UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Associação dos polimorfismos dos FcγR e do CR3 no
lúpus eritematoso sistêmico e sua influência no *burst*
oxidativo dos neutrófilos**

Juliana Escher Toller Kawahisa

Ribeirão Preto

2012

JULIANA ESCHER TOLLER KAWAHISA

**Associação dos polimorfismos dos FcγR e do CR3 no lúpus eritematoso
sistêmico e sua influência no *burst* oxidativo dos neutrófilos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Imunologia
Básica e Aplicada

Orientadora: Cleni Mara Marzocchi
Machado

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Toller-Kawahisa, Juliana Escher

Associação dos polimorfismos dos Fc γ R e do CR3 no lúpus eritematoso sistêmico e sua influência no *burst* oxidativo dos neutrófilos / Juliana Escher Toller Kawahisa; orientadora Cleni Mara Marzocchi Machado. -- Ribeirão Preto, 2012.

104f. : il.

Dissertação de Mestrado -- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

1. Lúpus Eritematoso Sistêmico 2. *Burst* oxidativo de neutrófilos 3. Receptor Fc γ 4. Receptor para complemento. I. Título. II. Marzocchi-Machado, Cleni Mara.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Toller-Kawahisa, Juliana Escher

Título do Trabalho: Associação dos polimorfismos dos Fc γ R e do CR3 no lúpus eritematoso sistêmico e sua influência no *burst* oxidativo dos neutrófilos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

**Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2009/12649-6
(bolsa) e 2009/14732-8 (auxílio pesquisa).**

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e em especial ao meu marido, pelo incentivo e apoio durante a minha jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me concedeu a graça de poder dedicar-me aos estudos, estando sempre presente nos momentos de glória e de aflição.

À Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado, por acreditar no meu potencial e investir no meu aprendizado com paciência, amizade e atenção.

Aos voluntários que participaram desta pesquisa, pela atenção, disponibilidade e compreensão em colaborar com este trabalho.

Ao meu marido Rogério Kawahisa, que com sua dedicação e amor esteve ao meu lado apoiando e incentivandominhas decisões.

Aos meus pais e irmãos que me apoiaram durante toda a minha existência.

À minha amiga de curso Isabel Cristina Costa Vigato Ferreira, que vivenciou comigo todo o desenvolvimento deste trabalho, por sua amizade e companheirismo.

Ao farmacêutico-bioquímico José Eduardo Cavalcanti Del Lama, pelo grande apoio e amizade durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Alexandre Três Pancoto, Universidade Federal do Espírito Santo, que esteve presente desde a primeira coleta até a análise dos dados, por sua atenção e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior, Depto.de Clínica Médica da FMRP-USP, pela atenção em auxiliar na parte clínica do estudo.

Ao Prof. Dr. Antônio Donadi, Depto de Clínica Médica da FMRP-USP, por ceder à infra-estrutura de seu laboratório; à farmacêutica-bioquímica Flávia Tremeschin de Almeida, e aos pós-graduandos Gustavo Martelli Palomino e Natália Fagundes Cagnin, pela atenção em ensinar técnicas de extração e amplificação de DNA necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim, Depto.de Física e Química da FCFRP-USP, por disponibilizar a infra-estrutura de seu laboratório de pesquisa.

A farmacêutica-bioquímica Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini, Depto.de Física e Química da FCFRP-USP, pela disponibilidade em colaborar com este trabalho.

À biomédica Fabiana Rossetto de Moraes, FCFRP-USP, pela atenção em realizar as leituras no citômetro de fluxo.

Ao Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Júnior, Depto.de Química da FFCLRP-USP, e ao Prof. Dr. Edson Zangiacomi Martinez, Depto.de Medicina Social da FMRP-USP, pelo auxílio nas análises estatísticas dos resultados.

Aos docentes do programa de pós-graduação Imunologia Básica e Aplicada da FMRP-USP pelos ensinamentos passados.

Ao Dr. Flávio Calil Petean e aos residentes do ambulatório de reumatologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, pela disposição e atenção em selecionar os pacientes incluídos neste estudo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, Depto.de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, por disponibilizar a infra-estrutura de seu laboratório.

À Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, Universidade Federal de São Carlos, que me incentivou a estudar e a realizar meus objetivos.

Aos meus amigos de curso Micássio Fernandes de Andrade, Everton de Oliveira Lima dos Santos, Luciana Mariko Kabeya, Gisele Aparecida Locachevic e Monique Thaís Costa Fonseca, por estarem presentes com amizade e apoio.

Aos coordenadores e funcionários do programa de pós-graduação Imunologia Básica e Aplicada da FMRP-USP pela disposição e atenção.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida.

**“Um dia, quando olhares
para trás, verás que os dias
mais belos foram aqueles em
que lutaste”.**

(Sigmund Freud)

RESUMO

Toller-Kawahisa JE. Associação dos polimorfismos dos FcγR e do CR3 no lúpus eritematoso sistêmico e sua influência no *burst* oxidativo dos neutrófilos [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2012. 104 f.

As infecções constituem a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), representando 20-55% das mortes e sendo 80% delas causadas por bactérias. O LES é uma doença autoimune inflamatória crônica e a suscetibilidade às infecções está associada às próprias anormalidades imunológicas da doença, bem como a sua terapia, particularmente imunossupressora e citotóxica. Além disso, os polimorfismos genéticos dos FcγR, FcγRIIa e FcγRIIIb, nos neutrófilos, têm sido associados com as disfunções imunes do LES. Os FcγR são importantes mediadores das funções efetoras do neutrófilo e atuam em sinergismo com os CR. O polimorfismo dos genes FCGR2A e FCGR3B determina a expressão de variantes alélicas com diferenças funcionais, as quais podem influenciar as respostas biológicas e a suscetibilidade e o prognóstico das doenças infecciosas. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos dos receptores FcγRIIa (H/R131), FcγRIIIb (HNA-1a, HNA-1b e HNA-1c) e CR3 (HNA-4a) no *burst* oxidativo de neutrófilos de pacientes com LES. Neutrófilos de pacientes com LES (n=36) e indivíduos saudáveis (n=36) foram purificados do sangue periférico ($0.5 \times 10^6/500\mu\text{L}$) e estimulados com $30\mu\text{g}$ de IC, IC/soro humano normal (SHN), IC/SHN inativado ou PMA 10^{-7}M . O *burst* oxidativo foi medido por quimioluminescência (QL) na presença de luminol 10^{-4}M ou lucigenina 10^{-4}M . As frequências dos genótipos de FcγRIIa, FcγRIIIb e HNA-4a em pacientes com LES (n=157) e indivíduos saudáveis (n=147) foram determinadas por PCR com *primers* oligoespecíficos e gel de agarose 2%. Quanto aos polimorfismos genéticos, foi observado que o alelo positivo de HNA-4a contribui para a proteção e o alelo negativo para a suscetibilidade ao LES. Entre os pacientes com LES, as infecções foram mais frequentes quando os alelos R131 de FCGR2A, HNA-1b de FCGR3B e HNA-4a positivo do CR3 estavam presentes. Para o *burst* oxidativo com luminol, no grupo controle, as homozigoses H131, HNA-1b e HNA-4a negativo foram associadas à redução do *burst* oxidativo dos neutrófilos comparado às homozigoses para os respectivos alelos correspondentes. No LES, o *burst* oxidativo foi maior na homozigose R131 do grupo LES inativo comparado ao homozigoto H131 controle; menor na homozigose HNA-1b do grupo LES ativo comparado ao homozigoto HNA-1a do controle e, também, na heterozigose HNA-4a positivo/negativo o *burst* foi menor no grupo LES ativo comparado ao LES inativo. A ausência de diferenças entre os grupos com LES e controle, nos ensaios de *burst* oxidativo com lucigenina e com PMA, sugerem que a NADPH oxidase, responsável pela geração do *burst* oxidativo, não está comprometida nos neutrófilos dos pacientes com LES. Esses resultados têm implicações para a fisiopatologia do LES e, sobretudo, reforçam a hipótese de que os polimorfismos dos FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a modulam o *burst* oxidativo de neutrófilos nos indivíduos saudáveis e no LES. Assim, o presente estudo contribui para o entendimento das anormalidades nas funções dos neutrófilos no LES.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico; *Burst* oxidativo; neutrófilos; receptor Fcγ; receptores para complemento; polimorfismo.

ABSTRACT

Toller-Kawahisa JE. Association of Fc γ R and CR3 polymorphisms in systemic lupus erythematosus and their influence on the neutrophil oxidative burst [dissertation]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2012. 104 f.

Infections represent 20-55% of all deaths in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). About 80% of them are caused by bacteria. SLE is an autoimmune disease in which disease-related and genetic factors and immunosuppressive and cytotoxic therapies all contribute to an increased susceptibility to infections. Recent data have provided evidence that genetic polymorphism of Fc γ R is associated with immune abnormalities and risk to development of SLE. Fc γ R can mediate neutrophil effector functions and play a synergistic action with CR. Fc γ RIIa and Fc γ RIIb display functionally relevant genetic polymorphisms, which allelic variants can influence the biological responses and the susceptibility to and course of infectious diseases. The aim of this study was to investigate the influence of the Fc γ RIIa (H/R131), Fc γ RIIb (HNA-1a, HNA-1b and HNA-1c) and CR3 (HNA-4a) polymorphisms on neutrophil oxidative burst of SLE patients. Neutrophils of SLE patients (n=36) and control individuals (n=36) were purified from peripheral blood ($0.5 \times 10^6/500 \mu\text{L}$) in Hanks 0.1% gelatin pH 7.2 and were stimulated with $30 \mu\text{g}$ of immune complexes (IC), IC/normal human serum (NHS), IC/heat-inactivated NHS (iNHS) or PMA 10^{-7}M . The oxidative burst was measured by chemiluminescence (CL) in the presence of luminol 10^{-4}M or lucigenin 10^{-4}M . The reaction was monitored in a luminometer at 37°C for 20 min and the results were analyzed as the area under the curve of the CL profile. Genotype frequencies of Fc γ RIIa, Fc γ RIIb and HNA-4a alleles for SLE patients (n=157) and for healthy subjects (n=147) were determined using PCR with sequence-specific primers and agarose gel 2%. It was observed that the HNA-4a positive allele contributes to the protection and the negative allele contributes to susceptibility to SLE. Among patients with SLE, infections were more frequent when the alleles R131 of FCGR2A, HNA-1b of FCGR3B and HNA-4a positive of CR3 were present. For the oxidative burst with luminol in the control group, the homozygous H131, HNA-1b and HNA-4a negative were associated with reduced oxidative burst of neutrophils compared to homozygous to their corresponding alleles. In SLE, the oxidative burst was higher in homozygous R131 inactive SLE group compared to the homozygous H131 control; it was also lower in homozygous HNA-1b active SLE group than homozygous HNA-1a control and either in the heterozygous HNA-4a positive/negative active SLE compared to inactive SLE group. The absence of differences between the SLE and control groups in the oxidative burst assays, using lucigenin and PMA, suggests that NADPH oxidase, responsible for generating the oxidative burst, is not impaired in neutrophils from patients with SLE. These results have implications for the pathophysiology of SLE and, above all, support the hypothesis that polymorphisms of FCGR2A, FCGR3B and HNA-4a modulate the oxidative burst of neutrophils in healthy and in SLE. Thus, this study contributes to the understanding of abnormalities in neutrophil functions in SLE.

Key words: Systemic Lupus Erythematosus; oxidative *burst*; neutrophils; Fc γ receptor; complement receptors; polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura dos receptores para imunoglobulina G (FcγR)	21
Figura 2 –Avaliação qualitativa das amostras de DNA	49
Figura 3 –Gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3 com produto da PCR para os polimorfismos de FCGR2A (CD32)	50
Figura 4 –Gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3 com produto da PCR para os polimorfismos de FCGR3B (CD16).....	50
Figura 5 –Gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3 com produto da PCR para os polimorfismos de HNA-4a (CR3)	51
Figura 6 –Neutrófilos purificados pelo método da gelatina, submetidos à citocentrifugação e corados por corante panótico	55
Figura 7 –Perfil de quimioluminescência (QL) registrado em milivolts (mV) em função do tempo em segundos	56
Figura 8 –Curvas dose resposta para a medida do <i>burst</i> oxidativo dos neutrófilos estimulados com os diferentes IC.....	57
Figura 9 – QL de neutrófilos dependente de luminol 10^{-4} M e lucigenina 10^{-4} M	58
Figura 10 –QL de neutrófilos dependente de luminol 10^{-4} M de indivíduos classificados de acordo com os polimorfismos de FcγRIIa	59
Figura 11 –QL de neutrófilos dependente de lucigenina 10^{-4} M de indivíduos classificados de acordo com os polimorfismos de FcγRIIa.....	61
Figura 12 –QL de neutrófilos dependente de luminol 10^{-4} M de indivíduos classificados de acordo com os polimorfismos de FcγRIIb	62
Figura 13 –QL de neutrófilos dependente de lucigenina 10^{-4} M de indivíduos classificados de acordo com os polimorfismos de FcγRIIb	64
Figura 14 –QL de neutrófilos dependente de luminol 10^{-4} M ou lucigenina 10^{-4} M de indivíduos classificados de acordo com os polimorfismos de CR3	65
Figura 15 –Citograma bidirecional	66
Figura 16 –Representação dos histogramas de fluorescência dos receptores de superfície celular em neutrófilos marcados com anticorpo anti-receptor específico e analisados por citometria de fluxo	67

Figura 17 –Expressão dos Fc γ R e CR nos neutrófilos de pacientes com LES e indivíduos controles. Mediana de intensidade de fluorescência por célula.....	68
Figura 18 –Expressão dos Fc γ R e CR nos neutrófilos de pacientes com LES e indivíduos controles. Porcentagem de células positivas para a expressão de cada receptor.....	69
Fluxograma 1 –Representação das atividades desenvolvidas.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nomenclatura dos alelos do FCGR3B e antígenos codificados.....	23
Tabela 2 – Polimorfismos do FCGR3B	24
Tabela 3 – Frequência dos alelos e dos genótipos de FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a	51
Tabela 4 – Combinação dos genótipos de FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a.....	53
Tabela 5 – Frequência das infecções para as combinações dos genótipos de FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
BSA	Albumina de soro bovino
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CFD	Diluyente para fixação do complemento
CR	Receptor para complemento
CR1, CR3	Receptores para complemento tipo 1 e tipo 3, respectivamente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Dinucleotídeo trifosfato
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis-amino tetracético
ERO	Espécie(s) reativa(s) de oxigênio
Fc	Fragmento cristalizável da molécula de anticorpo; porção Fc do anticorpo
FcR	Receptor para a porção Fc
FcγR	Receptor para a porção Fc gama; receptor para a IgG
FcγRIIa, FcγRIIIb	Isoformas do receptor Fcγ
FCGR	Gene para FcγR
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HGH	Hormônio do crescimento humano (<i>Human Growth Hormone</i>)
HNA	Antígeno de neutrófilo humano
IC	Imunocomplexo(s)
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IgG	Imunoglobulina G
ITAM	Sequência de ativação de imuno-receptor baseada em tirosina

ITIM	Sequência de inibição de imuno-receptor baseada em tirosina
ITU	Infecção do trato urinário
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
PB	Pares de bases
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PKC	Proteína quinase C
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
QL	Quimioluminescência
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHI	Soro humano inativado
SHN	Soro humano normal
SLEDAI	Índice de atividade da doença LES (<i>SLE Disease Activity Index</i>)
TBE	Tris- borato-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil) aminometano

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas	vi
1. Introdução.....	18
1.1 FcγR	20
1.1.1 FcγRIIa (CD32a).....	21
1.1.2 FcγRIIIb (CD16b)	22
1.2 Interação FcγR/CR.....	24
1.3 Neutrófilos e o <i>burst</i> oxidativo	26
2. Justificativa.....	29
3. Objetivos.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. Casuística e Métodos.....	33
4.1 Casuística.....	34
4.2 Principais reagentes e soluções	36
4.3 Equipamentos utilizados.....	38
4.4 Amostras de sangue.....	39
4.5 Obtenção dos neutrófilos	39
4.6 Obtenção do soro humano para opsonização (<i>pool</i> de soro humano normal)	40
4.7 Estímulos utilizados para o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos	40
4.7.1 Imunocomplexos (IC).....	40
4.7.2 Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA)	42
4.8 Medida do <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos por quimioluminescência	42
4.9 Análise da expressão dos receptores Fcγ e dos receptores para complemento em neutrófilos por citometria de fluxo	42
4.10 Extração e caracterização do DNA genômico	43
4.10.1 Extração por método de <i>salting out</i>	43
4.10.2 Quantificação de DNA na amostra e avaliação qualitativa da pureza	44
4.10.3 Análise dos genótipos.....	44

4.11 Análises estatísticas.....	47
4.11.1 Análise genotípica	47
4.11.2 Ensaios funcionais	47
5. Resultados.....	48
5.1 Caracterização do DNA genômico	49
5.2 Genotipagem dos FcγR e CR3	49
5.2.1 FCGR2A (CD32)	49
5.2.2 FCGR3B (CD16)	50
5.2.3 HNA-4a (CR3).....	50
5.2.4 Frequência dos genótipos encontrados.....	51
5.2.5 Combinações entre os genótipos encontrados	52
5.2.6 Combinações das infecções mais frequentes com os genótipos encontrados.....	53
5.3 Avaliação da preparação de neutrófilos	54
5.4 Medida do <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos	55
5.5 Análise da expressão dos receptores Fcγ e dos receptores para complemento em neutrófilos por citometria de fluxo	66
6. Discussão	70
7. Conclusões.....	84
8. Referências bibliográficas	86
Anexos.....	98
ANEXO A	99
ANEXO B	100

1. Introdução

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crônica, de etiologia desconhecida, mais frequente em mulheres (9mulheres :1 homem) em idade fértil. É caracterizada pela produção de autoanticorpos que têm como alvo vários antígenos próprios, como antígenos nucleares, macromoléculas citoplasmáticas, componentes lipídicos e proteínas plasmáticas, com formação e deposição de imunocomplexos (IC) em vários órgãos, como articulações, rins e pele (Liet al., 2009).

A eficiência do *clearance* dos IC circulantes depende da função dos receptores que reconhecem a porção Fc da IgG (FcγR, receptores para a porção Fc gama) e receptores para complemento (CR) (Hebert, 1991). A deposição de IC nos tecidos leva à liberação de mediadores inflamatórios e ativação local do complemento, com subsequente influxo de neutrófilos. Estes, por sua vez, liberam enzimas proteolíticas e promovem o *burst* oxidativo, o que contribui para a inflamação (Davies, 1996).

Fatores genéticos, ambientais e hormonais contribuem para a suscetibilidade ao LES. A maioria dos genes é incapaz de causar a doença por si só e suas frequências diferem entre as várias populações (Ferreiros-Vidalet al., 2007). A ideia mais provável é que a doença se desenvolva quando um limiar de efeitos de suscetibilidade, genéticos e ambientais, é atingido (Rhodes, Vyse, 2008).

As doenças infecciosas são uma causa comum de complicações no LES, representando 20-55% das mortes e sendo 80% delas causadas por bactérias (Cuchacovich, Gedalia, 2009). A suscetibilidade às infecções está associada às próprias anormalidades imunológicas da doença (Staples, Gerding, 1974, Willcocks et al., 2009), bem como a sua terapia, particularmente imunossupressora e citotóxica (Boumpas et al., 1991, Zonana-Nacach et al., 2001, Zandman-Goddard, Shoenfeld, 2003).

Dentre as anormalidades imunológicas que contribuem para as infecções no LES destacam-se o *clearance* ineficiente de IC e de bactérias opsonizadas, deficiências congênitas ou adquiridas do complemento (Mascart-Lemone et al., 1983), diminuição da quimiotaxia e fagocitose de neutrófilos (Clark et al., 1974, Phillips et al., 1985), redução da produção de espécies reativas de oxigênio, redução da expressão de FcγR e CR (Marzocchi-Machado et al., 2002), neutropenia, linfocitopenia e alguns polimorfismos genéticos (Iliopoulos, Tsokos, 1996, Fessler, 2002, Cuchacovich, Gedalia, 2009).

Entre os loci que contribuem para a suscetibilidade à doença, foi identificada uma região que inclui um grupo funcional e estruturalmente diverso de genes para os receptores para IgG, o gene para o FcγRIIa (FCGR2A) e o gene para o

FcγRIIIb(FCGR3B) (Cantor et al., 2004, Kinder et al. 2007, Rhodes, Vyse, 2008). O polimorfismo desses genes determina a expressão de variantes alélicas (alótipos), as quais apresentam diferenças funcionais quanto à capacidade de ligação à IgG e, consequentemente, influenciam as respostas celulares mediadas por estas moléculas (Kimberly et al., 1995, Daëron, 1997).

1.1 FcγR

Os FcγR pertencem a um grupo heterogêneo de glicoproteínas de superfície presentes em células hematopoiéticas. Estes receptores facilitam as interações antígeno-anticorpo e regulam uma variedade de respostas imunes humorais e celulares, incluindo fagocitose, *burst* oxidativo, desgranulação, citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), regulação da transcrição e da expressão de citocinas e de quimiocinas, ativação das células B e *clearance* de IC (Li et al., 2009).

Os FcγR ligam a porção do fragmento cristalizável (Fc) da IgG, proporcionando uma interação entre as respostas da imunidade celular e humoral. São codificados por oito genes presentes no braço longo do cromossomo 1, pertencem à superfamília das imunoglobulinas (Ig) e, em humanos, são divididos em três classes, FcγRI (CD64, localizado em 1q21), FcγRII e FcγRIII (CD32 e CD16, respectivamente, localizados em 1q23) (Niederer et al., 2010).

As classes do FcγR contêm moléculas estrutural e bioquimicamente distintas, diferindo quanto a sua distribuição celular e afinidade para as subclasses de IgG. Em humanos, podem ainda ser subdivididas em isoformas, tais como FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa e FcγRIIIb (Li et al., 2009, Niederer et al., 2010). A variação nos genes que codificam os FcγR é capaz de alterar a eficiência dos fagócitos no *clearance* de IC. Essa variação provê diferenças hereditárias e um mecanismo para as diferenças observadas na suscetibilidade ao LES (Salmon et al., 1990, 1992).

Estruturalmente, os FcγR possuem uma subunidade α com dois ou três domínios extracelulares semelhantes à Ig, uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática. Todos FcγR mostram um alto grau de homologia na sua porção extracelular (50-96%), mas diferem em seus domínios citoplasmáticos (Ravetch, Bolland, 2001). Podem ser divididos como receptores de ativação (FcγRI, FcγRIIa/c, FcγRIII) ou de inibição (FcγRIIb). A maioria dos FcγR de ativação não possui regiões de sinalização em sua cauda citoplasmática. Nesse caso, os FcγR se associam com proteínas adaptadoras de sinalização, como as cadeias γ , β , ou ζ comum dos receptores para Fc (FcR), que

possuem múltiplas sequências de ativação de imuno-receptor baseados em tirosina (ITAM) em sua cauda citoplasmática. As exceções são o FcγRIIa e o FcγRIIc, que possuem ITAM na cauda citoplasmática da sua cadeia α (Niederer et al., 2010) (Figura 1).

Figura 1— Representação esquemática da estrutura dos receptores para imunoglobulina G (FcγR). A figura mostra as sequências de ativação (ITAM) ou de inibição (ITIM) de imuno-receptor baseada em tirosina nas caudas citoplasmáticas das cadeias α dos FcγR ou das cadeias acessórias (por exemplo, cadeia γ). D1/2/3, domínio extracelular 1/2/3; TM, transmembrana; GPI, glicosil-fosfatidil-inositol. Adaptada de Niederer et al., 2010.

Os FcγR podem também ser divididos de acordo com a sua afinidade para IgG. O FcγRI é um receptor de alta afinidade, enquanto FcγRII e o FcγRIII são de média ou baixa afinidade. A ligação do Fc ocorre no domínio extracelular proximal da membrana celular (Ghazizadeh et al., 1995, Bruhns et al., 2009). O terceiro domínio presente no FcγRIaumenta sua afinidade pela IgG e permite sua ligação à IgG monomérica. Os receptores de baixa e média afinidade têm uma fraca interação com Fc e são geralmente incapazes de ligar estavelmente a IgG. Entretanto, a avidéz da interação FcγR:Fc aumenta quando a IgG está complexada. Cada subtipo de receptor tem afinidades diferentes para os isotipos de IgG, sendo que os isotipos IgG1 e IgG3 são geralmente ligados com maior afinidade (Takai, 2002, Niederer et al., 2010).

1.1.1 FcγRIIa (CD32a)

O FcγRIIa é o receptor de ativação mais distribuído em seres humanos, presente em monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e plaquetas (Daëron, 1997, Marzocchi-Machado, Lucisano-Valim, 2005). Exibe baixa afinidade para a IgG monomérica, mas se liga a IC de IgG eficientemente (Ravetch, Kinet, 1991, Gessner et al., 1998).

Uma mutação pontual no gene FCGR2A, que codifica o FcγRIIa, causa uma substituição de um aminoácido em seu domínio de ligação, uma histidina (H) por arginina (R) na posição 131 (Warmerdam et al., 1990). O FcγRIIa-H131 é o único FcγR capaz de uma interação eficiente com IgG2 (Parren et al., 1992, van Sorge et al., 2003).

O FcγRIIa-R131 não interage eficientemente com IC formados por IgG2, o que causa um *clearance* ineficiente desses IC circulantes, levando ao aumento de sua deposição no tecido, com subsequente dano tecidual (Karassa et al., 2002). Além disso, o polimorfismo do FCGR2A tem sido relacionado com a suscetibilidade ao LES (Salmon et al., 1996, Dijstelbloem et al., 2000, Zuniga et al., 2003), o que pode estar associado com a deposição de IC bem como com a ocorrência de infecções no LES. Ainda, devido à IgG2 ser uma fraca ativadora da via clássica do complemento (Karassa et al., 2002), o alelo H131 parece ser essencial para o *clearance* de IC de IgG2. Os neutrófilos de indivíduos homozigotos para FcγRIIa-H131 fagocitam bactérias opsonizadas por IgG2 mais eficientemente do que as células contendo FcγRIIa-R131 (Sanders et al., 1995).

Além disso, em relação às infecções, a relevância funcional deste polimorfismo é demonstrada por experimentos onde neutrófilos de indivíduos homozigotos para FcγRIIa-R131 mostraram uma redução significativa na captura das bactérias pneumococos, estreptococos do grupo B, neisserias, e estafilococos quando opsonizadas por IgG, comparado com a captura dessas bactérias por neutrófilos de indivíduos homozigotos FcγRIIa-H131 (van Sorge et al., 2003).

Por outro lado, em um estudo recente foi visto que a homozigose para FcγRIIa-H131 estava significativamente associada com bacteremia em adultos com pneumonia pneumocócica (Solé-Violán et al., 2011). Isso pode ser devido a diferenças de afinidade das variantes FcγRIIa-H131 ou -R131 para a proteína C reativa. Ela se liga aos polissacarídeos da parede celular bacteriana e é reconhecida pelo FcγRIIa com afinidade similar àquela observada com isoformas de IgG (Lu et al., 2008).

1.1.2 FcγRIIIb (CD16b)

O FcγRIII é um receptor de baixa afinidade para IgG. Possui dois genes, FCGR3A e FCGR3B, que codificam as proteínas FcγRIIIa e FcγRIIIb, respectivamente. O FcγRIIIb é expresso na superfície de neutrófilos em grande quantidade, entre $1-3 \times 10^6$ receptores por célula, sendo o receptor dominante em neutrófilos (Li et al., 2009). Como

este receptor não possui domínios intracelular e transmembrana, pensa-se que ele esteja associado com Fc γ RIIa ou com o receptor para complemento tipo 3 (CR3) para facilitar a ativação de funções celulares, como fagocitose, ADCC, *burst* oxidativo e desgranulação eficientes (Zhou et al., 1993, Zhou, Brown, 1994, Fernandes et al., 2006).

Estudos mostraram que esta glicoproteína também é importante para o rolamento de neutrófilos e adesão celular, necessários para o extravasamento entre os tecidos em resposta ao IC. Neutrófilos de indivíduos deficientes de Fc γ RIIIb têm uma habilidade diminuída de aderir superfícies celulares em condições de fluxo (Willcocks et al., 2008).

Quanto às formas polimórficas do FCGR3B, são conhecidas três formas alélicas designadas antígenos de neutrófilos humanos (HNA) -1a, -1b e -1c (anteriormente NA1, NA2, e SH) (Tabela 1), codificados pelos genes FCGR3B*01, FCGR3B*02 e FCGR3B*03, respectivamente (Gittinger, Bux, 2001).

Tabela 1 – Nomenclatura dos alelos do FCGR3B e antígenos codificados.

Antígeno (fenótipo)	Alelo	Nomenclatura anterior
HNA-1a	FCGR3B*01	NA1
HNA-1b	FCGR3B*02	NA2
HNA-1c + HNA-b	FCGR3B*03	SH

Adaptado de Gittinger; Bux, (2001).

Cinco substituições de nucleotídeos diferenciam FCGR3B*01 e FCGR3B*02, resultando em quatro substituições de aminoácidos no HNA-1b em relação ao HNA-1a (Bertrand et al., 2004) (Tabela 2). Isso resulta em dois motivos extras de N-glicosilação em HNA-1b. A menor glicosilação do HNA-1a aumenta sua afinidade por IgG3 e sua fagocitose mediada por IgG1 e IgG3 por neutrófilos, na ausência de complemento (Bredius et al., 1994, Salmon et al., 1990).

O alelo HNA-1c (Bux et al., 1997) difere do HNA-1b apenas por uma substituição nucleotídica. É provável que FCGR3B*03 tenha surgido pela duplicação de FCGR3B*02, provavelmente devido a um evento desigual de *crossing-over* durante a meiose (Bux, 2008) (Tabela 2). Alguns indivíduos HNA-1c positivos são também HNA-1a e HNA-1b positivos, indicando que existem três cópias do gene FCGR3B, o que é proporcional ao aumento da expressão do Fc γ RIIIb na superfície celular (Koene et al., 1998). Indivíduos com deleção FCGR3B também foram encontrados, e as

24 Introdução

populações que possuem alta frequência de HNA nulo, possuem também maior ocorrência do HNA-1c (Kissel et al., 2000).

Tabela 2 – Polimorfismos do FCGR3B.

Alelo	Posição do nucleotídeo						Substituição de Aminoácido					
	141	147	227	226	277	349	36	38	65	78	82	106
HNA-1a	G	C	A	C	G	G	Arg	Leu	Asn	Ala	Asp	Val
HNA-1b	C	T	G	C	A	A	Ser	Leu	Ser	Ala	Asn	Ile
HNA-1c	C	T	G	A	A	A	Ser	Leu	Ser	Asp	Asn	Ile

Adaptado de Li et al. (2009).

Vários estudos têm examinado associações do HNA-1 com SLE. Em populações asiáticas (Chu et al., 2004) e em uma população espanhola (Gonzalez-Escribano et al., 2002) o genótipo FCGR3B*02/*02 parece estar associado ao LES. Na população coreana este genótipo está associado a um efeito protetor à doença (Hong et al., 2005), enquanto em populações caucasianas nenhuma associação foi encontrada (Manger et al., 2002). Isto pode ser devido às diferentes frequências dos genes entre as populações: nas populações asiáticas o FCGR3B*01 é o mais frequente, enquanto nos caucasianos e africanos o FCGR3B*02 é mais frequente (Bux, 2008). Ainda, a associação do HNA-1b com LES parece ser paralela com as associações dos alelos polimórficos de FCGR2A e FCGR3A, já que estes contribuem para uma função celular alterada, o que pode ser relacionado com a deposição de IC e *clearance* ineficiente por neutrófilos (Niederer et al., 2010).

1.2 Interação FcγR/CR

O sinergismo entre os FcγR e CR é importante na defesa do hospedeiro para aumentar as funções efectoras dos fagócitos (Mantovani, 1975, Zhou, Brown, 1994). Os neutrófilos expressam receptores para os fragmentos dos componentes 3 (C3) e 4 (C4) do complemento, o CR1 (CR1; CD35; receptor C3b/C4b) e o CR3, e ambos estão envolvidos com a fagocitose. O papel do CR1 é mediar a aderência imune dos IC, para facilitar o seu *clearance* e aumentar a concentração de IC na superfície celular para a, subsequente, ativação dos FcγR (Fearon, 1980, Schifferli, 1986). O CR3 é uma integrina heterodimérica que se liga ao iC3b (fragmento inativado do C3b do complemento) depositado sobre as partículas estranhas, facilitando sua fagocitose (May, Machesky, 2001).

O CR1 (CD35) é expresso em eritrócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos B e T (Fearon, 1980). Este receptor tem como principal função promover a fagocitose de partículas opsonizadas por C3b e C4b (Medofet al., 1982) e a eliminação de IC da circulação pelos eritrócitos (Schifferli et al., 1986). Foi visto que em indivíduos com LES atíva expressão de CR1 nos eritrócitos (Lach-Trifilieff et al., 1999, De Carvalho-Lins et al., 2004, Marzocchi-Machado et al., 2005) e nos leucócitos (Wilson et al., 1986, Marquart et al., 1995, Marzocchi-Machado et al., 2002) está diminuída. Isto está associado com um *clearance* defeituoso de IC contendo C3b/C4b e pode ter implicações na patogenia da doença (Nielsen et al., 1998).

O CR3 (Mac-1, CD11b/CD18) é um heterodímero membro da família $\beta 2$ das integrinas, composto por uma única cadeia α (CD11b, localizada no cromossomo 16p11.2) ligada não covalentemente a uma cadeia β (CD18, localizada no cromossomo 21q22.3), expresso primariamente em neutrófilos, monócitos e macrófagos (Kohl, 2006). Ele promove a fagocitose de microrganismos opsonizados pelo fragmento iC3b do complemento (Beller et al., 1982, Wright et al., 1983), além de se ligar à molécula de adesão intracelular (ICAM)-1 nas células endoteliais, levando ao recrutamento dos neutrófilos ao local de infecção (Diamond et al., 1990). Buyon et al. (1988) demonstraram que a expressão do CR3 está aumentada em neutrófilos de pacientes com LES ativo, concordante com a elevação da ativação dos produtos do complemento no plasma.

O Fc γ R e o CR3 agem cooperativamente para estimular vias de sinalização intracelular que iniciam a polimerização da actina necessária para a fagocitose e ativam o complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase (Krauss et al., 1994, Zhou, Brown, 1994). O complexo NADPH oxidase é responsável pelo *burst* oxidativo dos neutrófilos (Babior, 2004). Schreiber et al. (1975) observaram que a presença de C3 reduz drasticamente a quantidade necessária de ligação de IgG para induzir a ingestão da partícula mediada por Fc γ R por monócitos. Ainda, o bloqueio da função do CR3 com anticorpos anti-CR3 reduz a fagocitose sem impedir a ligação do Fc γ R com a IgG (Brown et al., 1988).

Simsek et al. (1996) descreveram um polimorfismo para a cadeia CD11b do CR3 que consiste em uma troca de um único nucleotídeo (G302A), que leva à substituição de arginina por histidina na posição 61 na cadeia CD11b. Esse polimorfismo leva à variante HNA-4a negativa que tem ocorrência rara. A variante polimórfica HNA-4a positiva (antígeno Mart) é encontrada em diferentes frequências

entre as populações: acima de 90% no Brasil (Cardone et al., 2006), 99,1% nos Estados Unidos (Clague et al., 2003) e 100% na Coreia (Hans, Um, 1997).

Alguns estudos sugerem que o *burst* oxidativo de neutrófilos é mediado principalmente pelo FcγRIIIb (Krauss et al., 1994), enquanto outros sugerem que o *cross-linking* do FcγRIIa e FcγRIIIb seria o mais importante para esta função (Huizinga et al., 1989). Além disso, sabe-se que é a coagregação do FcγRIIIb nos neutrófilos que leva à ativação celular (Zhou, Brown, 1994).

Zhou e Brown (1994) sugeriram que a cooperação do CR3 com o FcγRIIIb resulta de uma interação física direta entre eles na superfície dos neutrófilos. Um mecanismo provável é a interação lectina-sacarídeo, uma vez que o CR3 possui atividade lectina (Rosset al., 1985) e o FcγRIIIb possui os resíduos de carboidratos para interagir com o domínio com atividade lectina no CR3 (Zhou et al., 1993). Assim, uma vez que a cooperação entre CR3 e FcγRIIIb é resultante de uma interação lectina-sacarídeo, é importante investigar se o polimorfismo HNA-1a e HNA-1b, que difere pelo maior número de sítios de glicosilação no HNA-1b, poderia influenciar esta cooperação, em particular no LES. Sobretudo por que polimorfismos no FcγRIIa e no CR3, outros que não HNA-4a, reduzindo a afinidade de ligação para IgG e para complemento, estão relacionados ao LES, pois podem alterar a sinalização induzida por FcγRIIIb (Niederer et al., 2010).

1.3 Neutrófilos e o *burst* oxidativo

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes em humanos e, tipicamente, o primeiro tipo celular recrutado para os locais de infecção. Constituem a primeira linha de defesa contra fungos e bactérias, proporcionando uma série de respostas rápidas e altamente reguladas, como quimiotaxia, fagocitose e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Löfgren et al., 1999).

A noção de que os neutrófilos são essenciais para a resposta do hospedeiro aos microrganismos foi estabelecida e dramaticamente ilustrada pela morbidade e mortalidade observada em indivíduos com redução significativa do número de neutrófilos circulantes. Contagens menores que 500 neutrófilos/mL no sangue periférico aumentam as chances de infecção, com pacientes tendo até 43 episódios de infecções graves a cada 3 anos (Bodey et al., 1966).

Quando um microrganismo consegue atravessar as barreiras físicas corporais, como a pele e membranas mucosas, ganham acesso ao tecido, onde podem ser opsonizados por proteínas solúveis, como fragmentos do complemento (C3b/iC3b) e IgG (Borregaard et al., 2010). O reconhecimento do microrganismo opsonizado por fragmentos do complemento e/ou IgG pelos receptores específicos de membrana facilita a ativação de neutrófilos e a fagocitose (Greenberg, Silverstein, 1993).

Os neutrófilos destroem os organismos patogênicos por uma série de passos bem coordenados que resultam na produção de ERO, em um processo chamado *burst* (explosão) oxidativo (Babior et al., 2002, Babior, 2004), e na liberação de moléculas citotóxicas contidas nos grânulos citoplasmáticos, processo chamado desgranulação (Faurschou, Borregaard, 2003). A enzima responsável pelo *burst* oxidativo é a NADPH oxidase, um complexo de múltiplas subunidades que são reunidas na membrana do neutrófilo ativado (Quinn et al., 2006). A NADPH oxidase é composta por pelo menos sete proteínas que residem no citosol e em compartimentos de membrana em neutrófilos em repouso. Durante a ativação do neutrófilo, os componentes citosólicos translocam-se para a membrana do fagossomo e se associam com o componente de membrana flavocitocromo b_{558} , para formar a NADPH oxidase (Klebanoff, 2005).

A iniciação da atividade da NADPH oxidase ocorre com o fechamento do vacúolo e coincide com a desgranulação, com uma diferença de apenas 20s entre os dois eventos (Segal et al., 1980). A ativação da NADPH oxidase resulta na redução do oxigênio molecular em ânion superóxido. O superóxido pode sofrer dismutação espontânea, formando o peróxido de hidrogênio. Com a desgranulação no fagossomo, a enzima mieloperoxidase liberada pode reagir com o peróxido de hidrogênio e produzir várias ERO como o radical hidroxil, ácido hipocloroso e oxigênio *singlet* (Amulic et al., 2012).

Embora o efeito benéfico da produção de ERO tenha um papel fisiológico nas defesas do hospedeiro contra agentes infecciosos, uma produção excessiva pode resultar em um estresse oxidativo, podendo ser um mediador de danos a uma variedade de estruturas celulares (lipídeos, membranas, DNA e proteínas) e perda do equilíbrio nas reações de oxi-redução, que são importantes para a homeostase (Valko et al., 2007). O superóxido normalmente não pode ser detectado no exterior da célula fagocítica (Segal, Meshulam, 1979, Thomaset al., 1992), a menos que o fechamento do vacúolo não aconteça de forma correta devido a um excesso ou depósito das partículas, resultando em uma fagocitose frustrada.

Respostas não controladas de neutrófilos podem exacerbar ou até mesmo causar doenças autoimunes e inflamatórias (Amulic et al., 2012). No LES, é possível que o *clearance* inapropriado e a fagocitose ineficiente de IC sejam resultantes da redução da expressão ou defeitos funcionais dos FcγR e dos CR. Diferentes manifestações clínicas do LES podem influenciar a produção de ânion superóxido mediada pela cooperação dos FcγR/CR (Alveset al., 2008). Além disso, sabe-se que há uma redução do *burst* oxidativo de neutrófilos mediado por FcγR e/ou CR (Marzocchi-Machado et al., 2002).

Não se sabe claramente sobre as contribuições relativas de FcγRIIa e FcγRIIb para a ativação da NADPH oxidase e liberação de ERO. Há indícios de que o *burst* oxidativo seja mediado principalmente pela ativação celular por FcγRIIb (Hundt, Schmidt, 1992), embora foi visto que a ligação com FcγRIIa é a mais importante (Huizinga et al., 1989). No LES, a produção de ERO pelos neutrófilos em resposta aos IC depositados nos órgãos contribui para os danos teciduais. Normalmente este processo é regulado pela inibição de FcγRIIa pelo FcγRIIb, evitando o *priming* dos neutrófilos por citocinas inflamatórias.

A identificação de pacientes com LES com defeitos na atividade dos neutrófilos é de interesse clínico por razões da relação das anormalidades com as deficiências nos mecanismos microbicidas (Tsokos, 1999, Cuchacovich, Gedalia, 2009).

2. Justificativa

O nosso grupo de pesquisa tem descrito alterações no *burst* oxidativo dos neutrófilos mediadas pelos FcγR e/ou CR no LES (Marzocchi-Machado et al., 2002; Alves et al., 2008), no entanto sem considerar o polimorfismo genético destes receptores.

Embora o *burst* oxidativo dos neutrófilos seja essencial para as defesas contra microrganismos (Babior, 1988), as ERO produzidas podem mediar a lesão tecidual no processo inflamatório crônico, que se estabelece pela deposição de IC no LES. Os IC contendo IgG ligam-se aos neutrófilos e estimulam a NADPH oxidase, responsável pelo *burst* oxidativo. Esta ligação é mediada pelos FcγR e/ou CR. As interações IC-neutrófilos via FcγR/CR podem estar comprometidas no LES, onde estes receptores, o sistema complemento e altos níveis de IC circulantes estão envolvidos na fisiopatologia (Davies, 1996). Dessa forma, a modulação da produção de ERO no LES pode ter envolvimento tanto na pré-disposição às infecções, quanto na exacerbação do dano tecidual.

Uma vez que os polimorfismos dos FcγR têm implicações no LES, a identificação das combinações dos genótipos para os FcγR e CR3 pode contribuir para o entendimento das anormalidades descritas nas funções efetoras dos neutrófilos nesta doença.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência dos polimorfismos dos receptores FcγRIIa (H/R131), FcγRIIIb (HNA-1a, HNA-1b e HNA-1c) e CR3 (HNA-4a) no *burst* oxidativo de neutrófilos de pacientes com LES.

3.2 Objetivos Específicos

- a) determinar os genótipos e a frequência dos alelos para o FcγRIIa: H131 e R131;
- b) determinar os genótipos para o polimorfismo do FcγRIIIb: HNA-1a, HNA-1b e HNA-1c;
- c) determinar os genótipos e a frequência dos alelos para o polimorfismo da cadeia CD11b do CR3-HNA-4a positivo e HNA-4a negativo;
- d) analisar as frequências das combinações dos genótipos para FcγRIIa, FcγRIIIb e CR3;
- e) analisar a expressão dos FcγRIIa (CD32), FcγRIIIb (CD16), CR3 (CD11b, CD18) e CR1 (CD35) nos neutrófilos, para avaliar se a combinação dos genótipos pode influenciar a expressão destes receptores envolvidos no *burst* dos neutrófilos;
- f) avaliar a influência dos diferentes genótipos para FcγRIIa, FcγRIIIb e CR3 no *burst* oxidativo dos neutrófilos, medido por quimioluminescência (QL) dependente de luminol e QL dependente de lucigenina, com os seguintes estímulos:
 - IC-IgG via FcγR;
 - IC-IgG opsonizado por complemento do soro humano normal (IC-IgG/SHN), via FcγR/CR;
 - forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), independente dos FcγR/CR.
- g) relacionar a ocorrência das infecções bacterianas nos pacientes com LES com as diferentes combinações dos genótipos para os polimorfismos FcγRIIa, FcγRIIIb e CR3.

4. Casuística e Métodos

4.1 Casuística

Os pacientes com LES foram selecionados no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP)-USP com a colaboração do Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi e do Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior, ambos do Depto. de Clínica Médica da FMRP-USP. Os pacientes (n=166) foram diagnosticados segundo os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia para o LES (Tanet al., 1982).

O grupo controle (n=147) foi constituído por voluntários saudáveis, doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto - Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP.

Este protocolo de pesquisa foi delineado de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS, Brasil, 1996) e recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (Anexo A).

Os voluntários foram esclarecidos sobre a pesquisa desenvolvida e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

O critério de exclusão foi a terapia imunossupressora recente, inferior a 3 meses, e corticoterapia esteroideal >10mg/dia. O critério de exclusão geral, para pacientes e controles, foi o tabagismo e/ou uso de medicamentos controlados e gravidez. Outro critério de exclusão para o grupo controle foi o uso de anti-inflamatórios há menos de 7 dias.

Para a análise dos polimorfismos genéticos, foram incluídos 157 pacientes com LES, sendo 18 homens e 139 mulheres, com idade média de $38,88 \pm 12,99$ e $45,38 \pm 13,45$, respectivamente, além de 147 indivíduos saudáveis, sendo 76 homens e 71 mulheres, com idade média de $36,04 \pm 11,40$ e $36,59 \pm 10,75$, respectivamente.

Para a análise dos prontuários dos pacientes, para verificar a ocorrência de infecções desde o diagnóstico do LES, foram incluídos 166 pacientes, sendo 21 homens e 145 mulheres, com idade média de $37,71 \pm 7,07$ e $44,96 \pm 13,52$, respectivamente.

O índice de atividade da doença (SLEDAI, *SLE Disease Activity Index*) foi calculado para todos os pacientes dos ensaios de *burst* oxidativo dos neutrófilos. A atividade da doença foi considerada para valores de SLEDAI >3. O SLEDAI para pacientes com LES ativo e inativo foi em média $6,07 \pm 2,8$ e $1,1 \pm 0,96$, respectivamente.

Para a medida da expressão dos FcγR e CR nos neutrófilos, foram incluídos 21 pacientes com LES ativo, sendo 4 homens e 17 mulheres, com idade média de $32,75 \pm 12,6$ e $35,35 \pm 11,30$, respectivamente; 16 pacientes com LES inativo, sendo 5

homens e 12 mulheres, com idade média de $35,6 \pm 17,68$ e $37 \pm 11,93$, respectivamente; e 36 indivíduos saudáveis sendo 9 homens e 27 mulheres, com idade média de $29,12 \pm 7,03$ e $35 \pm 10,60$, respectivamente.

Para a medida do *burst* oxidativo dos neutrófilos, foram incluídos 21 pacientes com LES ativo, sendo 2 homens e 19 mulheres, com idade média de $32,5 \pm 4,94$ e $34,05 \pm 11,94$, respectivamente; 16 pacientes com LES inativo sendo 4 homens e 12 mulheres, com idade média de $28 \pm 4,89$ e $36,33 \pm 9,81$, respectivamente; 36 indivíduos saudáveis, sendo 8 homens e 26 mulheres, com idade média de $30,12 \pm 6,93$ e $34,89 \pm 10,61$, respectivamente.

Não foi possível manter o mesmo número de indivíduos em todos os parâmetros estudados. Em particular nos ensaios de *burst* oxidativo, o número de ensaios é reduzido em relação aos demais, porque a obtenção das preparações de neutrófilos demanda procedimentos imediatos após a colheita de sangue e o protocolo é extenso. Essa característica do ensaio limita o número de amostras processadas por dia de experimento.

O Fluxograma 1 apresenta a organização das atividades desenvolvidas a partir das amostras de sangue obtidas dos voluntários pacientes e saudáveis.

Fluxograma 1. Representação das atividades desenvolvidas. SLEDAI, índice de atividade da doença (*SLE Disease Activity Index*); EDTA, ácido etileno diamino tetracético; SHN, soro humano normal; SHI, soro humano inativado; QL, quimioluminescência; Freq., frequência; PCR, reação em cadeia da polimerase; CR, receptor para complemento; FcγR, receptores para imunoglobulina G.

4.2 Principais reagentes e soluções

O Anexo B contém os protocolos para o preparo das soluções e/ou reagentes descritos abaixo.

- Purificação de neutrófilos

Solução de Hanks pH 7,2 (Paul, 1970).

Solução de Alséver (tampão citrato com azida sódica pH 6,1).

Líquido de Turk (violeta de genciana 1% em solução de ácido acético 1%).

CFD/gel 0,1% – Tampão de Fixação de Complemento com 0,1% de gelatina (pH 7,2).

Solução fisiológica (NaCl 0,15 mol/L).

Solução de NH₄Cl 0,83% pH 7,2.

Solução de gelatina (*Difco*) 2,5% em NaCl 0,15 mol/L.

- *Burst* oxidativo de neutrófilos

Luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinodiona) – Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, A8511.

Lucigenina (N,N' – Dimetil – 9,9' - Biacridinium dinitrate) – Sigma Aldrich Co., M8010.

Dimetilsulfóxido (DMSO) – Merck, USA.

PBS – salina tamponada com fosfato pH 7,4.

EDTA –ácido etileno diamino tetracético.

PMA – Forbol-12-miristato-13-acetato – Sigma Aldrich, P8139.

BSA (Albumina do Soro Bovino) – Sigma Aldrich A7638.

Anticorpo anti-BSA de alta afinidade funcional – via imunização de coelho, padronizado previamente em nosso laboratório (Marzocchi-Machado et al., 1999).

- Citometria de fluxo

BD FACS Solução de lise – BD Biosciences, USA, 349202.

PBS/SBF (Soro Bovino Fetal) 2% azida <0,1% pH 7,2%

Formaldeído PA – Quimis, Indaiatuba, São Paulo.

- Anticorpos anti-receptor específico

Controle isotípico IgG1 de camundongo, marcado com FITC, clone MOPC-21, código 555748 – Pharmingen.

Anti-CD35 humano, marcado com FITC (isotiocianato de fluoresceína), clone E11, IgG1 de camundongo, código 555452 – Pharmingen.

Controle isotípico IgG1 kappa de camundongo, marcado com PE, clone MOPC-21, código 555749 – Pharmingen.

Anti-CD11b/Mac-1 humano, marcado com PE, clone ICRF44, IgG1 de camundongo, código 555388 – Pharmingen.

Anti-CD16 humano, marcado com PE, clone 3G8, IgG1 de camundongo, código 555407 – Pharmingen.

Controle isotípico IgG2b kappa de camundongo, marcado com FITC, clone 27-35, código 555742 – Pharmingen.

Anti-CD32 humano, marcado com FITC, clone FLI826(2003), IgG2b de camundongo, código 555448 – Pharmingen.

- Extração de DNA

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio 10% – Mallinckrodt Baker, Ink. Phillipsburguer, USA.

MgCl₂ 1M.

Tris HCl 1M pH 8,0.

Perclorato de Sódio 5M.

NaCl 6M saturado.

EDTA.

Tampão de lise de eritrócitos.

Tampão de lise II.

Isopropanol absoluto - Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., México.

Etanol 70% - Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., México.

- Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Deoxinucleotídeos (dNTP) Set, molecular biology grade – Fermentas, Foster City, California, USA.

Taq DNA Polymerase (recombinant) – Fermentas.

MgCl₂ 25mM – Fermentas

Taq tampão com KCl - Fermentas

Primers – Invitrogen, Brasil.

H131 Sense: 5' ATC CCA GAA ATT CTC CCA 3'

R131 Sense: 5' ATC CCA GAA ATT CTC CCG 3'

HR Anti-sense: 5' CAA TTT TGC TGC TAT GGG C 3'

HGH (*Human growth hormone*) Sense: 5' GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA 3'

HGH Anti-sense: 5' CTC ACG GAT TTC TGT GTT TC 3'

HNA-4a Sense: 5' CTC CCC ACA GGG TGG TG 3'

HNA-4a Negativo Anti-sense: 5' AGT GAC TCA CCC TGC ATG T 3'

HNA-4a Positivo Anti-sense: 5' AGT GAC TCA CCC TGC ATG C 3'

HNA-1a Sense: 5' CAG TGG TTT CAC AAT GTG GAA 3'

HNA-1a Anti-sense: 5' ATG GAC TTC TAG CTG CAC 3'

HNA-1b Sense: 5' CAA TGG TAC AGC GTG CTT 3'

HNA-1b Anti-sense: 5' ACT GTC GTT GAC TGT GTC AG 3'

HNA-1c Sense: 5' AAG ATC TCC CAA AGG CTG TGG 3'

HNA-1c Anti-sense: 5' ACT GTC GTT GAC TGT GTC AT 3'

- Corrida do gel

Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,3.

Solução de agarose, Uniscience, 2% em TBE, São Paulo, Brasil

Tampão de amostra: azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%.

GelRed – Uniscience.

50pb DNA *Ladder* – Fermentas.

4.3 Equipamentos utilizados

Centrífuga Refrigerada Eppendorf modelo 5810R (Eppendorf Instruments Inc., Hamburg, Germany).

Centrífuga Refrigerada Eppendorf modelo 5415R (Eppendorf Instruments Inc., Hamburg, Germany).

Freezer -80°C (Forma Scientific).

Luminômetro EG&G Berthold, modelo AutoLumat Plus LB 953 (Bad Wildbad, Germany).

Microscópio Óptico Olympus BX51 (Almada, Setúbal, Portugal).

Espectrofotômetro DU – 70 (Beckman, Fullerton, CA, USA).

Fonte de eletroforese Termo EC 3000 XL Power Supply (Dubuque, Iowa, USA).

Termociclador Eppendorf – Mastercycler Gradient (Hamburg, Germany).

Vortex-Genie 2, Model G560 (Bohemia, NY, USA).

Banho-maria 5 Liters Water Bath – Polysciences (Niles, IL, USA).

Balança Analítica – Adventurer AR2140, marca Ohaus (Pine Brook, NJ, USA).

Autoclave Tuttnauer Semiautomatic Laboratory Table-Top Steam Sterilizers Modelo 2540 ML (Beit Shemesh, Israel).

Cubas para gel de agarose – Termo Scientific – Owl Easycast™ horizontal minigel 12cm X 14cm B2 e Owl Easycast™ horizontal minigel 9cm X 11cm B1 (Portsmouth, NH, USA).

Fotodocumentador Bio-Rad – Modelo Universal HoodII – Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

Citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (*Fluorescent Activated Cell Sorter*), “software Cell Quest Pro™” (Becton Dickinson).

4.4 Amostras de sangue

As amostras de sangue periférico foram colhidas por punção venosa, utilizando-se sistema de coleta a vácuo, em tubos estéreis e descartáveis. Para as amostras destinadas à genotipagem e expressão dos receptores, o sangue foi colhido em tubos contendo anticoagulante, o sal dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-K₂). Para o ensaio funcional de neutrófilos o sangue foi colhido em tubos estéreis sem anticoagulante e em seguida misturados com solução de AlséverpH 6,1, como anticoagulante na proporção de 1:2.

Para amostras de soro, o sangue foi obtido em tubos sem anticoagulante. As amostras de soro foram obtidas de voluntários saudáveis e reunidas para constituir um *pool* de soro humano normal (SHN). Este *pool* de SHN foi aliquotado e armazenado a -80°C, para ser utilizado como fonte de complemento para a opsonização dos IC.

O volume total de sangue colhido de cada voluntário foi de 20mL, sendo 5-10mL destinados à análise da expressão dos receptores na membrana dos neutrófilos e à extração de DNA, para a realização das genotipagens, e o restante para o isolamento de neutrófilos. Para o *pool* de SHN foram selecionados doadores voluntários saudáveis somente para esta finalidade, sendo o volume total de 20mL destinado à obtenção de soro.

4.5 Obtenção dos neutrófilos

Amostras de sangue total de cada doador saudável foram colhidas e adicionadas de anticoagulante (AlséverpH 6,1, na proporção 1:2 (v/v)), e, então, submetidas à centrifugação em centrífuga (Eppendorf, modelo 5810R) à 664xg por 10min em temperatura ambiente. O plasma foi desprezado juntamente com a camada de células mononucleares. Os neutrófilos foram separados das outras células pela adição de solução de gelatina 2,5% em NaCl 0,15M em quantidade equivalente a duas vezes o volume de células e as amostras ficaram em banho a 37°C por 15min. Ao sobrenadante

(que continham neutrófilos) adicionou-se NaCl 0,15M e as amostras foram centrifugadas à 562xg por 10min, em temperatura ambiente. As células foram lavadas com NH₄Cl 0,83% pH 7,2 (para lisar eritrócitos remanescentes), deixadas em repouso em banho por 5min a 37°C e centrifugadas a 562xg por 10min, em temperatura ambiente. Lavou-se o precipitado com NaCl 0,15M e esse foi submetido a 562xg por 10min. As células foram então ressuspensas em 1mL de solução de Hanks pH 7,2 contendo gelatina 0,1%. Uma alíquota foi retirada para a contagem do número de neutrófilos em câmara de Neubauer, utilizando-se Líquido de Turk como diluente. A suspensão celular foi ajustada para 4×10^6 células/mL de solução balanceada de Hanks pH 7,2 contendo gelatina 0,1%.

A viabilidade celular foi determinada através da exclusão do corante azul de Tripán. A técnica consiste em misturar 10µL de uma suspensão de neutrófilos na concentração de $3-5 \times 10^6$ /mL com 10µL de azul de Tripán 0,1% em NaCl 0,15M e contar os neutrófilos em câmara de Neubauer. As células não viáveis aparecem coradas em azul pela permeabilidade da membrana ao corante.

Esta metodologia assegura uma preparação contendo 80-90% de neutrófilos e viabilidade maior que 95%, como descrito por Lucisano e Mantovani (1984).

4.6 Obtenção do soro humano para opsonização (*pool* de soro humano normal)

Os soros foram obtidos a partir do sangue total de voluntários saudáveis, colhido por punção venosa na ausência de anticoagulante. O sangue foi deixado em repouso à temperatura de 4°C durante 1 hora para retração do coágulo formado, sendo posteriormente centrifugado a 664xg por 10min a 4°C, em centrífuga (Eppendorf, modelo 5810R). Os soros obtidos foram misturados, formando um *pool* de soro humano normal (SHN). Uma parte desse *pool* foi submetida ao calor (56°C por 30min) para obtenção do soro humano inativado (SHI), utilizado como controle negativo da ativação do complemento. Em seguida, os soros foram aliquotados e armazenados a -80°C até o momento do uso.

4.7 Estímulos utilizados para o *burst* oxidativo de neutrófilos

4.7.1 Imunocomplexos (IC)

Os neutrófilos humanos foram estimulados com IC que foram precipitados em zona de equivalência, formados por albumina de soro bovino e IgG policlonal de coelho anti-BSA de alta afinidade funcional, previamente preparada e caracterizada em nosso laboratório (Marzocchi-Machado et al., 1999). Para o preparo do IC, uma solução de

BSA 1mg/mL diluída 1:2 em PBS pH 7,4 foi misturada volume a volume, com uma preparação de anticorpo anti-BSA, na proporção da equivalência e deixado em banho a 37°C por 1hora.

Após o período de incubação o IC foi mantido a 4°C por uma noite e, no dia seguinte, os IC foram centrifugados a 134000xg, 4°C, por 15min, em centrífuga (Eppendorf, modelo 5415R). O sobrenadante foi descartado e os IC foram lavados duas vezes com PBS a 134000xg, 4°C, por 15min. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em 1000µL de PBS.

A dosagem de proteína foi feita por espectrofotometria a partir de uma alíquota de 50µL dos IC ressuspensos, adicionou-se 200µL de PBS e a mistura foi centrifugada a 134000xg, 4°C, por 10min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em uma mistura de 50µL de NaOH 0,1N e 950µL de PBS. A densidade ótica foi medida no comprimento de onda de 280nm. A quantidade de proteína obtida foi estimada pelo seguinte cálculo (Groves et al., 1968, Stoscheck, 1990):

$$\text{DO amostra (280nm)} \times 0,715 = \text{Quantidade de proteína (mg)}$$

Cada precipitado de IC foi ressuspensão como descrito a seguir: no primeiro tubo, os IC receberam um volume do *pool* de SHN diluído 1:2 em CFD pH 7,2 contendo gelatina 0,1%, na proporção de 1µL dessa diluição para cada 1µg de IC [por exemplo, para cada 100µg de IC adicionou-se 100µL da diluição 1:2 do SHN (50µL do SHN + 50µL do CFD gelatina 0,1%)]; no segundo tubo, os IC receberam o mesmo volume do tubo anterior de um *pool* de SHI diluído nas mesmas condições; e no terceiro tubo os IC receberam igual volume dos tubos anteriores somente de CFD gelatina 0,1%. Os três tubos foram mantidos em banho a 37°C por 30min. Em seguida eles foram submetidos a 134000xg, a 4°C, por 5min e lavados duas vezes com PBS nessas mesmas condições de centrifugação. O precipitado foi ressuspensão para 1µg/µL em PBS pH 7,4 e mantido em gelo até o momento do uso.

Desta forma, três tipos de estímulos foram oferecidos aos neutrófilos, os IC contendo IgG (IC-IgG), para estimulação via FcγR e os IC opsonizados pelo complemento do soro humano normal (IC-IgG/SHN), para estimulação via cooperação FcγR/CR; como controle negativo da ativação do complemento, parte dos neutrófilos receberam IC com soro humano inativado (IC-IgG/SHI).

4.7.2 Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA)

O PMA foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração 10^{-2} M e estocado a -80°C . No momento do uso, foi diluído em solução de Hanks pH 7,2, como descrito por Pavelkova e Kubala (2004). A concentração final utilizada foi 10^{-7} M.

4.8 Medida do *burst* oxidativo de neutrófilos por quimioluminescência

Os ensaios de quimioluminescência (QL) foram realizados segundo Alves et al. (2003). Os neutrófilos foram estimulados por diferentes IC: IC-IgG, IC-IgG/SHN ou IC-IgG/SHI ou Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) na presença de luminol ou lucigenina. O método consistiu em uma suspensão de 5×10^5 neutrófilos em solução de Hanks/gelatina 0,1% pH 7,2, na presença de luminol 10^{-4} M ou lucigenina 10^{-4} M, incubada com 30 μg dos diferentes IC ou PMA 10^{-7} M em um volume final de reação de 500 μL . As amostras contendo luminol foram incubadas por 2min e 30s e as que continham lucigenina por 3min a 37°C no luminômetro (Berthold, AutoLumat Plus), antes de o estímulo ser adicionado a cada amostra.

A produção de QL foi acompanhada em luminômetro, a 37°C por 20min e registradas em contagem de fótons por minuto (cpm). Os controles de QL espontânea consistiram em incubar as células e luminol ou lucigenina, na ausência dos estímulos. Os resultados foram expressos como a área integrada sob o perfil de QL registrado.

4.9 Análise da expressão dos receptores Fc γ R e dos receptores para complemento em neutrófilos por citometria de fluxo

A expressão dos Fc γ R e CR nos neutrófilos foi realizada de acordo com Marzocchi-Machado et al. (2002). Amostras de sangue total (100 μL) de cada paciente com LES e de cada indivíduo controle foram incubadas com 5 μL de anticorpo anti-receptor específico marcado com fluorocromo ou com anticorpo isotipo controle a temperatura ambiente, ao abrigo de luz, por 20min. O isotipo controle foi utilizado para descontar a fluorescência causada pela ligação inespecífica do anticorpo ao neutrófilo. Um tubo contendo somente células, sem marcação com anticorpos, foi analisado para descontar a autofluorescência celular.

Após o período de incubação, cada amostra recebeu 2000 μL de solução de lise BD para lisar os eritrócitos e foram novamente incubados à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 10min. Em seguida, foram centrifugadas a 760xg, a 4°C , por 10min em centrífuga (Eppendorf, modelo 5810R); o sobrenadante foi desprezado e as células

foram lavadas com 2000µL de PBS/soro bovino fetal (SBF) 2%, azida<0,1% pH7,2 gelado. As amostras foram então centrifugadas a 760xg, a 4°C, por 10min. Desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 200µL de PBS/formol 1%.

As análises foram feitas em citômetro de fluxo (FACSCalibur™, “software Cell Quest Pro™”, Becton Dickinson).

A população de neutrófilos foi distinguida e selecionada por citograma bidirecional. Os resultados obtidos em histogramas foram expressos em mediana da fluorescência/célula em escala logaritma e como porcentagem de células fluorescentes na população total.

4.10 Extração e caracterização do DNA genômico

4.10.1 Extração por método de *salting out*

O DNA genômico foi extraído de leucócitos do sangue periférico por técnica de *salting out*, cujo princípio baseia-se na precipitação das proteínas com NaCl 5M (Milleret al., 1988), com algumas modificações. As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de 10mL de sangue total colhido com anticoagulante EDTA-K₂. Completou-se o volume para 45mL com tampão de lise de eritrócitos e a mistura foi cuidadosamente homogeneizada e submetida à centrifugação a 1157xg por 6min à 20°C, em centrífuga (Eppendorf, modelo 5810R). O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em uma mistura contendo 1,1mL de perclorato, 125µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 4,5mL tampão de lise II para lise dos leucócitos. A mistura foi homogeneizada em vórtex e acrescida de 2mL de NaCl saturado 6M; novamente foi homogeneizada em vórtex e submetida à centrifugação a 1301xg por 8min à 23°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo limpo e estéril e adicionou-se 5mL de isopropanol. A solução foi lentamente homogeneizada até que o DNA fosse visível. O DNA foi retirado da solução e colocado em microtubo contendo 1mL de etanol à 70%. A mistura foi submetida à centrifugação a 2300xg por 5min à 4°C. A seguir, a remoção do sobrenadante foi realizada cuidadosamente e o tubo foi mantido invertido sobre um papel de filtro absorvente durante 24 horas até a secagem completa.

O DNA presente no precipitado seco foi dissolvido em 200µL de água destilada pura estéril, homogeneizado em vórtex por 30s e armazenado à temperatura de -20°C, em microtubofechado, até o momento do uso.

4.10.2 Quantificação de DNA na amostra e avaliação qualitativa da pureza

As amostras de DNA foram avaliadas quanto à concentração e pureza do material obtido baseando-se em métodos descritos por Maniatis et al.(1989). Para a quantificação, as amostras foram diluídas 100 vezes (1:100) em água pura e estéril e a leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280nm foi determinada em espectrofotômetro. A quantidade de DNA existente na amostra foi determinada pela leitura da absorvância no comprimento de onda de 260nm, onde 1 unidade (U) de densidade ótica (DO) corresponde a 50µg de DNA/mL. A concentração de DNA foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{DNA na amostra (}\mu\text{g/mL)} = \text{DO amostra (260nm)} \times 50 \times \text{diluição da amostra}$$

A pureza do ácido nucléico na amostra foi estimada pela razão entre os valores das leituras de DO em 260nm e 280nm (DO_{260nm}/DO_{280nm}), como mostra a fórmula abaixo,

$$\text{Pureza da amostra} = \text{DO amostra (260nm)} / \text{DO amostra (280nm)}$$

sendo que esta relação deve estar entre 1,8 e 2,0.

4.10.3 Análise dos genótipos

A padronização do protocolo utilizado foi realizada, tendo como controles amostras com genótipo previamente conhecidos e confirmados por sequenciamento em nosso laboratório; posteriormente foram utilizadas amostras de DNA de pacientes com LES e indivíduos saudáveis e analisadas para o polimorfismo alélico dos genes FCGR2A, FCGR3B e CR3.

Como controle positivo interno para o produto da PCR foi adicionado, em todos os tubos, oligonucleotídeos controles para o gene do hormônio do crescimento humano (HGH), conforme descrito previamente (Buxet al., 1995). Todas as reações foram acompanhadas com um controle do *mix* de reação sem DNA e com as amostras previamente genotipadas e sequenciadas em nosso laboratório.

4.10.3.1 FCGR2A

A análise do polimorfismo de FCGR2A foi realizada pela técnica de amplificação do DNA genômico auxiliada pela polimerase, utilizando-se os oligonucleotídeos *sense* específicos para cada um dos alelos, H131 e R131, e *anti-sense* comum aos dois, como descrito por Flesch et al. (1998), com algumas modificações.

Dois tubos de *mix* foram preparados, um correspondente ao H-131 e outro ao R-131. O *mix* de reação foi composto por: 1 μ M (2,5 μ L) de oligonucleotídeos *sense* e 1 μ M (2,5 μ L) de *anti-sense* alelo-específico; 0,5 μ M (1,25 μ L) de oligonucleotídeos do HGH *sense* e igual volume de *anti-sense*; 1U (0,2 μ L) da enzima Taq polimerase; 200 μ M de dNTP (2,5 μ L); 2,5 μ L de solução tampão da PCR (10 vezes concentrado); 1,5mM (1,5 μ L) de cloreto de magnésio; e água deionizada estéril para completar o volume de reação, que foi de 25 μ L. A cada tubo, exceto no controle sem DNA, foi adicionada cerca de 200ng de DNA genômico.

As reações foram realizadas em um termociclador automático de temperatura (Mastercycler, Eppendorf) no seguinte protocolo: 4min a 94°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de amplificação de 1min a 94°C para desnaturação, 2min a 50°C para anelamento e 45s a 72°C para extensão; e 1min a 72°C de extensão final. O tamanho dos fragmentos obtidos após a amplificação foi de 253 pares de base (pb) (Flesch et al., 1998).

4.10.3.2 FCGR3B

A análise por PCR do polimorfismo do FCGR3B foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos *sense* e *anti-sense* específicos para cada um dos alelos, HNA-1a, HNA-1b e HNA-1c, como descrito por Steffensen et al. (1999), com algumas modificações.

Três tubos de *mix* foram preparados, correspondentes ao HNA-1a, HNA-1b e HNA-1c. A mistura de reação foi composta por: 1 μ M de oligonucleotídeos *sense* e 1 μ M de *anti-sense* alelo-específico; 0,5 μ M de oligonucleotídeos do HGH; 1U da enzima Taq polimerase; 200 μ M de dNTP; 2,5 μ L do tampão para PCR (10 vezes concentrado); 1,5mM de cloreto de magnésio; e água deionizada estéril para completar o volume de reação, que foi de 25 μ L. A cada tubo, exceto no controle sem DNA, foi adicionada cerca de 200ng de DNA genômico.

As reações foram realizadas em um termociclador automático de temperatura (Mastercycler, Eppendorf) no seguinte protocolo: 5min a 94°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de amplificação de 30s a 95°C para desnaturação, 1min a 60°C para anelamento e 30s a 71°C para extensão; e 10min a 72°C de extensão final. O tamanho dos fragmentos obtidos após a amplificação foi de: HNA-1a: 141pb; HNA-1b: 155pb; e HNA-1c: 191pb, como descrito por Steffensen et al. (1999), com algumas modificações.

4.10.3.3 HNA-4a

A análise por PCR do polimorfismo da cadeia CD11b do CR3 foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos *sense* comum para os dois receptores e *anti-sense* específicos para cada um dos alelos, HNA-4a positivo e HNA-4a negativo, como descrito por Clague et al. (2003), com algumas modificações.

Dois tubos de *mix* foram preparados, correspondentes ao HNA-4a positivo e HNA-4a negativo. A mistura de reação foi composta por: 20µM de oligonucleotídeos *sense* e 20µM de *anti-sense* alelo-específico; 10µM de oligonucleotídeos do HGH; 2U da enzima Taq polimerase; 10mM de dNTP; 5µL de tampão para PCR (10 vezes concentrado); 1,5mM de cloreto de magnésio; e água deionizada estéril para completar o volume de reação, que foi de 50µL. A cada tubo, exceto no controle sem DNA, foi adicionada cerca de 400ng de DNA genômico.

As reações foram realizadas em um termociclador automático de temperatura (Mastercycler, Eppendorf) no seguinte protocolo: 15min a 95°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de amplificação de 30s a 95°C para desnaturação, 1min a 58°C para anelamento e 30s a 72°C para extensão; e 10min a 72°C de extensão final. O tamanho dos fragmentos obtidos após a amplificação foi de 124pb (Clague et al., 2003).

4.10.4 Eletroforese dos produtos da PCR

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR, para as variantes polimórficas dos FcγR e do CR3, foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3. Uma amostra de 25µL do produto de cada PCR foi misturada a 5µL de tampão de amostra contendo sacarose, azul de bromofenol e Gel Red (Uniscience, São Paulo, Brasil) e, então, aplicadas nos poços do gel com auxílio de pipeta. Amostras padrões de marcadores de número de pares de base, DNA *ladder* 50pb, foram acrescidas de Gel Red e aplicadas nos géis (0,5µg/poço).

Para o preparo dos géis foi feita uma mistura de 100mL de TBE e 2g de agarose (Uniscience), e colocada na cuba de eletroforese. As condições da corrida eletroforética foram 250V, 40mA, 100W por 50min. A corrida foi acompanhada pela migração do azul de bromofenol, contido na mistura da amostra. Após a migração, o gel foi fotografado em fotodocumentador (Bio-Rad, Universal HoodII). As bandas apareceram fluorescentes devido à presença do Gel Red no tampão de amostra. Após a leitura o gel foi descartado e as imagens digitalizadas foram arquivadas.

4.11 Análises estatísticas

4.11.1 Análise genotípica

A análise dos genótipos em pacientes e controles foi realizada com base no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As diferenças de frequências alélicas e genotípicas entre LES e controle foram determinadas pelo teste de Fisher com nível de significância 0,05.

4.11.2 Ensaios funcionais

A análise estatística dos dados baseou-se em modelos de regressão com estimação bayesiana (Spiegelhalter et al., 2000) de parâmetros. Considerando a proporção de células fluorescentes uma variável aleatória, que assume valores entre 0% e 100%, utilizou-se um modelo de regressão beta (Ferrari, Cribari-Neto, 2004) para as comparações entre grupos de interesse. A distribuição beta possui grande flexibilidade em sua forma, o que permite a modelagem de dados mesmo em situações onde a distribuição da variável mostra-se bastante assimétrica dentro do intervalo (0;1). Detalhes sobre o modelo de regressão beta em um contexto bayesiano de estimação de parâmetros podem ser encontrados em Branscum et al. (2007). A mediana de intensidade de fluorescência por célula e as áreas sob as curvas de QL, sendo variáveis contínuas, foram analisadas por modelos lineares de regressão heterocedásticos (ou seja, considerando variâncias diferentes a cada um dos grupos) com erro baseado na distribuição normal, com estimação bayesiana. Detalhes sobre este modelo podem ser encontrados em Coelho-Barros et al. (2008). Livre de pressupostos assintóticos (ou seja, cuja eficácia é baseada em grandes amostras), o uso de técnicas de estimação bayesiana de parâmetros torna-se atraente em situações como a do presente estudo, onde se deseja comparações entre grupos com tamanhos amostrais reduzidos. A estimação bayesiana de parâmetros fez uso de técnicas de simulação Monte Carlo em Cadeias de Markov (MCMC), considerando distribuições a priori não informativas (Branscum et al., 2007, Coelho-Barros et al., 2008). Nestas simulações, foram geradas 510 mil amostras para cada parâmetro de interesse, tomadas a cada 10 valores, sendo descartadas as 10 mil primeiras amostras para evitar influências dos valores iniciais. Em todas as análises estatísticas, utilizou-se o programa OpenBugs versão 3.2.1.

5. Resultados

5.1 Caracterização do DNA genômico

Para avaliar a qualidade das amostras de DNA extraídas, foi realizada a eletroforese das amostras diluídas 50 vezes e coradas com tampão de amostra em gel de agarose 0,8% em tampão TBE pH 8,3 (Figura 2).

Figura 2 –Representação da avaliação qualitativa das amostras de DNA extraídas pelo método de *salting out* coradas com tampão de amostra e GelRed. Eletroforese de gel de agarose 0,8% em TBE pH 8,3, a 100 volts por 40min. L, *Ladder* (marcador de pares de bases) de 50pb. Sete amostras de DNA escolhidas aleatoriamente, entre pacientes e controles. Foto de J.E. Toller-Kawahisa, arquivo do laboratório do autor.

A análise das bandas no gel de agarose demonstrou que o DNA estava íntegro, sem fragmentos, e adequadas para serem submetidas a PCR. A pureza da amostra também foi avaliada, e as leituras de DO em 260nm/280nm mostraram que a relação da pureza da amostra estava entre 1,8 e 2,0.

5.2 Genotipagem dos FcγR e CR3

A padronização da técnica foi realizada com oligonucleotídeos específicos para cada polimorfismo. As técnicas e materiais utilizados foram descritos em “Casuística e métodos”.

O fragmento de HGH amplificou em todas as reações, demonstrando que a amplificação gênica ocorreu durante a PCR. Todos os genótipos foram confirmados por três repetições para cada amostra de DNA.

5.2.1 FCGR2A (CD32)

A Figura 3 representa a eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose para análise dos genótipos H e R. O produto da PCR para estes alelos corresponde a 253pb. O HGH foi utilizado como controle interno com 428pb.

Figura 3 – Gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3 representando os produtos da PCR para os polimorfismos de FCGR2A (CD32) corado por tampão de amostra contendo GelRed. L, *Ladder* (marcador de pares de bases) de 50pb; HR, indivíduo heterozigoto; HH, indivíduo homozigoto para o alelo H; RR, indivíduo homozigoto para o alelo R. Foto de J.E. Toller-Kawahisa, arquivo do laboratório do autor.

5.2.2 FCGR3B (CD16)

A Figura 4 representa a análise dos produtos da PCR de HNA-1a, HNA-1b e HNA-1c em gel de agarose. O produto da PCR para HNA-1a possui tamanho de 141pb, para HNA-1b de 155pb e para HNA-1c de 191pb.

Figura 4 – Géis de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3 representando os produtos da PCR para os polimorfismos de FCGR3B (CD16) corados por tampão de amostra contendo GelRed. L, *Ladder* (marcador de pares de bases) de 50pb; HNA-1a/1b, indivíduo heterozigoto; HNA-1a indivíduo homozigoto; HNA-1b, indivíduo homozigoto, HNA-1c, indivíduo homozigoto. Foto de J.E. Toller-Kawahisa, arquivo do laboratório do autor.

5.2.3 HNA-4a (CR3)

A Figura 5 representa a análise dos produtos de PCR dos genótipos de HNA-4a em gel de agarose. A presença da mutação no receptor corresponde ao genótipo HNA-4a

negativo. Os produtos de amplificação dos genes de HNA-4a positivo e negativo possuem tamanho de 124pb.

Figura 5 – Gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3 representando os produtos da PCR para o polimorfismo da cadeia CD11b do CR3, alelo HNA-4a corado por tampão de amostra contendo GelRed. L, *Ladder* (marcador de pares de bases) de 50pb; +/-, indivíduo heterozigoto HNA-4a positivo e negativo; --, indivíduo homozigoto HNA-4a negativo; ++, indivíduo homozigoto HNA-4a positivo. Foto de J.E. Toller-Kawahisa, arquivo do laboratório do autor.

5.2.4 Frequência dos genótipos encontrados

A frequência dos genótipos e dos alelos para FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a em pacientes com LES e indivíduos saudáveis está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3– Frequência dos alelos e dos genótipos de FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a.

	Pacientes (n=157)		Controles (n=147)		Valor de P	Odds Ratio	95% I.C.
Alelos de FCGR2A	<i>n</i>	<i>Frequência</i>	<i>n</i>	<i>Frequência</i>			
H	121	0,3854	136	0,4626	0,0590	0,7284	0,5274-1,0059
R	193	0,6146	158	0,5374	0,0590	1,3729	0,9942-1,8961
Genótipos de FCGR2A							
HH	23	0,1465	30	0,2041	0,2264	0,6694	0,3684-1,2162
HR	75	0,4777	76	0,5170	0,5661	0,8545	0,5447-1,3404
RR	59	0,3758	41	0,2789	0,0872	1,5565	0,9593-2,5255
Genótipos de FCGR3B	<i>n</i>	<i>Frequência</i>	<i>n</i>	<i>Frequência</i>			
HNA-1a	29	0,18	24	0,16	0,6525	1,161	0,6405-2,105
HNA-1b	47	0,30	50	0,34	0,4624	0,8289	0,5114-1,343
HNA-1a/-1b	63	0,40	61	0,41	0,8164	0,9449	0,5978-1,493
HNA-1a/-1c	8	0,05	4	0,03	0,3812	1,919	0,5654-6,516
HNA-1b/-1c	4	0,03	3	0,02	1,0000	1,255	0,2760-5,706
HNA-1a/-1b/-1c	5	0,03	4	0,03	1,0000	1,176	0,3095-4,468
Não determinado*	1	0,01	1	0,01	1,0000	0,9359	0,0579-15,111
Alelos de HNA-4a	<i>n</i>	<i>Frequência</i>	<i>n</i>	<i>Frequência</i>			
Positivo	237	0,7548	249	0,8469	0,0046	0,5563	0,3697-0,8369
Negativo	77	0,2452	45	0,1531	0,0046	1,7977	1,1948-2,7049
Genótipos de HNA-4a							
Pos/pos	89	0,5669	107	0,7279	0,0040	0,4893	0,3024-0,7917
Neg/neg	9	0,0573	5	0,0340	0,4165	1,7270	0,5651-5,2783
Pos/neg	59	0,3758	35	0,2381	0,0128	1,9265	1,1704-3,1711

*Sem produto de amplificação por PCR.

Teste de Fisher bilateral; significância para $p < 0,05$; I.C., intervalo de confiança; pos, positivo; neg, negativo; HNA, antígeno de neutrófilo humano.

Para o FCGR2A, não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos e os alelos estudados, embora o intervalo de confiança para a frequência dos alelos H131 e R131 tenha ficado em seu limiar. Para o FCGR3B não foram encontradas diferenças significativas entre a frequência dos alelos e dos genótipos.

Para o HNA-4a, foram encontradas diferenças significativas para os alelos positivo e negativo, com o alelo positivo conferindo proteção (*Odds Ratio*, OR=0,5563) e o alelo negativo suscetibilidade (OR=1,7977) ao LES. Dentre os genótipos encontrados, apenas o homozigoto positivo e heterozigoto positivo/negativo do HNA-4a tiveram diferença significativa, sendo que o genótipo homozigoto positivo confere proteção (OR=0,4893) e o heterozigoto positivo/negativo suscetibilidade (OR=1,9265) ao LES.

5.2.5 Combinações entre os genótipos encontrados

A combinação dos genótipos do FCGR2A, FCGR3B e do HNA-4a e a frequência de cada combinação para pacientes com LES e para indivíduos saudáveis está apresentada na Tabela 4. As combinações mais frequentes são apresentadas em negrito.

Tabela 4– Combinação dos genótipos para os polimorfismos de FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a.

Genótipo FCGR3B HNA-4a	FCGR2A											
	H131				R131				HR131			
	LES		Controle		LES		Controle		LES		Controle	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HNA-1a												
Pos/pos	2	1,25	2	1,35	9	5,75	7	4,75	8	5,10	7	4,75
Neg/neg	0	0	0	0	1	0,65	0	0	1	0,65	0	0
Pos/neg	0	0	3	2,05	5	3,20	1	0,70	3	1,90	4	2,70
HNA-1b												
Pos/pos	5	3,20	5	3,40	7	4,45	12	8,15	14	8,90	19	12,90
Neg/neg	1	0,65	0	0	1	0,65	0	0	0	0	1	0,70
Pos/neg	3	1,90	6	4,05	5	3,20	2	1,35	11	7	5	3,40
HNA-1a/-1b												
Pos/pos	3	1,19	9	6,10	12	7,65	13	8,85	17	10,85	24	16,30
Neg/neg	2	1,25	1	0,70	3	1,19	1	0,70	0	0	2	1,35
Pos/neg	5	3,20	3	2,05	9	5,75	2	1,35	12	7,65	6	4,05
HNA-1a/-1c												
Pos/pos	0	0	0	0	2	1,25	1	0,70	2	1,25	2	1,35
Pos/neg	0	0	0	0	2	1,25	0	0	2	1,25	1	0,70
HNA-1b/-1c												
Pos/pos	1	0,65	0	0	1	0,65	1	0,70	1	0,65	1	0,70
Pos/neg	0	0	0	0	0	0	1	0,70	1	0,65	0	0
HNA-1a/-1b/-1c												
Pos/pos	1	0,65	1	0,70	2	1,25	0	0	1	0,65	3	2,05
Pos/neg	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,65	0	0
HNA-ausente*												
Pos/pos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,70
Pos/neg	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,65	0	0

LES, lúpus eritematoso sistêmico; pos, positivo para HNA-4a; neg, negativo para HNA-4a; HNA, antígeno de neutrófilo humano.

*sem produto de amplificação por PCR.

As combinações mais frequentes tanto no LES quando em indivíduos saudáveis continham heterozigose para FCGR2A (HR131) e para FCGR3B (HNA-1a/-b), associada com homozigose para o alelo positivo de HNA-4a.

5.2.6 Combinações das infecções mais frequentes com os genótipos encontrados

Entre os 166 pacientes com LES analisados, 71 apresentaram pelo menos uma das seguintes infecções: infecção do trato urinário (ITU), pielonefrite, celulite, sinusite, pneumonia e choque séptico. Os indivíduos foram separados de acordo com a combinação dos genótipos FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a e a Tabela 5 apresenta a frequência geral das infecções para as combinações dos genótipos. Os resultados mais frequentes estão apresentados em negrito.

Tabela 5– Frequência das infecções[§] para as combinações dos genótipos para os polimorfismos de FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a

Combinações de genótipos	Indivíduos com Infecções (total=71) n (%)	Ocorrência de infecções (total=141) n (%)	Média Infecções /paciente	Tempo de diagnóstico Média±DP
HH/HNA-1a ⁺ /1b ⁻ /1c ⁻ /pos	1 (1,41)	1 (0,71)	1	11
HH/HNA-1a ⁻ /1b ⁺ /1c ⁻ /pos	3 (4,23)	4 (2,84)	1,33	13,66±3,78
HH/HNA-1a ⁻ /1b ⁺ /1c ⁺ /pos	1 (1,41)	1 (0,71)	1	14
HH/HNA-1a ⁺ /1b ⁺ /1c ⁻ /pos	1 (1,41)	1 (0,71)	1	13
HH/HNA-1a ⁺ /1b ⁺ /1c ⁺ /pos	1 (1,41)	1 (0,71)	1	9
HH/HNA-1a ⁺ /1b ⁺ /1c ⁻ /neg	2 (2,81)	4 (2,84)	2	10±1,41
HH/HNA-1a ⁺ /1b ⁺ /1c ⁺ /posneg	1 (1,41)	5 (3,54)	5	10
RR/HNA-1a ⁺ /1b ⁻ /1c ⁻ /pos	4 (5,63)	5 (3,54)	1,25	13,25±2,87
RR/HNA-1a ⁺ /1b ⁻ /1c ⁺ /pos	1 (1,41)	3 (2,13)	3	13
RR/HNA-1a ⁺ /1b ⁻ /1c ⁺ /posneg	1 (1,41)	2 (1,42)	2	10
RR/HNA-1a ⁻ /1b ⁺ /1c ⁻ /pos	5 (7,05)	14 (9,93)	2,8	15,2±5,06
RR/HNA-1a ⁻ /1b ⁺ /1c ⁺ /pos	1 (1,41)	2 (1,42)	2	22
RR/HNA-1a ⁻ /1b ⁺ /1c ⁺ /posneg	2 (2,81)	3 (2,13)	1,5	19±2,82
RR/HNA-1a ⁺ /1b ⁺ /1c ⁻ /pos	5 (7,05)	11 (7,80)*	2,2	15,8±3,34
RR/HNA-1a ⁺ /1b ⁺ /1c ⁺ /pos	2 (2,81)	2 (1,42)	1	14±5,65
RR/HNA-1a ⁺ /1b ⁺ /1c ⁻ /posneg	6 (8,45)	9 (6,38)	1,5	14,33±6,40
RR/HNA-1a ⁺ /1b ⁺ /1c ⁺ /neg	2 (2,81)	3 (2,13)	1,5	12,5±2,12
HR/HNA-1a ⁺ /1b ⁻ /1c ⁻ /pos	2 (2,81)	6 (4,25)	3	16,5±12,02
HR/HNA-1a ⁺ /1b ⁻ /1c ⁺ /posneg	2 (2,81)	5 (3,54)*	2,5	13±4,24
HR/HNA-1a ⁻ /1b ⁺ /1c ⁻ /pos	4 (5,63)	7 (4,96)	1,75	16±9,38
HR/HNA-1a ⁻ /1b ⁺ /1c ⁺ /pos	1 (1,41)	4 (2,84)	4	17
HR/HNA-1a ⁻ /1b ⁺ /1c ⁺ /posneg	5 (7,05)	12 (8,51)	2,4	10,4±6,84
HR/HNA-1a ⁻ /1b ⁺ /1c ⁺ /posneg	1 (1,41)	2 (1,42)*	2	36
HR/HNA-1a ⁺ /1b ⁺ /1c ⁻ /pos	9 (12,68)	14 (9,93)*	1,55	14,22±6,33
HR/HNA-1a ⁺ /1b ⁺ /1c ⁻ /posneg	6 (8,45)	18 (12,77)*	3	16,83±6,01
HR/HNA-1a ⁺ /1b ⁺ /1c ⁺ /posneg	1 (1,41)	1 (0,71)	1	14
HR/HNA-1a ⁻ /1b ⁻ /1c ⁻ /pos	1 (1,41)	1 (0,71)	1	20

[§]Dados registrados nos prontuários do HCFMRP-USP; podem estar subestimados (ver discussão).

*1 paciente apresentou choque séptico.

DP, desvio padrão; pos, positivo para HNA-4a; neg, negativo para HNA-4a; HNA, antígeno de neutrófilo humano.

A maior ocorrência de infecções foi observada nos genótipos RR/HNA-1a⁻/1b⁺/1c⁻/pos, RR/HNA-1a⁺/1b⁺/1c⁻/pos, HR/HNA-1a⁺/1b⁻/1c⁺/posneg, HR/HNA-1a⁻/1b⁺/1c⁻/posneg, HR/HNA-1a⁺/1b⁺/1c⁻/posneg, que, ainda, estavam entre as combinações dos genótipos mais frequentes no LES (Tabela 4).

5.3 Avaliação da preparação de neutrófilos

Uma alíquota da suspensão de neutrófilos foi misturada volume a volume com plasma humano e submetida à citocentrifugação. A lâmina com as células foi submetida à coloração panótica. Como se pode observar na Figura 6, essa purificação celular forneceu cerca de 90% de neutrófilos.

Figura 6 – Neutrófilos purificados pelo método da gelatina, submetidos à citocentrifugação e corados por corante panótico. Imagem de microscopia óptica comum (1000X). Foto de J.E. Toller-Kawahisa, arquivo do laboratório do autor.

5.4 Medida do *burst* oxidativo de neutrófilos

Em uma primeira etapa, foi realizada a padronização da concentração de IC a ser utilizada nos ensaios de quimioluminescência (QL) (Figura 7). Inicialmente, as concentrações de IC testadas foram de 20µg, 30µg e 40µg. Com a finalidade de reduzir a concentração de IC utilizada e otimizar o número de neutrófilos por tubo, testou-se a quantidade de neutrófilos necessária para os ensaios. Os neutrófilos (5×10^5) foram estimulados com diferentes concentrações de IC, IC/SHN, IC/SHI ou PMA (Figura 8) e foi realizado o ensaio de QL. Como se pode observar, os IC estimularam a QL dos neutrófilos de maneira dose-dependente. Para essas condições, optou-se por utilizar a quantidade de 30µg de IC para 5×10^5 células em volume final de 500µL.

As Figuras 7A e C representam os perfis de QL e as Figuras 7B e D representam os valores das áreas sob as curvas dos perfis de QL registrados.

Figura 7 –Representação dos perfis de quimioluminescência (QL) registrados em milivolts (mV) em função do tempo em minutos (A, C) e áreas sob as curvas relativas aos perfis de QL (B, D). Neutrófilos (5×10^5) de indivíduos saudáveis foram estimulados com diferentes concentrações de IC na presença de luminol $10^{-4}M$ (A, B) ou lucigenina $10^{-4}M$ (C, D). A reação foi acompanhada em luminômetro a $37^\circ C$ por 20min e registrada em contagem de fótons por minuto (cpm). Gráficos representativos de três experimentos.

A Figura 8 mostra a curva dose resposta para a medida do *burst* oxidativo dos neutrófilos com diferentes concentrações dos IC.

Quando o IC é opsonizado com complemento (IC/SHN) há maior produção de QL. Isso demonstra que a ligação do complemento e da IgG no IC aos seus respectivos receptores (CR e Fc γ R) atuam em cooperação para o *burst* oxidativo de neutrófilos (Figura 8). O PMA foi incluído como controle, pois ativa o *burst* oxidativo por uma via independente de receptor de membrana.

Figura 8 –Representação das curvas dose resposta para a medida do *burst* oxidativo dos neutrófilos estimulados com os diferentes IC. Área sob a curva do perfil de quimioluminescência (QL). Neutrófilos foram estimulados com diferentes concentrações de IC, IC/SHN, IC/SHI e PMA 10^{-7} M na presença de luminol 10^{-4} M (A, 1×10^6 neutrófilos; B, 5×10^5 neutrófilos) ou lucigenina 10^{-4} M (C, 1×10^6 neutrófilos; D, 5×10^5 neutrófilos) em 500 μ L de Hanks gelatina 0,1% pH 7,2. Os resultados estão apresentados como área sob a curva do perfil de QL registrado. Gráfico representativo de três experimentos. A espontânea representa o controle de neutrófilos com luminol ou lucigenina, na ausência de IC.

Após a definição da concentração de IC (30 μ g) para 5×10^5 neutrófilos, os ensaios de QL foram iniciados os ensaios com neutrófilos de pacientes com LES ativo (n=21), LES inativo (n=16) e de indivíduos saudáveis (n=36). Não houve diferenças significativas para o *burst* oxidativo dependente de luminol (Figura 9A) e de lucigenina (Figura 9B) entre os grupos estudados, quando comparados sem discriminar os genótipos para os polimorfismos estudados.

Figura 9 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependente de luminol 10^{-4} M(A) e lucigenina 10^{-4} M (B). Neutrófilos (5×10^5) de pacientes com LES e de indivíduos saudáveis foram estimulados com $30 \mu\text{g}$ de IC-IgG, IC-IgG/SHN, IC-IgG/SHI ou com PMA 10^{-7} M. As barras representam as médias dos valores da área sob a curva de QL dos neutrófilos de cada grupo. LES-A, LES ativo; LES-I, LES inativo; CTL, controle.

A Figura 10 mostra a QL de neutrófilos dependente de luminol, considerando-se o polimorfismo do $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ nos grupos de pacientes com LES ativo, inativo e no grupo controle.

Figura 10 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependente de luminol 10^{-4} M de indivíduos classificados de acordo com o polimorfismo de FcγRIIa: HH, RR, HR. Neutrófilos (5×10^5) de pacientes com LES ativo, com LES inativo e de indivíduos controles foram estimulados com $30 \mu\text{g}$ de IC-IgG (A) ou $30 \mu\text{g}$ de IC-IgG/SHN (B). As barras representam as médias dos valores da área sob a curva de QL dos neutrófilos de cada grupo. Diferenças significativas: HH-controle vs RR-controle (IC-IgG), $p < 0,05$; RR-LES ativo vs HR-LES ativo (IC-IgG); HH-controle vs RR-controle (IC-IgG/SHN), $p < 0,05$; RR-LES inativo vs HH-controle (IC-IgG/SHN), $p < 0,05$. LES-A, LES ativo; LES-I, LES inativo; CTL, controle.

Para os resultados na Figura 10A foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) entre indivíduos com genótipo HH e RR do grupo controle, quando os neutrófilos foram estimulados com IC-IgG, sendo menor o *burst* oxidativo no grupo HH. Ainda, houve

diferença entre indivíduos RR e HR com LES ativo, com menor *burst* neste último ($p < 0,05$).

Quando foi analisada a QL de neutrófilos utilizando o estímulo IC-IgG/SHN (Figura 10B), houve redução significativa ($p < 0,05$) do *burst* oxidativo dos neutrófilos de indivíduos HH do grupo controle, quando comparados com o grupo RR controle e com o grupo RR do LES inativo.

A Figura 11 mostra a QL de neutrófilos dependente de lucigenina para os grupos de LES ativo, LES inativo e controle, classificados de acordo com o polimorfismo para o Fc γ RIIa, utilizando-se como estímulo IC-IgG (A) ou IC-IgG/SHN (B).

Figura 11 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependente de lucigenina 10^{-4} M de indivíduos classificados de acordo com opolismo de FcγRIIa: HH, RR, HR. Neutrófilos (5×10^5) de pacientes com LES ativo, com LES inativo e de indivíduos controles foram estimulados com $30 \mu\text{g}$ de IC-IgG (A) ou $30 \mu\text{g}$ de IC-IgG/SHN (B). As barras representam as médias dos valores da área sob a curva de QL dos neutrófilos de cada grupo. LES-A, LES ativo; LES-I, LES inativo; CTL, controle.

Para os resultados na Figura 11, não foram encontradas diferenças significativas na QL de neutrófilos dependente de lucigenina entre os diferentes genótipos para o polimorfismo de FcγRIIa.

A Figura 12 mostra a QL de neutrófilos dependente de luminol de pacientes com LES ativo e inativo e indivíduos controles, classificados de acordo com o polimorfismo de Fc γ RIIIb e estimulados com IC-IgG (A) ou IC-IgG/SHN (B).

Figura 12 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependente de luminol 10⁻⁴M de indivíduos classificados de acordo com opolimorfismo deFc γ RIIIb: HNA-1a, HNA-1b, HNA-1a/1b, HNA-1a/1c, HNA-1a/1b/1c e HNA-1b/1c. Neutrófilos (5x10⁵) de pacientes com LES ativo, com LES inativo e de indivíduos controles foram estimulados com 30 μ g de IC-IgG (A)ou 30 μ g de IC-IgG/SHN (B). As barras representam as médias dos valores da área sob a curva de QL dos neutrófilos de cada grupo. Diferenças significativas: HNA-1a-controle vs HNA-1b-controle (IC-IgG), p<0,05; HNA-1a-controle vs HNA-1b-LES ativo (IC-IgG); HNA-1a-LES inativo vs HNA-1b-LES ativo (IC-IgG); HNA-1a-controle vs HNA-1b-controle (IC-IgG/SHN), p<0,05; HNA-1a-controle vs HNA-1b-LES ativo (IC-IgG/SHN), p<0,05. LES-A, LES ativo; LES-I, LES inativo; CTL, controle.

Para o polimorfismo do FcγRIIIb, utilizando-se como estímulo IC-IgG (Figura 12A), neutrófilos de indivíduos homozigotos HNA-1a do grupo controle mostraram aumento significativo ($p<0,05$) do *burst* oxidativo comparado aos homozigotos HNA-1b controles e LES ativo; o *burst* oxidativo também foi maior ($p<0,05$) na homozigose para HNA-1a no LES inativo comparado à homozigose HNA-1b no LES ativo.

Na Figura 12B, com IC-IgG/SHN, o *burst* oxidativo também foi maior ($p<0,05$) para neutrófilos dos indivíduos homozigotos HNA-1a quando comparados aos homozigotos HNA-1b do grupo controle e homozigotos HNA-1b do grupo LES ativo.

A Figura 13 mostra a QL de neutrófilos dependente de lucigenina para os grupos de LES ativo, LES inativo e controle, classificados de acordo com o polimorfismo para o FcγRIIIb, utilizando-se como estímulo IC-IgG (A) ou IC-IgG/SHN (B).

Figura 13 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependente de lucigenina 10^{-4} M de indivíduos classificados de acordo com opolimorfismo de Fc γ RIIIb: HNA-1a, HNA-1b, HNA-1a/1b, HNA-1a/1c, HNA-1a/1b/1c e HNA-1b/1c. Neutrófilos (5×10^5) de pacientes com LES ativo, com LES inativo e de indivíduos controles foram estimulados com 30 μ g de IC-IgG (A) ou 30 μ g de IC-IgG/SHN (B). As barras representam as médias dos valores da área sob a curva de QL dos neutrófilos de cada grupo. LES-A, LES ativo; LES-I, LES inativo; CTL, controle.

Não foram encontradas diferenças significativas na QL de neutrófilos dependente de lucigenina entre os polimorfismos de Fc γ RIIIa estudados (Figura 13).

A Figura 14 mostra a QL de neutrófilos dependente de luminol (A) ou lucigenina (B) de indivíduos com LES ativo, LES inativo e indivíduos controles, classificados de acordo com o polimorfismo HNA-4a da cadeia CD11b do CR3.

Figura 14 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependente de luminol 10^{-4} M (A) ou lucigenina 10^{-4} M (B) de indivíduos classificados de acordo com o polimorfismo de CD11b no CR3: positivo/positivo, negativo/negativo e positivo/negativo. Neutrófilos (5×10^5) de pacientes com LES ativo, com LES inativo e de indivíduos controles foram estimulados com $30 \mu\text{g}$ de IC-IgG/SHN. As barras representam as médias dos valores da área sob a curva de QL dos neutrófilos de cada grupo. Diferenças significativas (somente luminol): neg/neg-controle vs pos/pos-controle, $p < 0,05$; neg/neg-controle vs pos/pos-LES inativo; neg/neg-controle vs pos/pos-LES ativo, $p < 0,05$; neg/neg-controle vs pos/neg-LES inativo, $p < 0,05$; pos/neg-LES ativo vs pos/neg-LES inativo, $p < 0,05$. LES-A, LES ativo; LES-I, LES inativo; CTL, controle.

Para os resultados da Figura 14A, na QL de neutrófilos dependente de luminol, a homozigose HNA-4a negativo no grupo controle mostrou redução significativa ($p < 0,05$) do *burst* oxidativo comparado à homozigose HNA-4a positivo nos grupos

controle, LES ativo e LES inativo, e ainda, comparada à heterozigose HNA-4a positivo/negativo no grupo LES inativo. A heterozigose no grupo LES ativo também reduziu o *burst* oxidativo comparado à heterozigose no grupo LES inativo ($p < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças significativas na QL dependente de lucigenina entre os genótipos para o polimorfismo de HNA-4a (Figura 14B).

5.5 Análise da expressão dos receptores Fcγ e dos receptores para complemento em neutrófilos por citometria de fluxo

O citograma bidirecional, representando uma população de neutrófilos (P1), é demonstrado na Figura 15. Três populações celulares principais são identificadas: neutrófilos (vermelho), monócitos (verde) e linfócitos (azul), separadas por seu tamanho e sua complexidade. A população de neutrófilos (P1) foi analisada para a expressão do FcγRIIa (CD32), do FcγRIIb (CD16), do CR3 e do CR1.

Figura 15 – Citograma bidirecional. Células do sangue total foram separadas de acordo com seu tamanho e sua complexidade no citômetro de fluxo. Em P1, neutrófilos (vermelho); em P2, monócitos (verde); e em P3, linfócitos (azul). P1 identifica a população de neutrófilos selecionada para a análise da expressão dos receptores.

A Figura 16 apresenta os histogramas de fluorescência para os FcγRIIa (A), FcγRIIb (B), CR1 (C) e CR3 (D) dos neutrófilos. Além dos tubos contendo o anticorpo anti-receptor específico, foram feitos dois tubos contendo anticorpos não-específicos isotipos controles (E, F) para descontar a fluorescência devido a ligação não específica do anticorpo à célula e um tubo sem anticorpos para descontar a autofluorescência celular.

Figura 16 – Representação dos histogramas de fluorescência dos receptores de superfície celular em neutrófilos marcados com anticorpo anti-receptor específico e analisados por citometria de fluxo. A, Fc γ RIIa (CD32); B, Fc γ RIIIb (CD16); C, CR1; D, CR3; E, anticorpo não-específico marcado com FITC; F, anticorpo não-específico marcado com PE.

A mediana de intensidade de fluorescência para a ligação dos anticorpos específicos aos seus respectivos receptores está apresentada na Figura 17. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados.

Figura 17– Expressão dos FcγR e CR nos neutrófilos de pacientes com LES e de indivíduos controles. Mediana de intensidade de fluorescência por célula. A, FcγRIIa (CD32); B, FcγRIIIb (CD16); C, CR1; D, CR3. Os resultados das amostras de cada voluntário paciente e controle estão apresentados. As barras representam os valores da média para cada grupo. LES-A, LES ativo; LES-I, LES inativo; CTL, controle.

A Figura 18 mostra a porcentagem de células fluorescentes para o FcγRIIa (CD32), FcγRIIIb (CD16), CR1 e CR3. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de indivíduos com LES ativo, com LES inativo e indivíduos controles.

Figura 18– Expressão dos FcγR e CR nos neutrófilos de pacientes com LES e indivíduos controles. Porcentagem de células positivas para a expressão de cada receptor. A, FcγRIIa (CD32); B, FcγRIIIb (CD16); C, CR1; D, CR3. Os resultados das amostras de cada voluntário paciente e controle estão apresentados. As barras representam os valores da média para cada grupo. LES-A, LES ativo; LES-I, LES inativo; CTL, controle.

6. Discussão

O polimorfismo dos FcγR tem sido associado ao LES (Cantor et al., 2004, Kinder et al. 2007, Rhodes, Vyse, 2008), no entanto há poucos trabalhos na literatura explorando a associação deste polimorfismo com as funções efetoras mediadas por eles nos neutrófilos.

Neste estudo, para a frequência dos alelos H131 e R131, não foram encontradas diferenças significativas entre os pacientes com LES e o grupo controle, embora o intervalo de confiança tenha ficado em seu limiar. Provavelmente, se fosse realizada a genotipagem de mais alguns indivíduos, teríamos um resultado significativo para a frequência alélica. A frequência do alelo R131 foi maior em pacientes com LES (0,61) quando comparado ao grupo controle (0,54), conferindo 1,37 vezes mais suscetibilidade ao LES. O alelo H131 foi mais frequente em indivíduos saudáveis (0,46) quando comparado com pacientes com LES (0,38), conferindo proteção ao LES (OR=0,7284). Este resultado corrobora com o observado na população afro-americana, onde o alelo R131 foi encontrado com maior frequência em pacientes com LES (0,64) quando comparado com o grupo controle (0,45) (Salmon et al., 1996). Na população coreana, foi visto que o alelo R131 era mais frequente em pacientes (0,51) quando comparado ao grupo controle (0,37) (Songet al., 1998). Ainda, duas meta-análises mostraram que o alelo R131 está relacionado com um risco aumentado à suscetibilidade ao LES (Karassa et al., 2002, Chu et al., 2004).

Com relação aos genótipos, não encontramos diferenças significativas entre os pacientes e os indivíduos saudáveis. O genótipo homozigoto H131 foi encontrado com mais frequência em indivíduos saudáveis (0,20) quando comparado a pacientes com LES (0,14). Indivíduos heterozigotos HR131 foram mais frequentes no grupo controle (0,51) do que em pacientes com LES (0,47). Para a homozigose R131, houve maior frequência entre pacientes (0,37) do que em indivíduos saudáveis (0,27). Este resultado corrobora com o observado na população afro-americana, onde a homozigose R131 é mais frequente em pacientes com LES (0,37) do que em indivíduos saudáveis (0,26) e a homozigose H131 é mais frequente em indivíduos saudáveis (0,36) do que em pacientes com LES (0,09) (Salmon et al., 1996).

Tendo em vista que a presença do alelo R131 pode resultar em uma ligação ineficiente aos IC formados por IgG2, possivelmente o risco aumentado ao desenvolvimento do LES possa ter implicações para o *clearance* ineficiente de IC circulantes, aumentando sua deposição no tecido, com consequente dano tecidual. De fato, alguns trabalhos têm associado o polimorfismo dos FcγR com nefrite lúpica (Hatta

et al., 1999, Gelmetti et al., 2006), o que reforça a associação do alelo R131 com a deposição de IC.

O FcγR é importante para o *clearance* de IC. Normalmente, os IC opsonizados com fragmentos do complemento se ligam ao CR1 presente nos eritrócitos e são transportados para o baço e fígado. Estes são, então, rapidamente removidos por macrófagos residentes via CR3, FcγRIIa e FcγRIIIa (Hebert, 1991). Polimorfismos nestes receptores estão envolvidos em uma diminuição no *clearance* de IC, o que por sua vez está associado ao LES (Brown et al., 2007). Isso pode desencadear cascatas pró-inflamatórias, ativação celular e a produção de ERO e citocinas pró-inflamatórias (Green et al., 1997; Nathan, 2006).

O FcγRIIa atua em cooperação com FcγRIIIb. Alguns estudos sugerem que em neutrófilos o FcγRIIIb seria importante para o acúmulo de IC na membrana para ativar o FcγRIIa e para o aumento do influxo de cálcio, enquanto que o FcγRIIa seria responsável pelo potencial de membrana e geração de superóxido (Brunkhorst et al., 1992). Em virtude disto, nós estudamos também a frequência do polimorfismo no FcγRIIIb.

Nenhuma diferença foi observada nas frequências genótípicas do FCGR3B, visto que estas frequências entre pacientes e indivíduos saudáveis foram similares. Quando não consideramos os genótipos que apresentaram HNA-1c, o genótipo mais frequente foi HNA-1a/-1b (pacientes-0,40 e indivíduos saudáveis-0,41), seguido pelo genótipo HNA-1b (pacientes-0,30 e grupo controle-0,34) e o genótipo HNA-1a foi pouco frequente (pacientes-0,18 e indivíduos saudáveis-0,16). Este resultado foi similar ao encontrado na população indiana, onde as frequências de HNA-1a, HNA-1b e HNA-1a/-1b em pacientes e indivíduos saudáveis foi similar, demonstrando que os polimorfismos de FCGR3B não estão envolvidos na suscetibilidade ao LES (Pradhan et al., 2010).

Já na população japonesa há relação entre os polimorfismos de FCGR3B e a suscetibilidade ao LES. O genótipo HNA-1b é mais frequente em pacientes com LES (0,24) quando comparado a indivíduos saudáveis (0,11) e o genótipo HNA-1a é mais frequente em indivíduos saudáveis (0,42) do que em pacientes (0,28) (Hatta et al., 1999). A associação do polimorfismo de FCGR3B com o LES provavelmente ocorre por diferenças da frequência genotípica, que pode estar alterada entre as populações e pode ser dependente de outros polimorfismos.

A frequência do alelo HNA-1c foi maior em pacientes com LES (0,11) do que em indivíduos saudáveis (0,08). Este resultado é diferente do encontrado na população indiana, onde a frequência do alelo HNA-1c em pacientes com LES (0,60) é menor em relação a indivíduos saudáveis (0,69) (Pradhan et al., 2010). Para indivíduos saudáveis, a frequência do HNA-1c é diferente do observado na população dinamarquesa (0,05) (Steffensen et al., 1998), na população alemã (0,05) (Flesh et al., 2002) e na população africana (0,35) (Flesh et al., 2002). Não encontramos diferenças significativas entre indivíduos saudáveis e pacientes com LES, provavelmente devido à baixa frequência deste alelo na população brasileira (Terzian et al., 2012).

Em indivíduos com LES, a herança do alelo HNA-1c ocorreu tanto com HNA-1a (0,05) quanto com o HNA-1b (0,03), sendo que cinco indivíduos herdaram os três alelos (0,03). Para indivíduos saudáveis, a herança do HNA-1c ocorreu com o HNA-1a (0,03), com o HNA-1b (0,02) ou com o HNA-1a/-1b (0,03). Estes resultados corroboram com os dados encontrados para indivíduos saudáveis brasileiros (Terzian et al., 2012) e para africanos (Flesh et al., 2002), uma vez que nestes estudos foi observado que o HNA-1c foi herdado com o HNA-1a, HNA-1b ou com dois alelos, mas foi diferente do encontrado em alemães, uma vez que nesta população não foram encontrados indivíduos HNA-1b/-1c (Flesh et al., 2002).

Ainda em relação aos polimorfismos de FCGR3B, não foi possível determinar o genótipo de um paciente com LES e de um indivíduo saudável, já que estes não apresentaram produto de amplificação por PCR. Seria necessário realizar o sequenciamento do éxon 3 do gene FCGR3B desses indivíduos, para determinar se a reação negativa foi devido a uma deleção no gene que codifica o FcγRIIIb ou devido ao aparecimento de um novo haplótipo na população, que não pôde ser determinado utilizando-se os *primers* oligoespecíficos para os polimorfismos de FCGR3B.

Vários estudos foram realizados a fim de determinar se o polimorfismo do FcγRIIIb poderia estar associado à suscetibilidade ao LES. Na Ásia e na Espanha foi encontrada uma relação entre o alótipo HNA-1b e a suscetibilidade ao LES (Hatta et al., 1999; Gonzales-Escribano et al., 2002), já na Coreia este mesmo alótipo possui papel protetor (Hong et al., 2005). Para a população caucasiana não foi encontrada nenhuma relação deste polimorfismo e o LES (Manger et al., 2002).

A presença do HNA-1c propõe que o gene do FCGR3B possua três alelos (Koene et al., 1998). Isso sugere que indivíduos que possuam os três alelos (HNA-1a/-1b/-1c) tenham três cópias do mesmo gene. Assim, neste trabalho, não consideramos a

frequência alélica deste receptor, pois para isso teríamos que estudar o número de cópias de cada alelo e não foi possível no momento. Um indivíduo que é homozigoto para o HNA-1a, por exemplo, poderia ter uma única cópia deste alelo, ou ainda ter duas cópias do mesmo.

O polimorfismo do FcγRIIIb resulta em isoformas que diferem entre si pelo número de sítios de glicosilação. Uma vez que o FcγRIIIb coopera com o CR3 por uma ligação tipo lectina e sacarídeo (Ross et al., 1985) estas diferenças no padrão de glicosilação das isoformas do FcγRIIIb podem influenciar o sinergismo desses receptores.

Tendo em vista a relevância da cooperação FcγR/CR e considerando-se o novo polimorfismo descrito para a cadeia CD11b do CR3 (HNA-4a), este é o primeiro trabalho que descreve a associação do polimorfismo do HNA-4a com a suscetibilidade ao LES. Nós encontramos que o alelo positivo é o mais frequente (0,75) e o alelo negativo o menos frequente (0,25) em pacientes com LES e que o alelo positivo está associado com proteção e o alelo negativo está associado com suscetibilidade ao LES. O genótipo homozigoto positivo está associado com proteção ao LES, enquanto que a heterozigose está associada com suscetibilidade. Como o genótipo homozigoto negativo é encontrado em baixa frequência (0,05), não foi possível estabelecer uma relação deste genótipo com a suscetibilidade ao LES.

Para indivíduos saudáveis, encontramos que o alelo positivo é o mais frequente (0,85) e o alelo negativo o menos frequente (0,15) na população estudada. Este resultado é similar ao encontrado na população brasileira por Cardone e cols. (2006) (HNA-4a positivo-0,82), mas é diferente do observado por Norcia e cols. (2009) (HNA-4a positivo-0,94). Ainda, a população brasileira apresenta maior frequência do alelo HNA-4a negativo em relação às populações: alemã (0,09) (Sachs et al., 2004), australiana (0,09) (Clague et al., 2003) e turca (0,11) (Hauck et al., 2011). Provavelmente esta diferença se deve ao fato que a população brasileira é altamente heterogênea, com alta taxa de mistura racial na população. Para a frequência genotípica, encontramos que o homozigoto positivo foi o mais frequente (0,72) e que o homozigoto negativo o menos frequente (0,03), o que corrobora com o encontrado por Cardone e cols. (2006) (HNA-4a homozigoto positivo-0,68 e HNA-4a homozigoto negativo-0,04).

Estes resultados mostram que o polimorfismo HNA-4a do CR3 está associado à suscetibilidade ao LES. Provavelmente esse polimorfismo resulta em modificação

estrutural do CR3, com consequente alteração na afinidade de ligação deste receptor ao seu ligante podendo ser relevante para as funções biológicas.

O CR3 é expresso em monócitos/macrófagos e neutrófilos e é ativado durante a resposta imune inicial à infecção. O C3b, um fragmento do complemento proveniente da clivagem do C3, se liga a microrganismos invasores e é clivado em iC3b (fragmento inativado), que é reconhecido pelo CR3, o que inicia a resposta fagocítica (Huang et al., 2011). Além disso, o CR3 também está envolvido no *clearance* de IC, que pode ser ineficiente em pacientes com LES (Hepburn et al., 2006).

O polimorfismo de CR3, que consiste em uma substituição de uma arginina por histidina na posição 161 na cadeia CD11b, leva ao genótipo HNA-4a negativo que tem ocorrência rara (Clague et al., 2003). Não há trabalhos sobre a influência deste polimorfismo nas funções mediadas pelo CR3.

O FcγRIIa e o CR3 interagem sinergisticamente com o FcγRIIIb para desencadear respostas intracelulares de neutrófilos, uma vez que este receptor não possui domínio intracelular ou transmembrana. Polimorfismos genéticos nestes receptores podem alterar a interação com os IC circulantes e resultar em sinalização intracelular alterada (Harley et al., 2008). Assim, é importante estudar a combinação dos polimorfismos do FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a em indivíduos com LES.

Para as combinações dos genótipos entre o FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a, algumas foram encontradas em baixa frequência. Por essa razão, as análises estatísticas desses resultados não foram feitas. Podemos observar que, para o grupo de pacientes com LES, nove combinações foram as mais frequentes e todas elas possuíam o alelo R131 (0,63). O alelo HNA-1b esteve presente em sete delas (0,52) e três combinações continham o alelo negativo em heterozigose (0,20). Para o grupo controle, sete combinações foram mais frequentes (0,61), sendo que o alelo R131 estava presente em seis delas (0,55), o HNA-1b estava presente em quatro combinações (0,46) e nenhuma combinação continha o alelo negativo.

Um estudo sobre a frequência dos haplótipos de FCGR2A e FCGR3B na população tailandesa demonstrou que a estimativa da combinação foi maior para H131/HNA-1a (0,70) e para R131/HNA-1a (0,67) (Siriboonrit et al., 2003). Já na população caucasiana, a estimativa de combinação foi maior para H131/HNA-1b (0,40) e para R131/HNA-1b (0,34) (Timothy et al., 2003). Estes resultados demonstram que não há desequilíbrio de ligação entre os genes que codificam estes receptores.

Este trabalho é o primeiro em combinar os genótipos de FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a. Para poder realizar as análises estatísticas e assim determinar a significância de alguma combinação no LES e em indivíduos saudáveis, é necessário incluir mais indivíduos em ambos os grupos em uma continuação deste estudo.

Adicionalmente, o polimorfismo dos FcγR está associado ao risco aumentado de infecções no LES. Apesar disso, a influência do polimorfismo dos FcγR com o *burst* oxidativo dos neutrófilos não tem sido investigada. Neste estudo, nós avaliamos a ocorrência de infecções e o *burst* oxidativo dos neutrófilos.

A análise da ocorrência de infecções nos pacientes com LES foi feita de maneira retrospectiva, pois foram obtidos a partir dos prontuários desde a data do início de atendimento no HCFMRP-USP até o presente. Os prontuários dos pacientes não possuem essas informações completas, sendo que muitas vezes, quando um paciente apresenta uma infecção, procura o pronto-atendimento médico nos postos de saúde. Esses dados não são anotados nos prontuários, salvo quando o paciente relata ao médico, no retorno ao hospital, o que se passou nos meses entre as consultas no Hospital das Clínicas, por isso os dados sobre as ocorrências de infecções podem estar subestimados neste estudo.

Em 166 pacientes analisados, 71 tiveram pelo menos um episódio de infecção desde o diagnóstico do LES (média de diagnóstico de quatorze anos). No total, esses pacientes apresentaram 141 episódios de infecções. Dentre as infecções encontradas, as mais frequentes foram infecção do trato urinário (ITU) (0,38), pneumonia (0,29), sinusite (0,14), celulite (0,10), pielonefrite (0,05) e choque séptico (0,04). A ITU e a pielonefrite são principalmente causadas por bactérias gram-negativas, as pneumonias por bactérias gram-positivas, a celulite e a sinusite podem ser causadas pelos dois tipos de bactérias e o choque séptico é estabelecido quando a infecção atinge à corrente sanguínea, disseminando-se por todo o organismo (Zandman-Goddard, Shoenfeld, 2003).

Vários estudos mostram a incidência de infecções no LES. Gladman et al. (2002) reportaram que 93 pacientes com LES apresentaram 148 episódios de infecção, em sua grande maioria por bactérias. Cervera et al. (1999) analisaram 1000 pacientes em um período de 5 anos e, neste período, 27% deles apresentaram pelo menos uma infecção. Noel et al. (2001) analisaram 87 pacientes em um período de 37 anos, nestes, em 57 episódios de infecção, 47% foram por bactérias.

Em uma segunda etapa, dividimos os pacientes que apresentaram infecção de acordo com a combinação dos genótipos de FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a. As infecções foram mais frequentes em indivíduos que eram heterozigotos HR131 e HNA-1a/-1b. O alelo R131 e o alelo HNA-1b estiveram mais presente nessas combinações. Apesar da possibilidade de subestimar a ocorrência de infecções, a frequência dos alelos R131 e HNA-1b reforçam os dados da literatura de que existe uma associação da homozigose de R131 e a suscetibilidade à doença pneumocócica (Rodriguez et al., 1999, Yee et al., 2000, Yuan et al., 2003). Ainda, neutrófilos de indivíduos homozigotos H131 têm uma capacidade fagocítica aumentada para a *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* opsonizadas por IgG (Bredius et al., 1994, Rodriguez et al., 1999, Fijen et al., 2000). Para o FcγRIIIb, foi visto que neutrófilos de indivíduos saudáveis HNA-1b possuíam capacidade fagocítica diminuída em relação a neutrófilos de indivíduos saudáveis HNA-1a (Salmon et al., 1996), essa característica pode ser um fator adicional à predisposição de infecções no LES.

Para o HNA-4a, as infecções foram mais frequentes em indivíduos homozigotos positivo, mas isso pode ser pelo fato de o alelo negativo ser menos frequente na população em geral. A combinação com a maior incidência de infecções foi HR/HNA-1a/-1b/positivo negativo

No LES, as infecções são as causas mais comuns de morbidade e mortalidade. Elas podem mimetizar a atividade da doença, o que resulta em atraso do diagnóstico e do tratamento (Cervera et al., 1999). A predisposição à infecção pode estar relacionada a defeitos na quimiotaxia, anormalidades na atividade fagocítica de neutrófilos, diminuição no *clearance* de IC e vários polimorfismos genéticos (Iliopoulos, Tsokos, 1996, Cuchacovich, Gedalia, 2009). O grau de envolvimento do polimorfismo para os FcγR nestas anormalidades não é conhecido. Isto justifica a investigação de funções efetoras mediadas pelos FcγR.

Os neutrófilos são células importantes tanto para a defesa contra patógenos quanto como mediadores do dano tecidual na deposição de IC. Dentre os mecanismos envolvidos nas respostas dos neutrófilos, o *burst* oxidativo é de extrema importância, uma vez que resulta na produção de ERO. As ERO, então, causam a destruição dos patógenos e, em processo inflamatório crônico, causam lesão tecidual. A medida das ERO produzidas pelos neutrófilos é relevante para a investigação dos mecanismos que levam ao *burst* oxidativo e de suas consequências fisiopatológicas.

Para estudar a produção de ERO por neutrófilos, sondas luminescentes, como o luminol e a lucigenina, têm sido utilizadas em ensaios de quimioluminescência (Alves et al., 2003). O luminol é uma espécie química capaz de ser oxidada pelas ERO geradas e atua amplificando a QL celular proporcional à produção total de ERO. Devido a suas propriedades físicas, como o tamanho reduzido e sua lipofilicidade, o luminol pode se difundir pela membrana plasmática e permitir a determinação de ERO intra e extracelular (Jancinova et al., 2006). Além disso, a QL dependente de luminol é fortemente induzida pelas reações da mieloperoxidase, tornando a quantidade desta peroxidase um fator limitante (Albrecht et al., 1993, Hasegawa et al., 1997).

A lucigenina, por sua vez, é oxidada somente pelo ânion superóxido, e atua como sonda para a quantificação deste radical e avaliação da atividade da NADPH oxidase. Ao contrário do luminol, a lucigenina não consegue atravessar a membrana celular (Kopprasch et al., 2003, Pavelkova, Kubala, 2004) e possui menor resposta de QL quando comparada com o luminol.

Diante do interesse de estudar a influência dos polimorfismos dos FcγR e CR3 na produção de ERO pelos neutrófilos de pacientes com LES, este estudo estabeleceu ensaios de quimioluminescência dependentes de luminol e lucigenina, estímulos dependentes de FcγR e CR. O forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) foi incluído como estímulo independente dos receptores estudados, já que é um lipídio solúvel que estimula o diacilglicerol (DAG) a ativar a enzima Proteína Quinase C (PKC), uma molécula envolvida na via de transdução de sinais, sem precisar se ligar a um receptor na membrana celular (Thelen et al., 1993). A PKC fosforila diversos componentes celulares, o que ativa a NADPH oxidase, desencadeando assim o *burst* oxidativo por uma via independente de receptor de membrana.

Tanto para luminol quanto lucigenina, para todos os grupos, os estímulos com IC-IgG e IC-IgG/SHI mostraram os mesmos valores, enquanto que para IC-IgG/SHN a resposta foi aumentada. Isto mostra a cooperação FcγR/CR para potencializar a resposta do neutrófilo, uma vez que a inativação das proteínas do complemento pelo calor (IC-IgG/SHI) resultam em valores para o *burst* iguais ao do IC-IgG.

Primeiramente, foi analisado o *burst* oxidativo dos neutrófilos de pacientes e indivíduos saudáveis sem a discriminação dos genótipos FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a. Para a QL dependente de luminol, a resposta dos neutrófilos de pacientes com LES e de indivíduos saudáveis não mostrou diferença significativa quando comparada para o mesmo estímulo. Para a lucigenina, não houve diferenças significativas, embora o perfil

de resposta de pacientes com LES ativo estava aumentado em relação ao grupo com LES inativo e este último estava aumentado em relação ao grupo saudável, para todos os estímulos, exceto com PMA.

Alves e cols.(2003) observaram que a produção de ânion superóxido por neutrófilos de pacientes com LES é modulada pelas manifestações clínicas da doença. No entanto, no presente estudo, os pacientes com LES ativo foram classificados em um único grupo, apenas levando-se em consideração o valor de SLEDAI>3 e, provavelmente, uma estratificação dentro dos grupos com LES, pelos valores de SLEDAI e manifestações clínicas, poderia apontar diferenças.

Outra possível explicação para essa diferença entre os grupos seria que durante a atividade da doença há muito estímulo disponível para a ativação do neutrófilo, contribuindo para que este sofra o processo de *priming*. Assim, quando estimulamos os neutrófilos desses pacientes, sua resposta é aumentada em relação ao grupo com LES inativo e o grupo controle, que não sofreu *priming*. Mesmo quando a doença está controlada, o paciente ainda possui liberação de antígenos próprios em sua circulação em baixa quantidade, causando um estímulo mínimo de seus neutrófilos, e, talvez por isso, a resposta dos neutrófilos desses pacientes também foi maior que a resposta do grupo controle.

O controle da resposta do neutrófilo é fino e modulado para prover uma resposta adequada e os fatores implicados neste papel modulador são conhecidos como agentes primadores. O *priming* acontece quando a resposta funcional do neutrófilo (produção de ERO, quimiotaxia, desgranulação) a um dado estímulo é amplificada pela exposição prévia da célula a um agente primador, que por si só não causaria uma resposta funcional perceptível, exceto quando o agente estiver em alta concentração (Swain et al., 2002).

Estudos mostraram que neutrófilos de pacientes infectados podem se mostrar hiperresponsivos (McCall et al., 1973) e que o tratamento dos neutrófilos *in vitro* com doses subestimulatórias de agentes ativadores podem causar uma resposta intensificada para um estímulo subsequente (Guthrie et al., 1984). Assim, neutrófilos podem encontrar primeiro um estímulo que não o ativaria diretamente, mas poderia levar a célula a um estado primado. Em um encontro subsequente com o estímulo apropriado, um estado completo de ativação seria alcançado.

Foi descrito por Nordenfelt e Tapper (2011) que neutrófilos que sofreram *priming* têm resposta amplificada. Enquanto o neutrófilo quiescente é capaz das mesmas

funções associadas com a ativação, o neutrófilo primado frente ao patógeno altera a expressão de seus receptores de superfície e moléculas de adesão, ativa a polimerização da actina, tem *oburst* oxidativo amplificado e sua desgranulação aumentada. O *priming* não é considerado um estado funcional, mas sim como um estado de contínua diferenciação, dependendo da quantidade e da identidade do agente primador (Swain et al, 2002).

A lucigenina é uma sonda incapaz de atravessar a membrana citoplasmática. Ela é convertida pelo ânion superóxido em uma molécula intermediária instável que emite luz quando volta ao seu estado fundamental (Dodeigne et al., 2000). Portanto, a QL dependente de lucigenina reflete a liberação do ânion superóxido no meio extracelular. Neste estudo, pacientes com LES ativo apresentaram maior QL dependente de lucigenina quando comparado ao LES inativo e ao grupo controle. Este resultado pode estar refletindo o fechamento tardio ou, ainda, o não fechamento do fagossomo dos neutrófilos, o que poderia ocasionar a liberação do ânion superóxido, de ERO ou do conteúdo dos grânulos no meio extracelular, o que contribui para o dano tecidual na patologia do LES.

Em uma próxima etapa, dividimos os indivíduos de acordo com seu polimorfismo genético para os FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a. Quando utilizamos como estímulo o PMA, não houve diferença significativa no *burst* dos neutrófilos com diferentes polimorfismos, ao contrário do que é observado quando utilizamos como estímulo IC-IgG ou IC-IgG/SHN. Isso mostra que as diferenças no *burst* oxidativo observadas entre alguns grupos é influenciada pelos genótipos, pois a NADPH oxidase respondeu igualmente para PMA, independente do polimorfismo.

Para o FCGR2A, utilizando luminol e IC-IgG e IC-IgG/SHN como estímulos, observamos diferenças significativas entre o genótipo HH e RR de indivíduos saudáveis, sendo que o *burst* oxidativo estava aumentado neste último. Podemos observar também que, com IC-IgG/SHN como estímulo, os neutrófilos de pacientes com LES inativo RR também possuíam *burst* oxidativo maior que os indivíduos saudáveis HH, provavelmente indicando que a presença do alelo R131 estaria aumentando a resposta destes neutrófilos. Para a resposta dos neutrófilos, avaliada por lucigenina, não houve diferenças significativas.

Em contrapartida, Nicu e cols. (2007) analisaram a influência do polimorfismo do FCGR2A no *burst* oxidativo de neutrófilos de pacientes com periodontite e não observaram diferenças significativas entre indivíduos homozigotos R131 e H131. Porém, diferente do nosso estudo, somente a liberação de H₂O₂ foi avaliada.

O maior *burst* oxidativo (medido por luminol) de neutrófilos de pacientes com genótipo homozigoto R131 pode ter consequências fisiopatológicas. Se o neutrófilo tentar fagocitar um IC muito grande e não conseguir, irá liberar as ERO no meio para tentar destruí-lo. Este processo conhecido como fagocitose frustrada leva ao dano tecidual e quanto mais ERO estes neutrófilos produzirem, mais danos irão causar ao tecido. Por outro lado, durante uma infecção, a maior produção de ERO pode ser decisiva para a eliminação do patógeno, impedindo o estabelecimento de infecção.

Para o FCGR3B, utilizando luminol, observamos diferenças significativas entre os neutrófilos estimulados tanto com IC-IgG quanto IC-IgG/SHN de indivíduos saudáveis HNA-1a e HNA-1b, sendo que o *burst* oxidativo estava diminuído neste último. A resposta dos neutrófilos de pacientes com LES ativo HNA-1b também estava diminuída em relação aos indivíduos saudáveis HNA-1a. Entre pacientes com LES inativo HNA-1a e LES ativo HNA-1b também houve diferença significativa para o estímulo IC-IgG. Em conjunto, estes dados sugerem que o genótipo HNA-1a confere um *burst* oxidativo aumentado em relação ao HNA-1b. Para a resposta dos neutrófilos avaliada por lucigenina, não houve diferenças significativas, embora, para o genótipo heterozigoto HNA-1a/1b, o *burst* oxidativo estava aumentado em pacientes com LES ativo.

O menor *burst* oxidativo de neutrófilos de indivíduos HNA-1b pode trazer consequências deletérias. Durante uma infecção, por exemplo, a maior liberação de ERO pode ser decisiva para eliminação do patógeno. A redução da produção de ERO, associada à imunossupressão no LES, pode comprometer ainda mais a resposta a agentes infecciosos. Considerando-se a dinâmica do processo inflamatório a redução do *burst* oxidativo poderia ocorrer em função de atenuar os efeitos deletérios mediados pelos FcγR na imunopatogênese da deposição de IC. O custo deste mecanismo de “regulação negativa” seria a pré-disposição às infecções.

Este é o primeiro trabalho mostrando a influência do polimorfismo de FCGR3B no *burst* oxidativo de neutrófilos em pacientes com LES. Salmon e cols. (1990) mostraram que neutrófilos de indivíduos saudáveis HNA-1b possuíam atividade fagocítica diminuída em relação a indivíduos HNA-1a. Provavelmente, o resultado diminuído do *burst* oxidativo para este genótipo encontrado em nosso trabalho possa estar relacionado a um possível comprometimento da fagocitose dos neutrófilos desses indivíduos.

Para o HNA-4a, utilizando luminol, foi observada diferença significativa entre o grupo de indivíduos saudáveis homozigotos positivos e homozigotos negativos, sendo o *burst* oxidativo menor neste último. Para os grupos de LES ativo e inativo homozigoto positivo, a resposta dos neutrófilos foi significativamente maior comparado ao grupo controle homozigoto negativo. Ainda, a heterozigose HNA-4a positivo/negativo em pacientes com LES ativo e inativo conferiu maior resposta dos neutrófilos quando comparado com indivíduos saudáveis. Em conjunto, estes resultados demonstram que a presença do alelo positivo aumenta o *burst* oxidativo de neutrófilos. Do ponto de vista patológico, essa maior resposta dos neutrófilos pode acarretar aumento do dano tecidual. Este é o primeiro estudo que relaciona o polimorfismo de HNA-4a com o *burst* oxidativo de neutrófilos.

Em conjunto, os resultados sugerem que onde há diferenças na QL dependente de luminol, outros sistemas enzimáticos, por exemplo, a mieloperoxidase, e sistemas antioxidantes, bem como enzimas dos grânulos, possam estar envolvidos na modulação da produção de ERO e ter associação com o polimorfismo dos FcγR e CR para a transdução de sinais na célula, os quais culminam com suas repsostas efetoras. Para a lucigenina, a ausência de diferenças nos ensaios de QL confirma que a atividade da NADPH oxidase não está afetada no LES, pois essa sonda monitora somente o ânion superóxido formado partir da ativação da NADPH oxidase, independente do conteúdo dos grânulos enzimáticos.

Não realizamos a combinação do FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a para o ensaio do *burst* oxidativo, pois o número de indivíduos em cada grupo foi muito pequeno, fazendo com que a análise dos dados não fosse possível.

Os resultados de QL sugeriram uma investigação mais detalhada dos receptores FcγRIIa, FcγRIIb, CR1 e CR3, uma vez que estes são os receptores envolvidos na produção de ERO pelos neutrófilos estimulados por IC opsonizados com complemento. Nós analisamos a densidade da expressão desses receptores na membrana dos neutrófilos, que foi expressa pela intensidade de fluorescência/célula e pela porcentagem de neutrófilos positivos, ou seja, neutrófilos expressando o receptor na população de neutrófilos estudada.

Não houve diferença na porcentagem de neutrófilos positivos para a expressão dos receptores estudados entre o grupo de pacientes com LES ativo e inativo e o grupo controle, embora fosse notado que para o CR1, o grupo de indivíduos saudáveis

apresentou uma média de células fluorescentes maior do que os pacientes com LES. Este resultado corrobora com os resultados descritos por Marzocchi-Machado et al. (2002, 2005). A diminuição do número de células expressando os receptores pode resultar no *clearance* de IC diminuído, o que pode ser prejudicial por ter como consequência a deposição de IC e o dano tecidual.

Para a mediana de intensidade de fluorescência/célula não foram observadas diferenças significativas. Embora alguns estudos demonstrem que existam diferenças quanto à expressão desses receptores nos indivíduos LES comparados aos indivíduos saudáveis (Marzocchi-Machado et al., 2002, Hepburn et al, 2004, Gergely et al., 2007,), este resultado sugere que os resultados do *burst* oxidativo de neutrófilos não sofreu interferência de uma expressão aumentada ou reduzida destes receptores. Embora, diferenças não significativas possam ter implicações biológicas.

A combinação dos genótipos do FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a para a expressão dos receptores não mostrou diferenças significativas e por isso não foi incluída.

Neste contexto, a análise da influência das combinações dos genótipos para FcγR com o polimorfismo HNA-4a do CR3 nas funções efectoras dos neutrófilos são relevantes para o entendimento da fisiopatologia de doenças infecciosas e de caráter autoimune, como o LES, e para identificar indivíduos, cujo fenótipo determinado pelo polimorfismo dos FcγR e CR3 possa conferir suscetibilidade ou proteção às infecções.

7. Conclusões

- Este trabalho mostrou que o alelo HNA-4a positivo contribui para a proteção e o alelo negativo suscetibilidade ao LES. Este é o primeiro trabalho a demonstrar que existe essa relação.
- Entre os pacientes com LES, as infecções foram mais frequentes quando os alelos R131 de FCGR2A, HNA-1b de FCGR3B e HNA-4a positivo estavam presentes.
- Para o *burst* oxidativo de neutrófilos utilizando luminol:
 - neutrófilos de indivíduos homozigotos R131 do grupo controle tiveram aumento em sua resposta quando comparado com neutrófilos de indivíduos homozigotos H131 também do grupo controle, tanto para o *burst* oxidativo mediado por FcγR (IC-IgG), quanto por FcγR/CR (IC-IgG/SHN);
 - neutrófilos de indivíduos com o genótipo HNA-1b tiveram o *burst* oxidativo menor do que neutrófilos de indivíduos HNA-1a, ambos do grupo controle;
 - para o HNA-4a, neutrófilos de indivíduos homozigotos negativos do grupo controle tiveram um *burst* oxidativo menor do que indivíduos homozigotos positivos dos grupos controle, LES ativo e LES inativo; sugerindo influência do alelo HNA-4a negativo na modulação negativa do *burst* oxidativo.
- Para o *burst* oxidativo de neutrófilos utilizando lucigenina:
 - os resultados apontam que a produção de ânion superóxido catalisada pela atividade da NADPH oxidase não é influenciada pelos polimorfismos dos FcγR e do CR3 e não está alterado nos neutrófilos de pacientes com LES estudados.
- Os dados mostram que os polimorfismos dos FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a afetam o *burst* oxidativo de neutrófilos, o que pode contribuir para a fisiopatologia do LES.
- Há uma associação entre o alelo HNA-4a negativo, que confere suscetibilidade ao LES, e a redução do *burst* oxidativo, o que pode ter implicações nas anormalidades funcionais dos neutrófilos no LES.

8. Referências bibliográficas

- Albrecht D, Jungi TW, Leuk J. Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes. *Biol.* 1993;54:300-6.
- Alves CM, Marzocchi-Machado CM, Louzada-Junior P, et al. Superoxide anion production by neutrophils is associated with prevalent clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2008;27:701-8.
- Alves CMOS, Marzocchi-Machado CM, Carvalho IF, et al. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fcγ and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. *Talanta.* 2003;60:601-8.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, et al. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:459-89.
- Babior BM. The respiratory burst oxidase. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1988;2(2):201-12.
- Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2002;397:342-4.
- Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:42-7.
- Beller DI, Springer TA, Schreiber RD. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J Exp Med.* 1982;156:1000-9.
- Bertrand G, Duprat E, Lefranc MP, et al. Characterization of human FCGR3B*02 (HNA-1b, NA2) cDNAs and IMGT standardized description of FCGR3B alleles. *Tissue Antigens.* 2004;64:119-31.
- Bodey GP, Buckley M, Sathe Y, et al. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med.* 1966;64:328-40.
- Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 2010;33(5):657-70.
- Boumpas DT, Paliogianni F, Anastassiou ED, et al. Glucocorticosteroid action on the immune system: molecular and cellular aspects. *Clin Exp Rheumatol.* 1991;9:413-23.
- Branscum AJ, Johnson WO, Thurmond MC. Bayesian beta regression: applications to household expenditure data and genetic distance between foot-and-mouth disease viruses. *Australian & New Zealand Journal of Statistics.* 2007;49(3): 287-301.
- Bredius RG, Fijen CA, De Haas M, et al. Role of neutrophil Fc gamma RIIa (CD32) and Fc gamma RIIIb (CD16) polymorphic forms in phagocytosis of human IgG1- and IgG3-opsonized bacteria and erythrocytes. *Immunology.* 1994;83:624-30.

- Brown EJ, Bohnsack JF, Gresham HD. Mechanism of inhibition of immunoglobulin G-mediated phagocytosis by monoclonal antibodies that recognize the Mac-1 antigen. *J Clin Invest.* 1988;81:365–75.
- Brown EE, Edberg JC, Kimberly RP. Fc receptor genes and the systemic lupus erythematosus diathesis. *Autoimmunity.* 2007;40(8):567-81.
- Bruhns P, Iannascoli B, England P, et al. Specificity and affinity of human Fc{gamma} receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood.* 2009;113(16):3716-25.
- Brunkhorst BA, Strohmeier G, Lazzari K, et al. Differential roles of FcγRII and FcγRIII in immune complex stimulation of human neutrophils. *J Biol Chem.* 1992;267:20659-66.
- Bux J. Human neutrophil alloantigens. *Vox Sang.* 2008;94:277–85.
- Bux J, Stein E-L, Bierling P, et al. Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fcγ receptor IIIb. *Blood.* 1997;89:1027-34.
- Bux J, Stein EL, Santoso S, et al. NA gene frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion.* 1995;35:54-7.
- Buyon JP, Abramson SB, Philips MR, et al. Dissociation between increased surface expression of gp165/95 and homotypic neutrophil aggregation. *J Immunol.* 1988;140(9):3156-60.
- Cantor RM, Yuan J, Napier S, et al. Systemic lupus erythematosus genome scan: support for linkage at 1q23, 2q33, 16q12-13, and 17q21-23 and novel evidence at 3p24, 10q23-24, 13q32, and 18q22-23. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3203–10.
- Cardone JD, Bordin JO, Chiba AK, et al. Gene frequencies of the HNA-4a and -5a neutrophil antigens in Brazilian persons and a new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for HNA-5a genotyping. *Transfusion.* 2006;46:1515-20.
- Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 5-year period: A multicenter prospective study of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore).* 1999;78(3):167-75.
- Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, et al. Association of Fcγ receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens.* 2004;63:21-7.
- Clark RA, Kimball HR, Decker JL. Neutrophil chemotaxis in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1974;33:167–72.
- Clague HD, Fung YL, Minchinton RM. Human neutrophil antigen-4a gene frequencies in an Australian population, determined by a new polymerase chain reaction method using sequence-specific primers. *Transfus Med.* 2003;13:149-52.

- CNS, Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, <http://www.datasus.gov.br/conselho/reso196/RES19696.htm>
- Coelho-Barros EA, Angelotti SP, Achcar JA, et al. Métodos de estimação em regressão linear múltipla: aplicação a dados clínicos. *Revista Colombiana de Estadística*. 2008;31:111-29.
- Cuchacovich R, Gedalia A. Pathophysiology and clinical spectrum of infections in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am*. 2009;35:75-93.
- Davies KA. Complement, immune complexes and systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*. 1996;35:15-23.
- Daëron M. Structural bases of FcγR functions. *Int Rev Immunol*. 1997;16:11-27.
- De Carvalho-Lins CE, Pereira-Crott LS, Teixeira JE, et al. Reduced erythrocyte complement receptor type 1 in systemic lupus erythematosus is related to a disease activity index and not to the presence or severity of renal disease. *Lupus*. 2004;13:517-21.
- Diamond MS, Staunton DE, deFougerolles AR, et al. ICAM-1 (CD54): A counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18), *J Cell Biol*. 1990;111:3129-39.
- Dijstelbloem HM, Bijl M, Fijnheer R, et al. Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2793-800.
- Dodeigne C, Thunus L, Lejeune R. Chemiluminescence as diagnostic tool: A review. *Talanta*. 2000;51(3):415-39.
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003; 5:1317-27.
- Fearon DT. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte. *J Exp Med*. 1980;152:20-30.
- Ferrari S, Cribari-Neto F. Beta regression for modelling rates and proportions. *Journal of Applied Statistics*. 2004;31(7):799-815.
- Ferreiros-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, et al. Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. *Genes Immun*. 2007;8:138-46.
- Fernandes MJ, Rollet-Labelle E, Paré G, et al. CD16b associates with high density, detergent-resistant membranes in human neutrophils. *J Biochem*. 2006;393:351-59.
- Fessler BJ. Infectious diseases in systemic lupus erythematosus: risk factors, management and prophylaxis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2002;16:281-91.

- Fijen CA, Bredius RG, Kuijper EJ, et al. The role of Fc gamma receptor polymorphisms and C3 in the immune defence against *Neisseria meningitidis* in complement-deficient individuals. *Clin Exp Immunol*. 2000;120(2):338-45.
- Flesch BK, Bauer F, Neppert J. Rapid typing of the human Fc gamma receptor IIA polymorphism by polymerase chain reaction amplification with allele-specific primers. *Transfusion*. 1998;38:174-6.
- Flesch BK, Doose S, Siebert R, et al. FCGR3 variants and expression of human neutrophil antigen-1a, -1b, and -1c in the populations of northern Germany and Uganda. *Transfusion*. 2002;42(4):469-75.
- Gelmetti AP, Freitas AC, Woronik V, et al. Polymorphism of the Fc gamma RII alpha IgG receptor in patients with lupus nephritis and glomerulopathy. *J Rheumatol*. 2000;33(3):523-30.
- Gergely P Jr, Isaák A, Szekeres Z, et al. Altered expression of Fc gamma and complement receptors on B cells in systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1108:183-92.
- Gessner JE, Heiken H, Tamm A, et al. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol*. 1998;76(6):231-48.
- Ghazizadeh S, Bolen JB, Fleit HB. Tyrosine phosphorylation and association of Syk with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *Biochem J*. 1995;305:669-74.
- Gittinger FS, Bux J. Study of four families concerning the linkage and inheritance of the allele encoding the granulocyte-specific antigen HNA-1c (SH). *J Transfusion*. 2001;41(6):847-8.
- Gladman DD, Hussain F, Ibanez D, et al. The nature and outcome of infection in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2002;11:234-39.
- Gonzalez-Escribano MF, Aguilar F, Sánchez-Román J, et al. Fc gamma RIIA, Fc gamma RIIIA and Fc gamma RIIB polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunogenet*. 2002;29:301-6.
- Green JM, Schreiber AD, Brown EJ. Role for a glycan phosphoinositol anchor in Fc gamma receptor synergy. *J Cell Biol*. 1997;139(5):1209-17.
- Greenberg S, Silverstein SC. *Fundamental Immunology*. 3rd edn., 1993, Raven Press, New York. Phagocytosis. pp. 941-964.
- Groves WF, Davis Jr FC, Sells BH. Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference. *Anal Biochem*. 1968;22:195-210.

- Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, et al. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide: Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med*. 1984;160(6):1656-71.
- Hans KS, Um TH. Frequency of neutrophil-specific antigens among Koreans using the granulocyte indirect immunofluorescence test (GIFT). *Immunohematology*. 1997;13:15-6.
- Harley JB, Alarcón-Riquelme ME, Criswell LA, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet*. 2008;40:204-210.
- Hasegawa H, Suzuki K, Nakaji S, et al. Analysis and assessment of the capacity of neutrophils to produce reactive oxygen species in a 96-well microplate format using lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence. *J Immunol Methods*. 1997;210(1):1-10.
- Hatta Y, Tsuchiya N, Ohashi J, et al. Association of Fc gamma receptor IIIB, but not of Fc gamma receptor IIA and IIIA polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun*. 1999;1(1):53-60.
- Hauck B, Philipp A, Eckstein R, et al. Human neutrophil alloantigen genotype frequencies among blood donors with Turkish and German descent. *Tissue Antigens*. 2011;78:416-20.
- Hebert LA. The clearance of immune complexes from the circulation of man and other primates. *Am J Kidney Dis*. 1991;17:352-61.
- Hepburn AL, Mason JC, Davies KA. Expression of Fc gamma and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2004;43:547-54.
- Hepburn AL, Mason JC, Wang S, et al. Both Fc gamma and complement receptors mediate transfer of immune complexes from erythrocytes to human macrophages under physiological flow conditions in vitro. *Clin Exp Immunol*. 2006;146(1):133-45.
- Hong CH, Lee JS, Lee HS, et al. The association between fcgammaRIIB polymorphisms and systemic lupus erythematosus in Korea. *Lupus*. 2005;14:346-50.
- Huang ZY, Hunter S, Chien P, et al. Interaction of two phagocytic host defense systems: Fc gamma receptors and complement receptor 3. *J Biol Chem*. 2011;286(1):160-8.
- Huizinga TW, van Kemenade F, Koenderman L, et al. The 40-kDa Fc gamma receptor (FcRII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis. *J Immunol*. 1989;142:2365-69.
- Hundt M, Schmidt RE. The glycosylphosphatidylinositol-linked Fc gamma receptor III represents the dominant receptor structure for immune complex activation of neutrophils. *Eur J Immunol*. 1992;22:811-16.

- Iliopoulos AG, Tsokos GC. Immunopathogenesis and spectrum of infections in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 1996;25:318-36.
- Jancinová V, Drábiková K, Nosál R, et al. The combined luminol/isoluminol chemiluminescence method for differentiating between extracellular and intracellular oxidant production by neutrophils. *Redox Rep.* 2006;11(3):110-6.
- Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JP. Role of the Fcgamma receptor IIa polymorphism in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1563–71.
- Kimberly RP, Salmon JE, Edberg JC. Receptors for immunoglobulin G. Molecular diversity and implications for disease. *Arthritis Rheum.* 1995;38:306-14.
- Kinder BW, Freemer MM, King TE Jr, et al. Clinical and genetic risk factors for pneumonia in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007;56:2679-86.
- Kissel K, Hofmann C, Gittinger FS, et al. HNA-1a, HNA-1b, and HNA-1c (NA1, NA2, SH) frequencies in African and American Blacks and in Chinese. *Tissue Antigens.* 2000;56:143–8.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005;77:598–625.
- Koene HR, Kleijer M, Roos D, et al. Fc gamma RIIIB gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct Fc gamma RIIIB genes in NA(1+,2+)SH(+) individuals. *Blood.* 1998;91(2):673-9.
- Kohl J. Self, non-self, and danger: a complementary view. *Adv Exp Med Biol.* 2006;586:71-94.
- Kopprasch S, Pietzsch J, Graessler J. Validation of different chemilumigenic substrates for detecting extracellular generation of reactive oxygen species by phagocytes and endothelial cells. *Luminescence.* 2003;18(5):268-73.
- Krauss JC, Xue W, Mayo-Bond L, et al. Reconstitution of antibody-dependent phagocytosis in fibroblasts expressing Fc gamma receptor IIIB and the complement receptor type 3. *J Immunol.* 1994;153:1769-77.
- Lach-Trifilieff E, Marfurt J, Schwarz S, et al. Complement receptor 1 (CD35) on human reticulocytes: normal expression in systemic lupus erythematosus and HIV-infected patients. *J Immunol.* 1999;162:7549-54.
- Li X, Ptacek TS, Brown EE, et al. Fcgamma receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun.* 2009;10(5):380-9.
- Löfgren R, Serrander L, Forsberg M, et al. CR3, FcgammaRIIA and FcgammaRIIIB induce activation of the respiratory burst in human neutrophils: the role of intracellular Ca^{2+} , phospholipase D and tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1452(1):46-59.

- Lu J, Marnell LL, Marjon KD, et al: Structural recognition and functional activation of FcγR by innate pentraxins. *Nature*. 2008;456:989-92.
- Lucisano YM, Mantovani B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. *J Immunol*. 1984;132:2015-20.
- Manger K, Repp R, Jansen M, et al. FcγR IIa, IIIa, and IIIb polymorphisms in German patients with systemic lupus erythematosus: association with clinical symptoms. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:786-92.
- Maniatis A, Tsakanikas S, Stamatellou M, et al. Intermediate-dose melphalan for refractory myeloma. *Blood*. 1989;74(3):1177.
- Mantovani B. Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1975;115:15-7.
- Marquart HV, Svendsen A, Rasmussen JM, et al. Complement receptor expression and activation of the complement cascade on B-lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol*. 1995;101:60-5.
- Marzocchi-Machado CM, Lucisano-Valim YM. Receptores para Imunoglobulina G (FcγR). *Medicina Ribeirão Preto*. 2005;38:82-95.
- Marzocchi-Machado CM, Alves CMOS, Azzolini AECS, et al. FcγR and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2002;11:240-8.
- Marzocchi-Machado CM, Polizello AC, Azzolini AE, et al. The influence of antibody functional affinity on the effector functions involved in the clearance of circulating immune complexes anti-BSA IgG/BSA. *Immunol Invest*. 1999;28:89-101.
- Mascart-Lemone F, Hauptmann G, Goetz J, et al. Genetic deficiency of C4 presenting with recurrent infections and a SLE-like disease. Genetic and immunologic studies. *Am J Med*. 1983;75:295-304.
- May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 2001;114:1061-77.
- McCall CE, DeChatelet LR, Cooper MR, et al. Human toxic neutrophils: Metabolic characteristics. *J Infect Dis*. 1973;127(1):26-33.
- Medof ME, Iida K, Mold C, et al. Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *J Exp Med*. 1982;156:1739-54.
- Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.

- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(3):173-82.
- Nicu EA, Van der Velden U, Everts V, et al. Hyperreactive PMNs in FcγRIIa 131 H/H genotype periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2007;34:938-45.
- Niederer HA, Clatworthy MR, Willcocks LC, et al. FcγRIIB, FcγRIIIB, and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1183:69-88.
- Nielsen CH, Rasmussen JM, Voss A, et al. Diminished ability of erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus to limit opsonized immune complex deposition on leukocytes and activation of granulocytes. *Arthritis Rheum.* 1998;41:613-22.
- Noel V, Lortholary O, Casassus P, et al. Risk factors and prognostic influence of infection in a single cohort of 87 adults with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:1141-4.
- Norcia AM, Sugano EY, Chiba AK, et al. Human neutrophil alloantigen-1a, -1b, -2, -3a and -4a frequencies in Brazilians. *Tissue Antigens.* 2009;74(5):404-7.
- Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2011;90(2):271-84.
- Paul J. Cell and tissue culture. 4th ed., New York, Edinburg E. & S. Livingstone, 1970.
- Parren PW, Warmerdam PA, Boeijs LC, et al. On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc γRIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J Clin Invest.* 1992;90:1537-46.
- Pavelkova M, Kubala L. Luminol-, isoluminol- and lucigenin-enhanced chemiluminescence of rat blood phagocytes stimulated with different activators. *Luminescence.* 2004;19(1):37-42.
- Phillips R, Lomnitzer R, Wade AA, et al. Defective monocyte function in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1985;34:69-76.
- Pradhan V, Deshpande N, Nadkarni A, et al. Fc γRIIIB polymorphisms: their association with clinical manifestations and autoantibodies in SLE patients from western India. *Int J Rheum Dis.* 2010;13(2):138-43.
- Quinn MT, Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with non-phagocyte oxidases. *J Leukoc Biol.* 2004;76:760-81.
- Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:275-90.
- Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:457-92.

- Rhodes B, Vyse TJ. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology*. 2008;47:1603-11.
- Rodriguez ME, van der Pol WL, Sanders LA, et al. Crucial role of FcγRIIa (CD32) in assessment of functional anti-*Streptococcus pneumoniae* antibody activity in human sera. *J Infect Dis*. 1999;179(2):423-33.
- Ross GD, Yount WJ, Walport MJ, et al. Disease-associated loss of erythrocyte complement receptors (CR1, C3b receptors) in patients with systemic lupus erythematosus and other diseases involving autoantibodies and/or complement activation. *J Immunol*. 1985;135:2005-14.
- Sachs UJ, Chavakis T, Fung L, et al. Human alloantibody anti-Mart interferes with Mac-1-dependent leukocyte adhesion. *Blood*. 2004;104(3):727-34.
- Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, et al. Allelic polymorphisms of human Fc γ receptor IIA and Fc γ receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest*. 1992;89:1274-81.
- Salmon JE, Edberg JC, Kimberly RP. Fc γ receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest*. 1990;85:1287-95.
- Salmon JE, Millard S, Schachter LA, et al. Fc γ RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest*. 1996;97:1348-54.
- Sanders LA, Feldman RG, Voorhorst-Ogink MM, et al. Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect Immun*. 1995;63:73-81.
- Schifferli JA, Ng YC, Peters DK. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N Engl J Med*. 1986;315:488-95.
- Schreiber AD, Parsons J, McDermott P, et al. Effect of corticosteroids on the human monocyte IgG and complement receptors. *J Clin Invest*. 1975;56(5):1189-97.
- Segal AW, Dorling J, Coade S. Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. Biochemical and morphological studies. *J. Cell Biol*. 1980;85:42-59.
- Segal AW, Meshulam T. Production of superoxide by neutrophils: a reappraisal. *FEBS Lett*. 1979;100:27-32.
- Simsek S, van der Schoot CE, Daams M, et al. Molecular characterization of antigenic polymorphisms (Ond(a) and Mart(a)) of the beta 2 family recognized by human leukocyte alloantisera. *Blood*. 1996;88(4):1350-8.
- Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, et al. Association of Fcγ receptor IIb and IIIb polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens*. 2003;61:374-83.

- Solé-Violán J, García-Laorden MI, Marcos-Ramos JA, et al. The Fcγ receptor IIA-H/H131 genotype is associated with bacteremia in pneumococcal community-acquired pneumonia. *Crit Care Med.* 2011;39(6):1388-93.
- Song YW, Han CW, Kang SW, et al. Abnormal distribution of Fc receptor type Iia polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998;41:421-6.
- Spiegelhalter DJ, Myles JP, Jones DR, et al. Bayesian methods in health technology assessment: a review. *Health Technol Assess.* 2000;4(38):1-130.
- Staples PJ, Gerding DN, Decker JL, et al. Incidence of infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1974;17:1-10.
- Steffensen R, Gülen T, Varming K, et al. FcγRIIIB polymorphism: evidence that NA1/NA2 and SH are located in two closely linked loci and that the SH allele is linked to the NA1 allele in the Danish population. *Transfusion.* 1999;39(6):593-8.
- Stoscheck CM, Deutscher MP. *Methods in Enzymology.* Academic Press Inc. New York, 1990.
- Swain SD, Rohn TT, Quinn MT. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4(1):69-83.
- Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:580-92.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25:1271-7.
- Terzian CC, Chiba AK, Santos VC, et al. FCGR3B*03 allele inheritance pattern in Brazilian families and some new variants of gene FCGR3B. *Transfusion* 2012;52(3):629-34.
- Thelen M, Dewald B, Baggiolini M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol Rev.* 1993;73(4):797-821.
- Thomas MJ, Hedrick CC, Smith S, et al. Superoxide generation by the human polymorphonuclear leukocyte in response to latex beads. *J Leukoc Biol.* 1992;51:591-6.
- Timothy RDJR, Petit E, Pierlot C, et al. Role of Fcγ receptors IIA, IIIA, and IIIB in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Rheumatol.* 2003;30(5):926-33.
- Tsokos GC. Overview of cellular immune functions in systemic lupus erythematosus. *Systemic lupus erythematosus.* Academic, San Diego, CA, 1999. pp. 17-54.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:44-84.

- van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG. FcgammaR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens*. 2003;61:189–202.
- Warmerdam PA, van de Winkel JG, Gosselin EJ, et al. Molecular basis for a polymorphism of human Fc gamma receptor II (CD32). *J Exp Med*. 1990;172(1):19-25.
- Willcocks LC, Smith KG, Clatworthy MR. Low-affinity Fcgamma receptors, autoimmunity and infection. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11:e24.
- Willcocks LC, Lyons PA, Clatworthy MR, et al. Copy number of FCGR3B, which is associated with systemic lupus erythematosus, correlates with protein expression and immune complex uptake. *J Exp Med*. 2008;205:1573-82.
- Wilson JG, Ratnoff WD, Schur PH, et al. Decreased expression of the C3b/C4b receptor (CR1) and the C3d receptor (CR2) on B-lymphocytes and of CR1 on neutrophils of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1986;29:739-47.
- Wright SD, Rao PE, van Voorhis WC, et al. Identification of the C3bi receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies, *Proc Natl Acad Sci*. 1983;5699-703.
- Yee AM, Phan HM, Zuniga R, et al. Association between FcgammaRIIa-R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2000;30(1):25-8.
- Yuan FF, Wong M, Pererva N, et al. FcgammaRIIA polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol*. 2003;81(3):192-5.
- Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. SLE and Infections. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2003;25:29-40.
- Zhou M J, Brown EJ. CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol*. 1994;125:1407-16.
- Zhou M, Todd RF 3rd, van de Winkel JG, et al. Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc gamma receptor III on human neutrophils: Possible role of lectin-like interactions. *J Immunol*. 1993;150:3030-41.
- Zonana-Nacach A, Camargo-Coronel A, Yañez P, et al. Infections in outpatients with systemic lupus erythematosus: a prospective study. *Lupus*. 2001;10(7):505-10.
- Zuniga R, Markowitz GS, Arkachaisri T, et al. Identification of IgG subclasses and C-reactive protein in lupus nephritis: the relationship between the composition of immune deposits and Fcgamma receptor type IIA alleles. *Arthritis Rheum*. 2003;48:460-70.

Anexos

ANEXO A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 21 de outubro de 2009

Ofício nº 3501/2009
CEP/SPC

Prezada Professora,

O trabalho intitulado **“ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS FCGAMAR E DO CR3 COM AS INFECÇÕES BACTERIANAS NO LUPUS ERYTEMATOSO SISTÊMICO: DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS E SUA INFLUÊNCIA NAS FUNÇÕES MEDIADAS POR NEUTRÓFILOS”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 297ª Reunião Ordinária realizada em 19/10/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 10569/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
PROFª DRª CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO B**1. Soluções para purificação de neutrófilos****Solução Balanceada de Hanks**

NaCl	8g
KCl	0,4g
CaCl ₂ Anidro	0,139g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1g
Na ₂ HPO ₄	0,048g
KH ₂ HPO ₄	0,06g
Glicose	1,0g
NaHCO ₃	0,35g
Água deionizada qsp	1000mL
Ajustar o pH final para 7,2 a 25°C com NaOH. Filtrar.	

Solução de gelatina 2,5% em cloreto de sódio 0,15M

Gelatina	2,5g
Solução de NaCl 0,15M qsp	100mL
Ferver.	

Cloreto de amônio 0,83%

Cloreto de amônio (NH ₄ Cl) [PM = 53,49; M = 0,16M]	4,28g	8,56g
Água deionizada estéril qsp	500mL	1000mL

Ajustar pH para 7,2 e Filtrar

Solução de Alsever

itrato trissódico 2H ₂ O	5g
loreto de sódio (NaCl)	2g
licose	0,5g
gua deionizada qsp	100mL
Ajustar pH final para 6,1 com ácido cítrico 10%. Filtrar	

Cloreto de Sódio 0,15M (0,9%)

NaCl [PM = 58,44]	8,76g
Água deionizada qsp	1000mL
Autoclavar.	

PBS (Salina Tamponada com Fosfato) pH 7,4 (10X)

NaCl	80,0g
KCl	2,0g
Na ₂ HPO ₄	11,5g
KH ₂ PO ₄	2,0g
Água deionizada estéril qsp	1000mL
Ajustar pH final para 7,4 a 25°C com HCl	

Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 10x concentrado

Tris Base	121,1g (1M)
Ácido Bórico Anidro	55,6g (0,9M)
EDTA.Na ₂ .2H ₂ O	3,7g (10mM)
Água deionizada estéril qsq	1000mL
Ajustar pH final para 8,3.	

2. Solução para contagem de leucócitos**Líquido de Turk**

Violeta Genciana 1%	1mL
Ácido Acético Glacial	1mL
Água deionizada estéril	100mL
qsq	

Azul de Tripán 0,1%

Tripán Blue	1mg
NaCl 0,15M pré-aquecido a 37°C	10mL
Manter sob agitação magnética constante por cerca de 30 minutos e filtrar. Aliquotar e guardar a -20°C	

3. Soluções para quimioluminescência**Luminol**

Luminol	1,77g
DMSO	20 µL
Hanks	4980 µL
Diluir.	

Lucigenina

Lucigenina	5mg
Hanks	1000 µL
Diluir.	

4. Soluções para extração de DNA

Tampão de lise de eritrócitos

Tris-HCl	1,57g
Água deionizada estéril	800mL
Dissolver e acertar pH para 7,5. Reservar.	
Sacarose	102,69g
MgCl ₂	0,048g
Triton X-100	10mL
Dissolver na solução de Tris-HCl, completar o volume para um litro e armazenar em geladeira.	

Tampão de Lise II

NaCl	4,35g
EDTA	8,92g
Água deionizada estéril	1L
Dissolver e acertar pH para 8,0 e armazenar em temperatura ambiente.	

Perclorato de Sódio 5,0M

Perclorato de Sódio	70,2g
Água deionizada estéril	100mL
Dissolver e armazenar a temperatura ambiente.	

Cloreto de Sódio 6,0M saturado

NaCl	34,8g
Água deionizada estéril	100mL

Dissolver e armazenar a temperatura ambiente.

5. Soluções para Gel de agarose**Tampão de amostra para DNA 6X**

40% sacarose	4g
0,25% azul de bromofenol	0,025mL do 1%
Água deionizada estéril	10mL

Alíquotas de 1mL e armazenar em -20°C.
Para aplicar as amostras no gel, adicionar 2µL em 1mL de tampão de amostra.

Gel de agarose 2%

Agarose	2g
Água deionizada estéril	100mL

Ferver em microondas até a agarose dissolver completamente. Colocar na forma da cuba para eletroforese.