Adriana Peixoto Gelmetti

**Polimorfismo do receptor IgG FcγRIIa em
pacientes com nefrite lúpica e glomerulopatias**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Clínica Médica da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Nefrologia

Orientadora: Dr^a. Viktória Woronik

São Paulo

2004

**Ao meu esposo Fábio, que sempre me apoiou
e ajudou em todos os momentos,
e sobretudo pelo seu amor**

**Aos meus pais Mário e Lúdia
que sempre se esforçaram para me proporcionar
modelos de retidão, confiança e estímulo para o estudo**

Agradecimentos

À Dr^a. Viktória Woronik que durante todo o período de minha formação orientou-me com extrema competência e dedicação, contribuindo valiosamente para o meu aprimoramento profissional e pessoal

Ao Dr. Renato Costa Monteiro Filho por sua disposição em transmitir seus conhecimentos e cuja co-orientação foi extremamente importante para a realização deste trabalho

Ao Dr. Antônio Carlos de Freitas, cuja co-orientação foi pautada pela competência, disponibilidade, dedicação e companheirismo

À Dr^a Ana Paula Bazílio, pela amizade e cooperação que sempre me ofereceu, e cujo trabalho de doutorado foi a inspiração para a linha de pesquisa deste trabalho

À amiga Martha Celle pela sua inestimável ajuda, que nunca esquecerei

Ao Dr. Benedito Jorge Pereira, amigo e companheiro, pelas contribuições sempre pertinentes e estímulo constante

Ao Dr. Isac de Castro pela disponibilidade e competente orientação estatística

Aos colegas do Laboratório de Genética do Instituto Butantan, chefiado pela Dr^a. Rita de Cássia Stocco, e aos colegas Olga Brunner e Luís Gustavo Bentim Góes, exemplos de generosidade e solidariedade

Aos colegas do Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Medicina Xavier Bichat em Paris, onde pude aprimorar meus conhecimentos, sobretudo com a ajuda incondicional de Michelle e Ivan

À Dr^a Vilma Trindade Viana, sempre prestativa e pronta para auxiliar no que fosse preciso

Aos colegas do Laboratório de Investigação Médica - LIM 17, que colaboraram na execução deste trabalho

Aos colegas do Laboratório de Osteodistrofia – LIM 16, em especial Dr^a. Vanda Jorgetti, Luciene e Wagner, sempre dispostos a auxiliarem com tudo que se mostrasse necessário

Ao Dr. Jorge Fares, pelo apoio durante todo este período de aprimoramento

Aos colegas do Hospital Brigadeiro que me apoiaram e me estimularam

Às secretárias Eliana, Célia e Denise que direta ou indiretamente colaboraram com a execução deste trabalho

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO	1
Receptores Fcγ	7
Receptor FcγRI	12
Receptor FcγRII	13
Receptor FcγRIII	14
Receptores e genética	15
Receptores e doenças auto-imunes	16
Receptores e LES	17
OBJETIVOS.....	20
CASUÍSTICA E MÉTODOS	22
Análise do polimorfismo do FcγRIIa por PCR genômico.....	26
ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
RESULTADOS.....	32
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

ABREVIATURAS

LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
GP	Glomerulopatia
PCR	Polymerase chain reaction
FAN	Fator anti-nuclear
Anti-dsDNA	Anticorpo anti-double stranded DNA
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
ANF	Antinuclear factor
ARA	American Rheumatism Association
OMS	Organização Mundial de Saúde
Fc	Fragmento cristalizável
IgG	Imunoglobulina G
Fc γ R	Receptor Fc γ R
kDa	Quilodáltons
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
IP3	Trifosfato inositol
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
NIH	National Institute of Health
EDTA	Ácido etilenodiamina tetra-acético
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato

μl	Microlitro
ng	Nanograma
mM	Milimol
μM	Micromol
UI	Unidade Internacional
pmol	Picomol
GP Prolif	Glomerulopatia proliferativa
GP não Prolif	Glomerulopatia não proliferativa
IC	Índice de cronicidade
IA	Índice de atividade
aCL	Anticorpo Anti-cardiolipina
anti-RNP	Anticorpo Anti-ribonucleoproteína

Resumo

Gelmetti, A.P. **Polimorfismo do receptor IgG FcγRIIa em pacientes com nefrite lúpica e glomerulopatias**. São Paulo, 2004. 57p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença auto-imune caracterizada pela deposição de imunocomplexos nos tecidos. O clareamento de imunocomplexos está comprometido no LES, contribuindo para a patogênese da nefrite lúpica. Os receptores Fcγ (FcγR) participam do clareamento dos imunocomplexos contendo IgG, pois se ligam à porção Fc desta molécula. O FcγRIIa é um receptor que tem dois alelos co-dominantemente expressos, o R131 e o H131, os quais diferem na sua eficiência em se ligar a subclasses de IgG. Células que expressam o homozigoto FcγRIIa-H/H131 são as únicas que se ligam eficientemente a imunocomplexos contendo IgG2, enquanto as que expressam FcγRIIa-R/R131 o fazem de forma menos eficaz. Este polimorfismo tem sido descrito como fator de risco para nefrite lúpica, embora ainda haja controvérsias. O propósito do nosso estudo foi o de analisar, em uma população de nefrite lúpica e em outra de glomerulopatias primárias, a associação entre o genótipo FcγRIIa-R/R131 e a gravidade da doença renal na sua instalação (definida pelo momento da biópsia renal) e ao final do seguimento, bem como possíveis relações com aspectos histológicos renais. A genotipagem do receptor FcγRIIa foi realizada em 76 pacientes com nefrite lúpica e 63 com glomerulopatias primárias através da extração do DNA genômico, seguido de reação de polimerização em cadeia (PCR) e *nested* PCR, utilizando-se *primers* específicos. Os pacientes foram avaliados por parâmetros clínicos e laboratoriais. Setenta e um pacientes com nefrite lúpica realizaram biópsia renal, enquanto 5 que já se encontravam em hemodiálise não a realizaram. Pacientes com glomerulonefrite membranoproliferativa, nefropatia da IgA e glomerulonefrite proliferativa mesangial foram agrupados como glomerulopatias proliferativas enquanto os com glomeruloesclerose segmentar e focal, glomerulopatia de lesões mínimas ou glomerulonefrite membranosa foram agrupados como glomerulopatias não proliferativas. O homozigoto FcγRIIa-R/R131 foi mais prevalente no grupo com nefrite lúpica (42,1% de R/R131 e 14,5% de H/H131) em relação ao grupo com glomerulopatias primárias (23,8% de R/R131 e 23,8% de H/H131), dado este estatisticamente significativo ($p < 0.05$). Houve segregação do genótipo FcγRIIa-R/R131 nos pacientes com nefrite lúpica quando comparados aos com glomerulopatias não proliferativas, mas não quando comparados aos com glomerulopatias proliferativas ($p < 0.05$). Não houve diferença na distribuição genotípica do receptor FcγRIIa em relação a classe histológica de nefrite lúpica, tampouco em relação aos que evoluíram ou não para insuficiência renal (Pcr = 1,4mg/dl ao final do seguimento). Um aumento na frequência do genótipo FcγRIIa-R/R131 foi encontrado nos pacientes com nefrite lúpica apresentando níveis mais elevados de FAN (FAN > 1/100) e consumo de complemento C3 ($p < 0,05$), mas não naqueles com presença de anticorpos anti-dsDNA ou anti-fosfolípide ($p > 0,05$). Estes achados sugerem que uma distribuição anormal dos genótipos do receptor FcγRIIa com predomínio do homozigoto R/R131 é um fator importante que pode influenciar

o desenvolvimento de nefrite lúpica e de glomerulopatias proliferativas. O genótipo FcγRIIa-R/R131 também está relacionado com maior atividade lúpica (FAN>1/100 e consumo de C3) em pacientes brasileiros.

Summary

Gelmetti, A.P. **Polymorphism of the FcγRIIa IgG receptor in lupus nephritis and glomerulopathy patients.** São Paulo, 2004. 57p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by tissue deposition of immune complexes. Immune complex clearance is impaired in SLE, contributing to the pathogenesis of lupus nephritis. Fcγ receptors (FcγR) participate in the clearance of the immune complexes containing immunoglobulin G, because they bind the Fc domain of this molecule. The FcγRIIa receptor has two co dominant alleles, R131 and H131. They differ in their efficiency to bind IgG subclasses. Cells expressing the homozygote FcγRIIa-H/H131 are the only ones, which bind efficiently immune complexes containing IgG2, whereas those expressing FcγRIIa-R/R131 do not. This polymorphism has been described as a risk factor for lupus nephritis. However, reports are still controversial. This study aims to establish the role of FcγRIIa polymorphism in the severity and prognosis of lupus nephritis compared to primary glomerulopathies, and whether it is related to histological findings or not. In 76 patients with lupus nephritis and 63 patients with primary glomerulopathies, genotyping of the FcγRIIa receptor was performed with standard PCR, followed by nested PCR using specific primers. The same patients were assessed according to clinical and laboratory patterns. Seventy-one patients with lupus nephritis underwent biopsy, while five did not since they were already under dialysis. Patients diagnosed as membranoproliferative glomerulonephritis, IgA glomerulonephritis and mesangial proliferative glomerulonephritis were grouped as proliferative glomerulopathies, while those with focal segmental glomerulosclerosis, membranous glomerulonephritis and minimal change disease were grouped as nonproliferative glomerulopathies. The homozygous FcγRIIa-R/R131 was more prevalent in lupus nephritis (42,1% being R/R131 and 14,5% H/H131) than in glomerulopathies (23,8% being R/R131 and 23,8% H/H131). These data were statistically significant ($p<0.05$). A segregation of the FcγRIIa-R/R131 genotype was found in patients with lupus nephritis compared to nonproliferative glomerulopathies, but not when compared to proliferative glomerulopathies ($p<0.05$). No relation was found between genotype distribution and histological class or renal insufficiency (end-study serum creatinine = 1.4 mg/dl). The genotype R/R131 was more prevalent in lupus nephritis patients presenting complement 3 (C3) consumption and higher antinuclear factor (ANF) titers, but not in those with anti-double-stranded DNA or antiphospholipid antibodies ($p>0.05$). We concluded that a skewed distribution of the FcγRIIa genotypes with R/R131 predominance may contribute to the development of lupus nephritis and proliferative glomerulopathy. In Brazilian patients, this polymorphism is also related to more intense lupus activity (ANF > 1/100 and C3 consumption).

INTRODUÇÃO

Introdução

Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença caracterizada pelo depósito tissular de complexos antígeno-anticorpo circulantes, levando à liberação de mediadores inflamatórios e influxo de células inflamatórias, e expressando-se clinicamente sob variadas formas, entre elas glomerulonefrite.

O diagnóstico de LES é estabelecido pela presença de critérios clínicos e laboratoriais definidos pela American Rheumatism Association (ARA) modificada em 1982 (1) (Quadro 1). São necessários 4 critérios positivos para o diagnóstico de LES.

Quadro 1 – Critérios para LES revisados pela ARA, 1982

Critérios
Rash malar
Rash discóide
Fotossensibilidade
Úlceras orais
Artrites não deformantes
Serosites (pleurites e pericardites)
Doença renal (proteinúria persistente, hematúria, cilindros)
Acometimento do Sistema Nervoso Central (convulsões ou psicoses)
Acometimento hematológico (anemia, leucopenia, linfopenia, trombocitopenia)
Alterações imunológicas (células LE, anticorpo anti-dsDNA, anticorpo anti-Sm ou VDRL falso positivo)
FAN positivo

anti-dsDNA (anticorpo anti ácido desoxirribonucleico de hélice dupla), anti-Sm (anticorpo anti antígeno *Smith*), VDRL (*Venereal Disease Research Laboratories*), FAN (fator anti-nuclear)

A prevalência do LES na população varia de 14,6 a 50,8 casos por 100.000 habitantes, acometendo principalmente mulheres jovens (2). Há maior incidência na população negra, em pacientes que apresentam certos haplotipos do sistema HLA (antígeno do complexo maior de histocompatibilidade), nos indivíduos da mesma família, e naqueles com deficiência congênita de complemento, sugerindo a participação de fatores genéticos.

A nefrite lúpica pode estar presente em 50 a 75% dos casos, podendo acometer glomérulos, túbulos, vasos e interstício. O diagnóstico é feito através da presença de proteinúria maior que 500 mg em 24 horas ou pela presença de hematúria. A

classificação da nefrite lúpica, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) – modificada em 1995, baseia-se nos achados histológicos de microscopia óptica, microscopia eletrônica e imunofluorescência de fragmentos de biópsia renal (Quadro 2) (3).

Quadro 2 – Classificação da nefrite lúpica de acordo com a OMS, 1995

Classe Histologia	
I	Glomérulo normal à MO, mas com depósitos na IF
II	Alterações mesangiais puras <ul style="list-style-type: none">a) MO normal, depósitos mesangiais à IF ou à MEb) Hiper celularidade mesangial e depósitos à IF ou à ME
III	Glomerulonefrite segmentar e focal <ul style="list-style-type: none">a) Lesões ativas necrosantesb) Lesões ativas e esclerosantesc) Lesões esclerosantes
IV	Glomerulonefrite difusa (mesangial grave, proliferação endocapilar mesangiocapilar e/ou depósitos subendoteliais extensos) <ul style="list-style-type: none">a) Sem lesões segmentaresb) Com lesões ativas necrosantesc) Com lesões ativas e esclerosantesd) Com lesões esclerosantes
V	Glomerulonefrite membranosa <ul style="list-style-type: none">a) Glomerulonefrite membranosa purab) Associada a lesões da classe II (a ou b)
VI	Glomerulonefrite esclerosante avançada

MO (microscopia óptica); IF (imunofluorescência); ME (microscopia eletrônica)

A etiologia do LES ainda é desconhecida. É bem conhecida, no entanto, a estimulação policlonal dos linfócitos B que se tornam hiper-ativos por defeito intrínseco dos mesmos ou por alteração nas funções reguladoras dos linfócitos T (4), ocorrendo uma síntese aumentada de imunoglobulinas, particularmente as IgGs (5).

As imunoglobulinas complexadas a antígenos, conhecidos (nucleossomos) ou não, formarão imunocomplexos. Níveis plasmáticos elevados de imunocomplexos circulantes predisõem à sua deposição nos tecidos, além da formação “in situ” dos mesmos (6). Uma vez depositados em glomérulos, haverá ativação do sistema complemento e conseqüente envolvimento da cascata da coagulação, infiltração de leucócitos, e liberação de citocinas e enzimas proteolíticas, desencadeando resposta inflamatória tecidual e síntese aumentada de matriz extracelular (7).

Anticorpos da classe IgG parecem ser relevantes na patogênese da nefrite lúpica, pois alguns relatos demonstram uma estreita relação entre níveis de IgG anti-dsDNA e índices de atividade histológica nesses pacientes (8). Ainda nesta linha de raciocínio, Bootsma et al. relatam na maioria dos seus pacientes que a recidiva é precedida por um aumento significativo de IgG anti-dsDNA (9). Também é conhecido que a IgG é a imunoglobulina predominante no glomérulo de pacientes com nefrite lúpica e que a severidade da nefrite se correlaciona com a quantidade de IgG glomerular (10).

Com relação às subclasses de IgGs, quatro são conhecidas: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, que diferem entre si estruturalmente e por suas propriedades biológicas, como mostra o Quadro 3 (11).

Quadro 3: Propriedades físico-químicas e biológicas das IgGs e suas subclasses

Características	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Peso Molecular (kDa)	146	146	165	146
Número de resíduos	15	12	62	12
Concentração sérica (mg/ml)	9	3	1	0,5
% IgG total	65	23	8	4
Meia-vida (dias)	21	20	7	21
Fixação de complemento	++	+	+++	-

Dentre as subclasses de IgG, há predomínio de IgG1 e IgG2 séricas em pacientes com atividade lúpica renal, como já demonstrado por alguns autores (12,13). Já com relação ao imune depósito em glomérulos na nefrite lúpica, os achados são menos uniformes, pois enquanto alguns autores mostram predomínio de IgG1 e IgG2 (14), outros relatam um predomínio de IgG2 e/ou IgG3 (15,16). Porém, mesmo havendo discordância, a subclasse de IgG dominante na circulação não é necessariamente a que se encontra mais depositada no rim.

Os imunocomplexos circulantes são removidos através do sistema complemento e de receptores que se ligam à porção Fc de imunoglobulina G, os FcγR. A eficiência com a qual o sistema mononuclear fagocitário remove tais imunocomplexos depende da capacidade funcional destes receptores. A capacidade para ligar-se ao FcγR e ativar complemento varia entre as subclasses de IgG.

O clareamento de imunocomplexos circulantes em pacientes com LES está comprometido, como demonstrado por Frank et al. (17), participando na sua deposição e subsequente inflamação de órgãos e tecidos. Um dos mecanismos

envolvidos na disfunção da remoção destes imunocomplexos se dá pela menor expressão dos receptores Fc γ encontrada no LES (18). Outro mecanismo proposto seria uma capacidade de fagocitose diminuída, relacionada a variantes alélicas dos receptores Fc γ , os chamados polimorfismos (19).

Receptores Fc γ

Os receptores Fc γ são glicoproteínas ligadas à membrana celular, específicos para os isotipos IgG de imunoglobulinas e expressos em células da linhagem hematopoiética, principalmente. Estes receptores são codificados por genes pertencentes à superfamília das Imunoglobulinas que estão localizados no braço longo do cromossomo 1, na banda q23-24 (20).

São conhecidas três classes de receptores Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16), que diferem entre si quanto ao seu peso molecular, distribuição nas células, capacidade de ligação a diferentes subclasses de IgG, e capacidade de desencadear sinais intracelulares. Os Fc γ Rs possuem dois (no caso dos receptores Fc γ RII e Fc γ RIII) ou três (no caso do Fc γ RI) domínios extracelulares, uma região transmembrana, e um prolongamento citoplasmático de tamanho variável (Fig.1). Cada classe contém vários membros codificados por genes distintos, havendo também variantes alélicas que desempenham diferentes capacidades quanto à sua função, sendo denominadas polimorfismos.

Fig. 1 – Estrutura molecular dos receptores Fcγ

Algumas características gerais e distribuição dessas classes de receptores encontram-se nos quadros 4, 5 e 6 (21,22).

Quadro 4: Características gerais dos Receptores FcγRs

Receptor	Peso molecular (kDa)	CD	Afinidade IgG monomérica	Ligação a subclasses IgG
FcγRI	72	CD64	Alta	3>1>4>>>2
FcγRII	40	CD32	Baixa	3>1=2>>>4
FcγRIII	50-80	CD16	Média e Baixa	1=3>>>2=4

Quadro 5 : Isoformas dos receptores FcγRs

<u>Receptor</u>	<u>Genes</u>	<u>Isoformas</u>
FcγRI	A, B, C	a1, a2, b1, b2, c
FcγRII	A, B, C	a1, a2, b1, b2, b3, c
FcγRIII	A, B	a, b

Quadro 6: Distribuição celular dos receptores FcγRs

<u>Receptor</u>	<u>Sangue periférico</u>	<u>Tecidos</u>
FcγRI	Monócitos, neutrófilos (via IFN-γ)	Macrófagos
FcγRII	Monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos B, plaquetas	Macrófagos, células de Langerhans, células endoteliais, células dendríticas
FcγRIII	Sub-populações de células T e monócitos, eosinófilos, células <i>Natural Killer</i> , neutrófilos (FcRIIIb)	Macrófagos, células mesangiais, trofoblastos (placenta)

IFN-γ - Interferon γ

A IgG na forma de imunocomplexos liga-se então ao receptor FcγR, dando início a um processo biológico que se manifesta por uma resposta metabólica que pode ser de ativação ou de inibição da célula. Desta forma, duas classes de receptores são categorizadas – os receptores de ativação, caracterizados pela presença da porção ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) na região citoplasmática do receptor e os receptores de inibição, caracterizados pela presença da porção ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*). As duas categorias de receptores geralmente estão co-expressas na mesma célula e irão modular a resposta celular.

A ligação do receptor ao imunocomplexo no domínio extracelular desencadeia a fosforilação da porção ITAM por membros da família src quinase e o conseqüente recrutamento de moléculas sinalizadoras contendo SH2, que se ligam à porção ITAM fosforilada. Dependendo do tipo de célula ativada pelo receptor $Fc\gamma R$, diferentes quinases estão envolvidas nestas vias sinalizadoras. O evento final é a produção de IP3 (trifosfato de inositol) e mobilização sustentada de cálcio intracelular dos estoques intracelulares, além de influxo de cálcio do extra para o intracelular. Como efeito final, a ativação dos receptores $Fc\gamma Rs$ poderá resultar em degranulação, fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), transcrição de genes para citocinas ou influxo de mediadores inflamatórios. Por outro lado, quando um receptor de inibição interage com o imunocomplexo, a resposta celular será de inibição. Assim, a fosforilação da porção ITIM impedirá a produção de IP3, com conseqüente bloqueio do influxo de cálcio intracelular. Os eventos cálcio-dependentes citados acima, como degranulação, fagocitose, ADCC, e influxo de mediadores inflamatórios e citocinas, serão então bloqueados. Os receptores $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIa$, $Fc\gamma RIIIa$ e $Fc\gamma RIIIb$ são receptores de ativação, enquanto o $Fc\gamma RIIb$ é um receptor de inibição (23). A representação esquemática da ativação e inibição celular pós-receptor encontra-se nas figuras 2, 3 e 4.

Fig. 2 - Representação esquemática de receptores de ativação e inibição

Fig. 3 – Ativação celular desencadeada por fosforilação do FcγR-ITAM

Fig. 4 – Ativação celular inibida por FcγR-ITIM

Receptor FcγRI

O receptor FcγRI, que está presente em monócitos, macrófagos e pode ser induzido em neutrófilos via IFN- γ , é o único que tem habilidade de ligar-se à IgG monomérica. Ele possui alta afinidade para IgG1 e IgG3 e está envolvido na fagocitose em processos imunes, na geração de radicais superóxido, na ADCC e no desencadeamento da liberação de citocinas, tais como TNF- α (Fator de necrose tumoral α) e IL-6 (Interleucina 6). O FcγRI não possui polimorfismo estrutural ou funcional conhecido, com exceção de alguns membros de uma família belga, onde quatro indivíduos não apresentavam FcγRI em monócitos (21).

Receptor FcγRII

O receptor FcγRII é o mais amplamente expresso de todos os FcγR e está presente em fagócitos mononucleares, neutrófilos e plaquetas, além de células de Langerhans e células endoteliais. Possui baixa afinidade para IgG monomérica, ligando-se apenas a imunocomplexos. O FcγRII é codificado por três diferentes genes (FcγRIIA, FcγRIIB e FcγRIIC) gerando recombinações alternativas que resultam em seis isoformas diferentes (FcγRIIa1, a2; FcγRIIb1, b2, b3; e FcγRIIc). Estes produtos são semelhantes entre si, diferindo apenas em sua região citoplasmática ou em seu peptídeo sinalizador, o que determina a função efetora dos mesmos. Existem evidências que o FcγRII é capaz de mediar geração de superóxido, morte de células tumorais, lise de eritrócitos e fagocitose de complexos imunes grandes, além de desencadear a liberação de citocinas. Proteínas desta classe de receptor têm uma região extracelular similar com aproximadamente 180 aminoácidos (que contém dois domínios *Ig-like*), um domínio transmembrana e um domínio intracitoplasmático que varia no comprimento de 44 a 76 aminoácidos (21).

É descrito um polimorfismo do receptor FcγRIIa1 com expressão clínica importante, em que ocorre uma substituição nucleotídica de adenosina (A) por guanidina (G) na posição 494 no exon 4. Essa alteração ocorre no gene que codifica a síntese do segundo domínio extracelular da proteína, gerando uma mudança de aminoácido. Quando houver a base adenosina, o aminoácido gerado será a histidina (H) na posição 131, conferindo uma ligação mais eficiente do FcγRIIa a IgG2 em contraponto à ligação pouco eficiente deste receptor à imunoglobulina quando o aminoácido presente é a arginina (R), gerado pela presença da base guanidina.

O FcγRIIa-H/H131 é o único receptor de IgG humana que se liga a IgG2 com alta afinidade, enquanto o FcγRIIa-R/R131 o faz com baixa eficiência, e o heterozigoto FcγRIIa-R/H131 tem afinidade intermediária. Há um segundo polimorfismo nesse receptor localizado no primeiro domínio na posição 27, em que ocorre uma substituição de glutamina por triptofano, porém trata-se de um polimorfismo não funcional (24), isto é, não há prejuízo na sua função (Fig. 5).

Fig. 5 – Polimorfismo do receptor FcγRIIa

Receptor FcγRIII

O receptor FcγRIII é codificado por 2 genes, o FcγRIIIA e o FcγRIIIB, que são expressos em diferentes tipos de células. Esta classe de receptor possui duas isoformas, o FcγRIIIa e o FcγRIIIb. O FcγRIIIa é um receptor transmembrana

expresso em células NK (*Natural Killer*), monócitos e macrófagos, enquanto o Fc γ RIIIb é expresso exclusivamente em neutrófilos como um receptor ligado a fosfoinositol (GPI) (24). O Fc γ RIIIa é capaz de se ligar a IgG monomérica e é considerado um receptor de média afinidade; já o Fc γ RIIIb não se liga a IgG monomérica, sendo um receptor de baixa afinidade. Ambos possuem alta especificidade para imunocomplexos contendo IgG1 e IgG3.

Alguns polimorfismos do Fc γ RIII foram descritos. O Fc γ RIIIa apresenta duas variantes alélicas, F176 e V176 (também conhecido como F/V158), que diferem por um aminoácido na posição 176 no domínio extracelular (fenilalanina e valina, respectivamente). Comparados aos homozigotos F/F176, indivíduos V/V176 têm maior capacidade de ligação a IgG1 e IgG3. Um segundo polimorfismo do receptor Fc γ RIIIa ocorre, havendo uma substituição de leucina (L) por arginina (R) ou histidina (H), influenciando a capacidade de ligação à IgG humana. O Fc γ RIIIb também possui duas formas alélicas, o NA1 e o NA2, que diferem por quatro aminoácidos. Os neutrófilos dos indivíduos homozigotos para NA2 têm menor capacidade fagocitária comparados aos NA1 (24).

Receptores e genética

Em estudos genéticos, observou-se variação na frequência do polimorfismo dos receptores e particularmente do receptor Fc γ RIIIa nos diferentes grupos étnicos. Assim, Kuwano et al. estudaram populações indígenas brasileiras do sul da Amazônia (kayapós) e mostraram maior frequência do genótipo Fc γ RIIIa-R/R131 em

comparação a doadores de sangue de um grande centro urbano como São Paulo (25). Já Osborne et al. verificaram uma maior frequência do genótipo FcγRIIa-H/H131 em indivíduos japoneses e chineses (respectivamente 61 e 50%), quando comparados aos voluntários brancos (23%) e indianos (13%) (26).

Receptores e doenças auto-imunes

Por conferirem variabilidade na capacidade de clareamento dos imunocomplexos, a presença de polimorfismos tem sido avaliada em pacientes com doenças auto-imunes, buscando-se um possível genótipo protetor ou não para a instalação da doença bem como para o seu prognóstico. Seguindo essa linha, estudo em pacientes com vasculite ANCA (*antineutrophil cytoplasmic antibody*) relacionada mostrou maior frequência do alelo FcγRIIa-R131 naqueles com creatinina sérica elevada e que desenvolveram insuficiência renal (27). Djistelbloem et al., em pacientes portadores de Doença de Wegener, relacionaram o genótipo FcγRIIa-R/R131 à maior recidiva da doença em 5 anos (28). Com isso, em algumas situações clínicas, há indícios de um genótipo “não protetor” para instalação de doença mais grave ou mesmo de pior prognóstico.

Receptores e LES

Com relação ao polimorfismo dos receptores Fc γ RIIa em pacientes lúpicos, os resultados são ainda controversos. Embora a maioria dos autores tenha encontrado relação do alelo Fc γ RIIa-R131 com essa patologia (29,30,31), outros não confirmaram esses resultados (32,33,34). Isto se deve em parte ao papel da raça na expressão destes receptores, dificultando as comparações. No entanto, parece haver relação entre susceptibilidade para o LES e o polimorfismo do receptor Fc γ RIIa. Assim, estudo de meta-análise mostrou a associação do homozigoto Fc γ RIIa-R/R131 com risco 1,3 vezes maior para o desenvolvimento de LES, ao mesmo tempo em que não conseguiu definir uma possível associação com nefrite lúpica (35).

Alguns trabalhos, no entanto, associam o genótipo do receptor Fc γ RIIa com a gravidade da doença lúpica. Manger et al. (36), estudando população branca européia, notaram maior frequência do genótipo Fc γ RIIa-R/R131 nos pacientes lúpicos com proteinúria ou anemia hemolítica e também naqueles com maior frequência de positividade de marcadores sorológicos como anti-RNP nuclear (anticorpo anti-ribonucleoproteína) e baixos C3 e C4, sugerindo que o polimorfismo do receptor Fc γ RIIa constitui um fator adicional que influi em algumas manifestações clínicas da doença, porém não representa um risco genético à ocorrência do LES. O mesmo autor confirmou posteriormente esses dados estudando os receptores Fc γ RIIa, IIIa, e IIIb na população lúpica alemã e concluiu que os três receptores citados influenciam manifestações clínicas e o curso da doença, mas não constituem risco genético para a ocorrência do LES, acentuando-se esta correlação

quando o genótipo duplo negativo ou triplo negativo está presente. Dentre as manifestações clínicas citadas, encontram-se maior frequência de nefrite (63% *versus* 33%), proteinúria (58% *versus* 11%), anemia (84% *versus* 55%) e a presença de anticorpo anti-cardiolipina (63% *versus* 22%), além de incidência desses sintomas clínicos numa faixa etária mais precoce (37).

Outros autores, agora estudando nefrite lúpica em população branca européia, mostraram uma associação do homozigoto FcγRIIa-R/R131 quando comparado a controles normais, sugerindo seu envolvimento na patogênese da lesão (38). Ainda em populações brancas, especificamente espanhola, Zuñiga et al. (29) mostraram uma diminuição significativa de FcγRIIa-H/H131 e FcγRIIIa-V/V176 em nefrite lúpica. Outro trabalho demonstrou aumento significativo da frequência do alelo R131 somente no subgrupo onde foi detectado anticorpo anti-C1q e no subgrupo com nefrite, não sendo demonstrado aumento no grupo de lúpicos como um todo (39). Esse último trabalho discute a possibilidade de o alelo R131 estar associado a um subgrupo de nefríticos num universo de lúpicos, associando-se a esse dado o fato de anticorpos anti-C1q serem predominantemente da subclasse IgG2.

Estudos em populações não brancas como orientais chineses e malaios e posteriormente em japoneses relatam mais constantemente ausência de associação do polimorfismo do receptor FcγRIIa com nefrite lúpica e/ou parâmetros clínicos de LES (33,30). No entanto, foi descrito em pacientes lúpicos coreanos que o alelo FcγRIIa-R131 era fator preditivo importante de nefrite lúpica comparado a pacientes lúpicos sem nefrite (40). Já estudo em populações de afro-americanos, que se caracterizam por apresentarem LES e nefrite lúpica mais graves, mostra uma associação do genótipo FcγRIIa-R/R131 com LES (41).

Por outro lado, Zuñiga et al. (42), estudando a relação entre os genótipos e a composição dos imuno depósitos renais, mostraram que o genótipo FcγRIIa-R/R131 pode contribuir para uma deficiente remoção de imunocomplexos circulantes e desencadeamento de atividade fagocitária com liberação de mediadores inflamatórios glomerulares sem, no entanto, mostrar associação entre esses genótipos e as formas histológicas de nefrite lúpica proliferativas e não proliferativas.

Em nosso meio, onde a população é altamente miscigenada, Bazílio et al. demonstraram uma relação significativa entre a frequência do homozigoto FcγRIIa-R/R131 e a presença de nefrite lúpica quando comparada a controles normais (43), e uma relação de significância estatística limítrofe entre tal genótipo e LES sem nefrite. Neste mesmo estudo os autores encontraram sugestão de associação, porém estatisticamente não significativa, do genótipo FcγRIIa-R/R131 com maior gravidade e número de surtos de nefrite lúpica.

Com relação ao receptor FcγRIIIa, Wu et al. observaram forte associação entre o alelo FcγRIIIa-F176 e LES, especialmente nos pacientes com nefrite (44). Já um estudo de meta-análise concluiu que o polimorfismo do mesmo teria impacto significativo no desenvolvimento de nefrite lúpica, contribuindo com risco 1,2 vezes maior de desenvolvimento de doença renal em pacientes lúpicos, mas não na susceptibilidade ao LES sem nefrite (45).

Outros polimorfismos (FcγRIIb-NA1 e NA2) e o recentemente descrito FcγRIIb-I/T232 precisam ser mais estudados. Quanto a este último, Kyogoku et al. demonstraram associação do FcγRIIb-T/T232 e FcγRIIIa-176F/F com susceptibilidade ao LES (46).

OBJETIVOS

Objetivos

O propósito do nosso estudo foi o de analisar, em uma população de nefrite lúpica e de glomerulopatias primárias, a associação entre o genótipo $Fc\gamma RIIa-R/R131$ e a gravidade da doença renal na sua instalação (definida pelo momento da biópsia renal) e ao final do seguimento, bem como possíveis relações com aspectos histológicos renais.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Casuística e Métodos

Foram estudados setenta e seis pacientes lúpicos, definidos pelos critérios revisados do Colégio Americano de Reumatologia de 1982 (1), em seguimento regular no Ambulatório da Unidade de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP) ou em Centros de Hemodiálise na cidade de São Paulo.

Os pacientes lúpicos foram divididos em três grupos étnicos pré-definidos: caucasianos brasileiros ($n = 62$), afro-sul americanos ($n = 12$) e orientais ($n = 2$). Setenta e um pacientes apresentavam diagnóstico histopatológico de nefrite lúpica segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (3), avaliados pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas como parte da investigação clínica de rotina, enquanto cinco que já se encontravam em tratamento dialítico no início do trabalho não realizaram biópsia renal.

A distribuição dos pacientes quanto às classes histopatológicas de nefrite lúpica foi a seguinte: 42 (55,3%) com glomerulonefrite proliferativa difusa (classe IV), 28 (36,8%) com glomerulonefrite membranosa (classe V), 1 (1,3%) com glomerulonefrite crônica (classe VI) e 5 (6,6%) pacientes sem diagnóstico histológico.

Os pacientes em seguimento na Unidade de Nefrologia do Hospital das Clínicas foram avaliados através de parâmetros clínico-laboratoriais com retornos ambulatoriais regulares definidos pelo médico que os assistia, e tratados com imunossupressão convencional seguindo critérios clínico-laboratoriais de avaliação de atividade da doença. Os esquemas terapêuticos mais comumente utilizados foram administração oral ou endovenosa de corticóide e administração endovenosa de ciclofosfamida obedecendo a critérios usados na Unidade de Nefrologia do Hospital das Clínicas, adaptados do tratamento preconizado por Steinberg et al. (47), segundo protocolo do NIH (*National Institute of Health- USA*).

Avaliações laboratoriais com dosagens séricas de creatinina, complemento, FAN, anti-dsDNA, hemograma, proteínas totais e frações, anticorpo anti-fosfolípide, anticorpo anti-cardiolipina, além de proteinúria e Urina I foram realizadas periodicamente. Foram excluídos pacientes diabéticos, e os portadores de sorologia positiva para Hepatite B, C ou HIV.

Os dados clínicos e laboratoriais foram resgatados do prontuário dos pacientes, sendo considerados dados iniciais aqueles próximos ao momento da biópsia renal e dados finais os da data do último seguimento até junho de 2003. O tempo de seguimento dos pacientes variou de seis meses a dez anos. A função renal foi avaliada pela dosagem sérica de creatinina, sendo definidos os pacientes com insuficiência renal aqueles com creatinina acima de 1,4mg/dl. Não foi possível localizar alguns dados laboratoriais iniciais daqueles pacientes já em tratamento dialítico em unidades fora do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Como grupo controle foram incluídos sessenta e três pacientes com glomerulopatias primárias, também em seguimento no Ambulatório da Unidade de

Nefrologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. A distribuição destes pacientes quanto ao diagnóstico histopatológico foi: 22 (34,9%) com glomerulonefrite membranosa, 17 (27%) com glomeruloesclerose segmentar e focal, 10 (15,9%) com nefropatia da IgA, 6 (9,5%) com glomerulonefrite membranoproliferativa, 5 (7,9%) com glomerulopatia de lesões mínimas e 3 (4,8%) com glomerulonefrite proliferativa mesangial. Para efeito de comparações agrupamos as glomerulopatias em proliferativas (glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite mesangial e a nefropatia da IgA) e não proliferativas (glomeruloesclerose segmentar e focal, glomerulonefrite membranosa e glomerulopatia de lesões mínimas). A exemplo do grupo de portadores de nefrite lúpica, também nos glomerulopatas foram excluídos os pacientes portadores de sorologia positiva para vírus B, C ou HIV, assim como pacientes diabéticos. Os dados clínico-laboratoriais e de biópsia renal foram coletados de seus prontuários como descrito para o grupo com nefrite lúpica.

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP e os pacientes deram seu consentimento mediante informações prévias.

As características dos grupos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Características clínico-laboratoriais

	Nefrite Lúpica	Glomerulopatias
Idade (anos)	27,92 ± 9,64	36,76 ± 13,64*
Sexo	68F : 8M	35F : 28M*
Creatinina inicial (mg/dl)	2,10 ± 2,02	1,27 ± 0,79*
Creatinina final (mg/dl)	2,45 ± 2,57	1,80 ± 1,97
Proteinúria inicial (g/24 h)	5,77 ± 6,80	5,11 ± 5,25
Proteinúria final (g/24 h)	1,33 ± 1,33	2,24 ± 2,62*
Tempo de seguimento (meses)	34,37 ± 31,36	54,13 ± 34,46*
Teste t	* p<0,05	Média ± desvio padrão

Análise do polimorfismo do FcγRIIa por PCR genômico

Amostras de sangue total periférico (3 ml) foram colhidas em seringas com EDTA e o DNA genômico foi extraído através do GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (*Amersham Pharmacia Biotech*). Um fragmento de 1 kilobase do gene FcγRIIa, contendo o exon 4 e partes do exon 5 separados por um intron, foi amplificada através de PCR, por meio de *primers* específicos: P63 5'(Fw) CAAGCCTCTGGTCAAGGTC-3' e RII anti-sense 5'(Rev) CAATGACCACAGCCACAATG-3', ambos já descritos por Song et al.(40). O exon 4 codifica o domínio extracelular do FcγRIIa, que contém o polimorfismo funcional resultante da substituição de uma base (A por G) no nucleotídeo da posição 494. Essa primeira reação foi realizada com a adição de aproximadamente 100ng de DNA genômico em um volume de reação de 25μl, contendo 2,5μl de tampão de PCR (10x), 0,75μl de MgCl₂ (50mM), 0,5μl de mistura de nucleotídeos (dNTP) (100μM), 0,5μl de cada primer (P63 e RII) (10pmol/μl) e 0,25μl de *Taq polymerase* (Invitrogen®) (5UI/μl). A reação de PCR foi realizada num termociclador Biometra TPersonal 48 com as seguintes condições: 94°C por 3 min; 29 ciclos de 94°C por 3 minutos, 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 min, 72°C por 40 segundos e finalmente 72°C por 5 minutos.

O produto obtido dessa PCR inicial foi submetido à *nested* PCR, com a utilização dos seguintes *primers*: 494A 5'(Fw) AAATCCCAGAAATTCTCCCA-3', 494G 5'(Fw) AAATCCCAGAAATTCTCCCG-3' e P52 anti-sense 5'(Rev) GAAGAGCTGCCCCATGCTG-3'. Os dois primeiros *primers* conferem a especificidade necessária para a determinação do polimorfismo, uma vez que

diferem entre si por uma base (A para o alelo H131 e G para o alelo R131). Essa segunda reação continha 1µl do produto obtido na primeira reação de PCR, 2,5µl de tampão de PCR (10x), 0,7µl de MgCl₂ (50mM), 0,5µl de mistura de nucleotídeos (dNTP) (100µM), 0,5µl de cada primer (P52 e 494A na PCR-2 e P52 e 494G na PCR-3) (10pmol/µl), além de 0,25µl de *Taq polymerase* (Invitrogen®) (5UI/µl). O volume total de reação foi 25µl. As condições para a *nested* PCR foram: 94°C por 3 minutos; 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 1 minuto, 72°C por 40 segundos e ao fim, 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados tanto da PCR quanto da *nested* PCR foram analisados por eletroforese em gel contendo 1,2% agarose e brometo de etídio e fotodocumentados no aparelho Biometra com o software Biodocanalyse.

Para ajustarmos as reações foram utilizados plasmídeos clonados, gentilmente fornecidos pelo Dr. Jan G. J. van de Winkel do Departamento de Imunologia da University Medical Center Utrecht, na Holanda.

Representação esquemática da amplificação do polimorfismo seguida dos plasmídeos amplificados por PCR e *nested* PCR encontram-se na Figura 6. Exemplos de produtos de DNA amplificados a partir de pacientes encontram-se na Figura 7.

Fig. 6 – (A) Representação esquemática da amplificação por PCR e *nested* PCR do polimorfismo do receptor FcγRIIa. (B) Plasmídeos amplificados por PCR, seguido de *nested* PCR em gel de agarose a 1,2% para ilustrar o polimorfismo. MM – Marcador molecular, HH – homozigoto para H131, HR – heterozigoto e RR – homozigoto para R131.

Fig. 7. Análise do produto de DNA amplificado de 6 pacientes com nefrite lúpica através da técnica de PCR e *nested* PCR utilizando-se *primers* específicos para FcγRIIa-H131 (494A) ou FcγRIIa-R131 (494G) em eletroforese em gel de agarose demonstrando as possíveis combinações (H/R131, H/H131, R/R131, H/R131, H/H131, R/R131, respectivamente)

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise estatística

Os dados categóricos foram descritos em frequência absoluta (n) e frequência relativa (%). Nas matrizes em que o desfecho era genotípico, utilizamos o teste qui quadrado (χ^2) de tendência. Quando as matrizes eram quadráticas (2x2), utilizamos o χ^2 com a correção de Yates.

As variáveis contínuas foram expressas na forma de média e desvio padrão da amostra. Quando comparadas duas amostras independentes, foi utilizado o teste t não pareado e quando comparados mais de dois grupos, utilizou-se ANOVA para medidas não repetidas com pós-teste de student Newman-Keuls. Quando comparados os pacientes na situação inicial *versus* final (estudo longitudinal) utilizamos o teste t de student pareado.

Foi considerado para todo o estudo risco $\alpha \leq 5\%$ ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Resultados

A distribuição do polimorfismo do receptor FcγRIIa foi analisada em 76 pacientes com nefrite lúpica e comparada com os 63 pacientes glomerulopatas. Foi observada uma associação tanto do genótipo FcγRIIa-R/R131 quanto do alelo R131 com nefrite lúpica em relação ao grupo de glomerulopatias ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Por outro lado, quando desdobramos a população das glomerulopatias em proliferativas e não proliferativas e comparamos a distribuição genotípica do receptor com a dos pacientes com nefrite lúpica, verificamos uma frequência maior do receptor FcγRIIa-R/R131 entre nefrite lúpica e glomerulopatias não proliferativas apenas (42,1% R/R131 e 14,5% H/H131 *versus* 20,5% R/R131 e 22,7% H/H131, respectivamente) não havendo diferença entre nefrite lúpica e glomerulopatias proliferativas (42,1% R/R131 e 14,5% H/H131 *versus* 31,6%, R/R131 e 26,3% H/H131, respectivamente) (Tabela 2). Encontramos esse mesmo comportamento na distribuição do alelo R131 (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição dos genótipos FcγRIIa e alelos em pacientes com nefrite lúpica (NL), glomerulopatias (GPs), glomerulopatias proliferativas (GPs prolifs) e glomerulopatias não proliferativas (GPs não prolifs)

	Genótipo					Alelo		
	<i>n</i>	R/R	R/H	H/H	<i>p'</i>	R131	H131	<i>p</i> ²
GPs	63	15 (23,8)	33 (52,4)	15 (23,8)	<0.05	0.50	0.50	<0.05
GPs prolifs	19	6 (31,6)	8 (42,1)	5 (26,3)	0,22	0,53	0,47	0,27
GPs não prolifs	44	9 (20,5)	25 (56,8)	10 (22,7)	<0.05	0,49	0,51	<0.05
Nefrite lúpica	76	32 (42,1)	33 (43,4)	11 (14,5)		0.64	0.36	

¹ χ^2 de tendência (vs nefrite lúpica)

² χ^2 com correção de Yates (vs nefrite lúpica)

Com relação à histologia, a análise da distribuição do genótipo do receptor FcγRIIa em relação às classes de nefrite lúpica IV e V não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as duas classes (42,9% R/R131 e 19% H/H131 vs 39,3% R/R131 e 3,6% H/H131, respectivamente) (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição dos genótipos do receptor FcγRIIa e classes histológicas de NL

	Genótipo				<i>p</i> ¹
	<i>n</i>	R/R	R/H	H/H	
Classe IV	42	18 (42,9)	16 (38,1)	8 (19)	
Classe V	28	11 (39,3)	16 (57,1)	1 (3,6)	0,47

¹ χ^2 de tendência

Também não se observou diferente prevalência do genótipo FcγRIIa-R/R131 em relação à presença ou ausência de crescentes (48,7% R/R131 e 17,9% H/H131 vs 31,2% R/R131 e 9,4% H/H131, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição dos genótipos do receptor FcγRIIa e presença de crescentes

	<i>n</i>	Genótipo <i>n</i> (%)			<i>p</i> ¹
		R/R	R/H	H/H	
Crescentes presentes	39	19 (48,7)	13 (33,4)	7 (17,9)	0,29
Crescentes ausentes	32	10 (31,2)	19 (59,4)	3 (9,4)	

¹ χ^2 de tendência

Com relação aos parâmetros clínicos funcionais dos pacientes lúpicos, agrupados quanto aos seus genótipos, não houve diferença significativa quanto a dados epidemiológicos ou de proteinúria e creatinina inicial e final (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição dos genótipos do receptor FcγRIIa e características clínico-laboratoriais na nefrite lúpica

	R/R	R/H	H/H
Idade (anos)	25,70 ± 9,02	30,56 ± 10,44	26,91 ± 7,70
Sexo	28F : 4M	30F : 3M	10F : 1M
Creatinina inicial (mg/dl)	1,88 ± 1,86	2,11 ± 1,97	2,70 ± 2,67
Creatinina final (mg/dl)	2,55 ± 2,62	2,06 ± 2,40	3,34 ± 2,91
Proteinúria inicial (g/24h)	5,69 ± 5,63	6,22 ± 5,25	5,64 ± 2,71
Proteinúria final (g/24h)	1,69 ± 1,35	1,01 ± 1,29	1,43 ± 1,25

ANOVA

Média ± desvio padrão

A função renal dos pacientes com nefrite lúpica foi avaliada através da creatinina plasmática e consideramos com insuficiência renal aqueles com $\text{Pcr} \geq 1,4$ mg/dl. A distribuição dos pacientes quanto à insuficiência renal, assim definida, ao final do seguimento está na Tabela 6. Assim, de 76 pacientes estudados, 28 (36,8%) apresentaram insuficiência renal e não houve associação do genótipo $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ -R/R131 com ou sem insuficiência renal ao final do seguimento (42,9% R/R131 e 21,4% H/H131 vs 41,7% R/R131 e 10,4% H/H131).

Tabela 6: Distribuição dos genótipos do receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ e insuficiência renal

	Genótipo <i>n</i> (%)				<i>p</i> ¹
	<i>n</i>	R/R	R/H	H/H	
Creatinina < 1,4mg/dl	48	20 (41,7)	23 (47,9)	5 (10,4)	
Creatinina [≥] 1,4mg/dl	28	12 (42,9)	10 (35,7)	6 (21,4)	0,34

¹ χ^2 de tendência

Dentro deste mesmo grupo (76 pacientes), 18 evoluíram para perda renal e hemodiálise (23,6%). Comparando o grupo que evoluiu para hemodiálise com aquele que não evoluiu para hemodiálise, não houve associação entre seus genótipos e hemodiálise (44,5% R/R131 e 22,2% H/H131 vs 41,4% R/R131 e 12,1% H/H131, respectivamente) (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição dos genótipos do receptor FcγRIIa e hemodiálise

Hemodiálise	Genótipo <i>n</i> (%)				<i>p</i> [†]
	<i>n</i>	R/R	R/H	H/H	
Não	58	24 (41,4)	27 (46,5)	7 (12,1)	
Sim	18	8 (44,5)	6 (33,3)	4 (22,2)	0,14

[†] χ^2 de tendência

Portanto, apesar de termos uma expectativa de que o genótipo H/H131 tivesse um possível papel “protetor” em relação à função renal, esse fato não ocorreu. Não houve diferença estatisticamente significativa das creatininas inicial ou final em relação à distribuição genotípica. Estudando no entanto a histologia, verificamos um maior achado de alterações vasculares trombóticas nos pacientes com genótipo FcγRIIa-H/H131 em relação aos pacientes que não apresentavam este achado histológico (50% H/H131 e 16,7% R/R131 vs 10,8% H/H131 e 43,1% R/R131, respectivamente) (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição dos genótipos do receptor FcγRIIa e presença de vasculite arterial em biópsia renal

	Genótipo <i>n</i> (%)				<i>p</i> [†]
	<i>n</i>	R/R	R/H	H/H	
Vasculite ausente	65	28 (43,1)	30 (46,1)	7 (10,8)	
Vasculite presente	6	1 (16,7)	2 (33,3)	3 (50)	<0,05

[†] χ^2 de tendência

Estudando marcadores imunológicos dos pacientes com nefrite lúpica em relação ao genótipo, encontramos associação significativa do FcγRIIa-R/R131 com FAN maior que 1/100 e C3 baixo, apontando para uma relação com marcador da doença (FAN) e atividade imunológica (C3). Por outro lado, não encontramos associação dos diferentes genótipos com a presença ou não de anticorpo anti-fosfolípide (Tabela 9).

Tabela 9: Distribuição dos genótipos do receptor FcγRIIa e parâmetros de atividade lúpica

Genótipos	FAN>1/100	anti-DNA +	C3 baixo	anti-fosfolípide +
R/R	23 (47,9%)	17 (47,2%)	23 (52,3%)	8 (38,1%)
R/H	23 (47,9%)	17 (47,2%)	18 (40,9%)	10 (47,6%)
H/H	2 (4,2%)	2 (5,6%)	3 (6,8%)	3 (14,3%)
Significância	*p < 0,05	p = 0,09	*p < 0,05	p = 0,89

χ² de tendência

É conhecida a relação entre o tratamento imunossupressor com a sobrevida renal e a do paciente lúpico. Assim, vários esquemas de imunossupressão são propostos como tratamento, porém em nosso meio temos usado o do NIH com algumas variantes adaptadas a cada paciente. Com a finalidade de avaliarmos se a intensidade da imunossupressão interferiu no desenlace final do paciente (função renal/hemodiálise), contabilizamos as doses de imunossupressores administradas aos pacientes em relação à distribuição genotípica. Não houve nenhuma relação entre doses de imunossupressores e genótipos (Tabela 10).

Tabela 10: Distribuição dos genótipos do receptor FcγRIIa e doses de imunossupressores

	R/R	R/H	H/H
Corticóide oral (mg/dia)	17,76 ± 8,45	22,68 ± 11,91	19,36 ± 9,64
Metilprednisolona (mg)	2143 ± 2007	2000 ± 2026	1071 ± 2244
Ciclofosfamida (mg)	5034 ± 3539	4854 ± 4262	6057 ± 4034
Tempo de seguimento (meses)	34,23 ± 33,85	42,25 ± 37,49	23,43 ± 18,07
ANOVA	Média ± desvio padrão		

DISCUSSÃO

Discussão

Estudo anterior deste laboratório realizado por Bazílio et al. (43) mostrou que controles normais apresentavam distribuição genotípica de 21% de R/R131 e 27% de H/H131, diferente da observada em doadores de sangue japoneses, onde foi relatada incidência de mais de 50% de genótipo H/H131 e menos de 10% de R/R131 (46), porém semelhante à observada em caucasianos franceses (18% de R/R131 e 31% de H/H131) (48) e chineses (16% de R/R131 e 26% de H/H131) (33). Assim sendo, neste protocolo o nosso controle não foi a população normal já previamente estudada e sim a de glomerulopatias primárias, cuja distribuição genotípica por nós constatada (23,8% de R/R131 e 23,8% de H/H131) foi semelhante à de indivíduos normais brasileiros (21% de R/R131 e 27% de H/H131).

Achados do presente estudo mostraram uma distribuição genotípica na nefrite lúpica de 42,1% de R/R131 e 14,5% de H/H131 e nos glomerulopatas de 23,8% de R/R131 e de 23,8% de H/H, verificando-se frequência maior do genótipo R/R131 no grupo com nefrite lúpica. O mesmo ocorreu com a distribuição do alelo R131, que predominou no grupo com nefrite lúpica (0,64) em relação ao grupo de glomerulopatias (0,50) ($p<0,05$).

Estes achados estão em concordância com estudos prévios de europeus (38) e afro-americanos (41) em populações de lúpicos, embora outros autores não tenham encontrado correlação entre polimorfismo do Fc γ RIIa e lesão renal (32,49).

Os nossos achados concordam com as hipóteses imunopatológicas de envolvimento do polimorfismo dos receptores Fc γ RIIa no déficit de clareamento de imunocomplexos na nefrite lúpica. Tal hipótese fica reforçada por estudos que demonstraram uma ineficiência no clareamento da subclasse IgG2 de imunoglobulina nos indivíduos homozigotos R/R131 e nos heterozigotos R/H131, proporcionando assim um maior risco de deposição de imunocomplexos do tipo IgG2 (41). De fato, níveis aumentados de imunocomplexos circulantes contendo IgG2 são encontrados em pacientes lúpicos com atividade renal mas não em lúpicos com atividade extra-renal (12). Além disso, Zuñiga et al. (15) demonstraram que IgG2 e IgG3 foram as subclasses predominantes nos imuno depósitos em biópsias renais de pacientes com nefrite lúpica, encontrando também associação com o genótipo Fc γ RIIa-R/R131.

Quando dividimos o grupo dos glomerulopatas em formas proliferativas e não proliferativas, verificamos uma segregação do genótipo R/R131 nas formas proliferativas (31,6% R/R131 e 26,3% H/H131) semelhante à observada na nefrite lúpica, em contraposição às formas não proliferativas (20,5% R/R131 e 22,7% H/H131), onde não houve segregação de genótipo.

Esta constatação permite-nos inferir sobre mecanismos imunopatológicos comuns entre a proliferação glomerular encontrada na nefrite lúpica e a encontrada nas glomerulopatias primárias. Assim, no grupo proliferativo onde foram incluídas glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite mesangial e nefropatia da

IgA, caracterizado por níveis baixos ou inexistentes de imunocomplexos circulantes de IgG, a questão não estaria na remoção de complexos circulantes. O que provavelmente ocorre, portanto, é uma estimulação direta da proliferação tecidual com envolvimento destes receptores. Seguindo este raciocínio, Zuñiga et al. (15) descreveram o papel da ativação inflamatória em neutrófilos polimorfonucleares e monócitos pela proteína C-reativa, a qual também se liga aos receptores FcγRIIa-R/R131, desencadeando potente ativação celular com liberação de citocinas, radicais livres e proteases. Dessa forma, a proteína C-reativa presente no depósito imune glomerular amplificaria a lesão. Estes achados ficam reforçados, segundo estes mesmos autores, pela reação de imunocoloração para proteína C-reativa positiva, porém com fraca intensidade, em glomerulonefrite membranoproliferativa e glomerulonefrite difusa aguda, e muito mais intensa em nefrite lúpica. Outros autores lembram também a importância da proteína C-reativa, que se liga ao C1q ativando a via clássica do complemento, adicionando outro fator que contribui para a lesão tecidual (50)

Com relação à histologia do LES (classificação pela OMS) nossos dados mostraram uma distribuição genotípica semelhante entre classe IV (42,9% R/R131 e 19% H/H131) e classe V (39,3% R/R131 e 3,6% H/H131). Sato et al.(30), estudando 69 biópsias de pacientes com nefrite lúpica, também não encontraram associação entre o polimorfismo do receptor FcγRIIa e histologia na nefrite lúpica, embora houvesse maior predomínio de pacientes com classes I e II ($n = 32$), restando 23 pacientes com classes III e IV e 13 pacientes com classe V. Dijstelbloem et al. (51) também não encontraram maior prevalência do genótipo FcγRIIa-R/R131 nos pacientes com nefrite lúpica classes III e IV. O mesmo autor não pôde comparar

classes III e IV com classe V devido ao reduzido número de pacientes com essa última classe ($n = 7$).

Estudamos ainda a distribuição dos genótipos quanto aos índices de atividade (IA - que pode ter valor de 0 a 24) e cronicidade (IC - que pode ter valor de 0 a 12) da nefrite lúpica padronizados pela OMS. Com a aplicação destes índices, tem sido observado por alguns autores que pacientes com $IA > 12$ e $IC > 4$ têm pior prognóstico em termos de sobrevida renal a longo prazo (52). Outros centros, no entanto, não têm constatado tal valor prognóstico em estudos de larga escala (53). Dos 12 pacientes que apresentaram $IC > 4$ (33,3% R/R131, 41,7% R/H131 e 25% H/H131), não verificamos nenhuma segregação genotípica. Nenhum paciente apresentou $IA > 12$. Já Zuñiga et al. (15) observaram que os pacientes com nefrite lúpica apresentando $IC > 4$ em biópsia renal tiveram maior prevalência do genótipo $Fc\gamma RIIa$ -R/R131 em relação à frequência esperada (41% R/R131, 5% H/H131 vs 25% R/R131 e 25% H/H131).

Com relação à função renal, nossos achados sugerem não haver segregação genotípica condicionando gravidade da nefrite lúpica na sua instalação (creatinina inicial), nem na sua progressão, medida pela creatinina ao final do seguimento. Também não houve nenhuma segregação genotípica relacionada à evolução para insuficiência renal crônica terminal com necessidade de hemodiálise. Manger et al. (36) demonstraram igualmente homogeneidade quanto à função renal entre os diferentes genótipos na população lúpica estudada, observando apenas um início mais precoce de redução da função renal nos pacientes com genótipo $Fc\gamma RIIa$ -R/R131. Song et al. tampouco observaram associação do genótipo com *clearance* de creatinina (40).

Logo, não achamos relação entre os parâmetros clínicos de pacientes com nefrite lúpica e o polimorfismo do receptor FcγRIIa. Este parece ter influência apenas na predisposição para nefropatia e não na evolução da mesma. Certamente outros fatores também envolvidos no LES, como sistema complemento e outras subclasses de IgGs, podem alterar o curso da doença nestes pacientes. A exemplo de outros autores, observamos associação entre o genótipo FcγRIIa-H/H131 e alterações histológicas vasculares com trombose. É possível que a presença deste genótipo exerça um papel de lesão histológica que contrabalança a sua maior eficiência em clarear imunocomplexos da subclasse IgG2. O receptor FcγRIIa é o único expresso em plaquetas e células endoteliais, sendo que o genótipo FcγRIIa-H/H131 é o único receptor capaz de reconhecer eficientemente IgG2. A subclasse IgG2 tem sido associada com o anticorpo anti-cardiolipina (aCL), como observado por Sammaritano et al. (54). Neste relato, apenas os pacientes que apresentavam aCL da subclasse IgG2 apresentavam complicações clínicas, especificamente trombose arterial e/ou venosa. Quanto à distribuição genotípica, pacientes com anticorpo anti-cardiolipina e trombose apresentavam 40% de homozigose para FcγRIIa-H/H131, comparado com apenas 25% dos pacientes sem doença. Estudo de meta-análise também observou que, dentre os pacientes com LES, os que apresentavam anticorpo anti-cardiolipina eram mais frequentemente homozigotos para H/H131 do que heterozigotos (55).

Estudando atividade imunológica dos pacientes com nefrite lúpica em relação ao genótipo, encontramos associação significativa do FcγRIIa-R/R131 com marcadores de atividade lúpica (FAN maior que 1/100) e de atividade imunológica (baixo C3). Manger et al. (36) também relataram relação entre polimorfismo do

receptor Fc γ RIIa e atividade imunológica, relacionando o genótipo Fc γ RIIa-R/R131 com hipocomplementemia e presença do anticorpo anti-RNP.

Em resumo, uma distribuição anormal dos genótipos do receptor Fc γ RIIa com predomínio do homozigoto Fc γ RIIa-R/R131 pode contribuir para a patogênese e/ou desenvolvimento de doença renal no LES. Tal associação parece relacionar-se com o componente proliferativo decorrente da presença de imunocomplexos nesta patologia. Não observamos relação do polimorfismo com a evolução clínica destes pacientes, porém houve relação com marcadores de atividade imunológica.

CONCLUSÕES

Conclusões

- Observamos um aumento significativo da frequência do genótipo FcγRIIa-R/R131 nos pacientes com nefrite lúpica em relação às glomerulopatias primárias ($p<0,05$)
- A frequência do alelo R131 é significativamente maior nos pacientes com nefrite lúpica em relação às glomerulopatias primárias ($p<0,05$)
- Houve segregação do genótipo FcγRIIa-R/R131 nas glomerulopatias proliferativas (glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite proliferativa mesangial, nefropatia da IgA), semelhante à observada na nefrite lúpica, em contraposição às glomerulopatias não proliferativas (glomeruloesclerose segmentar e focal, glomerulopatia de lesões mínimas, glomerulonefrite membranosa), onde não houve segregação de genótipo ($p<0,05$)
- Não houve diferença estatisticamente significativa da frequência do genótipo FcγRIIa-R/R131 no grupo de nefrite lúpica em relação à classe histológica, insuficiência renal, proteinúria inicial ou final e doses acumuladas de imunossupressores

- Encontramos associação significativa do genótipo $Fc\gamma RIIa-R/R131$ com marcadores de atividade lúpica ($FAN > 1/100$) e de atividade imunológica (consumo de C3)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- 1 - Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, Mc Shane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982,25:1271-77.
- 2 - Appel GB, Valeri A. The course and treatment of lupus nephritis. *Annu. Rev. Med.* 1994,45:525-37.
- 3 - Churg GJ, Bernstein J, Glasscock RJ. Renal disease: classification and atlas of glomerular diseases. 2nd ed. New York: Igaku-Shoin; 1995,151-180.
- 4 - Fournie GJ, Drue P. Towards understanding the pathogenesis of SLE. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996,11:10-12.
- 5 - Nossent JC, Henzen-Logmans SC, Vroom TM, Huysen V, Berden JH, Swaak AJ. Relation between serological data at the time of biopsy and renal histology in lupus nephritis. *Rheumatol Int.* 1991,11:77-82.
- 6 - Oates JC, Gilkeson GS. Mediators of injury in lupus nephritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2002,14:498-503.
- 7 - Yokoyama H, Takabatake T, Takeda M. Up-regulated MHC – class II expression and IFN and soluble IL-2R in lupus nephritis. *Kidney Int.* 1992,42:755-61.
- 8 - Okamura M, Kanayama Y, Amatsu K. Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded

- DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology. *Ann. Rheum. Dis.* 1993,52:14-20.
- 9 - Bootsma H, Spronk PE, Ter Borg EJ. The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-dsDNA antibodies for relapses in Systemic Lupus Erythematosus: A prospective long-term observation. *Ann. Rheum. Dis.* 1997,56:661-6.
- 10 - Hill GS, Hingalis N, Tron F, Bach JF. Systemic lupus erythematosus: morphologic correlations with immunologic and clinical data at the time of biopsy. *Am. J. Med.* 1978,64:61-79.
- 11 - Calich V. Imunoglobulinas: Estrutura e função. In: CALICH, V.; VAZ, C. *Imunologia*. Rio de Janeiro: Revinter Ltda; 2001,55-83.
- 12 - Bijl M, Dijstelbloem M, Oost WW, Bootsma H, Derksen RHW, Aten J, Limburg PC, Kallenberg CGM. IgG subclass distribution of autoantibodies differs between renal and extra-renal relapses in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatology*. 2002,41:62-67.
- 13 - Prada AE, Strife CF. IgG subclass restriction of autoantibody to solid-phase C1q in membranoproliferative and lupus glomerulonephritis. *Clin.Immunol. Immunopathol.* 1992,63:84-8.
- 14 - Imai H, Hamai K, Komatsuda A, Ohtani H, Miura AB. IgG subclasses in patients with membranoproliferative glomerulonephritis, membranous nephropathy, and lupus nephritis. *Kidney Int.* 1997,51:270-7.
- 15 - Zuñiga R, Markowitz GS, Thaschawee A, Imperatore EA, D'Agati VD, Salmon JE. Identification of IgG subclasses and C-reactive protein in lupus nephritis: the relationship between the composition of immune deposits and Fcγ receptor type IIa alleles. *Arthritis Rheum.* 2003,48:460-70.
- 16 - Haas M. IgG subclass deposits in glomeruli of lupus and non-lupus membranous nephropathies. *Am. J. Kidney Dis.* 1994,23:358-64.

- 17 - Frank MM, Hamburger MI, Lawley TJ, Kimberly RP, Plotz PH. Defective reticuloendothelial system Fc-receptor function in Systemic Lupus Erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 1979,300:518-23.
- 18 - Marzocchi-Machado CM, Alves CMOS, Azzolini AECS, Polizello ACM, Carvalho IF, Lucisano-Valim YM. Fc γ and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, 2002,11:240-48.
- 19 - Salmon JE, Kimberly RP, Gibofsky A, Fotino M. Defective mononuclear phagocyte function in Systemic Lupus Erythematosus: dissociation of Fc receptor-ligand binding and internalization. *J. Immunol.* 1984,133:2525-31.
- 20 - Salmon JE, Pricop L. Human receptors for Immunoglobulin G. *Arthritis Rheum.* 2001,44:739-50.
- 21 - Van de Winkel JGJ, Anderson CL. Biology of Human Immunoglobulin G Fc Receptors. *J. Leukoc. Biol.* 1991,49:511-24.
- 22 - Kimberly RP, Salmon JE, Edberg JC. Receptors for Immunoglobulin G: molecular diversity and implications for disease. *Arthritis Rheum.* 1995,38:306-14.
- 23 - Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2001,19:275-90.
- 24 - Fossati G, Bucknall RC, Edwards SW. Fc γ receptors in autoimmune diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* 2001,31:821-31.
- 25 - Kuwano ST, Bordin JO, Chiba AK. Allelic polymorphisms of human Fc γ RIIa and Fc γ RIIb among distinct groups in Brazil. *Transfusion* 2000,40:1388-92.
- 26 - Osborne JM, Chacko GW, Brandt JT, Anderson CL. Ethnic variation in frequency of an allelic polymorphism of human Fc γ RIIa determined with allele specific oligonucleotide probes. *J. Immunol. Methods.* 1994,173:207-17.

- 27 - Tse WY, Abadeh S, Jefferis SR, Savage COS, Adu D. FcγRIIa receptor polymorphisms are predictors of renal outcome in ANCA-positive systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2000,120:60.
- 28 - Dijstelbloem HM, Scheepers RHM, Oost WW, Stegeman CA, Van der Pol WL, Sluiter WJ, Kallenberg CGM, Van de Winkel JGJ, Tervaert JWC. Fcγ receptor polymorphisms in Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 1999,42:1823-27.
- 29 - Zuñiga R, Sonia NG, Peterson MGE, Reveille JD, Baethge BA, Alarcón GS, Salmon JE. Low-binding alleles of Fcγ Receptor types IIa and IIIa are inherited independently and are associated with Systemic Lupus Erythematosus in Hispanic patients. *Arthritis Rheum.* 2001,44:361-67.
- 30 - Sato H, Iwano M, Akai Y, Nishino T, Fujimoto T, Shuiki H, Dohi K. FcγRIIa polymorphism in Japanese patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* 2001,10:97-101.
- 31 - Yun HR, Koh HK, Kim SS, Chung WT, Kim DW, Hong KP, Song GG, Chang HK, Choe JY, Bae SC, Salmon JE, Yoo DH, Kim TY, Kim SY. FcγRIIa/IIIa polymorphism and its association with clinical manifestations in Korean lupus patients. *Lupus* 2001,10:466-72.
- 32 - Botto M, Theodoridis E, Beumon HLC, Briggs D, Isenberg DA, Walport ML, Davies K. FcγRIIa polymorphism in Systemic Lupus Erythematosus (SLE): no association with disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1996,104:264-68.
- 33 - Yap SN, Phipps ME, Manivasagar M, Tan SY, Bosco JJ. Human Fc gamma receptor IIa (FcγRIIa) genotyping and association with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) in Chinese and Malays in Malaysia. *Lupus* 1999,8:305-10.
- 34 - D'Alfonso S, Rampi M, Bocchio D, Colombo G, Scorza-Smeraldi R, Momigliano-Richiardi P. Systemic Lupus Erythematosus candidate genes in the Italian population: evidence for a significant association with Interleukin-10. *Arthritis Rheum.* 2000,43:120-28.

-
- 35 - Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JPA. FcγRIIa-SLE META-ANALYSIS INVESTIGATORS. Role of the Fcγ Receptor IIa polymorphism in susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2002,46:1563-71.
- 36 - Manger K, Repp R, Spriewald BM, Rascu A, Geiger A, Wassmuth R, Westerdaal NAC, Wentz B, Manger B, Kalden JR, Van de Winkel JGJ. Fcγ receptor IIa polymorphism in Caucasian patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998,41:1181-9.
- 37 - Manger K, Repp R, Jansen M, Geisselbrecht M, Wassmuth R, Westerdaal NAC, Pfahlberg A, Manger B, Kalden JR, Van de Winkel JGJ. Fcγ receptor IIa, IIIa, and IIIb polymorphisms in German patients with Systemic Lupus Erythematosus: association with clinical symptoms. *Ann. Rheum. Dis.* 2002,1:786-92.
- 38 - Duits AJ, Bootsma H, Derksen RHWM, Spronk PE, Kater L, Kallenberg CGM, Capel PJA, Westerdaal NAC, Spierenburg GT, Gmelig-Meyling FHJ, Van de Winkel JGJ. Skewed distribution of IgG Fc receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus patients. *Arthritis Rheum.* 1995,9:1832-36.
- 39 - Norsworthy P, Theodoridis E, Botto M, Athanassiou P, Beynos H, Gordon C, Isenberg D, Walport MJ, Davies K. Overrepresentation of the Fcγ Receptor type IIa R131/R131 genotype in Caucasoid systemic lupus erythematosus patients with autoantibodies to C1q and glomerulonephritis. *Arthritis Rheum.* 1999,42:1828-32.
- 40 - Song YW, Han CW, Kang SW, Baek HJ, Lee EB, Shin CH, Hahn BH, Tsao BP. Abnormal distribution of Fcγ receptor type IIa polymorphisms in Korean patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998,41:421-26.
- 41 - Salmon JE, Millard S, Schachter LA, Arnett FC, Ginzler EM, Gourley MF, Ramsey-Goldman R, Peterson MGE, Kimberly RP. FcγRIIa alleles are heritable

- risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J. Clin. Invest.* 1996,97:1348-54.
- 42 - Zuñiga R, Markowitz GS, Thaschawee A, Imperatore EA, D'Agati VD, Salmon JE. Identification of IgG subclasses and C-reactive protein in lupus nephritis. The relationship between the composition of immune deposits and Fcγ receptor type IIa alleles. *Arthritis Rheum.* 2003,48:460-70.
- 43 - Bazílio AP, Viana VST, Toledo R, Woronik V, Bonfá E, Monteiro RC. FcγRIIa polymorphism: susceptibility for immune complex-mediated lupus nephritis in Brazilian patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004,19:1427-31.
- 44 - Wu J, Edberg JC, Redecha PB. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 1997,100:1059-70.
- 45 - Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JPA. The FcγRIIIa-F158 allele is a risk factor for the development of lupus nephritis: a meta-analysis. *Kidney Int.* 2003,63:1475-82.
- 46 - Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N. Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002,46:1242-54.
- 47 - Steinberg AD, Kaltreider HB, Staples PJ, Goetzl EJ, Talal N, Decker JL. Cyclophosphamide in lupus nephritis: a controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 1971,75:165-71.
- 48 - Michel M, Piette JC, Roullet E, Duron F, Francis C, Nahum L, Pelletier N, Crassard I, Nunez S, Michel C, Bach JF, Tournier-Lasserre E. The R131 low affinity allele of the FcγRIIa receptor is associated with systemic lupus erythematosus but not with other autoimmune diseases in French Caucasians. *Am. J. Med.* 2000,108:580-83.

-
- 49 - Smyth LJC, Snowden N, Carthy D, Papasteriades C, Hajeer A, Ollier W. Fc γ RIIa polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 1997,56:744-46.
- 50 - Volonakis JE. Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1982,389:235-49.
- 51 - Dijstelbloem HM, Bijl M, Fijnheer R, Scheepers RHM, Oost WW, Jansen MD, Sluiter WJ, Limburg PC, Derdsen RHW, Van de Winkel JGJ, Kallenberg CGM. Fc γ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2000,43:2793-800.
- 52 - Austin HA3rd, Muenz LR, Joyce KM, Aantonovych TT, Balow JJ. Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int.* 1984,25:689-95.
- 53 - Donadio JV, Glassock RJ. Immunossuppressive drug therapy in lupus nephritis. *Am. J. Kidney Dis.* 1993,21:239-49.
- 54 - Sammaritano LR, Ng S, Sobel R, Lo SK, Simantov R, Furie R, Kaell A, Silverstein R, Salmon J. Anticardiolipin IgG subclasses: Association of IgG2 with arterial and/or venous thrombosis. *Arthritis Rheum.* 1997,40:1998-2006.
- 55 - Karassa FB, Bijl M, Davies KA, Kallenberg CGM, Khamashta MA, Manger K, Michel M, Piette JC, Salmon JE, Song YW, Tsuchiya N, Yoo DH, Ioannidis J. Role of the Fc γ receptor IIa polymorphism in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2003,48:1930-38.