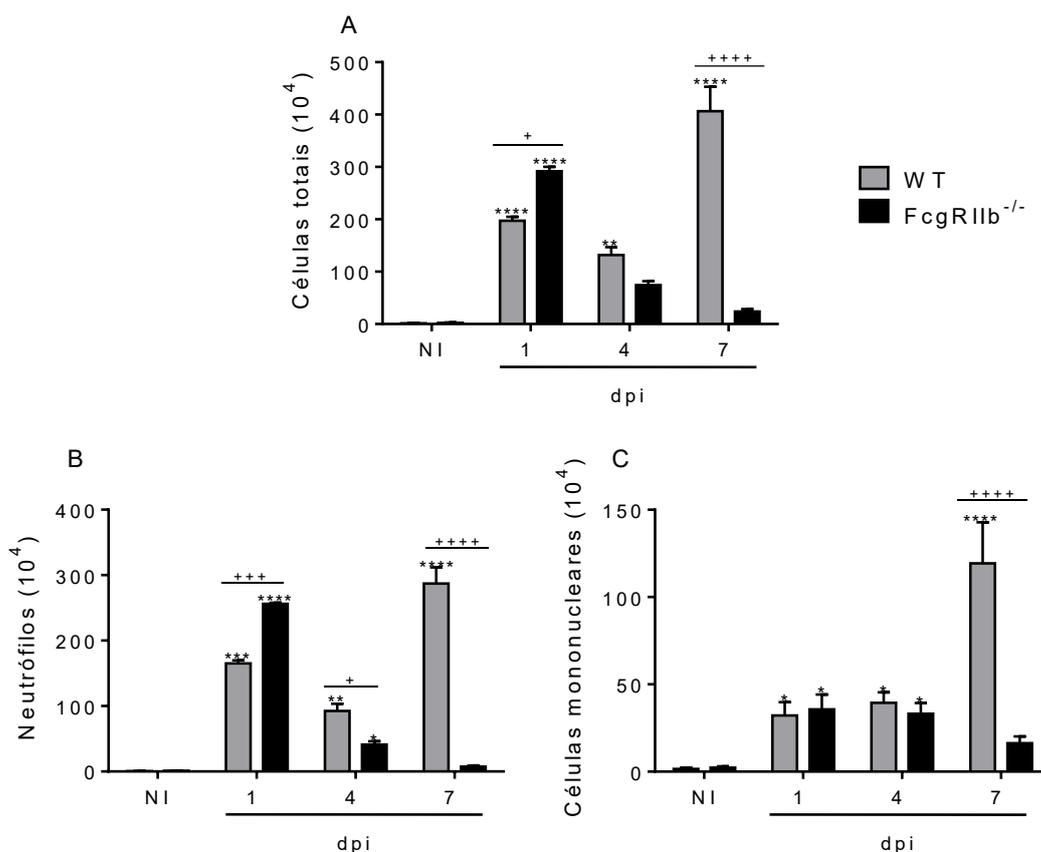


Figura 11– Recrutamento celular no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para FcγRIIb (FcγRIIb^{-/-}). O modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes de receptores FcγRIIb e selvagens foi realizado a

partir do inóculo de 10^5 UFC/10 μ L com injeção intra-articular de 10 μ L. Um, quatro e sete dias após a infecção, os animais foram eutanasiados para a recuperação de leucócitos totais (A), de mononucleares (B) e neutrófilos (C) acumulados para a cavidade articular. Valores expressos em média de número de células por cavidade + EPM. * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$, *** para $p < 0,001$ e **** para $p < 0,0001$ em relação ao grupo não infectado. + para $p < 0,05$, ++ para $p < 0,01$, +++ para $p < 0,001$ e ++++ para $p < 0,0001$ em relação aos grupos infectados. Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey. Foram utilizados 6 animais por grupo. dpi – dias pós infecção

Em relação à quantidade de bactérias recuperadas da articulação, não houve diferença no crescimento de *S. aureus* entre os dois grupos nos tempos de 1 e 4 dias após a infecção. Apenas no dia 7 dpi, animais deficientes para Fc γ RIIb apresentaram menor carga bacteriana em relação aos animais selvagens, como demonstrado anteriormente. (Figura 12).

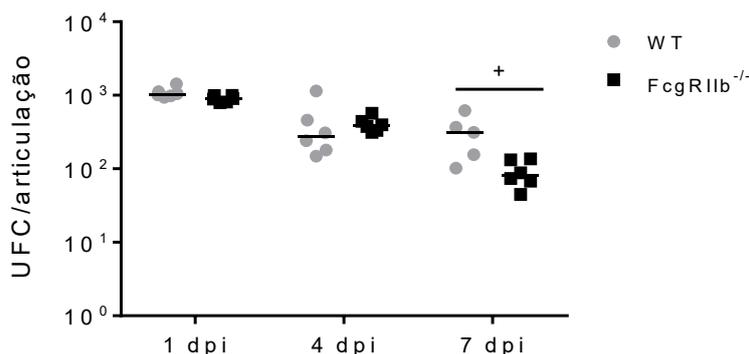


Figura 12 – Carga bacteriana no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para Fc γ RIIb (Fc γ RIIb^{-/-}). Animais Fc γ RIIb^{-/-} e WT foram infectados com um inóculo de 10^5 UFC/10 μ L de *S. aureus* intra-articular. Os animais foram eutanasiados após um, quatro e sete dias e foi realizada a maceração do joelho dos animais para posterior plaqueamento, identificação e contagem de colônias na articulação. + para $p < 0,05$ em relação aos grupos infectados após teste One-way ANOVA. Foram utilizados 5 ou 6 animais por grupo.

Um outro parâmetro inflamatório importante deste modelo é a presença de dor articular, que pode ser causada por moléculas pró-inflamatórias e também pelo próprio *S. aureus* (4,84). Não houve diferença entre ambos os grupos no primeiro dia avaliado. Porém, animais deficientes para Fc γ RIIb tiveram um limiar de retirada de pata maior a

partir do quarto dia de infecção, ou seja, resistem a maiores pressões, o que representa níveis mais baixos de dor (Figura 13).

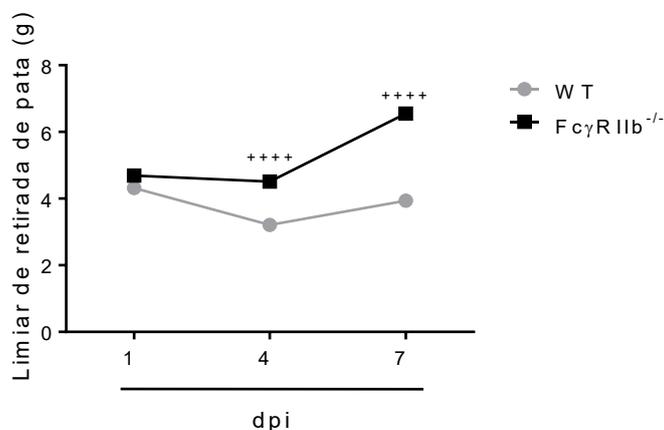


Figura 13 – Limiar de retirada de pata em modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para FcγRIIb (FcγRIIb^{-/-}). O modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes de receptores FcγRIIb e selvagens foi realizado a partir do inóculo de 10⁵ UFC/10μL com injeção intra-articular de 10 μL. Um, quatro e sete dias após a infecção, os animais foram distribuídos em gaiolas metálicas e submetidos ao método von Frey de medida de nocicepção. **** para p <0,0001 em relação aos grupos infectados. Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey. Foram utilizados 6 animais por grupo.

Após essa demonstração inicial de diferenças importantes entre os animais selvagens e deficientes para FcγRIIb após a infecção por *S. aureus*, o próximo passo foi tentar entender como a ausência do receptor FcγRIIb modifica o curso da doença, levando a um melhor controle da carga bacteriana após 7 dias de infecção nos animais deficientes para FcγRIIb. Assim, buscamos entender os mecanismos associados com um maior recrutamento celular, especialmente de neutrófilos, no primeiro dia após a infecção nos animais deficientes para FcγRIIb. Primeiro, foi feita a dosagem de quimiocinas relacionadas com o recrutamento de neutrófilos no tecido periarticular. Como observado na Figura 14, a infecção por *S. aureus* levou a um aumento dos níveis de CXCL1 e CXCL6 no primeiro dia em ambos os grupos em relação aos animais não infectados. Porém, não houve diferenças entre animais selvagens e deficientes para FcγRIIb. Embora sem diferença estatística nos valores de CXCL6, é importante observar que houve um valor de p = 0,08 entre os grupos.

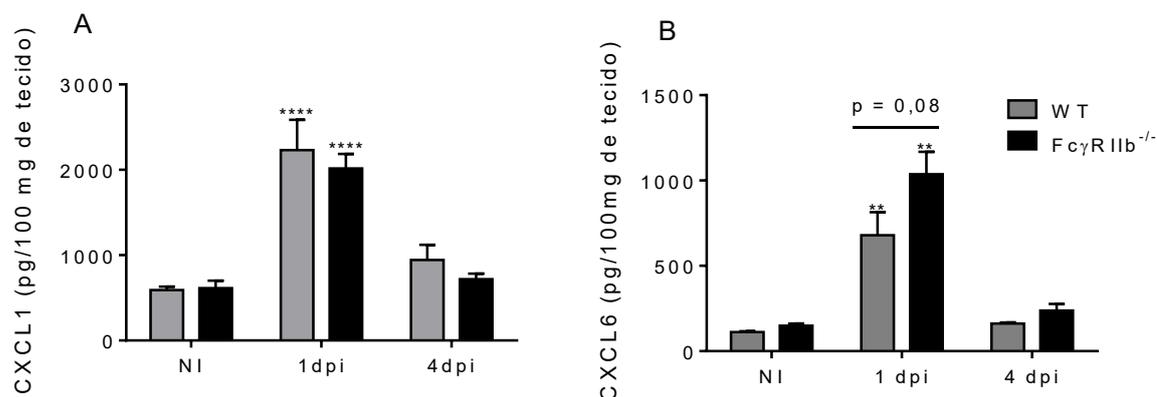


Figura 14 – Níveis de CXCL1 e CXCL6 em modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para FcγRIIb (FcγRIIb^{-/-}). O modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes de receptores FcγRIIb e selvagens foi realizado a partir do inóculo de 10⁵ UFC/10μL com injeção intra-articular de 10 μL. Um e quatro dias após a infecção, os animais foram eutanasiados para a retirada do tecido periarticular e, por meio do ensaio de ELISA foram dosados os níveis de CXCL-1 (A) e CXCL6 (B). ** para p < 0,01 e **** para p < 0,0001 em relação ao grupo não infectado. + para p < 0,05 em relação aos grupos infectados. Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey. Foram utilizados 6 animais por grupo.

Sabendo-se que os animais deficientes para FcγRIIb apresentam expressivo aumento no acúmulo de células no início de infecção (1 dia) e os níveis de quimiocinas nos animais nocautes se assemelham aos animais selvagens, nós consideramos duas outras possibilidades que pudessem explicar um maior número de neutrófilos em animais deficientes para FcγRIIb. Primeiro, avaliamos a expressão do receptor CXCR2 na superfície de neutrófilos de medula após estímulo com *S. aureus*. O receptor CXCR2 é um receptor altamente expresso em neutrófilos ativados e uma peça muito importante no recrutamento de tais células, uma vez que se liga a diversas quimiocinas (CXCL1, CXCL2, CXCL6 e outras) e garante a movimentação da célula na direção do gradiente de quimiocinas, levando ao infiltrado de neutrófilos no sítio da inflamação. Observou-se, então, um aumento na porcentagem de neutrófilos expressando tal receptor no grupo deficiente para FcγRIIb (Figura 15). Esse dado explicaria um maior infiltrado de neutrófilos em animais deficientes para FcγRIIb mesmo apresentando concentrações equiparáveis das quimiocinas CXCL1 e CXCL6 em ambos os grupos.

O próximo passo foi avaliar se a viabilidade dos neutrófilos era diferente entre os dois grupos. A apoptose foi quantificada por meio da contagem de neutrófilos morfologicamente apoptóticos em lâmina de lavado realizado 1 dia após a infecção. De acordo com a Figura 15, animais deficientes para receptores FcγRIIb apresentam porcentagens maiores de neutrófilos em apoptose (Figura 15). Pensando no aumento do acúmulo de neutrófilos no primeiro dia de infecção, esse dado não é o esperado, mas isso poderia facilitar, de certa forma, um melhor controle da resposta inflamatória articular em tempos mais tardios, visto que a apoptose de neutrófilos é um importante processo de resolução da inflamação e para que o tecido se recupere após a infecção.

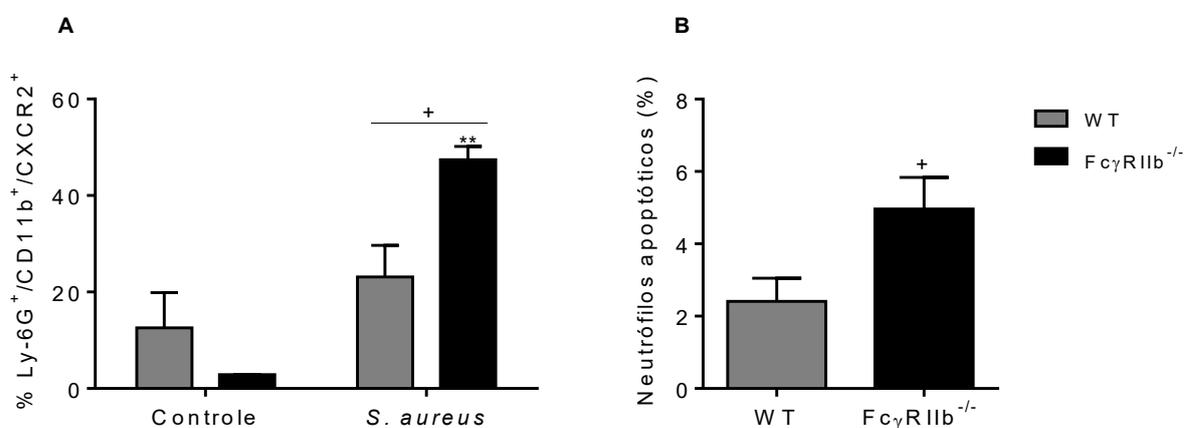


Figura 15 – Animais deficientes em FcγRIIb (FcγRIIb^{-/-}) têm maior quantidade de neutrófilos expressando CXCR2 e neutrófilos em apoptose. (A) As medulas dos animais foram lavadas e as células incubadas com *S. aureus* ou PBS (controle) por seis horas. A expressão do receptor foi avaliada por meio de citometria de fluxo. (B) O modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes de receptores FcγRIIb e selvagens foi realizado a partir do inóculo de 10⁵ UFC/10μL com injeção intra-articular de 10 μL. Um dia a infecção, os animais foram eutanasiados para a recuperação de células na cavidade articular e lâminas foram preparadas para a análise morfológica de neutrófilos apoptóticos. ** para p < 0,01 em relação ao controle. + para p < 0,05 em relação aos grupos infectados. Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey para gráfico A, teste T não pareado para gráfico B. Foram utilizados de 5 a 6 animais por grupo.

Após a avaliação de CXCR2 e neutrófilos apoptóticos, outros marcadores de inflamação e de ativação celular entre animais selvagens e deficientes para FcγRIIb foram avaliados. IL-1β é uma citocina pró-inflamatória produzida e ativada nas infecções por *S.*

aureus (85). Para analisar sua importância neste modelo, IL-1 β foi dosada em tecido periarticular. Como observado na Figura 16, a infecção por *S. aureus* levou a um aumento dos níveis de IL-1 β no primeiro dia em ambos os grupos em relação aos animais não infectados. Entre os grupos infectados, os animais deficientes para Fc γ RIIb apresentavam níveis significativamente mais altos que os animais selvagens no primeiro dia após a infecção. No quarto dia, a quantidade de IL-1 β reduz e não há diferenças entre os grupos infectados e entre os grupos infectados e seus respectivos controles (Figura 16A). Assim como a dosagem de IL-1 β no tecido periarticular, tal dosagem foi realizada em macrófagos derivados de medula óssea. Os resultados *in vitro* foram semelhantes aos observados *in vivo*, macrófagos de animais deficientes para Fc γ RIIb produzem mais IL-1 β ao serem incubados com *S. aureus* por 6 horas, quando comparados aos animais selvagens (Figura 16B). A bactéria foi previamente opsonizada com soro de animais selvagens para garantir a fagocitose.

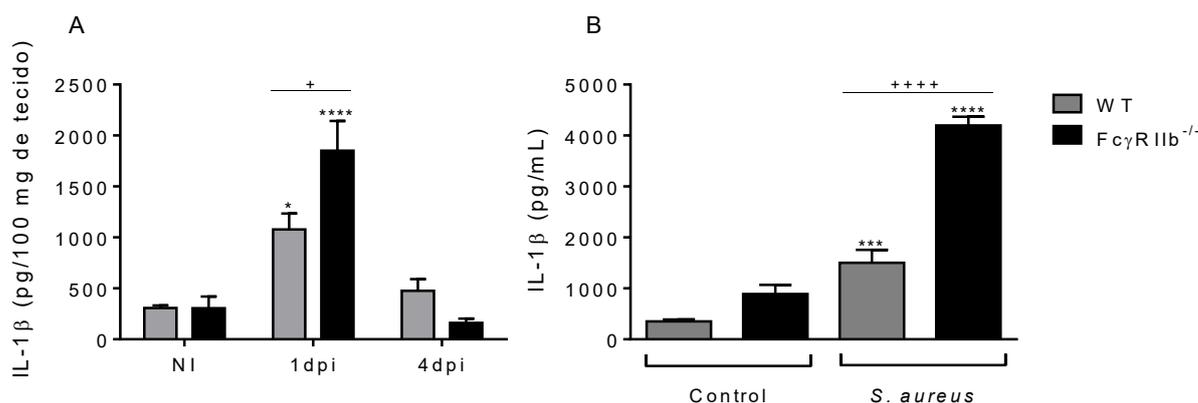


Figura 16 – Níveis de IL-1 β em modelo experimental de artrite séptica e em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos selvagens (WT) e deficientes para Fc γ RIIb (Fc γ RIIb^{-/-}). (A) O modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes de receptores Fc γ RIIb e selvagens foi realizado a partir do inóculo de 10⁵ UFC/10 μ L com injeção intra-articular de 10 μ L. Um e quatro dias após a infecção, os animais foram eutanasiados para a retirada do tecido periarticular e, por meio do ensaio de ELISA foram dosados os níveis de IL-1 β . (B) Os macrófagos de animais deficientes para os receptores Fc γ RIIb e selvagens diferenciados por sete dias foram incubados com *S. aureus*. Por meio de ensaio de ELISA foram dosados os níveis de IL-1 β no sobrenadante das células. * para p < 0,05, *** para p < 0,001 e **** para p < 0,0001 em relação ao grupo não infectado. + para p < 0,05, ++++ para p < 0,0001

em relação aos grupos infectados. Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey. Foram utilizadas 6 amostras por grupo.

O aumento de IL-1 β requer a produção de pro-IL-1 β e sua clivagem enzimática por caspase 1, gerando a interleucina ativa. Um importante mecanismo que leva à produção de caspase 1 e à clivagem de IL-1 β é por meio do inflamassoma NLRP3. Os mecanismos que ativam tal inflamassoma ainda não são muito claros, mas sabe-se que a cascata de moléculas e enzimas que levam à produção de IL-1 β envolve SYK (86). SYK é uma tirosina cinase importante na transmissão do sinal dos receptores Fc para a sinalização intracelular, levando à produção de mensageiros secundários e gerando diversas respostas celulares. Devido à sua importância na via de sinalização e na possível conexão entre os receptores Fc γ R e a produção de IL-1 β por meio de NLRP3, tal molécula foi dosada por Western blot no tecido periarticular de animais selvagens e deficientes para Fc γ RIIb 7 dias após a injeção de *S. aureus*. Qualitativamente, observou-se que os grupos infectados possuem maior expressão de SYK, especialmente os animais nocautes (Figura 17).

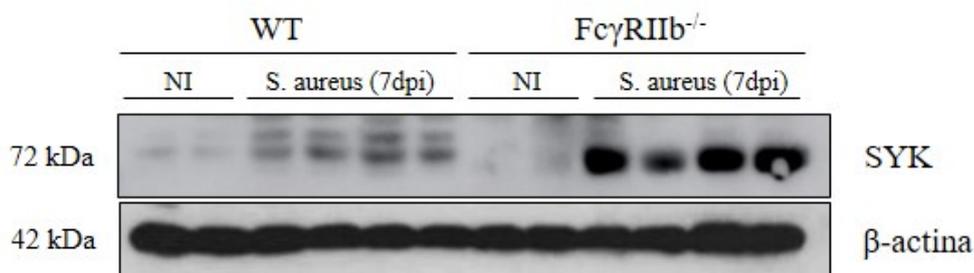


Figura 17– Recrutamento celular no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para Fc γ RIIb (Fc γ RIIb^{-/-}). O modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes de receptores Fc γ RIIb e selvagens foi realizado a partir do inóculo de 10⁵ UFC/10 μ L com injeção intra-articular de 10 μ L. Sete dias após a infecção, os animais foram eutanasiados e o tecido periarticular foi retirado e processado para Western blot. β -actina foi utilizado como controle.

4.3 Papel do receptor FcγRIII na resposta inflamatória e controle bacteriano na artrite induzida por *S. aureus*

A partir dos resultados iniciais, foi realizada uma cinética da infecção para avaliar as diferenças entre o acúmulo celular e controle bacteriano na articulação dos animais selvagens e deficientes para o receptor FcγRIII. Uma vez que os animais nocautes apresentaram infiltrado celular similar ou aumentado após sete dias de infecção, decidiu-se estudar tempos mais tardios. Animais selvagens e deficientes para o receptor FcγRIII foram, então, submetidos à infecção e eutanasiados 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção. A contagem de leucócitos totais, neutrófilos mostra um expressivo aumento no acúmulo de células no 14º dia após a infecção nos animais FcγRIII^{-/-}, em comparação aos animais selvagens. Após 42 dias de infecção, os animais deficientes para tal receptor ainda apresentam grande acúmulo de leucócitos, enquanto os animais selvagens apresentam poucas células e especialmente mononucleares (Figura 18).

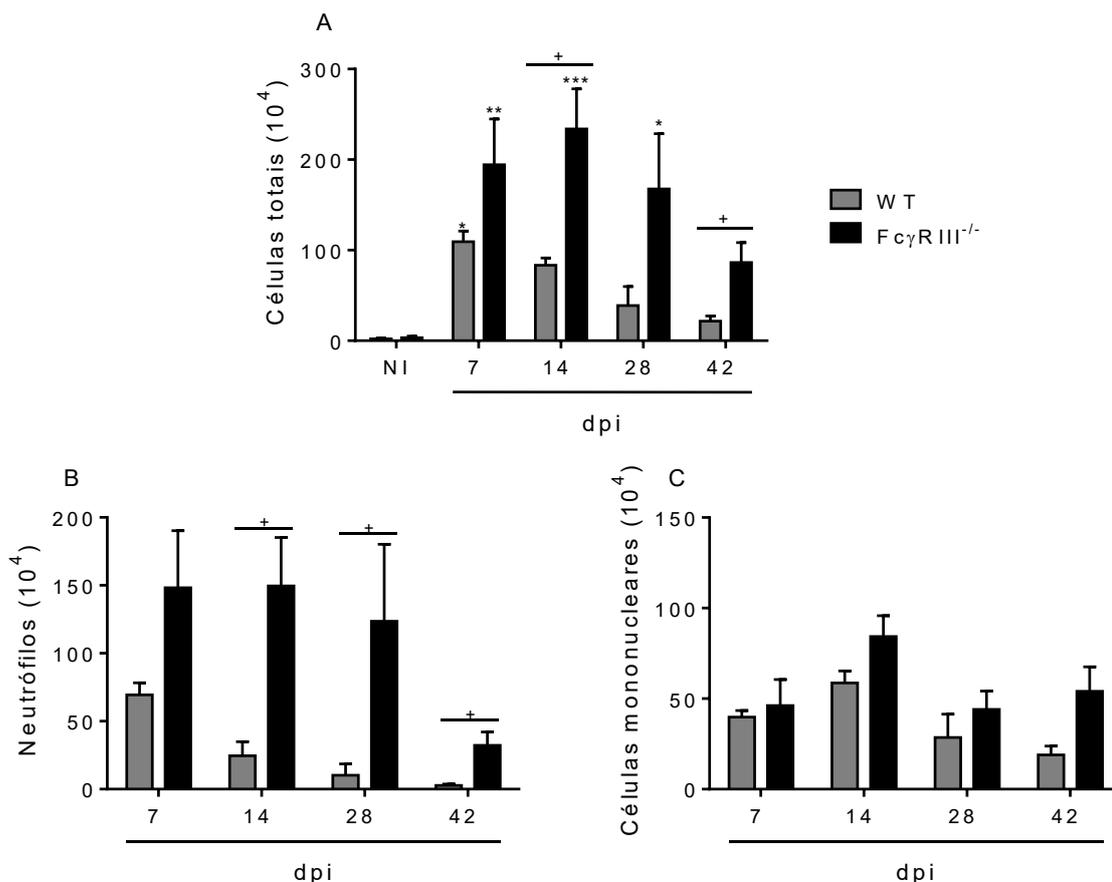


Figura 18 – Recrutamento celular no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagem (WT) e deficientes para FcγRIII (FcγRIII^{-/-}). O modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes de receptores FcγRIII e selvagens foi realizado a

partir do inóculo de 10^5 UFC/10 μ L com injeção intra-articular de 10 μ L. 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção, os animais foram eutanasiados para a recuperação de leucócitos totais (A), de neutrófilos (B) e mononucleares (C) acumulados para a cavidade articular. Valores expressos em média de número de células por cavidade + EPM. * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ em relação ao grupo não infectado. + para $p < 0,05$ em relação aos grupos infectados. Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey. Foram utilizados 6 animais por grupo.

Em relação à quantidade de bactérias recuperadas da articulação, não houve diferença no crescimento de *S. aureus* entre os dois grupos nos tempos de 7 e 14 dias após a infecção. Nos tempos de 28 e 42 dpi, animais deficientes para Fc γ RIII apresentaram maior carga bacteriana em relação aos animais selvagens (Figura 19).

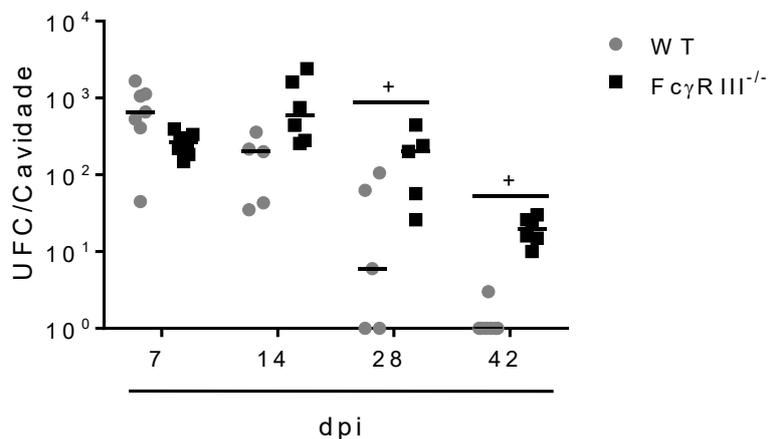


Figura 19 – Carga bacteriana no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens(WT) e deficientes para Fc γ RIII (Fc γ RIII^{-/-}). Animais Fc γ RIII^{-/-} e WT foram infectados com um inóculo de 10^5 UFC/10 μ L de *S. aureus* intra-articular. Os animais foram eutanasiados após 7, 14, 28 e 42 dias e foi realizada a maceração do joelho dos animais para posterior plaqueamento, identificação e contagem de colônias na articulação. + para $p < 0,05$ em relação aos grupos infectados após teste One-way ANOVA. Foram utilizados de 5 a 7 animais por grupo.

Um outro parâmetro inflamatório importante deste modelo é a presença de dor articular. Não houve diferença entre os grupos nos dias avaliados, ou seja, animais selvagens e nocautes apresentam resistência à pressão e nocicepção comparáveis (Figura 20).

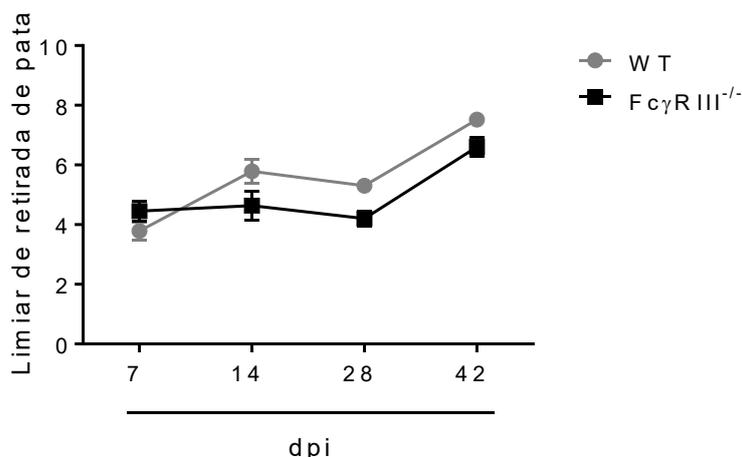


Figura 20 – Limiar de retirada de pata em modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para FcγRIII (FcγRIII^{-/-}). O modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes de receptores FcγRIII e selvagens foi realizado a partir do inóculo de 10⁵ UFC/10μL com injeção intra-articular de 10 μL. 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção, os animais foram distribuídos em gaiolas metálicas e submetidos ao método von Frey de medida de nocicepção. Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey. Foram utilizados 6 animais por grupo.

Para evidenciar as diferenças encontradas anteriormente, foi realizada a análise histopatológica da articulação tibiofemoral após 28 dias de infecção. Esse tempo foi escolhido por se tratar de uma fase tardia, mas na qual os animais nocautes ainda apresentam intenso acúmulo de leucócitos no tecido sinovial. Os cortes histológicos foram corados com coloração de H&E, a análise foi realizada por um único patologista. Os cortes estão representados na Figura 21, sendo que as imagens localizadas a esquerda possuem aumento de 40 vezes, um local de interesse foi selecionado e está representado no centro com aumento de 100 vezes, neste aumento outro local de interesse foi selecionado e está representado a direita em aumento de 600 vezes. Os animais não infectados apresentam tecido articular normal caracterizado por membrana sinovial íntegra e subíntima constituída de tecido adiposo, sem infiltrado celular e reabsorção óssea (Figura 21A-F). Após 28 dias de infecção, os animais selvagens apresentaram infiltrado celular, perda óssea e de cartilagem e hiperplasia da membrana sinovial (Figura 21G-I). No mesmo tempo, os animais nocautes têm maior escore histopatológico (Figura 21M), apresentando infiltrado celular mais intenso, composto principalmente por

neutrófilos que se acumulam formando áreas de microabcesso (Figura 21L), um tipo de lesão característica desta infecção cujo objetivo é restringir o microrganismo e otimizar sua eliminação (16). Também é observado perda óssea e cartilaginosa mais acentuada e extensa hiperplasia da membrana sinovial (Figura 21J e K).

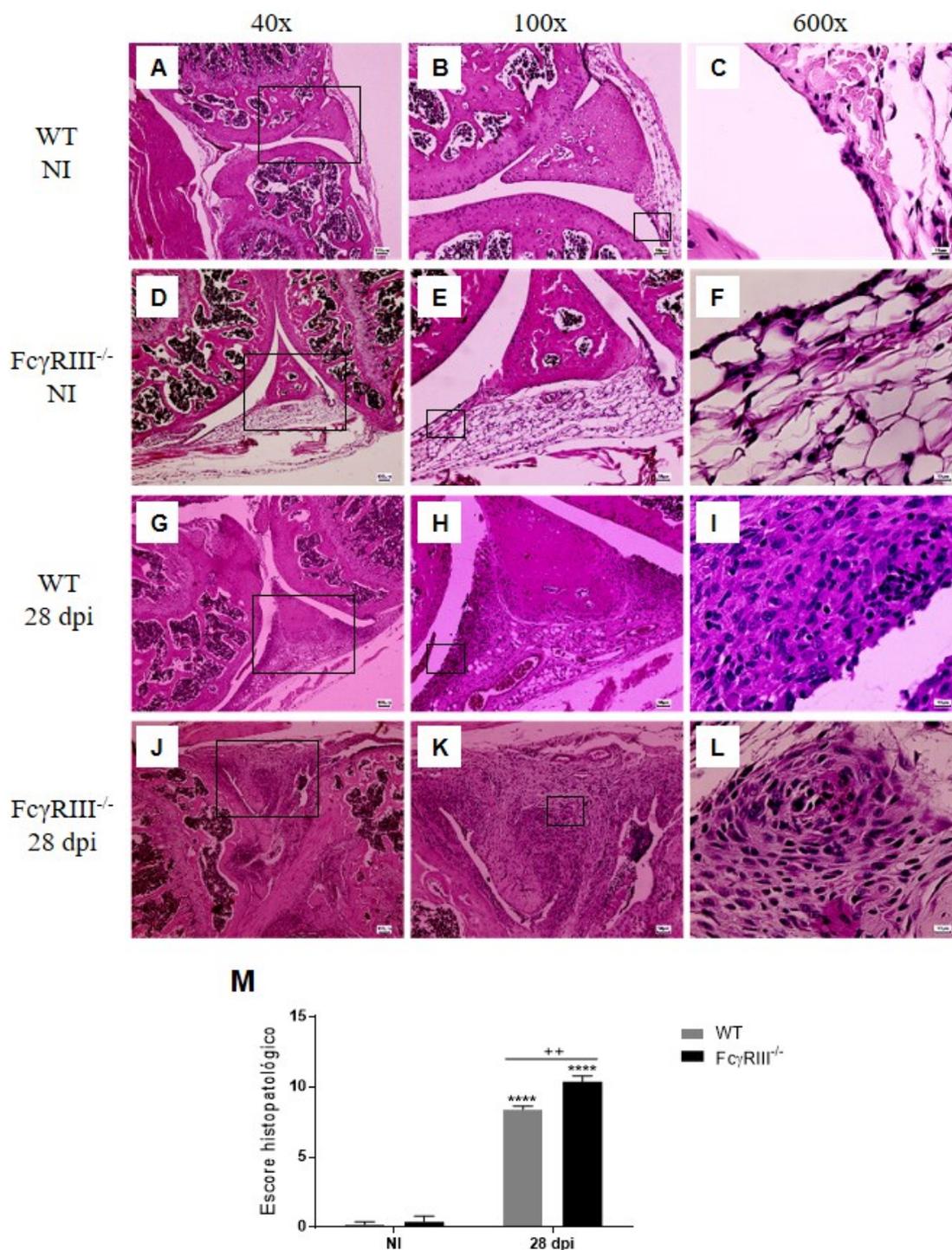


Figura 21 – Escore e cortes histopatológicos no modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para FcγRIII (FcγRIII^{-/-}). Animais deficientes em

receptores Fc γ RIII e selvagens foram infectados com um inóculo de 10^5 UFC/10 μ L de *S. aureus* intra-articular. Os animais foram eutanasiados após 28 dias de infecção e foi realizado o processamento e análise dos cortes histopatológicos. (A-C) Animal WT não infectado; (D-F) Animal Fc γ RIII^{-/-} não infectado; (G-I) Animal WT após 28 dias de infecção; (J-L) Animal Fc γ RIII^{-/-} após 28 dias de infecção. Imagens A, D, G e J possuem aumento de 40 vezes; Imagens B, E, H e K possuem aumento de 100 vezes; Imagens C, F, I e L possuem aumento de 600 vezes. **** para $p < 0,0001$ em relação ao grupo não infectado, ++ para $p < 0,01$ em relação aos grupos infectados após teste One-way ANOVA. Foram utilizados 5 animais por grupo.

Com a demonstração de diferenças importantes entre os animais selvagens e deficientes para Fc γ RIII após a infecção por *S. aureus*, o próximo passo foi tentar entender como a ausência do receptor Fc γ RIII modifica o curso da doença, dificultando o controle bacteriano e prolongando a infecção. Assim, buscamos entender os mecanismos associados com o maior acúmulo celular, especialmente de neutrófilos, nos tempos tardios da infecção e a dificuldades destas células em eliminar a bactéria nos animais deficientes para Fc γ RIII. Inicialmente, foi feita a dosagem de uma importante quimiocina relacionada com o recrutamento de neutrófilos no tecido periarticular. Como observado na Figura 22, a infecção por *S. aureus* levou a um aumento dos níveis de CXCL1 no sétimo dia em ambos os grupos em relação aos animais não infectados. Porém, os animais selvagens apresentam normalização destes valores, que retornam ao nível basal 28 dias após a infecção. Enquanto isso, animais deficientes para Fc γ RIIIb continuam apresentando valores elevados de CXCL1. Além da quimiocina, também foi dosado a interleucina IL-1 β devido ao seu importante papel na inflamação. Não foi observado aumento de IL-1 β no grupo de animais selvagens em nenhum dos tempos, enquanto os animais nocautes têm aumento dos níveis de interleucina14 e 28 dias após a infecção (Figura 22).

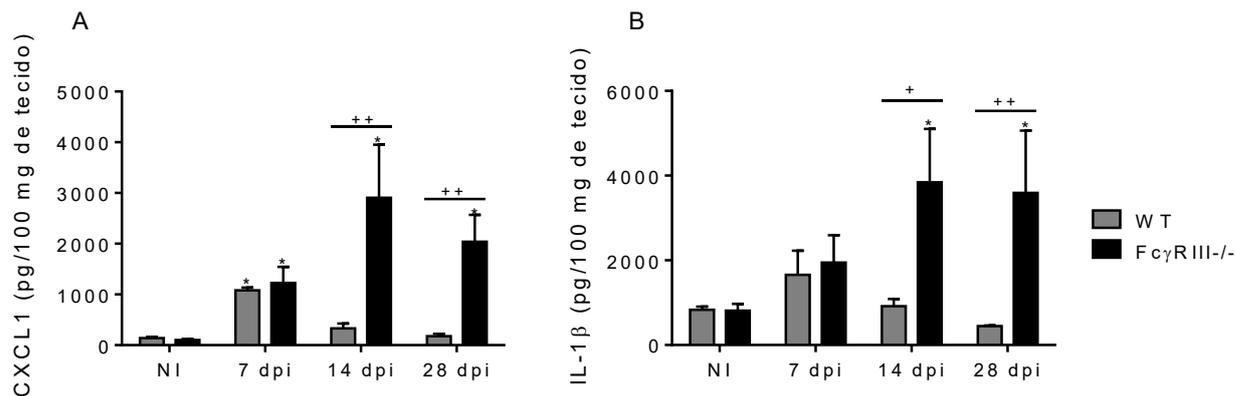


Figura 22 - Níveis de CXCL1 e IL-1β em modelo experimental de artrite séptica em camundongos selvagens (WT) e deficientes para FcγRIII (FcγRIII^{-/-}). O modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes em receptores FcγIII e selvagens foi realizado a partir do inóculo de 10⁵ UFC/10μL com injeção intra-articular de 10 μL. 7, 14 e 28 dias após a infecção, os animais foram eutanasiados para a retirada do tecido periarticular e, por meio do ensaio de ELISA foram dosados os níveis de IL-1β (A) e CXCL1 (B). * para p < 0,05 em relação ao grupo não infectado. + para p < 0,05, ++ para p < 0,01 em relação aos grupos infectados. Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey. Foram utilizados 6 animais por grupo.

Uma vez que os animais deficientes para receptores FcγRIII são incapazes de controlar a bactéria e mantêm grande acúmulo de células na articulação mesmo após 42 dias de infecção, decidiu-se avaliar a exaustão de linfócitos no linfonodo poplíteo destes animais. A exaustão clonal é um fenômeno de proteção do sistema imune no caso de excesso de antígenos ou exposição prolongada a estes. Nesse cenário, os linfócitos têm sua atividade reduzida e aumentam a expressão de algumas moléculas, como PD1, que são utilizadas como marcadores de exaustão (45,87,88). O observado por meio de citometria de fluxo foi um aumento de expressão de PD1 em linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, em relação aos animais selvagens (Figura 23).

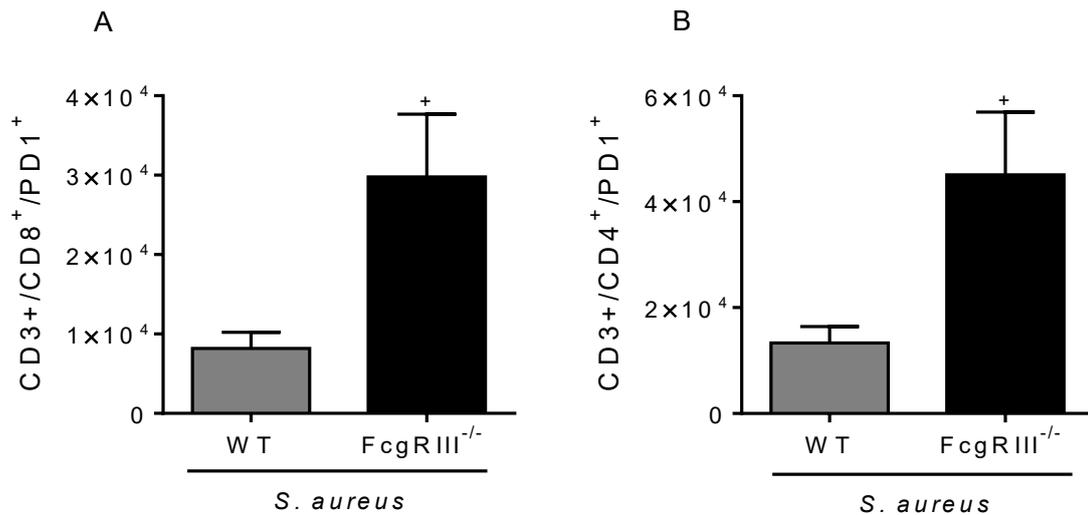


Figura 23 – Animais deficientes em FcγRIII (FcγRIII^{-/-}) têm maior quantidade de linfócitos CD4 e CD8 no linfonodo poplíteo expressando PD1. O modelo experimental de artrite séptica em camundongos deficientes em receptores FcγRIII e selvagens foi realizado a partir do inóculo de 10⁵ UFC/10μL com injeção intra-articular de 10 μL. 42 dias após a infecção, os animais foram eutanasiados para a retirada do linfonodo poplíteo. Expressão representada em valores absolutos de células. + para p < 0,05 em relação aos grupos infectados. Teste *t* não pareado. Foram utilizados de 5 a 6 animais por grupo.

5 DISCUSSÃO

Artrite séptica é uma doença com altas taxas de morbidade e mortalidade, além de estar associada a graves complicações. No contexto desta infecção, o neutrófilo se destaca como uma célula muito importante na eliminação do microrganismo, mas também no agravamento da lesão tecidual (3,4,10,34). Muitos dos mecanismos efetores dos neutrófilos, e outras células, são mediadas por receptores FcγR. Estes receptores se ligam à porção constante das Imunoglobulinas G e desencadeiam ou inibem respostas como fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, geração de ROS, liberação de enzimas lisossomais, regulação da produção de anticorpos, produção de quimiocinas e citocinas, degranulação de neutrófilos e produção de mediadores que ativam ou interrompem cascatas inflamatórias (49,55,57,89). No presente trabalho, estudamos dois receptores FcγR para investigarmos a importância dessa família de receptores na patogênese da artrite séptica: FcγRIIb e FcγRIII, sendo o primeiro um receptor inibitório e o segundo um receptor ativador. Estudar a função destes receptores durante a infecção é importante para compreender o equilíbrio entre respostas pró e anti-inflamatórias nesta infecção, contribuindo com informações sobre a intensidade da resposta, o controle bacteriano e o retorno à homeostase.

Diversos estudos demonstram a importância de FcγR em diferentes modelos e doenças, como Lupus Sistêmico Eritematoso (70), Artrite Induzida por Antígeno (71), infecções virais (53,75,76) e infecções bacterianas (77,79,80), inclusive infecção sistêmica por *S. aureus* (58), entre outros. Nesses estudos, é evidente que FcγRIIb é muito importante no controle da resposta inflamatória, reduzindo a atividade celular e diversos processos pró-inflamatórios como produção de anticorpos, fagocitose e sobrevivência, sendo essencial para o controle dos danos causados por células e citocinas, mas podendo comprometer o *clearance* dos microrganismos. Já os receptores FcγR ativadores, têm importante papel na ativação celular e na eliminação dos microrganismos (50,79). Esses papéis exercidos pelos receptores FcγR são muito importantes na imunopatologia da artrite séptica induzida por *S. aureus*, portanto estes se tornam pontos essenciais no estudo dessa doença.

Para compreender melhor a resposta inflamatória de animais deficientes para FcγRIIb e FcγRIII e a melhor maneira de investiga-la, o recrutamento de leucócitos e a carga bacteriana na articulação dos dois grupos foram comparados aos animais selvagens em um único tempo, considerado o pico da inflamação para o último grupo. Observamos,

então, que os animais Fc γ RIIb possuem número bastante reduzido de células no sétimo dia e também redução na recuperação de bactéria, quando comparados aos animais selvagens. Tais dados trazem à tona diferentes questionamentos, pois sugerem que os animais controlam melhor a bactéria no início da infecção, seja por um acúmulo maior e mais inicial de leucócitos ou seja por uma eficiência aumentada destas células, que por razões desconhecidas deixam a cavidade articular ou entram em apoptose antes do que o observado nos animais selvagens. Por outro lado, os animais deficientes para Fc γ RIII apresentam diferença discreta quando comparados aos animais selvagens, apresentando aumento no acúmulo de neutrófilos, mas valores equiparáveis de células totais, mononucleares e carga bacteriana. Comparando-se os dados entre os dois nocautes e pensando no papel oposto que exercem, demos prosseguimento ao estudo com duas abordagens: para animais deficientes em Fc γ RIIb avaliamos os tempos iniciais (1, 4 e 7 dias após a infecção) e para animais deficientes em Fc γ RIII avaliamos os tempos mais tardios (7, 14, 28 e 42 dias após a infecção). É certo que estes receptores possuem diferentes e importantes papéis em diversos momentos da resposta inflamatória e da resolução da doença, mas os tempos foram delimitados para otimizar o estudo.

Analisando o perfil de recrutamento de leucócitos dos animais deficientes para o receptor Fc γ RIIb, é possível afirmar que a ausência deste receptor possibilita um rápido recrutamento celular, com um acúmulo intenso já no primeiro dia de infecção. Entretanto, este acúmulo não se mantém, sendo que quatro e sete dias após a infecção, o número de células na cavidade é comparável ao do animal não infectado. Para entender o que leva a esse intenso acúmulo de células, principalmente neutrófilos, os níveis de CXCL1 e CXCL6 foram quantificados no tecido periarticular no primeiro e quarto dia de infecção. Ao contrário do esperado, não foi observado aumento destas quimiocinas em relação aos animais selvagens. Muitos são os quimioatraentes que podem ser responsáveis pelo infiltrado inflamatório, como outras quimiocinas e leucotrienos (90). O leucotrieno B4 (LTB4) é um mediador inflamatório lipídico importante no recrutamento e ativação de neutrófilos em diversos quadros inflamatórios como infecções virais (91), doenças alérgicas de pele e pulmonares (91,92), doenças parasitárias (93) e bacterianas (94,95), entretanto não quantificamos LTB4 neste trabalho, assim como de vários quimioatraentes para garantirmos que não se trata do aumento de um ou mais destes levando ao acúmulo de neutrófilos. Outra opção para explicarmos essa diferença no recrutamento de células é a expressão aumentada de receptores para quimioatraentes nos animais nocautes, de

forma que a mesma quantidade de quimiocinas pode atrair mais células para o sítio da infecção. Estudos demonstram que a redução na expressão de receptores de quimiocinas como CXCR1 e CXCR2 causam deficiência no recrutamento de neutrófilos, o que pode levar ao comprometimento na eliminação de microrganismos e no controle de infecções como sepse e infecção por *H. pylori* (96,97). Os mecanismos por trás da regulação da expressão de CXCR1 e 2 não são totalmente claros, sendo que os próprios microrganismos podem inibir tal expressão por meio de TLR e óxido nítrico (NO) (96–98). Não se sabe se *S. aureus* é capaz de induzir essa alteração na expressão de receptores de quimiocinas ou o papel de receptores FcγR neste processo, então decidimos avaliar a expressão de CXCR2 em neutrófilos de medula óssea incubados com *S. aureus* por 6 horas. Foi observado um aumento na porcentagem de células expressando este receptor nos animais deficientes para FcγRIIb em relação aos animais selvagens, o que vai de encontro com o aumento do recrutamento de neutrófilos, mesmo com quantidades equiparáveis de quimiocinas. Esse resultado sugere que a ausência de FcγRIIb promove a expressão aumentada de CXCR2 e o aumento no recrutamento de neutrófilos, ou impede que a bactéria reduza a expressão deste receptor. Analisando a cinética de recrutamento de células, observamos também que, apesar do infiltrado celular ser muito intenso no primeiro dia de infecção, no quarto e sétimo dia o acúmulo sofre uma grande redução e se equipara aos animais não infectados. Esse dado sugere que os animais deficientes para FcγRIIb controlam melhor a infecção logo no início e suas células saem da cavidade ou entram em apoptose, favorecendo o controle da resposta inflamatória e evitando que os neutrófilos causem danos teciduais. Para confirmar tal hipótese, analisamos a apoptose das células do lavado por meio da análise morfológica e observamos que os animais nocautes apresentam maior porcentagem de neutrófilos apoptóticos já no primeiro dia de infecção. O aumento da apoptose desde o início da resposta inflamatória pode estar relacionado a um mecanismo de controle do acúmulo de neutrófilos, ou ainda a tendência a apoptose independente do controle da infecção pode ser uma característica desses animais. Sabe-se que FcγRIIb é importante para a apoptose de linfócitos B e T em quadros como sepse e doenças auto-imunes (78,99,100), mas não existem estudos sobre o papel deste receptor na apoptose de neutrófilos. A apoptose de neutrófilos é um importante processo para manter a homeostase, controlando a inflamação e dando início à restauração do tecido. Geralmente, a apoptose de neutrófilos é acompanhada por uma redução geral da atividade celular e uma série de eventos anti-inflamatórios. Este tipo de morte celular é desencadeada por fatores externos, como FasL e TNF- α , e fatores

intrínsecos, como ROS, estando sempre relacionada ao aumento e ativação de caspases apoptóticas (101). A apoptose pode ser induzida, atrasada ou aumentada por microrganismos, de acordo com sua capacidade de evadir e manipular o sistema imune, sendo que a própria fagocitose pode induzir a morte celular (102). A apoptose vem sendo estudada como potencial alvo terapêutico para doenças inflamatórias e infecciosas, uma vez que sua regulação pode evitar danos teciduais causados pelo excesso de células, principalmente neutrófilos, no sítio da inflamação (101–104). Os neutrófilos apoptóticos são ingeridos por macrófagos em um processo chamado eferocitose, que possibilita a limpeza do tecido sem a liberação de moléculas citotóxicas que podem causar danos. A eferocitose é vista como um processo central na resolução da inflamação e no início do reparo tecidual, sendo capaz de modular a resposta das células ao redor para torna-las pró-resolutivas (102,103). Apesar de muito importante, a eferocitose não foi observada no presente estudo, provavelmente devido aos tempos escolhidos para a eutanásia dos animais, sendo que no primeiro dia de infecção os animais ainda não apresentam níveis significativos de eferocitose e no quarto dia de infecção a intensa redução de células, principalmente neutrófilos, compromete tal avaliação. Tempos intermediários devem ser estudados para traçar um perfil mais completo de apoptose e eferocitose em animais deficientes para FcγRIIb.

A redução carga bacteriana está diretamente relacionada ao controle da inflamação e à evolução para a cura, ou seja, animais que após sete dias de infecção apresentam baixo nível de carga bacteriana na articulação estão mais próximos da resolução da inflamação. Diante disto, observa-se que os animais FcγRIIb^{-/-} possuem menor quantidade de bactérias demonstrando que controlam melhor a inflamação. Este resultado aliado aos anteriores pode indicar que a ausência dos receptores inibitórios FcγRIIb permite maior atividade celular nos primeiros dias de inflamação, sendo que o pico de neutrófilos na articulação acontece mais inicialmente e, uma vez que estas células são capazes de combater bactérias eficientemente, estas são eliminadas mais cedo (34). Entretanto, podemos observar que a carga bacteriana dos animais nocautes, apesar de reduzida, ainda está elevada (aproximadamente 100 UFC/articulação), o que não confirma a hipótese de que estes animais controlam a infecção completamente e evoluem para a resolução da inflamação antecipadamente. Estudos com tempos mais tardios precisam ser realizados para se entender melhor como a infecção prossegue após o sétimo dia, uma vez que os neutrófilos entram em apoptose e o acúmulo de leucócitos é muito reduzido nesse ponto da doença. Outro parâmetro avaliado foi a nocicepção dos animais

submetidos à infecção. A dor é causada por diversos mediadores e mecanismos, sendo que os neutrófilos e as bactérias de forma direta são capazes de ativar nociceptores (84). Como esperado, os animais deficientes para FcγRIIb têm menos nocicepção no sétimo dia de infecção, provavelmente devido às menores inflamação articular e presença de bactéria na articulação.

Para compreender o mecanismo por trás dos dados encontrados até aqui, outros marcadores de inflamação foram avaliados, dentre eles IL-1β. As citocinas desempenham diferentes papéis em doenças inflamatórias, sendo muito importante acompanhar os perfis e os impactos na resposta imune (105,106). Neste estudo, avaliou-se a produção de IL-1β, uma vez que está demonstrado na literatura que esta interleucina é importante na patogênese de doenças infecciosas (85,107). Os animais deficientes para FcγRIIb apresentaram aumento significativo de IL-1β no primeiro dia após a infecção quando comparados aos animais selvagens. De modo similar, macrófagos extraídos de medula de animais deficientes para FcγRIIb também produzem mais IL-1β após o estímulo com *S. aureus*. Um dos mecanismos envolvidos na liberação de IL-1β ativa envolve a clivagem de pró-IL-1β por caspase-1 ativada após a montagem e ativação do complexo de inflamassoma. Os inflamassomas são importantes mecanismos de controle de infecção, sendo o NLRP3 o mais descrito e estudado (32,33). Os mecanismos que levam à formação deste inflamassoma ainda não muito claros, mas sabe-se que ele pode ser ativado por diversos microrganismos, incluindo *S. aureus* (108). Uma via não canônica de clivagem e ativação de caspase-1 foi demonstrada devida à ação da molécula tirosina cinase SYK, posteriormente à ativação do receptor Dectina-1 (86,109). Esta tirosina cinase também é conhecida por fosforilar mensageiros secundários e propagar o sinal dos receptores FcγR ativadores, desencadeando uma série de respostas celulares como fagocitose e proliferação (48). Quando o receptor ativado é o FcγRIIb, inibitório, este reduz o recrutamento de SYK e leva à desforforilação de vários mensageiros secundários, inibindo respostas celulares (48). Devido à sua importância na via de sinalização e na possível conexão entre os receptores FcγR e a produção de IL-1β por meio de caspases, SYK foi dosada por *Western blot* no tecido periarticular de animais selvagens e deficientes para FcγRIIb e foi observado um aumento de expressão de SYK total em animais nocautes infectados. A ativação de SYK ocorre quando este é fosforilado e/ou se associa à tirosinas fosforiladas dos domínios ITAM, portanto a dosagem de SYK fosforilado também é importante para avaliarmos sua atividade, apesar de não ser a sua única forma ativa, mas não foi realizada (46). O aumento da expressão de SYK nos

animais deficientes para FcγRIIb sugere um aumento da clivagem de caspases inflamatórias, o que levaria ao aumento de IL-1β, como observado, mas também aumento de IL-18 (32,33). Além disso, a ativação de NLRP3 induz a ativação de caspase, aumentando a apoptose celular, o que também pode ser observado neste estudo (110). A ativação do inflamassoma pode ser um ponto chave na indução da apoptose em cenários como a infecção por *Aggregatibacter* (111), ou não estar correlacionada a este fenômeno, como em casos de apoptose de células pancreáticas induzido por estresse (112), indicando que se trata de uma relação complexa que deve ser investigada de acordo com o estímulo inflamatório.

Em relação aos estudos com animais deficientes para FcγRIII, os resultados iniciais foram importantes para o direcionamento dos estudos com avaliações de tempos mais tardios após a infecção por *S. aureus* (7, 14, 28 e 42 dias após a infecção). Analisando o perfil de recrutamento de leucócitos destes animais, é possível afirmar que a ausência deste receptor acarreta em um grande infiltrado inflamatório durante muitos dias, muito além do observado para animais selvagens, que conseguem controlar a infecção e o acúmulo de leucócitos, adotando um perfil celular resolutivo. Associado ao aumento no recrutamento celular, observamos níveis elevados de CXCL1 e IL-1β mesmo em tempos tardios da infecção (28 dias), sugerindo que ainda há estímulos para que novas células, especialmente neutrófilos, sejam recrutados e ativados. O prolongamento da inflamação e a dificuldade na resolução da doença pode significar que, na ausência do receptor FcγRIII, as células perdem sua capacidade de controlar a bactéria e/ou saírem do sítio de inflamação e entram em apoptose quando necessário. Para investigar se o excesso de células estava relacionado ao melhor ou pior controle da infecção, avaliamos a carga bacteriana na articulação dos animais. A redução da carga bacteriana é essencial para que os estímulos pró-inflamatórios reduzam e para que as células deixem a cavidade, entrem em apoptose ou adotem um perfil resolutivo, impedindo que ocorra destruição tecidual. Diante disto, observa-se que os animais FcγRIII^{-/-} possuem maior quantidade de bactérias após 28 e 42 dias de infecção, demonstrando que não são capazes de reduzir a infecção mesmo com grande acúmulo de leucócitos. Estes resultados nos sugerem que a ausência de FcγRIII impede a completa eliminação do microrganismo, levando ao aumento no acúmulo de leucócitos na cavidade articular. Neste trabalho, não investigamos os mecanismos que levam à esta falha, uma vez que os receptores FcγR estão envolvidos em várias etapas, como ativação celular, fagocitose e produção de ROS.

Os outros parâmetros inflamatórios avaliados foram o escore histopatológico e a nocicepção. Por meio de análise histológica, observamos que após 28 dias de infecção os animais ainda apresentam reabsorção óssea, dano na cartilagem, infiltrado inflamatório e hiperplasia sinovial. Entretanto, esses achados são muito mais intensos nos animais deficientes para Fc γ RIII, que apresentam ainda infiltrado inflamatório agudo composto predominantemente de neutrófilos que formam microabscessos para tentar conter a bactéria e otimizar a resposta inflamatória (16), enquanto o infiltrado nos animais selvagens é misto, contendo muitas células mononucleares. O aumento no escore histopatológico nos animais nocautes reflete o que já foi encontrado nos dados anteriores, estes animais têm dificuldade em controlar a infecção, resultando em grande infiltrado inflamatório e aumento no dano tecidual. Por outro lado, apesar do grande acúmulo de leucócitos e bactérias na cavidade articular, os animais nocautes não apresentam maior nocicepção quando comparados aos animais selvagens. É importante observarmos que inclusive os animais selvagens ainda apresentam baixa resistência à pressão após 28 dias de infecção, demonstrando que a nocicepção é um processo complexo que envolve vários fatores além dos analisados aqui. Esse dado pode ser explicado porque o início da resposta inflamatória é semelhante entre animais selvagens e deficientes para Fc γ RIII, o que já causaria alterações na comunicação neuronal em regiões centrais do sistema nervoso, mantendo a percepção de nocicepção por tempo prolongado, independente da resposta inflamatória articular. Uma resposta semelhante é observada em modelo de artrite induzida por antígeno, quando a antecipação da resolução da inflamação articular não antecipa a dor articular (dados não publicados).

Analisando todos os dados apresentados nos experimentos com Fc γ RIII, podemos afirmar que a ausência deste receptor compromete a eliminação da bactéria e leva a uma resposta inflamatória aumentada e disfuncional. Como o microrganismo permanece na cavidade articular por muito tempo, temos um excesso de estímulo que pode levar a um quadro de exaustão clonal. A exposição prolongada e persistente de células, geralmente linfócitos, a antígenos e/ou estímulos inflamatórios pode levar à redução da atividade destas células, cenário chamado de exaustão clonal (45). Esse processo pode ser uma falha no sistema imune, mas também é um tipo de proteção do organismo para evitar uma resposta imune exacerbada e desproporcional, que pode causar mais danos ao hospedeiro, e é muito importante em cenários como infecção, principalmente viral, e câncer. Em quadros como infecções pelo vírus da coriomeningite linfocitária, vírus da hepatite C, vírus da hepatite B e vírus influenza, a exaustão clonal é um mecanismo de proteção para

evitar a complicação da doença, entretanto, pode estar associada à reduzida eliminação do vírus e a cronificação da infecção, especialmente em casos de pacientes imunossuprimidos (87,88,113). Por outro lado, em infecções bacterianas como sepse, a exaustão está associada à severidade da doença e ao aumento da mortalidade, principalmente em idosos (114). Os marcadores de exaustão clonal mais utilizados são PD1 e CTLA-4, sendo que a inibição destas moléculas leva ao aumento na ativação da resposta imune, motivo pelo qual elas se tornaram importantes alvos terapêuticos para o tratamento de diferentes tipos de câncer (45,47,88,115). Ao analisarmos os linfonodos poplíteos dos animais 42 dias após a infecção, observamos que os animais nocautes possuem expressão maior número de linfócitos expressando PD1, sugerindo que essas células não respondem à infecção de forma efetiva devido à exaustão clonal. Apesar de pouco estudado, é possível que no caso dos animais deficientes para FcγRIII outras células também apresentam algum tipo de exaustão, uma vez que o sistema imune inato também não responde à infecção de forma adequada. Mais estudos precisam ser realizados para explicarmos como a ausência deste receptor impacta na resposta imune e os mecanismos destes fenômenos. Além disso, é importante lembrarmos que existem outros receptores FcγR ativadores que continuam funcionais nos animais deficientes para FcγRIII, portanto algumas respostas biológicas podem ser compensadas pelos outros receptores.

No presente estudo, demonstramos que FcγRIIb e FcγRIII atuam na resposta imune contra *S. aureus* por diferentes mecanismos, gerando respostas antagônicas. A ausência do receptor inibitório FcγRIIb resulta em uma cinética de recrutamento celular completamente diferente, com o pico da inflamação no primeiro dia e redução brusca do acúmulo de células no quarto e sétimo dias de infecção. Nesse contexto, a expressão de CXCR2 é aumentada, assim como a apoptose de neutrófilos, o que pode explicar as diferenças no acúmulo celular. Além disso, observamos maior eliminação da bactéria e menor nocicepção sete dias após a infecção, indicando melhor controle da infecção. Por outro lado, a ausência do receptor ativador FcγRIII resulta no aumento do recrutamento de leucócitos a partir do 14º dia de infecção, principalmente de neutrófilos, células características da fase aguda da inflamação. Além disso, a carga bacteriana recuperada na articulação também é aumentada a partir do 28º dia de infecção. A permanência da bactéria na articulação induz o recrutamento e ativação de mais células, por meio de quimiocinas (CXCL1) e citocinas (IL-1β), que apresentam níveis mais elevados nos animais nocautes após 14 e 28 dias de infecção. Outro fator alterado pela ausência de

Fc γ RIII é o escore histopatológico, animais nocautes apresentam maior dano tecidual e infiltrado inflamatório, o que está de acordo com os resultados anteriores. Vários fatores podem levar à inefetividade das células no controle da infecção, neste estudo demonstramos que uma opção é a exaustão clonal de linfócitos, que perdem sua função frente ao excesso de antígenos e estímulos. Apesar de ainda não conhecermos os mecanismos completos desencadeados pelos receptores Fc γ R, várias são as hipóteses que podemos investigar e confirmar, ampliando o conhecimento da associação destes receptores com a doença estudada e as possibilidades de novos alvos terapêuticos que podem auxiliar na eliminação do microrganismo e reduzir o dano causado pelo patógeno e pela resposta inflamatória.

6 CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho, foi possível compreender um pouco da importância dos receptores Fc γ R e como eles impactam na resposta inflamatória em um modelo experimental de artrite séptica induzida por *S. aureus*. Utilizando animais deficientes para Fc γ RIIb, observamos uma rápida montagem da resposta imune-inflamatória que foi importante para o controle da infecção e que impediu a instalação de uma inflamação crônica. Por outro lado, animais deficientes para Fc γ RIII não foram capazes de controlar a bactéria, gerando uma resposta exacerbada e lesão articular mais acentuada.

Não há dúvidas quanto à importância da família de receptores Fc γ R no controle da infecção, esses receptores estão envolvidos em diversos processos e possuem funções opostas e complementares, atuando por diversas vias e mecanismos. Estudar essas vias de sinalização e os mecanismos associados a essas respostas pode ser útil para entender as abordagens ideais de controle da infecção e da resposta imune na artrite séptica induzida por *S. aureus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Torre L, Garcı I. Advances in the management of septic arthritis. 2003;29:61–75.
2. Mathews CJ, Kingsley G, Field M, Jones A, Weston VC, Phillips M, et al. Management of septic arthritis: A systematic review. *Postgrad Med J*. 2008;84(991):265–70.
3. Kennedy N, Chambers ST, Nolan I, Gallagher K, Werno A, Browne M, et al. Native joint septic arthritis: Epidemiology, clinical features, and microbiological causes in a New Zealand population. *J Rheumatol*. 2015;42(12):2392–7.
4. Boff D, Oliveira VLS, Queiroz Junior CM, Silva TA, Allegretti M, Verri WA, et al. CXCR2 is critical for bacterial control and development of joint damage and pain in *Staphylococcus aureus*-induced septic arthritis in mouse. *Eur J Immunol*. 2018;48(3):454–63.
5. Mathews CJ, Weston VC, Jones A, Field M, Coakley G. Bacterial septic arthritis in adults. Vol. 375, *The Lancet*. 2010. p. 846–55.
6. Helito CP, Noffs GG, Pecora JR, Gobbi RG, Tirico LE, Lima AL, et al. Epidemiology of septic arthritis of the knee at Hospital das Clinicas, Universidade de Sao Paulo. *Brazilian J Infect Dis*. 2014;18(1):28–33.
7. Ross JJ. Septic arthritis. *Infect Dis Clin North Am*. 2005;19(4):799–817.
8. Colavite PM, Sartori A. Septic arthritis: Immunopathogenesis, experimental models and therapy. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2014;20(1):1–8.
9. Saraux A, Taelman H, Blanche P, Batungwanayo J, Clerinx J, Kagame A, Kabagabo L, Ladner J, Van de Perre P, Le Goff P BJ. HIV infection as a risk factor for septic arthritis. *Br J Rheumatol*. 1997;36(3):333–7.
10. Shirliff ME, Mader JT. Acute septic arthritis. Vol. 15, *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. p. 527–44.
11. García-Arias M, Balsa A, Mola EM. Septic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* [Internet]. 2011;25(3):407–21. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521694211000258>
12. Tarkowski A. Infectious arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20(6):1029–44.
13. Goldenberg DL. Septic arthritis. Vol. 351, *Lancet*. 1998. p. 197–202.
14. Boff D, Crijns H, Teixeira MM, Amaral FA, Proost P. Neutrophils: Beneficial and harmful cells in septic arthritis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):1–28.
15. Zecconi A, Scali F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol Lett* [Internet].

- 2013;150(1–2):12–22. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.01.004>
16. Brandt SL, Putnam NE, Cassat JE, Serezani CH. Innate Immunity to *Staphylococcus aureus*: Evolving Paradigms in Soft Tissue and Invasive Infections. 2018;
 17. Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Staphylococcal manipulation of host immune responses Vilasack. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(9):529–43.
 18. Murray P, Ken S R, Michael P. *Microbiologia médica*. 7^a. Elsevier, editor. 2018. 888 p.
 19. Nade S. Septic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* [Internet]. 2003;17(2):183–200. Available from:
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed6&AN=2003241359>
 20. Gomes RS, Adrian U, Flato P. Diagnóstico da monoartrite aguda na emergência *
 Diagnosis of acute monoarthritis in emergency. *Medicina (B Aires)*. 2009;7(47):104–10.
 21. Goldenberg DL, Hogarth PM, Pietersz GA, Ravetch J V, Luster AD, Weinshank R, et al. Septic arthritis. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2017;13(4):1–12. Available from:
<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1201294>
 22. Mehta MS, McClure JT, Mangold K, Peterson LR. Performance of 3 real-time PCR assays for direct detection of *Staphylococcus aureus* and MRSA from clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2015;83(3):211–5. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.06.005>
 23. Klaschik S, Lehmann LE, Steinhagen F, Book M, Molitor E, Hoeft A, et al. Differentiation between *staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococcus* species by real-time pcr including detection of methicillin resistant in comparison to conventional microbiology testing. *J Clin Lab Anal*. 2015;29(2):122–8.
 24. Goldenberg DL. Septic arthritis. *Lancet*. 1998;351(9097):197–202.
 25. Thwaites GE, Edgeworth JD, Gkrania-Klotsas E, Kirby A, Tilley R, Török ME, et al. Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(3):208–22.
 26. Rotun SS, McMath V, Schoonmaker DJ, Maupin PS, Tenover FC, Hill BC, et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. *Emerg Infect Dis*. 1999;5(1):147–9.
 27. Oliveira GA, Okada SS, Guenta RS, Mamizuka EM. Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à

- oxacilina. *J Bras Patol.* 2001;37(4):239–46.
28. Bardin T. Gonococcal arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2003;17(2):201–8.
 29. Marques GC, Marques MN, Miyoshi SR, Maciel RR, Macchione MC. Artrites sépticas e piomiosite tropical. *Revista Brasileira de Medicina.* 2001;102–14.
 30. Kotzias Neto A, Oliveira MA, Stipp WN. Treatment evaluation of septic arthritis of the hip. *Rev Bras Ortop [Internet].* 2011;46(Suppl 4):14–20. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-36162011001000004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 31. Pietrocola G, Arciola CR, Rindi S, Di Poto A, Missineo A, Montanaro L, et al. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *Int J Artif Organs [Internet].* 2011;34(9):799–810. Available from: <http://www.artificial-organs.com/Navigator.action?cmd=navigate&urlkey=Abstract&t=IJO&UidArticle=8AEDA61B-67BC-4784-8897-FD9966C45350>
 32. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell.* 2002;10(2):417–26.
 33. Mankan AK, Dau T, Jenne D, Hornung V. The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1 β processing in neutrophils. *Eur J Immunol.* 2012;42(3):710–5.
 34. Rigby KM, DeLeo FR. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Immunopathol.* 2012;34(2):237–59.
 35. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu Rev Immunol [Internet].* 2012;30(1):459–89. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>
 36. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol [Internet].* 2013;13(3):159–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>
 37. Pham CTN. Neutrophil serine proteases: Specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(7):541–50.
 38. Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol.* 2013;35(4):377–94.
 39. van Kesse KPM, Bestebroer J, van Strijp JAG. Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol.* 2014;5(SEP):1–12.
 40. Haworth O, Buckley CD. Pathways involved in the resolution of inflammatory

- joint disease. *Semin Immunol* [Internet]. 2015;27(3):194–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.04.002>
41. Headland SE, Jones HR, Norling L V., Kim A, Souza PR, Corsiero E, et al. Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Sci Transl Med*. 2015;7(315):1–13.
 42. Pozzi C, Lofano G, Mancini F, Soldaini E, Speziale P, De Gregorio E, et al. Phagocyte subsets and lymphocyte clonal deletion behind ineffective immune response to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(5):750–63.
 43. Cole J, Aberdein J, Jubrail J, Dockrell DH. The Role of Macrophages in the Innate Immune Response to *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. *Mechanisms and Contrasts* [Internet]. 1st ed. Vol. 65, *Advances in Microbial Physiology*. Elsevier Ltd.; 2014. 125-202 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.004>
 44. Hamza T, Li B. Differential responses of osteoblasts and macrophages upon *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Microbiol* [Internet]. 2014;14:207. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25059520>
 45. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(8):486–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3862>
 46. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular - Abbas 8ed-2*. Elsevier Ed Ltda. 2015;(8):631–67.
 47. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials*. 2016;39(1):98–106.
 48. Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002;2(8):580–92. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri856>
 49. Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M, et al. R406, an Orally Available Spleen Tyrosine Kinase Inhibitor Blocks Fc Receptor Signaling and Reduces Immune. *Pharmacology*. 2006;998–1008.
 50. Mancardi D, Daëron M. Fc Receptors in Immune Responses. In: *Reference Module in Biomedical Sciences* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2018 May 17]. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128012383001197>
 51. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fc receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* [Internet]. 2009;113(16):3716–25. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-09-179754>
 52. Braun A, Gessner JE, Varga-szabo D, Syed SN, Konrad S, Stegner D, et al. STIM1

- is essential for Fcγ receptor activation and autoimmune inflammation. *Blood*. 2009;113(5):1097–105.
53. Zhang L, Chen J, Wang D, Li N, Qin Y, Du D, et al. Ligation of porcine Fc gamma receptor III inhibits levels of antiviral cytokine in response to PRRSV infection in vitro. *Res Vet Sci* [Internet]. 2016;105:47–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.01.009>
 54. Bournazos S, DiLillo DJ, Ravetch J V. The role of Fc–FcγR interactions in IgG-mediated microbial neutralization. *J Exp Med* [Internet]. 2015;212(9):1361–9. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20151267>
 55. Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev*. 2015;268(1):25–51.
 56. Blom AB, Van Lent PL, Van Vuuren H, Holthuysen AE, Jacobs C, Van De Putte LB, et al. FcγR expression on macrophages is related to severity and chronicity of synovial inflammation and cartilage destruction during experimental immune-complex-mediated arthritis (ICA). *Arthritis Res*. 2000;2(6):489–503.
 57. Marzocchi-Machado CM, Lucisano-Valim YM. Receptores para imunoglobulina G (FcγR). *Medicina (B Aires)*. 2005;38(1):82–95.
 58. Gjertsson I, Kleinau S, Tarkowski A. The impact of Fcγ receptors on *Staphylococcus aureus* infection. *Microb Pathog* [Internet]. 2002;33(4):145–52. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401002905243>
 59. Sánchez-Mejorada G, Rosales C. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol*. 1998;63(5):521–33.
 60. Coggeshall KM. Inhibitory signaling by B cell Fc gamma RIIb. *Curr Opin Immunol*. 1998;10(3):306–12.
 61. Daëron M. Fc Receptor Biology. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1997;15(1):203–34. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.15.1.203>
 62. Strohmeier GR, Brunkhorst BA, Seetoo KF, Meshulam T, Bernardo J, Simons ER. Role of the Fc gamma R subclasses Fc gamma RII and Fc gamma RIII in the activation of human neutrophils by low and high valency immune complexes. *J Leukoc Biol* [Internet]. 1995;58(4):415–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7561517>
 63. Nimmerjahn F, Gordan S, Lux A. FcγR dependent mechanisms of cytotoxic, agonistic, and neutralizing antibody activities. *Trends Immunol* [Internet]. 2015;36(6):325–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.04.005>
 64. Akula S, Mohammadamin S, Hellman L. Fc receptors for immunoglobulins and their appearance during vertebrate evolution. *PLoS One*. 2014;9(5).

65. Brauweiler AM, Cambier JC. Autonomous SHIP-dependent Fc γ R signaling in pre-B cells leads to inhibition of cell migration and induction of cell death. *Immunol Lett.* 2004;92(1–2):75–81.
66. Hogarth PM, Pietersz GA. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(4):311–31.
67. Li X, Su K, Ji C, Szalai AJ, Wu J, Zhang Y, et al. Immune opsonins modulate BLyS/BAFF release in a receptor-specific fashion. *J Immunol* [Internet]. 2008;181(2):1012–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3684394&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
68. Moalli F, Doni A, Deban L, Zelante T, Zagarella S, Bottazzi B, et al. Role of complement and Fc γ receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*.1. Moalli F, Doni A, Deban L, Zelante T, Zagarella S, Bottazzi B, et al. Role of complement and Fc γ receptors in the prote. 2010;116(24):5170–81.
69. Lu J, Marnell LL, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. Structural recognition and functional activation of Fc γ R by innate pentraxins. *Nature* [Internet]. 2008;456(7224):989–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07468>
70. Li X, Ptacek TS, Brown EE, Edberg JC. Fc γ receptors: Structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun.* 2009;10(5):380–9.
71. van Lent PLEM, van Vuuren A, Blom AB, Holthuysen AEM, van De Putte LBA, van De Winkel JGJ, et al. Role of Fc receptor γ chain in inflammation and cartilage damage during experimental antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(4):740–52.
72. Abdollahi-Roodsaz S, Koenders MI, Walgreen B, Bolscher J, Helsen MM, Van Den Berselaar LA, et al. Toll-like receptor 2 controls acute immune complex-driven arthritis in mice by regulating the inhibitory Fc γ receptor IIB. *Arthritis Rheum.* 2013;65(10):2583–93.
73. Vogelpoel LTC, Hansen IS, Rispens T, Muller FJM, Van Capel TMM, Turina MC, et al. Fc gamma receptor-TLR cross-talk elicits pro-inflammatory cytokine production by human M2 macrophages. *Nat Commun* [Internet]. 2014;5:1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6444>
74. Nabbe KCAM, Blom AB, Holthuysen AEM, Boross P, Roth J, Verbeek S, et al. Coordinate expression of activating Fc γ receptors I and III and inhibiting Fc γ receptor type II in the determination of joint inflammation and cartilage destruction during immune complex-mediated arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(1):255–65.
75. Jans J, Vissers M, Heldens JGM, Jonge MI De, Levy O, Ferwerda G. Fc gamma receptors in respiratory syncytial virus infections: implications for innate

- immunity. *Rev Med Virol*. 2014;24(1):55–70.
76. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Involvement of the Fc γ receptor IIA cytoplasmic domain in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Gen Virol*. 2010;91(1):103–11.
 77. Clatworthy MR, Smith KGC. Fc γ RIIb Balances Efficient Pathogen Clearance and the Cytokine-mediated Consequences of Sepsis. *J Exp Med* [Internet]. 2004;199(5):717–23. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20032197>
 78. Pinheiro-da-Silva F, Chiamolera M, Charles N, Kanamaru Y, Velasco IT, Benhamou M, et al. B LYMPHOCYTES UNDERGO APOPTOSIS BECAUSE OF Fc γ RIIB STRESS RESPONSE TO INFECTION: A NOVEL MECHANISM OF CELL DEATH IN SEPSIS. *SHOCK*. 2006;25(1):61–65.
 79. Swisher JFA, Feldman GM. The many faces of Fc γ RI: Implications for therapeutic antibody function. *Immunol Rev*. 2015;268(1):160–74.
 80. Belperron AA, Liu N, Booth CJ, Bockenstedt LK. Dual role for Fc γ 3 receptors in host defense and disease in *Borrelia burgdorferi*-infected mice. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2014;4(June):1–11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00075/abstract>
 81. Boff D. PAPEL DA ENZIMA 5-LIPOXIGENASE NA PATOGÊNESE DA ARTRITE SÉPTICA EXPERIMENTAL. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS; 2013.
 82. Morgan D. Neutrophils, apoptotic. [Internet]. 2013 [cited 2018 Jun 25]. Available from: <http://dexterwet.blogspot.com/2013/07/neutrophils-apoptotic-blood-film-one.html>
 83. Ängeby Möller K, Johansson B, Berge OG. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *J Neurosci Methods*. 1998;84(1–2):41–7.
 84. Chiu IM, Heesters BA, Ghasemlou N, Von Hehn CA, Zhao F, Tran J, et al. Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature* [Internet]. 2013;501(7465):52–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12479>
 85. Ali A, Na M, Svensson MND, Magnusson M, Welin A, Schwarze JC, et al. IL-1 receptor antagonist treatment aggravates staphylococcal septic arthritis and sepsis in mice. *PLoS One*. 2015;10(7):1–14.
 86. Duffy EB, Periasamy S, Hunt D, Drake JR, Harton JA. Fc γ R mediates TLR2- and Syk-dependent NLRP3 inflammasome activation by inactivated *Francisella tularensis* LVS immune complexes. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2016;100(6):1335–47. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.2A1215-555RR>

87. Keşmir C, De Boer RJ. Clonal exhaustion as a result of immune deviation. *Bull Math Biol.* 2003;65(3):359–74.
88. Cornberg M, Kenney LL, Chen AT, Waggoner SN, Kim SK, Dienes HP, et al. Clonal exhaustion as a mechanism to protect against severe immunopathology and death from an overwhelming CD8 T cell response. *Front Immunol.* 2013;4(DEC).
89. Nimmerjahn F. Translating Inhibitory Fc Receptor Biology into Novel Therapeutic Approaches. *J Clin Immunol.* 2016;36:83–7.
90. Afonso P V., Janka-Junttila M, Lee YJ, McCann CP, Oliver CM, Aamer KA, et al. LTB4 Is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis. *Dev Cell* [Internet]. 2012;22(5):1079–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2012.02.003>
91. Le Bel M, Brunet A, Gosselin J. Leukotriene B4, an endogenous stimulator of the innate immune response against pathogens. *J Innate Immun.* 2014;6(2):159–68.
92. Oyoshi MK, He R, Li Y, Mondal S, Yoon J, Afshar R, et al. Leukotriene B4-Driven Neutrophil Recruitment to the Skin Is Essential for Allergic Skin Inflammation. *Immunity* [Internet]. 2012;37(4):747–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.018>
93. Tavares NM, Araújo-Santos T, Afonso L, Nogueira PM, Lopes UG, Soares RP, et al. Understanding the Mechanisms Controlling *Leishmania amazonensis* Infection In Vitro: The Role of LTB4 Derived From Human Neutrophils. *J Infect Dis* [Internet]. 2014;210(4):656–66. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiu158>
94. Soares EM, Mason KL, Rogers LM, Serezani CH, Faccioli LH, Aronoff DM. Leukotriene B4 Enhances Innate Immune Defense against the Puerperal Sepsis Agent *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol* [Internet]. 2013;190(4):1614–22. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1202932>
95. Caffrey-Carr AK, Hilmer KM, Kowalski CH, Shepardson KM, Temple RM, Cramer RA, et al. Host-derived leukotriene B4 is critical for resistance against invasive pulmonary aspergillosis. *Front Immunol.* 2018;8(JAN):2–11.
96. Endrich S, Schmausser B, Androulis M, Müller-Hermelink HK, Eck M. CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils is down-regulated by *H. pylori*: a new pathomechanism in *H. pylori* infection? *Pathol - Res Pract.* 2004;200(4):339.
97. Rios-Santos F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CMC, et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(5):490–7.
98. Alves-Filho JC, Snego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA, Auxiliadora-Martins M, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of

- infection. *Nat Med*. 2010;16(6):708–12.
99. Juvet SC, Thomson CW, Kim EY, Joe B, Adeyi O, Zhang L. FcR γ promotes T cell apoptosis in Fas-deficient mice. *J Autoimmun* [Internet]. 2013 May [cited 2018 Jun 23];42:80–93. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841112001485>
 100. Jhou JP, Chen SJ, Huang HY, Lin WW, Huang DY, Tzeng SJ. Upregulation of Fc γ RIIB by resveratrol via NF- κ B activation reduces B-cell numbers and ameliorates lupus. *Exp Mol Med* [Internet]. 2017;49(9):e381. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2017.144>
 101. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
 102. Kennedy AD, Deleo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res*. 2009;43(1–3):25–61.
 103. Martin KR, Ohayon D, Witko-Sarsat V. Promoting apoptosis of neutrophils and phagocytosis by macrophages: Novel strategies in the resolution of inflammation. *Swiss Med Wkly*. 2015;145(February):1–10.
 104. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: Relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun*. 2010;2(3):216–27.
 105. Gouwy M, Struyf S, Proost P, Van Damme J. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(6):561–80.
 106. Vilček J, Feldmann M. Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Rheumatologia*. 2006;20(2):65–74.
 107. Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, Byrne MH, et al. Lipid-Cytokine-Chemokine Cascade Drives Neutrophil Recruitment in a Murine Model of Inflammatory Arthritis. *Immunity* [Internet]. 2010;33(2):266–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.07.018>
 108. Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Wardenburg JB, McElvania-TeKippe E, et al. *Staphylococcus aureus* α -hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS One*. 2009;4(10).
 109. Gringhuis SI, Kaptein TM, Wevers BA, Theelen B, Van Der Vlist M, Boekhout T, et al. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 β via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nat Immunol*. 2012;13(3):246–54.
 110. Gaidt MM, Hornung V. The NLRP3 Inflammasome Renders Cell Death Pro-inflammatory. *J Mol Biol* [Internet]. 2018;430(2):133–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.11.013>

111. Zhao P, Liu J, Pan C, Pan Y. NLRP3 inflammasome is required for apoptosis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-infected human osteoblastic MG63 cells. *Acta Histochem* [Internet]. 2014;116(7):1119–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2014.05.008>
112. Wali JA, Gurzov EN, Fynch S, Elkerbout L, Kay TW, Masters SL, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome complex is not required for stress-induced death of pancreatic islets. *PLoS One*. 2014;9(11):3–11.
113. McKinney EF, Lee JC, Jayne DRW, Lyons PA, Smith KGC. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature*. 2015;523(7562):612–6.
114. Inoue S, Suzuki K, Komori Y, Morishita Y, Suzuki-Utsunomiya K, Hozumi K, et al. Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. *Crit Care*. 2014;18(3).
115. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol* [Internet]. 2015;36(4):265–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.02.008>

ANEXO 1**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 236 / 2012, relativo ao projeto intitulado “ESTUDO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS COM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA ARTICULAR EM UM MODELO DE ARTRITE SÉPTICA”, que tem como responsável Flávio Almeida Amaral, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 30/08/2012. Este certificado espira-se em 30/08/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 236 / 2012, related to the Project entitled “STUDY OF THE MECHANISMS ASSOCIATED WITH THE INFLAMMATORY RESPONSE IN A MODEL OF SEPTIC ARTHRITIS”, under the supervision of Flávio Almeida Amaral, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 30/08/2012. This certificate expires in 30/08/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 30/08/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 118/2018

Título do projeto: Papel dos receptores FcgR na regulação da inflamatória articular e controle bacteriano em modelo murino de artrite séptica induzido por Staphylococcus aureus

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Flavio Almeida Amaral

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Bioquímica e Imunologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 04/06/2018. Validade: 04/06/2018 à 03/06/2023

Belo Horizonte, 05/06/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br