UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Fc γ R e CR3 no lúpus eritematoso sistêmico: variantes polimórficas e sua
influência na fagocitose e desgranulação dos neutrófilos

Isabel Cristina Costa Vigato Ferreira

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Fc γ R e CR3 no lúpus eritematoso sistêmico: variantes polimórficas e sua
influência na fagocitose e desgranulação dos neutrófilos

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Isabel Cristina Costa Vigato
Ferreira.

Orientadora: Profa. Dra. 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.

Vigato-Ferreira, Isabel Cristina Costa

FcγR e CR3 no lúpus eritematoso sistêmico: variantes polimórficas e sua influência na fagocitose e desgranulação dos neutrófilos. Ribeirão Preto, 2012.

97 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Marzocchi-Machado, Cleni Mara.

1. Lúpus eritematoso sistêmico. 2. Neutrófilos. 3. Fagocitose. 4. Desgranulação. 5. Receptores para IgG. 6. Receptor para complemento. 7. Polimorfismos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Isabel Cristina Costa Vigato Ferreira

Título do trabalho: FcγR e CR3 no lúpus eritematoso sistêmico: variantes polimórficas e sua influência na fagocitose e desgranulação dos neutrófilos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*“Senhor Deus, eu Te agradeço de todo o coração
pelo Teu amor e Tua fidelidade,
pois tens mostrado que o Teu nome
e as Tuas promessas estão acima de tudo.
Quando Te chamei, Tu me respondeste
e com o Teu poder me deste força e coragem...
O Teu amor, Senhor, permanece para sempre...
Não abandones a obra que começaste!”*

Dedicatória

A Deus, por ter me concedido a graça do seu amor, por ser minha fortaleza e por ter me acompanhado fielmente durante a realização deste estudo, iluminando meu caminho, mostrando as direções e dando sabedoria para concluir este trabalho.

Aos meus pais, Doroti e Moacir, por terem me oferecido a oportunidade de crescer através dos estudos e, então, optar pela vida acadêmica, pelos seus ensinamentos, confiança, por darem todo o incentivo e amor necessários na caminhada desta minha formação e por serem coautores desta conquista.

*Ao meu marido e grande amor, Samuel,
por estar ao meu lado desde o início da
vida acadêmica, seguindo os mesmos
passos, buscando os mesmos sonhos,
vivenciando as mesmas conquistas, por
sempre me incentivar a dar o máximo de
mim e principalmente pelo seu amor e
companheirismo.*

*Aos meus irmãos, Humberto e Ricardo, e
minha avó Dolores, pelos conselhos,
incentivo e momentos de alegria;*

*aos meus sobrinhos, Helena e João
Gabriel, por me fazerem sorrir em meio a
qualquer situação;*

*aos meus sogros, Heloísa e Reneval, e à
minha “nova família”, pela amizade, força
e acolhimento.*

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado, minha orientadora, por ter acreditado em mim, pela sua presença constante, seus ensinamentos, atenção e paciência e, acima do seu profissionalismo, agradeço por ser essa pessoa maravilhosa e por sempre nos presentear com o seu carinho de mãe;

aos pacientes incluídos em nosso estudo, pela disposição em nos ajudar participando de nossa pesquisa, mesmo com suas inúmeras limitações;

à amiga e colega de laboratório Juliana Escher Toller Kawahisa, minha fiel companheira, pela sua responsabilidade, por dividir comigo todo o trabalho do mestrado e por ter sido o peso contrário na balança, que colaborou para que tudo ocorresse da melhor maneira possível;

ao amigo farmacêutico-bioquímico e técnico do nosso laboratório, José Eduardo Cavalcanti Del Lama, pela amizade, companhia e auxílio diário no desenvolvimento de cada experimento;

à amiga e aluna de iniciação científica Thalita Estracanholi de Castro pelos momentos juntos e pelo auxílio na padronização das metodologias;

à Profa. Dra. Elisa Maria de Sousa Russo Carbolante, pelo auxílio com seus conhecimentos em tantas dúvidas e por dividir conosco o mesmo laboratório;

ao amigo e Prof. Dr. João Alexandre Três Pancoto da Universidade do Espírito Santo (UFES) por nos disponibilizar toda a ajuda necessária durante o desenvolvimento do trabalho;

ao Prof. Dr. Paulo Louzada Junior, do Depto de Clínica Médica da FMRP-USP, pela colaboração com este trabalho e por tamanha atenção disponibilizada para nos auxiliar com a parte clínica do estudo;

ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi, do Depto de Clínica Médica da FMRP-USP, pela colaboração com este trabalho e por ter disponibilizado seu laboratório para que pudessemos iniciar nossas atividades de biologia molecular;

à farmacêutica-bioquímica Flávia Tremeschin de Almeida e aos pós-graduandos Gustavo Martelli Palomino e Natália Fagundes Cagnin pelo auxílio na padronização dos ensaios de biologia molecular;

à farmacêutica-bioquímica Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini, do Depto de Física e Química da FCFRP-USP, pelo seu imenso carinho conosco, sua atenção, e pela prontidão em nos auxiliar diariamente com seu grande conhecimento e experiência;

à Profa. Dra. Yara Maria Lucizano Valim, do Depto de Física e Química da FCFRP-USP, por nos disponibilizar a infraestrutura de seu laboratório e mais que isso, pelos ensinamentos de vida em cada palavra mencionada e por nos “adotar” como parte da família da Bioquímica;

ao Prof. Dr. Flávio Calil Petean e aos residentes do Ambulatório de Reumatologia do HCFMRP-USP pela atenção e auxílio no recrutamento de pacientes para a pesquisa;

ao geneticista Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior, do Depto de Química da FFCLRP-USP e ao estatístico Prof. Dr. Edson Zangiacomi Martinez, do Depto de Medicina Social da FMRP-USP, pelo grande auxílio nas análises de nossos resultados;

à biomédica Fabiana Rossetto de Moraes, da FCFRP-USP, pela atenção e prontidão na realização das leituras no citômetro de fluxo;

ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, do Depto de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, por disponibilizar a infraestrutura de seu laboratório para o uso do fotodocumentador;

aos voluntários saudáveis de nosso estudo, pela doação de amostra sanguínea para a realização de experimentos;

aos amigos e alunos do laboratório de Bioquímica, Micássio Fernandes de Andrade, Everton de Oliveira Lima dos Santos, Luciana Mariko Kabeya, Ana Paula Landi Librandi, Andréa Figueiredo Rinhel, Larissa Marchi e Adriana Balbina P. Paschoalato por compartilhar conosco suas idéias e seus dia-a-dia;

aos amigos que estiveram comigo e torceram por mim durante o desenvolvimento deste trabalho, em especial Miliane Rodrigues Frazão e Heliara Maria Spina Canela, pelos inúmeros momentos de alegria;

aos professores do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP por contribuírem para o meu aprendizado e crescimento acadêmico;

aos coordenadores e funcionários do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP pela disposição em ajudar;

à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado;

à Fundação de Amparo o Ensino e à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho (processo 2009/14732-8);

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de mestrado;

a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

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

*“Não existem pessoas de sucesso e pessoas
fracassadas; o que existem são pessoas que lutam
pelos seus sonhos ou desistem deles.”*

(Augusto Cury)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
1. Introdução	2
1.1. Neutrófilos	2
1.2. Fagocitose e Desgranulação	3
1.3. FcγR	6
1.4. FcγRIIa (CD32a)	9
1.5. FcγRIIIb (CD16b)	11
1.6. Receptores para complemento (CR)	13
1.7. Cooperação FcγR/CR	15
1.8. Lúpus Eritematoso Sistêmico	16
2. Justificativa	19
3. Objetivos	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. Resumo das Atividades Desenvolvidas	23
5. Casuística e Metodologia	25
5.1. Casuística	25
5.2. Principais reagentes utilizados	27
5.2.1. Extração de DNA	27
5.2.2. Reação em cadeia de polimerase (PCR)	27
5.2.3. Corrida do gel	28
5.2.4. Purificação de neutrófilos	28
5.2.5. Ensaio de fagocitose	28
5.2.6. Ensaios de desgranulação	29
5.2.7. Expressão de receptores	29
5.3. Equipamentos utilizados	30
5.4. Extração e caracterização do DNA genômico	31
5.4.1. Extração por método de <i>salting out</i>	31
5.4.2. Quantificação de DNA na amostra e avaliação qualitativa da pureza	32
5.4.3. Avaliação da integridade do DNA	32
5.4.4. Análise dos genótipos	32
5.4.4.1. FcγRIIA (CD32a)	33
5.4.4.2. FcγRIIIB (CD16b)	33
5.4.4.3. CR3 (CD11b/CD18)	34
5.4.5. Análise dos produtos da PCR	34
5.5. Coleta de dados nos prontuários dos pacientes	35
5.6. Amostras de sangue: fonte de células e soro	35
5.7. Imunocomplexos	36
5.8. Obtenção de polimorfonucleares neutrófilos	37
5.9. Ensaio de fagocitose	38
5.10. Ensaios de desgranulação	40

5.10.1.	Quantificação de Lisozima	40
5.10.2.	Quantificação de Elastase	41
5.11.	Análise da expressão dos receptores por citometria de fluxo	41
5.12.	Análises estatísticas	43
5.12.1.	Análise genotípica	43
5.12.2.	Análise da expressão dos receptores	43
5.12.3.	Análises dos ensaios funcionais dos neutrófilos	44
6.	Resultados	46
6.1.	Avaliação da integridade do DNA	46
6.2.	Análise dos genótipos	46
6.2.1.	FCGR2A (CD32a)	46
6.2.2.	FCGR3B (CD16b)	47
6.2.3.	HNA-4a (CR3)	48
6.2.4.	Frequência da variantes polimórficas	48
6.2.5.	Combinações entre os genótipos encontrados	50
6.2.6.	Associação das infecções mais frequentes com os genótipos encontrados	50
6.2.7.	Ensaio de Fagocitose	53
6.2.8.	Ensaio de Desgranulação	57
6.2.8.1.	Lisozima	57
6.2.8.2.	Elastase	61
6.2.9.	Análise da expressão dos receptores	65
7.	Discussão	69
9.	Referências bibliográficas	82
10.	Anexos	93
10.1.	Anexo I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	93
10.2.	Anexo II: Protocolos para o preparo das principais soluções utilizadas	94

RESUMO

VIGATO-FERREIRA, I.C.C. **FcγR e CR3 no lúpus eritematoso sistêmico: variantes polimórficas e sua influência na fagocitose e desgranulação dos neutrófilos.** 2012. 97f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune e a suscetibilidade às infecções está associada às suas anormalidades imunológicas e a sua terapia imunossupressora e citotóxica. Dentre as alterações que predispõem às infecções no LES estão anormalidades moleculares e funcionais dos neutrófilos: *clearance* e fagocitose ineficientes de imunocomplexos (IC) e bactérias, neutropenia, defeitos na quimiotaxia, redução do *burst* oxidativo e redução da expressão de receptores para IgG (FcγR) e para complemento (CR). Além disso, os polimorfismos genéticos dos FcγR 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 (CR1 e CR3). O polimorfismo dos genes FcγRIIA e FcγRIIB 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. Em particular, o alótipo FcγRIIa-R131, tem menor afinidade para a IgG2, o que resulta em prejuízo na fagocitose mediada por esta imunoglobulina. A IgG2 é essencial contra bactérias encapsuladas e os pneumococos são responsáveis por 6-18% das infecções bacterianas no LES. O objetivo deste estudo foi investigar a influência dos polimorfismos genéticos dos FcγR na fagocitose e desgranulação dos neutrófilos, associados ao polimorfismo do CR3, e à ocorrência de infecções bacterianas no LES. Os genótipos foram determinados por reações da polimerase em cadeia para os polimorfismos das variantes alélicas; a fagocitose e desgranulação foram estimuladas por IC contendo IgG (IC-IgG) e por IC-IgG e complemento (IC-IgG/SHN); a fagocitose de IC por neutrófilos e a expressão dos FcγR e CR3 foram avaliadas por citometria de fluxo; e a desgranulação dos neutrófilos estimulada por IC foi medida pela liberação de elastase e lisozima. Os resultados mostraram: maior frequência para o genótipo R-131 no LES; associação do genótipo HNA-4a negativo para o CR3 com a suscetibilidade para o LES e associação do HNA-4a positivo com proteção; fagocitose menor em neutrófilos de pacientes com LES com genótipo HR-131 comparados aos neutrófilos do grupo controle com genótipo R-131 (IC-IgG e IC-IgG/SHN); no polimorfismo do FcγRIIB, a fagocitose e a lisozima foram menores em neutrófilos de pacientes com LES com genótipo HNA-1b e maior para HNA-1a/1b comparados aos controles com os respectivos genótipos (IC-IgG/SHN); a ocorrência de infecções foi mais frequentemente associada à presença do alelo R-131 e HNA-1b; nenhuma diferença foi observada para o polimorfismo HNA-4a do CR3, bem como para a elastase. Este estudo contribui para o entendimento das anormalidades nas funções dos neutrófilos no LES e para a identificação de indivíduos, cujo polimorfismo dos FcγR e CR3 possa conferir suscetibilidade ou proteção às infecções.

Palavras-chaves: Lúpus eritematoso sistêmico; neutrófilos; fagocitose; desgranulação; receptores para IgG; receptor para complemento; polimorfismos.

ABSTRACT

VIGATO-FERREIRA, I.C.C. FcγR and CR in systemic lupus erythematosus: polymorphisms and their influence in the phagocytosis and degranulation of neutrophils.

2012. 97f. Dissertation (Masters). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Systemic lupus erythematosus (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. Factors predisposing to infection include defects in chemotaxis, abnormalities in neutrophil phagocytic activity, decreased immune complex (IC) and bacteria clearance, neutropenia, reduced oxidative burst, abnormalities in the expression of FcγR (FcγR) and complement (CR) receptors. Recent data have provided evidence that genetic polymorphism of FcγR is associated with immune abnormalities and risk to development of SLE. FcγR can mediate neutrophil effector functions and play a synergistic action with CR. FcγRIIa and FcγRIIIb display functionally relevant genetic polymorphisms, which allelic variants can influence the biological responses and the susceptibility to and course of infectious diseases. In particular, the presence of the FcγRIIa-R131 allotype results in lower affinity binding to IgG2, a subclass of IgG specific for encapsulated bacteria. Since pneumococci accounts for 6-18% of all bacterial infections in SLE, the R131 allele can be relevant as a risk factor for infections. The aim of this study was to investigate the influence of the FcγR polymorphisms on the phagocytosis and degranulation of neutrophils, associated with CR3 polymorphism, and bacterial infections in SLE. Genotypes were determined by polymerase chain reactions for the polymorphisms of the allelic variants; the phagocytosis and the degranulation were stimulated with IC-containing IgG (IC-IgG) and IC-IgG and complement (IC-IgG/NHS); the phagocytosis of IC by neutrophils and expression of FcγR and CR3 were evaluated by flow cytometry, and degranulation of neutrophils stimulated with IC was measured by the release of lysozyme and elastase. The results showed a higher frequency for the genotype R-131 in SLE and association of genotype HNA-4a negative for the CR3 with susceptibility to SLE and association of HNA-4a with protection; the phagocytosis was lower in neutrophils from patients with SLE with HR-131 genotype than those in neutrophils from control group with genotype R-131 (IC-IgG and IC-IgG/NHS); in the FcγRIIIb polymorphism, the phagocytosis and lysozyme were lower in neutrophils from patients with SLE with genotype HNA-1b and higher for HNA-1a/1b than those controls with the respective genotypes (IC-IgG/NHS); the occurrence of infections was more frequently associated with the presence of the allele R-131 and HNA-1b; no difference was observed for polymorphism HNA-4a of the CR3, neither for elastase. This study can contribute for the understanding of neutrophil abnormalities in SLE and identifying genetic markers that would predict patients Who are at high risk for infections.

Key words: Systemic lupus erythematosus; neutrophils; phagocytosis; degranulation; Fcγ receptor; complement receptor; polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	4
Figura 2.....	5
Figura 3.....	8
Figura 4.....	11
Figura 5.....	39
Figura 6.	43
Figura 7.....	46
Figura 8.	47
Figura 9.....	47
Figura 10.....	48
Figura 11.....	53
Figura 12.....	54
Figura 13.	56
Figura 14.....	57
Figura 15.	58
Figura 16.....	59
Figura 17.....	60
Figura 18.....	61
Figura 19.....	62
Figura 20.....	63
Figura 21.	64
Figura 22.....	65
Figura 23.....	66
Fluxograma 1.	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	12
Tabela 2.	12
Tabela 3.	49
Tabela 4.	51
Tabela 5.	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
BSA	Albumina de soro bovino
C	Citoplasmático; refere-se aos domínios citoplasmáticos das moléculas de receptor Fc γ
C3 e C4	Componentes 3 e 4 do complemento, respectivamente
C3bi	Fragmento C3b inativado
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
EC	Extracelulares; refere-se aos domínios extracelulares das moléculas de receptor Fc γ
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 Fc γ
FCGR	Gene para Fc γ R
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
HNA	Alotígeno de neutrófilo humano
IC	Imunocomplexo(s)
IgG	Imunoglobulina da classe G

ITAM	Motivo de ativação de imuno-receptor baseado em tirosina
ITIM	Motivo de inibição de imuno-receptor baseado em tirosina
ITU	Infecção do trato urinário
LPS	Lipopolissacarídeo
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
OR	<i>Odds ratio</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógeno
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PMN	Polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
SAAVNA	N-succinyl-alanina-valina-p-nitroanilida
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHI	Soro humano normal inativado
SHN	Soro humano normal
SLEDAI	Índice de atividade da doença (<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>)
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo (<i>single-nucleotide polymorphism</i>)
TM	Transmembrana; refere-se aos domínios transmembrana das moléculas de receptor Fcγ
TBE	Tris- borato-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil) aminometano

Introdução

1. Introdução

1.1. Neutrófilos

O sistema imunológico inato é composto por uma série de células (neutrófilos, monócitos/macrófagos, mastócitos, células *natural killer* e células dendríticas) e uma variedade de mediadores solúveis, oriundos destas células e do sistema complemento, que formam, em sincronismo, um sistema de defesa efetivo contra qualquer ameaça à integridade do organismo humano (Naussef, 2007, Kumar, Sharma, 2010).

Os polimorfonucleares (PMN) neutrófilos constituem uma subpopulação de leucócitos inicialmente descrita por Paul Erlich, no final do século XIX (Erlich, 1880, Amulic et al., 2012), cujas funções foram elucidadas por seu contemporâneo Elie Metchnikoff, ao observar a resposta inflamatória gerada em consequência da inserção de espinhos de roseira em larva de estrela-do-mar (Metchnikoff, 1893, Segal, 2005; Kumar, Sharma, 2010). Desde então, os neutrófilos passaram a ser conhecidos como as principais células efectoras da imunidade inata por desempenhar um importante papel na primeira linha de defesa contra patógenos extracelulares e na inflamação aguda (Kumar, Sharma, 2010; Mantovani et al. 2011).

A produção de neutrófilos é, quantitativamente, a principal atividade da medula óssea, sendo que dois terços da hematopoiese são destinados a originar células mieloides (granulócitos e monócitos). Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sistema imunológico (~40-60%), com uma produção em estado estacionário de $1 - 2 \times 10^{11}$ células por dia em um adulto saudável, sendo que este número pode aumentar drasticamente durante infecções (Wright et al., 2010). Além disso, os neutrófilos estão entre as células do organismo com vida mais curta, permanecendo circulante pelo sangue por apenas 6 a 8 horas aproximadamente (Borregaard, 2010, Amulic et al., 2012).

A resposta inflamatória mediada por neutrófilos é considerada um processo desenvolvido em muitos passos. Inicialmente, os neutrófilos precisam atravessar a parede dos vasos sanguíneos e migrar até o sítio da inflamação ou infecção. Assim, em resposta a estímulos quimiotáticos, as células se ligam a moléculas do endotélio vascular denominadas selectinas e esta primeira interação permite o seu rolamento. Em seguida, ocorre a firme adesão dos neutrófilos circulantes ao endotélio vascular ativado, promovida pela ligação das integrinas e, finalmente, a migração transendotelial, caracterizada pelo extravasamento e migração das células para o foco inflamatório (Faurschou, Borregaard, 2003, Amulic et al., 2012).

Uma vez no local da inflamação/infecção, os neutrófilos irão eliminar os microrganismos estranhos efetivamente. Para sua eliminação, os patógenos são ingeridos

pelos neutrófilos por um processo conhecido como fagocitose e destruídos pela combinação de metabólitos reativos de oxigênio e substâncias citotóxicas (Kennedy, DeLeo, 2009). A maioria dos passos que este processo compreende é dependente da mobilização de grânulos citoplasmáticos e vesículas secretoras. Este processo é facilitado pela presença de inúmeros receptores presentes na superfície da célula (Faurschou, Borregaard, 2003).

1.2. Fagocitose e Desgranulação

O processo de fagocitose é o principal mecanismo de remoção de agentes patogênicos e restos celulares do organismo e caracteriza-se por ser um processo ativo, mediado por receptores, durante o qual uma partícula é internalizada pela membrana da célula em um vacúolo denominado fagossomo (Flannagan et al., 2011, Amulic et al., 2012).

Assim como para outros fagócitos, os detalhes do mecanismo de internalização desempenhado pelos neutrófilos dependem do tipo de interação entre a célula e o microrganismo, sendo que esta interação pode ser direta, através do reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) por receptores de reconhecimento padrões (PRR) ou por intermédio de opsoninas. Este último compreende a fagocitose mediada por receptores para imunoglobulina G (IgG), conhecidos como FcγR, ou por receptores do complemento (Nordenfelt, Tapper, 2011, Amulic et al., 2012).

A internalização de partículas opsonizadas por IgG via FcγR é um modelo de fagocitose bastante conhecido e pode ser conceitualmente separado em três passos: a) ligação das partículas opsonizadas ao receptor; b) indução de uma cascata de sinalização intracelular; e c) formação de pseudópodos que englobam as partículas por um processo dependente da polimerização da actina (Flannagan et al., 2011).

Após o englobamento das partículas opsonizadas, forma-se o fagossomo. O fagossomo nascente adquire suas propriedades letais após um processo de maturação, que culmina com a fusão dos grânulos, momento em que se forma o fagolisossomo, e então, liberação do conteúdo antimicrobiano no lúmen deste fagolisossomo, processo conhecido como desgranulação. Simultaneamente, a montagem da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase na membrana fagossomal permite a produção de radicais de oxigênio em resposta a um aumento excessivo no consumo de oxigênio, processo denominado metabolismo oxidativo ou *burst* respiratório. Em conjunto, estes dois mecanismos criam um ambiente tóxico para a maioria dos agentes patogênicos (Nauseef, 2007, Nordenfelt, Tapper, 2011, Amulic et al., 2012). A Figura 1 ilustra o mecanismo de fagocitose e atividade microbicida do neutrófilo.

Figura 1. Fagocitose e atividade microbicida do neutrófilo. Após a fagocitose, os microrganismos são destruídos por espécies reativas de oxigênio (ERO) e proteínas antimicrobianas liberadas dos grânulos. FcR, receptor para Fc; CR, receptor para complemento; MPO, mieloperoxidase. Adaptado de Kennedy e DeLeo (2009).

Os grânulos dos neutrófilos são formados sequencialmente durante a diferenciação mieloide e sua formação (granulopoiese) inicia-se na fase de promielócitos pela fusão de vesículas transportadoras imaturas que brotam do complexo de Golgi (Faurschou, Borregaard, 2003).

Existem três tipos fundamentais de grânulos nos neutrófilos. Como visto na Figura 2, os grânulos azurófilos (também denominados primários ou peroxidase positivos) são os primeiros a ser formados durante a maturação do neutrófilo, são maiores que os demais, com diâmetro aproximado de $0,3\ \mu\text{M}$ e caracterizam-se por possuir alto conteúdo de mieloperoxidase (MPO). A produção de MPO é cessada na transição de promielócito para mielócito. A segunda classe formada são os grânulos específicos (ou secundários) com $0,1\ \mu\text{M}$ de diâmetro e também contêm uma ampla variedade de compostos antimicrobianos; estes grânulos são formados em fase de mielócitos e metamielócitos. O terceiro tipo formado são os grânulos terciários ou gelatinase, apresentam diâmetros menores que os específicos e, assim como estes, são MPO negativos. Além destes, um quarto conjunto de estruturas também é considerado como parte da família dos grânulos, são as vesículas secretoras. Tais vesículas

são formadas por endocitose nos estágios finais da maturação dos neutrófilos (Faurschou, Borregaard, 2003, Amulic et al., 2012).

Quanto à propensão à desgranulação, os grânulos azurófilos são os mais difíceis de mobilização, seguido pelos grânulos específicos, grânulos gelatinase e, finalmente, vesículas secretoras (Wright et al., 2010, Amulic et al., 2012).

O conteúdo das vesículas secretoras é importante nas fases iniciais da inflamação. Estas vesículas contêm vários receptores associados à membrana, incluindo aqueles que medeiam a interação da célula com o endotélio ativado, e outros, como receptores para complemento (CR1/CR3), FcR e receptores para N-Formilmetionina Leucil-Fenilalanina (fMLP), os quais estão envolvidos na interação hospedeiro-patógeno. Em seguida, os grânulos terciários são secretados durante o extravasamento dos neutrófilos para o tecido e chegam até o local da inflamação (Nordenfelt, Tapper, 2011).

No sítio inflamatório, ocorre a completa ativação dos neutrófilos, o que leva ao início do metabolismo oxidativo e mobilização dos grânulos azurófilos e específicos. A desgranulação dos grânulos primários e secundários contribui para a criação de um meio microbicida no local inflamatório e produz um ambiente hostil para patógenos invasores. Tais grânulos podem se fundir tanto com o fagossomo, contribuindo para as atividades antimicrobianas neste compartimento, quanto com a membrana plasmática, liberando seu conteúdo antimicrobiano para o tecido (Amulic et al., 2012).

Figura 2. Conteúdo dos grânulos dos neutrófilos, estágio de formação e propensão à desgranulação. Adaptado de Amulic et al. (2012).

Os grânulos azurofílicos sofrem exocitose limitada em resposta a estímulos e, acredita-se que possam contribuir para a morte e degradação de microrganismos que se encontram no fagolisossomo (Faurschou, Borregaard, 2003). Entre as proteínas dos grânulos azurofílicos estão aquelas com atividade antimicrobiana direta (defensinas e azurocidina, por exemplo), serino proteases (proteinase-3, catepsina G e elastase) e uma peroxidase que é expressa apenas em neutrófilos e monócitos, a mieloperoxidase (Naussef, 2007).

A elastase, em particular, apresenta como mecanismo antimicrobiano a capacidade de clivar proteínas da membrana externa e fatores de virulência de enterobactérias com alta especificidade, sugerindo uma possível co-evolução de fatores de virulência e atividade antimicrobiana. Camundongos deficientes de elastase são altamente suscetíveis às infecções fúngicas e bacterianas (Amulic et al., 2012).

A lisozima é um peptídeo antimicrobiano catiônico, cuja biossíntese está presente em todos os subconjuntos de grânulos e apresenta concentrações máximas em grânulos específicos. Esta enzima degrada as paredes celulares bacterianas através da clivagem de polímeros de peptideoglicanos e exerce atividade bactericida contra algumas bactérias gram positivas não patogênicas. Além disso, há relatos na literatura de que a lisozima se liga a lipopolissacarídeos (LPS) e reduz a produção de citocinas e a mortalidade causada por LPS em um modelo murino de choque séptico (Faurschou, Borregaard, 2003, Amulic et al., 2012).

1.3. FcγR

A atividade biológica dos anticorpos depende da interação de suas porções Fc com sistemas efetores, como células e sistema complemento. Existem receptores para a porção Fc das diferentes classes de anticorpos. Tais receptores são expressos por diferentes tipos celulares e podem gerar diferentes sinais em uma única célula, dependendo do domínio citoplasmático que tal receptor possui (Bruhns 2009).

Os receptores para a porção do fragmento cristalizável das imunoglobulinas (FcR) foram inicialmente descritos como um grupo heterogêneo de glicoproteínas de superfície de células hematopoiéticas que facilitam a interação do imunocomplexo formado com células efectoras do sistema imunológico, e, posteriormente, formas solúveis destas moléculas foram identificadas em alguns fluídos biológicos (Galon et al., 1995; Daëron, 1997). Estes receptores regulam uma variedade de respostas imunológicas, humoral e celular, incluindo fagocitose, desgranulação, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), *clearance* de imunocomplexos, dentre outras (Li et al., 2009).

Os Fc γ R atuam como um elo entre a imunidade humoral e ramos do sistema imunológico celular. Tais receptores conferem potentes funções efetoras aos leucócitos em consequência da sua ligação à IgG (van Sorge et al., 2003), apresentando importância no *clearance* de imunocomplexos e ligação a antígenos complexados (Daëron, 1997).

Em humanos, existem três famílias de Fc γ R que se diferenciam de acordo com a homologia estrutural, afinidade e especificidade às subclasses de IgG, expressão nas células e funções biológicas: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16), além do receptor neonatal para IgG (FcRn) (Pradhan et al., 2008, Li et al., 2009).

Estes receptores podem ser classificados como receptores de ativação (Fc γ RI, Fc γ RIIa/c, Fc γ RIII) ou de inibição (Fc γ RIIb), quanto a sua capacidade de estimular ou inibir funções como fagocitose, citotoxicidade, desgranulação, apresentação de antígenos e produção de citocinas via motivos de ativação ou inibição de imunoreceptor baseados em tirosina, ITAM ou ITIM, respectivamente (Li et al., 2009).

A família de Fc γ R também pode ser dividida em receptores de alta afinidade para IgG (Fc γ RI) ou de baixa a média afinidade (Fc γ RII e Fc γ RIII). Quanto à sua estrutura, os Fc γ R podem apresentar dois ou três domínios extracelulares (EC) semelhantes a imunoglobulinas altamente conservados entre as diferentes classes destes receptores. Além dos domínios EC, os Fc γ R possuem domínios transmembranas (TM) e domínios citoplasmáticos (C), sendo este último de estrutura variável entre as classes de Fc γ R (Gessner et al., 1998). O Fc γ RI tem um terceiro domínio semelhante a Ig considerado importante para o aumento da afinidade para IgG. Os receptores de baixa afinidade apresentam uma interação fraca com a porção Fc e geralmente são incapazes de se ligar estavelmente à IgG monomérica (Niederer et al., 2010). A Figura 3 ilustra as estruturas dos receptores para IgG.

O sítio de ligação para a IgG encontra-se no domínio EC de uma cadeia de aminoácidos, denominada cadeia α , presente nos Fc γ R. Alguns dos Fc γ R são moléculas formadas apenas por esta cadeia α (receptores de cadeia única: Fc γ RIIb, Fc γ RIIa/c e Fc γ RIIIb), com a sequência transdutora de sinal no seu domínio C, enquanto outros são complexos de uma ou mais cadeias (γ , β , ou ζ) associadas à cadeia α (receptores de cadeias múltiplas: Fc γ RI, Fc γ RIIIa e FcRn), e a sequência transdutora de sinal encontra-se no domínio C das moléculas acessórias. Todavia, a cadeia α do Fc γ RIIIb não apresenta os domínios TM e C e, então, a expressão deste receptor na membrana dos neutrófilos é mediada por uma molécula âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Daëron, 1997, Selvaraj et al., 1988, Marzocchi-Machado, Lucisano-Valim, 2005).

Figura 3. Estruturas dos receptores para IgG (FcγR). ITAM, motivo de ativação de imuno-receptor baseado em tirosina; ITIM, motivos de inibição de imuno-receptor baseados em tirosina; GPI, glicosil-fosfatidil-inositol; D1/2/3, domínios extracelular 1, 2 ou 3; TM, transmembrana. Adaptado de Niederer et al. (2010).

Os genes para FcγR (FCGR) humanos constituem uma família de oito genes localizados no braço longo do cromossomo 1 (1q21–23) (Salmon, Pricop, 2001; van Sorge et al., 2003). Na posição 1q23 deste cromossomo, se localizam genes agrupados que constituem o locus FCGR2-FCGR3, sendo eles FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A e FCGR3B. A existência desta diversidade de genes é vista como resultado da duplicação de genes e eventos de recombinação, seguidos por mutações durante a evolução (Pradhan et al., 2008).

A subclasse de receptores FcγRII envolve três genes (FCGR2A, FCGR2B e FCGR2C), cujos produtos de transcrição são as proteínas FcγRIIa, FcγRIIb e FcγRIIc. Os FcγRII (CD32) são os receptores de baixa afinidade para IgG mais amplamente distribuídos. Enquanto os FcγRIIa e FcγRIIc apresentam um motivo de ativação baseado em tirosina, o FcγRIIb é o único receptor que contém um motivo de inibição em seu domínio citoplasmático. Ainda quanto aos FcγRII, estes são expressos constitutivamente em neutrófilos e se ligam à IgG monomérica com baixa afinidade e apresentam afinidade maior para dímeros ou agregados de IgG (Li et al., 2009).

Quanto à família FcγRIII, dois genes (FCGR3A e FCGR3B) codificam os receptores FcγRIIIa e FcγRIIIb como produto de transcrição, respectivamente. A subclasse FcγRIII é considerada de baixa afinidade; entretanto, FcγRIIIa se liga à IgG monomérica com uma afinidade intermediária e tanto FcγRIIIa quanto FcγRIIIb se ligam a IgG multimérica e a imunocomplexos eficientemente. (Li et al., 2009)

O engajamento de imunocomplexos de IgG com FcγRIIa ou FcγRIIIb inicia respostas funcionais muito diferentes nos neutrófilos. A sinalização via FcγRIIa inicia a quimiotaxia, fagocitose e destruição do patógeno quando os neutrófilos são estimulados com bactérias opsonizadas com soro. Por outro lado, FcγRIIIb tem demonstrado um papel na secreção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em resposta ao estímulo de imunocomplexos, mas pouco ou nenhum papel na fagocitose ou destruição de bactérias opsonizadas. Além disso, os neutrófilos de indivíduos que são deficientes geneticamente de FcγRIIIb não mostraram prejuízo na fagocitose e destruição do patógeno (Niederer et al., 2010).

Baseando-se em suas funções biológicas e localização cromossomal, os FCGR podem estar relacionados à suscetibilidade ao LES. Um grande número de polimorfismos tem sido descrito entre as sequências gênicas que codificam os receptores FcγRIIa, IIA, IIB e IIIB. Além disso, polimorfismos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphisms-SNP*) encontrados nestes quatro genes exibem funções biológicas diferentes entre os genótipos encontrados (Salmon, Pricop, 2001, Lee et al., 2009).

1.4. FcγRIIa (CD32a)

O polimorfismo do gene FcγRIIA é o mais estudado e aparentemente de maior interesse e implicações clínicas. O produto deste gene é o FcγRIIa, a subclasse de FcγR mais amplamente distribuída e expressa em neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e plaquetas (Daëron, 1997, van Sorge et al., 2003, Marzocchi-Machado, Lucisano-Valim, 2005). O gene FCGR2A tem dois alelos expressos codominantemente, H131 e R131, que se diferenciam pelo aminoácido da posição 131 no domínio extracelular, onde ocorre a substituição de uma histidina por uma arginina, respectivamente (Figura 4A). Tal mutação ocorre no domínio de ligação à IgG; assim, as variantes polimórficas apresentam diferenças na habilidade de se ligar à IgG2 humana, uma subclasse de IgG específica para as porções de carboidratos nas cápsulas bacterianas (Salmon, Pricop, 2001). A variante FcγRIIa-R131 tem menor afinidade para a IgG2, e esta característica, consequentemente, prejudica a fagocitose mediada por esta imunoglobulina (Warmerdan et al., 1990).

O alótipo FcγRIIa-H131 é o único capaz de ligar IgG2 eficientemente, o que lhe confere um importante papel na imunidade mediada pela opsonina IgG2 (Niederer et al., 2010). Esta subclasse de IgG é essencial para a defesa contra bactérias encapsuladas, tais como *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* (Kimberly et al., 1995). Os neutrófilos de indivíduos homozigotos para FcγRIIa-H/H131 fagocitam bactérias opsonizadas por IgG2

mais eficientemente do que as células FcγRIIa-R/R131 (Sanders et al., 1995). Uma vez que a IgG2 é um ativador fraco do sistema complemento, o polimorfismo do FcγRIIa pode ser mais crítico para os mecanismos de defesa contra patógenos encapsulados, quando os níveis de IgG2 estão relativamente baixos, como por exemplo em crianças (Bredius et al., 1994), ou ainda, quando os níveis séricos de complemento estão reduzidos, como no LES. Esta importância do polimorfismo do FcγRIIa é reforçada pelos estudos epidemiológicos, que mostram uma baixa incidência de infecções por bactérias encapsuladas na população japonesa, onde o alótipo FcγRIIa-H/H131 é predominante (Ohto, Matsuo, 1989).

Clinicamente, o interesse para o estudo dos FcγR tem origem nos mecanismos de *clearance* de imunocomplexo (IC) (Schifferli, Taylor, 1989). O LES é um exemplo clássico de doença autoimune mediada por IC, onde a disfunção dos FcγR correlaciona-se com a atividade da doença, nefrite e com os níveis séricos de IC (Kimberly et al., 1983, Duits et al., 1995, Marzocchi-Machado et al., 2002, Bazílio et al., 2004). Algumas manifestações do LES, tais como anemia hemolítica autoimune e hipocomplementemia pronunciada (Rascu et al., 1997), foram mais frequentes em pacientes com homozigose para o alelo R131 do FcγRIIa.

Alguns estudos já relacionaram o polimorfismo do FCGR2A com a suscetibilidade ao LES (Dijstelbloem et al., 2000; Salmon et al., 1996) e a presença do alelo FcγRIIa-R-131 também tem sido associada às infecções pneumocócicas invasivas em pacientes com LES, mesmo na ausência de terapia imunossupressora, hipocomplementemia, baixos níveis de IgG2 e neutropenia (Yee et al., 1997). Além disso, a defesa efetiva contra o *Streptococcus pneumoniae* mostrou ser dependente da fagocitose da bactéria mediada pela IgG2, que é determinada pelo polimorfismo do FcγRIIa. A homozigose para os alótipos H131 e a heterozigose H/R131 foi protetora para a sepse pneumocócica, enquanto que o alótipo R131 foi associado ao maior risco desta infecção em crianças (Yuan et al., 2003).

Streptococcus pneumoniae e *Neisseria meningitidis* são os principais causadores de sepse e meningite (Brouwer et al., 2009). Os pacientes com LES, que foram esplenectomizados, têm um maior risco de doenças pneumocócicas e infecções por outros encapsulados. As manifestações da infecção pneumocócica, tais como sepse, pneumonia e meningite são bem documentadas no LES, sendo o pneumococo responsável por 6-18% de todas as infecções bacterianas nesta doença (Fessler, 2002).

Vários fatores de risco têm sido identificados para as doenças estreptocócicas e meningocócicas, mas a causa para as diferenças na suscetibilidade entre os indivíduos e as populações ainda é desconhecida. Alguns polimorfismos genéticos de um único nucleotídeo

são candidatos para explicar estas diferenças e um deles é o polimorfismo dos FcγR (Brouwer et al., 2009). Isso reforça o interesse no entendimento da associação entre o polimorfismo dos FcγR, o LES e as infecções bacterianas.

Figura 4. Representação esquemática das variantes polimórficas dos FcγR. **(A)** Polimorfismo do FcγRIIa: R-131, arginina na posição 131; H-131, histidina na posição 131; EC, extracelular; TM, transmembrana; C, citoplasmático. **(B)** Polimorfismo do FcγRIIIb: HNA, antígeno de neutrófilo humano (1a e 1b); ITAM: motivo de ativação de imunoreceptor baseado em tirosina; GPI: glicosil fosfatidil inositol. Adaptado de Marzocchi-Machado, Lucisano-Valim (2005).

1.5. FcγRIIIb (CD16b)

O gene FCGR3B é o único entre os FCGR que codifica um receptor ancorado na membrana por uma molécula de glicosil fosfatidil inositol (GPI), o receptor FcγRIIIb (Li et al., 2009), uma proteína composta por 184 aminoácidos (Muschter et al., 2011). Este receptor é restrito a humanos, expresso constitutivamente apenas em neutrófilos e uma pequena subpopulação de basófilos e se liga a imunocomplexos de IgG com baixa afinidade. Tal receptor é altamente abundante, atingindo um número de 100000 a 300000 receptores por célula (Niederer et al., 2010).

Quanto ao polimorfismo do FCGR3B, três variantes alotípicas foram identificadas através de estudos sorológicos: NA1, NA2 e SH, posteriormente renomeadas de aloantígeno de neutrófilo humano (HNA)-1a, -1b e -1c (Gittinger, Bux, 2001). A Tabela 1 apresenta a nomenclatura utilizada para identificar o polimorfismo do receptor FcγRIIIb.

Tabela 1. Nomenclatura utilizada para identificar os alelos do gene FCGR3B (receptor FcγRIIIb).

<i>Antígeno (fenótipo)</i>	<i>Alelo</i>	<i>Nomenclatura formal</i>
HNA-1a	FCGR3B*01	NA1
HNA-1b	FCGR3B*02	NA2
HNA-1c	FCGR3B*03	SH

Adaptado de Gittinger, Bux (2001)

Seis mutações pontuais (*single nucleotide polymorphism* – SNP) diferem as três variantes (NA1, NA2 e SH); destas, 5 são mutações não sinônimas, ou seja, codificam aminoácidos diferentes, e 1 sinônima. Os cinco aminoácidos trocados estão todos localizados no primeiro domínio extracelular da molécula (Li et al., 2009). Os alótipos FcγRIIIb-HNA-1a e FcγRIIIb-HNA-1b diferem entre si devido às substituições nos aminoácidos das posições 65 e 82, resultando em dois sítios extras de glicosilação no HNA-1b (Salmon et al., 1990), como ilustrado na Figura 4B. Em relação ao HNA-1c, este alótipo é resultante de uma mutação no gene FCGR3B-HNA-1b; a troca de uma citosina por uma adenina na posição 266 resulta na substituição de uma alanina por um ácido aspártico (Bux et al., 1997). Além disso, tem sido descrito que indivíduos que carregam o alótipo HNA-1c apresentam um aumento no número de cópias do gene FCGR3B, levando também a uma hiperexpressão do receptor FcγRIIIb (Muschter et al., 2011). A Tabela 2 mostra as três variantes alótípicas geradas pelo polimorfismo do FcγRIIIb.

Tabela 2. Mutações pontuais observadas entre as três variantes alélicas do FcγRIIIb

<i>Variantes alélicas</i>	<i>Posição do nucleotídeo</i>						<i>Posição do aminoácido</i>					
	141	147	227	266	277	349	36	38	65	78	82	106
<i>HNA-1a</i>	G	C	A	C	G	G	Arg	Leu	Asn	Ala	Asp	Val
<i>HNA-1b</i>	C	T	G	C	A	A	Ser	Leu	Ser	Ala	Asn	Ile
<i>HNA-1c</i>	C	T	G	A	A	A	Ser	Leu	Ser	Asp	Asn	Ile

Adaptado de Li et al. (2009)

Os neutrófilos de indivíduos com o alótipo FcγRIIIb-HNA-1b apresentam uma menor afinidade à IgG1 e IgG3, o que leva a uma menor eficiência para a fagocitose mediada por essas imunoglobulinas, quando comparados com os neutrófilos do alótipo FcγRIIIb-HNA-1a

(Muschter et al., 2011). No entanto, estes alótipos não apresentam diferenças quanto à fagocitose mediada por IgG2 (SALMON et al., 1990; BREDIUS et al., 1994).

Quanto à relevância clínica do polimorfismo do FcγRIIIb, há uma associação altamente significativa entre o fenótipo combinado das homozigoses para ambos FcγRIIa-R131 e FcγRIIIb-HNA-1b e infecções meningocócicas em pacientes com deficiência de componentes da via terminal do sistema complemento (Fijen et al., 1993).

Embora alguns estudos tenham mostrado uma associação do alelo FcγRIIIb-HNA-1b com linfocitopenia no LES (Jönsen et al., 2007) e maior frequência deste alótipo na doença (Hatta et al., 1999), não há diferenças entre os alótipos HNA-1a e HNA-1b quanto às afinidades de ligação às subclasses de IgG (Bruhns et al., 2008). Esta associação pode ser dependente do número de cópias do gene FcγRIIIB. Willcocks et al. (2008) observaram que a redução do número de cópias do gene FcγRIIIB correlaciona-se com a redução da sua expressão e da sua função nos neutrófilos em pacientes com LES, o que também foi relacionado com glomerulonefrite (Aitman et al., 2006).

Em neutrófilos, a função mediada pelo FcγRIIIb depende da cooperação com outros receptores. Os neutrófilos humanos expressam constitutivamente as isoformas FcγRIIa e FcγRIIIb. A expressão do FcγRIIIb é predominante no neutrófilo, com $1-3 \times 10^6$ moléculas/célula, comparada ao FcγRIIa com $1-2 \times 10^4$ moléculas/célula (Unkless et al., 1995). Embora o FcγRIIIb não possua sequência de sinalização no citoplasma, a sua interação com outros receptores na superfície celular é importante para uma resposta efetora completa, visto que a cooperação do FcγRIIIb com o FcγRIIa e o CR3 (CD11b, CD18; Mac-1) é necessária para a fagocitose, ADCC e desgranulação eficientes (Hundt, Schimdt, 1992). Além disso, é a coagregação dos FcγRIIIb nos neutrófilos que leva à ativação celular (Zhou, Brown, 1994).

1.6. Receptores para complemento (CR)

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 (Medof et al., 1982, Huang, 2010).

O receptor para complemento do tipo 1 (CR1), também denominado CD35 ou receptor para C3b/C4b é uma glicoproteína intrínseca de membrana expressa em eritrócitos, na maioria dos leucócitos e células glomerulares (Fearon, 1980). Na circulação, 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 et al.,

1986). Este receptor desempenha um importante papel relacionado à fagocitose de partículas opsonizadas por C3b e C4b (Medof et al., 1982).

O CR1 tem sido associado ao *clearance* ineficiente de IC no LES. Embora o CR1 apresente um polimorfismo numérico de expressão, este polimorfismo não está relacionado com o LES. A redução da expressão do CR1 parece ser uma característica adquirida com a atividade da doença (Iida et al., 1982; Wilson et al., 1986; Marzocchi-Machado et al., 2002, 2005).

Quanto ao receptor para complemento 3 (CR3), também conhecido com CD11b/CD18, Mac-1 ou $\alpha_M\beta_2$ -integrina, este é um heterodímero da família das β integrinas que têm um importante papel nos processos de adesão celular e fagocitose. Desta forma, CD11b/CD18 liga-se a um amplo número de ligantes, incluindo proteínas da matriz extracelular e proteínas da coagulação. Tal receptor é indicado como a principal molécula de adesão em interações entre leucócitos e células endoteliais ou plaquetas (Sachs et al., 2004).

A molécula do complemento C3b, um produto de clivagem do ligante C3, recobre microorganismos invasores e é clivada à forma C3bi, a qual é reconhecida pelo CR3. O CR3 se liga a este C3bi e tem função de mediar a fagocitose de partículas opsonizadas com esta proteínas do complemento. (Huang et al., 2011)

A subunidade CD11b do receptor é conhecida por ser polimórfica e imunogênica (Sachs et al., 2004). Em 1996, Simsek et al. descreveram um polimorfismo para a subunidade CD11b, onde uma mutação de uma guanina (G) para uma adenina (A) na posição 230 leva a alteração do aminoácido arginina por histidina na posição 61 e está associada com o aloantígeno HNA-4a (Bux, 2008). Este antígeno é denominado aloantígeno dos neutrófilos humanos 4a (HNA-4a) e indivíduos que carregam o alelo R61 (G230) são designados Mart-positivo enquanto os indivíduos homozigotos para H61 (A230) Mart-negativos (Sachs et al., 2004). A variante polimórfica HNA-4a-positivo é encontrada em mais de 90% da população brasileira (Cardone et al., 2006). Há relato de que aloanticorpos anti-HNA-4a estariam envolvidos na redução do *burst* oxidativo dos neutrófilos (Bux, 2008). No entanto, ainda não é sabido se a função do CR3 é influenciada pelo polimorfismo do HNA-4a.

Há evidência de que a sinalização através de CR3 possa influenciar a sinalização por Fc γ R. Estudos mais antigos já demonstravam que a presença da molécula C3 reduz drasticamente a quantidade de IgG necessária para induzir a ingestão de partículas mediada por Fc γ R (Schreiber et al., 1975, Ehlenberger, Nussenzweig, 1977). Ainda, outro estudo mostrou que o bloqueio do receptor CR3 com anticorpos anti-CR3 leva à redução da

fagocitose mediada por FcγR, sem o prejuízo da ligação entre IgG e este receptor (Brown et al., 1988).

1.7. Cooperação FcγR/CR

Como é sabido, o receptor FcγRIIIb se encontra ancorado na célula através de uma molécula de GPI por não possuir domínios transmembrana e citoplasmático; sendo assim, tal receptor não possui sequência de sinalização intracelular. Alternativamente, este receptor pode interagir com outros receptores de superfície celular, como a β2 integrina (CD11b/CD18) e FcγRIIa (Marzocchi-Machado, Lucisano-Valim, 2005, Li et al., 2009, Niederer et al., 2010). Tais interações podem ser essenciais para a função do FcγRIIIb, pois, devido à ausência destes domínios, certas interações intermoleculares tornam-se cruciais para o desempenho da função do FcγRIIIb. Assim, a diferença no número de sítios de glicosilação de HNA-1a e HNA-1b pode ser responsável pelo desencadeamento de respostas divergentes em cada um dos fenótipos (Li et al., 2009).

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). O CR3 liga-se aos IC opsonizados pelo complemento, mas também interage diretamente com o FcγRIIIb. A ativação simultânea do FcγRIIIb e CR3 leva ao *burst* oxidativo em neutrófilos, devido à fosforilação do domínio citoplasmático do FcγRIIa e ao *cross-linking* do CR3, que induz a associação do FcγRIIa com o citoesqueleto (Zhou, Brown, 1994). Assim, alguns estudos sugerem que, em neutrófilos, o FcγRIIIb, embora não possua domínios TM ou C, este receptor seria importante para o acúmulo de IC na membrana para ativar o FcγRIIa e para estimular o aumento do influxo de cálcio, enquanto que o FcγRIIa seria o responsável pelo potencial de membrana e geração de superóxido (Brunkhorst et al., 1992; Zhou et al., 1993).

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 (ROSS et 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.

1.8. Lúpus Eritematoso Sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica sistêmica, de etiologia multifatorial, que se caracteriza por acometer diversos órgãos e sistemas e apresentar importantes distúrbios imunológicos. A doença é um protótipo de doenças autoimune e caracteriza-se pela formação de autoanticorpos dirigidos contra antígenos nucleares e deposição de imunocomplexos, os quais participam de lesão tissular imunologicamente mediada (Li et al., 2009, Freire et al., 2011, Neméth, Mócsai 2012).

O LES é a doença autoimune mais diversificada clínica e sorologicamente, com mais de 100 autoanticorpos identificados em pacientes, e apresenta um amplo espectro de sintomas, os quais compreendem os sintomas mais sutis até risco de vida e falência múltipla de órgãos (Liu, Ahearn, 2009).

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 (Cuchacovich, Gedalia, 2009).

As manifestações clínicas do LES são variadas, podendo envolver qualquer órgão ou sistema, isolada ou simultaneamente, em qualquer período da doença. O LES acomete principalmente as articulações, a pele, as células sanguíneas, os vasos sanguíneos, as membranas serosas, os rins e o cérebro. Por ser uma doença multissistêmica, muitas vezes de início insidioso e com apresentação clínica variável, o diagnóstico de LES pode ser difícil, principalmente na avaliação inicial (Freire et al., 2011).

Nenhuma alteração clínica ou laboratorial, isoladamente, pode ser responsável pelo diagnóstico do LES, apesar de algumas dessas alterações serem muito sugestivas de tal enfermidade. Em 1982, o *American College of Rheumatology* (ACR) propôs os critérios de classificação para LES (Tan et al., 1982), e tais critérios são frequentemente utilizados para diagnóstico de pacientes com LES. Quanto ao controle da atividade da doença, em 1985 foi desenvolvido e validado um índice da atividade da doença (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* - SLEDAI) que tem sido utilizado com sucesso pelos clínicos da área (Gladman 2002).

Admite-se que fatores genéticos, ambientais e hormonais possam desencadear, em conjunto, o LES. A interação de múltiplos fatores ao atingir um limiar de efeitos de suscetibilidade leva à perda do controle imunorregulatório, ocasionando o desenvolvimento de autoanticorpos, deficiência na remoção de imunocomplexos, ativação do sistema de complemento e de outros processos inflamatórios que levam à lesão tissular (Rhodes, Vyse, 2008, Freire et al., 2011).

Entre os fatores etiológicos podem-se destacar os fatores genéticos, considerando-se que a doença é uma desordem poligênica e numerosos genes têm sido identificados; e fatores ambientais, especialmente raios ultravioleta, infecções virais, fatores emocionais, substâncias químicas e hormônios sexuais. Embora o desenvolvimento do LES ocorra em ambos os sexos e independe da faixa etária, tem maior incidência em mulheres (9:1) e o pico de incidência é em torno de 30 anos de idade (Pradhan et al., 2008; Liu, Ahearn, 2009; Freire et al., 2011).

Alguns genes têm merecido destaque em virtude das evidências de sua associação com as anormalidades observadas no LES. Dentre estes se encontram os FCGR, o FCGRIIA e o FCGRIIIIB (Kinder et al. 2007; Rhodes, Vyse, 2008).

No LES, os FcγR estão envolvidos na destruição de células normais opsonizadas com autoanticorpos ou no clearance ineficiente de IC. A ineficiência para remover IC solúveis descrita nesta doença leva à deposição destes complexos nos tecidos, estimulando inflamação e destruição tecidual, que é característica da reação de hipersensibilidade do tipo III (Davies et al., 1994; Jancar, Sánchez Crespo, 2005).

Uma vez que a interação dos neutrófilos com os IC é mediada por FcγR e CR, presentes nestas células, as anormalidades, genéticas ou adquiridas, nestas moléculas podem contribuir para os mecanismos de lesão tecidual, a fagocitose ineficiente e as infecções observadas no LES. É possível que todo este comprometimento da resposta imune no LES seja resultante de defeitos na expressão e função dos FcγR determinados pelo polimorfismo genético e por variantes do número de cópias destes genes (Li et al., 2009).

O polimorfismo genético do FCGRIIA e do FCGRIIIIB determina a expressão de variantes alélicas (alótipos), as quais apresentam diferenças funcionais quanto à capacidade de ligação à IgG e, conseqüentemente, influenciam as respostas celulares mediadas por estas moléculas (Kimberly et al., 1995; Daëron, 1997).

Os FcγR são importantes mediadores das funções efectoras do neutrófilo e atuam em sinergismo com os CR (CR1 e CR3) para assegurar a eficiência desta célula nos mecanismos de destruição de patógenos. Os FcγR estimulam respostas inflamatórias, citotóxicas, de hipersensibilidade, endocíticas e fagocíticas das células efectoras do sistema imune. A ativação e regulação destas funções mediadas pelos FcγR estão envolvidas na fisiopatologia da autoimunidade no LES e várias anormalidades envolvendo estes receptores têm sido descritas no LES (Iliopoulos, Tsokos, 1996; Cuchacovich, Gedalia, 2009).

.....

Justificativa

.....

2. Justificativa

O nosso grupo de pesquisa tem descrito alterações nas funções efetoras de *clearance* de imunocomplexos, mediadas por Fc γ R e/ou CR, no LES (Marzocchi-Machado et al., 2002, 2005, Alves, et al., 2008). Entretanto, tais estudos não consideram os polimorfismos dos Fc γ R, os quais têm sido associados com as disfunções imunes no LES (Rhodes, Vyse, 2008).

Os Fc γ R são importantes mediadores das funções efetoras do neutrófilo e atuam em sinergismo com os CR. O polimorfismo dos genes Fc γ RIIA e Fc γ RIIIB 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.

Assim, a identificação das combinações dos genótipos para os Fc γ R e CR3 e a investigação dos papéis específicos destes receptores, bem como a cooperação entre eles, considerando os diferentes genótipos, pode contribuir para o entendimento das anormalidades nas funções efetoras dos neutrófilos em pacientes com LES.

.....

Objetivos

.....

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Determinar a associação dos polimorfismos dos Fc γ R e do CR3 no lúpus eritematoso sistêmico e sua influência na fagocitose e desgranulação dos neutrófilos.

3.2. Objetivos específicos

- a) determinar as frequências das variantes polimórficas para o Fc γ RIIa: H131 e R131;
- b) determinar as frequências das variantes polimórficas para o Fc γ RIIIb: HNA-1a, HNA-1b e HNA-1c;
- c) determinar as frequências das variantes polimórficas para o CR3: HNA-4a-positivo e HNA-4a-negativo;
- d) analisar as frequências das combinações entre variantes polimórficas para Fc γ RIIa, Fc γ RIIIb e CR3;
- e) quantificar a expressão dos Fc γ RIIa (CD32), Fc γ RIIIb (CD16) e CR3 (CD11b, CD18) nos neutrófilos;
- f) avaliar a influência das diferentes variantes polimórficas para Fc γ RIIa, Fc γ RIIIb e CR3 na fagocitose dos neutrófilos mediada por Fc γ R e Fc γ R/CR;
- g) avaliar a influência das diferentes variantes polimórficas para Fc γ RIIa, Fc γ RIIIb e CR3 na desgranulação dos neutrófilos mediada por Fc γ R e Fc γ R/CR;
- h) relacionar a ocorrência das infecções bacterianas, registradas nos prontuários, com as diferentes combinações das variantes polimórficas de Fc γ RIIa, Fc γ RIIIb e CR3.

Resumo das Atividades Desenvolvidas

4. Resumo das Atividades Desenvolvidas

O Fluxograma 1 descreve, brevemente, as atividades desenvolvidas durante a realização deste trabalho. A partir da colheita das amostras sanguíneas de pacientes e indivíduos controles, as atividades foram organizadas conforme demonstrado neste fluxograma.

Fluxograma 1. Organização das atividades desenvolvidas. LES, lúpus eritematoso sistêmico; SLEDAI, índice de atividade da doença (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*); EDTA, ácido etileno diamino tetracético; SHN, soro humano normal; SHI, soro humano inativado; PCR, reação em cadeia da polimerase; CR, receptor para complemento; FcγR, receptores para imunoglobulina G.

5. Casuística e Metodologia

5.1. Casuística

O projeto de pesquisa recebeu parecer favorável do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) para o seu desenvolvimento (Anexo I). Este protocolo de pesquisa foi delineado de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS, Brasil, 1996).

Os pacientes com LES envolvidos neste estudo 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, docentes do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP.

Todos os pacientes com LES incluídos no trabalho foram diagnosticados segundo os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia para o LES (Tan et al., 1982).

Os índices de atividade da doença foram avaliados de acordo com o *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) (Bombardier et al., 1992). Os índices foram considerados se presentes na data da colheita sanguínea ou, no máximo, dez dias que a precederam. Os pacientes que apresentaram um valor maior ou igual a três do SLEDAI foram adicionados ao grupo de LES ativo; um valor menor que três indicou doença inativa (SLEDAI < 3). Tanto pacientes com LES ativo, quanto com LES inativo, foram incluídos no estudo.

O índice de atividade da doença foi calculado para todos os pacientes incluídos nos ensaios funcionais e na análise da expressão dos receptores. Os valores médios do SLEDAI foram $6,07 \pm 2,8$ e $1,1 \pm 0,96$, para LES ativo e inativo, respectivamente.

O grupo controle foi constituído por voluntários saudáveis, doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto - Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP. Os voluntários saudáveis foram selecionados considerando-se os sexos e as idades dos pacientes com LES, sendo que para cada paciente estudado admitiu-se um voluntário saudável de mesmo sexo e faixa etária.

Todos os doadores voluntários, ao serem convidados a participar da pesquisa, foram esclarecidos sobre o protocolo de pesquisa e, aqueles que concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O critério de exclusão geral, para pacientes e controles, foi o tabagismo e/ou uso de medicamentos controlados e gravidez. Para o grupo de LES, o critério de exclusão utilizado foi a terapia imunossupressora recente, inferior a três meses, e corticoterapia esteroideal maior

ou igual a 10mg/dia. Para o grupo controle, o critério de exclusão foi o uso de anti-inflamatórios há menos de sete dias.

Cento e sessenta e seis (166) pacientes com LES foram incluídos em nosso estudo e cento e quarenta e sete (147) indivíduos saudáveis. Destes, 21 pacientes eram do sexo masculino e 145 do sexo feminino, com idade média de $37,71 \pm 7,07$ e $44,96 \pm 13,52$, respectivamente.

Para a genotipagem, 157 amostras de sangue de pacientes com LES e cento e quarenta e sete (147) de controles foram coletadas e os respectivos ácidos desoxirribonucléicos (DNA) foram extraídos e armazenados. Destas, 18 pacientes eram homens e 139 mulheres, com idade média de $38,88 \pm 12,99$ e $45,38 \pm 13,45$, respectivamente; e para os indivíduos saudáveis, 76 eram homens e 71 mulheres, com idade média de $36,04 \pm 11,40$ e $36,59 \pm 10,75$, respectivamente.

Para a expressão dos receptores, foram incluídos no estudo 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 os ensaios funcionais, 42 amostras de pacientes com LES e o mesmo número de indivíduos saudáveis foram incluídas no estudo. Destas, amostras de 26 pacientes e de seus respectivos controles foram submetidas à avaliação funcional dos neutrófilos pelo ensaio de fagocitose, sendo 13 pacientes com LES ativo (11 mulheres e 2 homens, com média de idade de $33,6 \pm 11,17$ e $39 \pm 14,14$, respectivamente), 13 pacientes com LES inativo (7 mulheres e 6 homens, com média de idade de $34,14 \pm 10,25$ e $27,2 \pm 5,6$, respectivamente) e 26 controles (19 mulheres e 7 homens, com média de idade de $33,8 \pm 10$ e $31,7 \pm 9,4$, respectivamente). Para os ensaios de desgranulação, 30 pacientes e seus respectivos controles foram incluídos no estudo, tanto para a quantificação da enzima elastase quanto para a lisozima. Destes, 20 pacientes apresentavam LES em atividade (19 mulheres e 1 homem, com média de idade de $33,6 \pm 13$ e 26, respectivamente), 10 pacientes com LES inativo (6 mulheres e 4 homens, com média de idade de $37,3 \pm 11,6$ e 34 ± 11 , respectivamente) e 30 indivíduos controles (25 mulheres e 5 homens, com média de idade de $35,76 \pm 12,1$ e $30,4 \pm 8,9$, respectivamente).

O número de indivíduos incluídos nos ensaios funcionais variou de acordo com o rendimento de células em cada dia de experimento.

5.2. Principais reagentes utilizados

Os protocolos seguidos para o preparo das principais soluções utilizadas estão descritos no Anexo II.

5.2.1. 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.

5.2.2. 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.

*Oligonucleotídeos – 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 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'

5.2.3. Corrida do gel

- *Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH8,3.
- *Solução de agarose, Uniscience, 2% em TBE, São Paulo, Brasil.
- *Tampão de amostra: azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%.
- *GelRed – Uniscience.
- *Marcador de pares de base (pb): 50pb DNA Ladder – Fermentas.

5.2.4. Purificação de neutrófilos

- *Solução de Hanks pH7,2 (PAUL, 1970).
- *Solução de Alsever (tampão citrato com azida sódica pH6,1).
- *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 (pH7,2).
- *Solução fisiológica (NaCl 0,15 mol/L).
- *Solução de NH₄Cl 0,83% pH7,2.
- *Solução de gelatina (Difco) 2,5% em NaCl 0,15 mol/L.

5.2.5. Ensaio de fagocitose

- *Solução de Hanks pH7,2 (PAUL, 1970).
- *Solução de gelatina (Difco) 2,5% em NaCl 0,15M.
- *Citocalasina D - Sigma Aldrich (C8273).
- *EDTA/NaCl (0,1M, pH 4,4).
- *Anticorpo anti-albumina de soro bovino (BSA) de alta afinidade funcional - via imunização de coelha, padronizado previamente em nosso laboratório (MAZOCCHI-MACHADO et al; 1999).
- *BSA marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) - (Sigma Aldrich A9771).
- *PBS – salina tamponada com fosfato, pH 7,4.
- *PBS/citrato 0,02M.
- *Azul de Tripán – (C.I. 23850) Vetec Química Fina (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

5.2.6. Ensaios de desgranulação

Lisozima

- *Solução de Hanks pH 7,2 (PAUL, 1970).
- *Solução de gelatina (Difco) 2,5% em NaCl 0,15M.
- *Citocalasina B (0,03M).
- *fMLP (N-Formyl-Met-Leu-Phe) - Sigma Aldrich (F3506).
- **Micrococcus lysodeikticus* - Sigma Aldrich (M3770).
- *Lisozima padrão - Sigma Aldrich (L6876).
- *Tampão fosfato (K_2HPO_4 - 0,1M pH 7,0).
- *Anticorpo anti-BSA de alta afinidade funcional.
- *BSA - Sigma Aldrich (A7638).

Elastase

- *Solução de Hanks pH 7,2 (PAUL, 1970).
- *Solução de gelatina (Difco) 2,5% em NaCl 0,15M.
- *Citocalasina B (0,03M).
- *fMLP (N-Formyl-Met-Leu-Phe) - Sigma Aldrich (F3506).
- *N-succinyl-alanina-alanina-valina-p-nitroanilida (SAAVNA) (Calbiochem - 454454, Merck-KGaA, Darmstadt, Hessen, Germany).
- *Anticorpo anti-BSA de alta afinidade funcional.
- *BSA - Sigma Aldrich (A7638).

5.2.7. Expressão de receptores

- *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 kappa de camundongo, marcado com ficoeritrina (PE), clone MOPC-21, código 555749 – PHARMINGEN, San Diego, CA – USA.
 - Anti-CD11b/Mac-1 humano, marcado com PE, clone ICRF44, IgG1 de camundongo, código 555388 – PHARMINGEN.
 - Controle isotípico IgG1 de camundongo, marcado com FITC, clone MOPC-21, código 555748 – PHARMINGEN.

- Anti-CD32 humano, marcado com FITC, clone FLI826(2003), IgG2b de camundongo, código 555448 – 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-CD16 humano, purificado, clone 3G8, IgG1 de camundongo, código 555403 – PHARMINGEN.
- Anti-CD11b/Mac-1 humano, purificado, clone ICRF44, IgG1 de camundongo, código 555385 – PHARMINGEN.
- Controle isotípico (anti-TNP) IgG1 de camundongo, purificado, NA/LE, clone 107,3, código 555721 – PHARMINGEN.

5.3. 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).
- *Microscópio Óptico Olympus BX51 (Almada, Setúbal, Portugal).
- *Espectrofotômetro PG Instruments Ltd T-70 (Ramsey, Minnesota, USA).
- *Espectrofotômetro Hitachi U-2910 (Tokio, Japan)
- *Fonte de eletroforese Termo EC 3000 XL Power Supply (Dubuque, Iowa, USA).
- *Termociclador Eppendorf – Mastercycler Gradient (Hamburgue, Germany).
- *Vortex-Genie 2, Model G560 (Bohemia, NY, USA).
- *Banho-maria - 5 Liter 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).

*Leitor de ELISA EIA Multi-well Reader II, Sigma Dieagnostics (St.Louis, MO, USA).

*Agitador com temperatura – Environmental Shaker Incubator ES-20 – Biosan (Riga, LV, EU).

5.4. Extração e caracterização do DNA genômico

5.4.1. Extração por método de *salting out*

A extração do DNA genômico foi realizada pela técnica de *salting out*, cujo princípio baseia-se na precipitação das proteínas com NaCl 6M, como descrito previamente por Miller et al. (1988), com algumas modificações.

Para a extração foram utilizados 10mL de sangue total colhido em presença de anticoagulante, o sal dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-K₂), o qual foi acrescido de cerca de 35mL de tampão de lise de eritrócitos. A mistura foi homogeneizada e submetida à centrifugação a 1157xg por 6 minutos sob 20°C. O sobrenadante foi então desprezado e as células ressuspensas em uma mistura de 1,1mL de perclorato de sódio 5M, 125µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 4,5mL tampão de lise II para lise dos leucócitos.

A mistura foi vigorosamente homogeneizada em vórtex por 10s e acrescida de 2 mL de NaCl saturado 6M. Novamente a mistura foi homogeneizada em vórtex por 15s e submetida à centrifugação a 1301xg por 8 minutos sob 23°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno estéril e adicionado de 5mL de isopropanol, que causa a precipitação do DNA.

A visualização do DNA foi permitida após o sobrenadante acrescido de isopropanol ser lentamente homogeneizado por inversão do tubo por cerca de 1min. O sobrenadante foi desprezado e o DNA precipitado foi colocado em um microtubo, lavado com 1mL de etanol a 70% e submetido à centrifugação a 2300xg por 5 minutos sob 4°C.

Posteriormente, 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.

Após secagem, o DNA foi acrescido de 200µL de água destilada pura estéril, homogeneizado em vórtex por 30 segundos e, então, armazenado sob temperatura de -20°C, até o momento do uso.

5.4.2. 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 em Maniatis et al. (1989). Para a quantificação, as amostras foram diluídas 100 vezes em água pura e estéril e a leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280nm foram determinadas em espectrofotômetro (PG Instruments Ltd). A quantidade de DNA existente na amostra foi determinada pela leitura da absorvância no comprimento de onda de 260nm, onde 1 unidade de densidade ótica (DO) corresponde a 50µg de DNA/mL.

A concentração de DNA foi calculada pela seguinte fórmula:

DNA na amostra (µg/mL) = DO amostra (260nm) x 50 x 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:

Pureza da amostra = DO amostra (260nm) / DO amostra (280nm);

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

5.4.3. Avaliação da integridade do DNA

Para a avaliação da integridade do DNA as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,3, baseando-se em métodos descritos em Maniatis et al. (1989).

As amostras de DNA (5µL) foram diluídas 50 vezes e acrescidas de 5 µL de tampão de amostra contendo sacarose e azul de bromofenol e adicionado de GelRed® e então, aplicadas nos poços do gel com auxílio de pipeta.

Após a corrida eletroforética por 40min sob 100 volts, o gel foi visualizado e fotografado em fotodocumentador de luz ultra-violeta (UV) (Bio-Rad, Universal HoodII).

5.4.4. Análise dos genótipos

A análise dos genótipos foi padronizada utilizando-se como controles amostras de DNA com genótipo previamente conhecido e confirmado por sequenciamento em nosso laboratório.

Como controle positivo interno das reações, todas elas foram adicionadas de oligonucleotídeos específicos para o gene do hormônio do crescimento humano (HGH), conforme descrito previamente (Bux et al., 1995).

Cada reação foi acompanhada com um controle negativo, o qual continha todos os reagentes utilizados na reação exceto o DNA, e com amostras de DNA previamente genotipadas e sequenciadas em nosso laboratório.

5.4.4.1. FcγRIIA (CD32a)

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

Foram realizados dois tubos de *mix*, um correspondente ao H-131 e outro ao R-131. O *mix* de reação foi composto por: 1 μM (2,5μL) de oligonucleotídeos *sense* e 1μM (2,5μL) de *anti-sense* alelo-específico; 0,5μM (1,25μL) de oligonucleotídeos do HGH *sense* e igual volume de *anti-sense*; 1 unidades (U) (0,2μL) da enzima Taq polimerase; 200μM de dNTP (2,5μL); 2,5μL de solução tampão da PCR (10 vezes concentrado); 1,5mM (1,5μL) de cloreto de magnésio; e água deionizada estéril para completar o volume de reação, que foi de 25μL. 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: 4 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de amplificação de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 2 minutos a 50°C para anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão; e 1 minuto 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).

5.4.4.2. FcγRIIIB (CD16b)

A análise por PCR do polimorfismo do gene FCGR3B foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos *sense* e *anti-sense* específicos para cada um dos alelos do receptor FcγRIIb, HNA-1a, HNA-1b e HNA-1c, como descrito por Bux et al. (1997 e 2000), com algumas modificações.

Foram realizados três tubos de *mix*, correspondentes ao HNA-1a, HNA-1b e HNA-1c. A mistura de reação foi composta por: 1μM de oligonucleotídeos *sense* e 1μM de *anti-sense* alelo-específico; 0,5μM de oligonucleotídeos do HGH; 1 unidades (U) da enzima Taq polimerase; 200μM de dNTP; 2,5μL 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

25µL. 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: 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de amplificação de 30 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 60°C para anelamento e 30 segundos a 71°C para extensão; e 10 minutos a 72°C de extensão final. O tamanho dos fragmentos obtidos após a amplificação foi de: HNA-1a: 118pb; HNA-1b: 155pb; e HNA-1c: 191pb (Bux et al., 1997, 2000).

5.4.4.3. CR3 (CD11b/CD18)

A análise por PCR do polimorfismo para a cadeia CD11b do CR3 foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos *sense* comum para os dois receptores *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.

Foram realizados 2 tubos de *mix*, 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; 2 unidades (U) da enzima Taq polimerase; 10mM de dNTP; 5µL de tampão para PCR (10 vezes concentrado); 1,5 mM 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: 15 minutos a 95°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de amplificação de 30 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 58°C para anelamento e 30 segundos a 72°C para extensão; e 10 minutos a 72°C de extensão final, segundo protocolo descrito por Clague et al, 2003. O tamanho dos fragmentos obtidos após a amplificação foi de 124 pb.

5.4.5. Análise 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 pH8,3. Uma amostra de 25µL do produto de cada PCR foi misturada a 5µL de tampão de amostra contendo sacarose e azul de bromofenol e adicionado de GelRed® e, então, aplicadas

nos poços do gel com auxílio de pipeta. Amostras padrões de marcadores de número de pares de base, DNA *ladder* 50pb, também foram 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 1 hora e 20 minutos. 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. Após a leitura o gel foi descartado e as imagens digitalizadas foram arquivadas.

5.5. Coleta de dados nos prontuários dos pacientes

As informações epidemiológicas de cada paciente foram obtidas retrospectivamente a partir dos registros médicos oficiais disponibilizados para consulta no setor de pesquisa do HCFMRP-USP. Os dados foram coletados a partir da primeira consulta realizada no HCFMRP-USP e incluíram sexo, idade e tempo de diagnóstico.

As informações referentes à ocorrência de infecções, manifestações clínicas relacionadas ao LES, parâmetros hematológicos, determinação dos níveis séricos de complemento (C3 e C4) e presença de anticorpos anti-nucleares também foram registradas e consideradas ao realizar o cálculo da atividade da doença de cada paciente no momento da colheita sanguínea.

5.6. Amostras de sangue: fonte de células e soro

As amostras de sangue periférico foram colhidas por punção venosa, utilizando-se o sistema de coleta a vácuo, em tubos estéreis e descartáveis.

Para as amostras destinadas à genotipagem e expressão de receptores, o sangue foi colhido em tubos contendo anticoagulante EDTA-K₂.

Para os ensaios funcionais de neutrófilos, o sangue foi colhido em tubos estéreis sem anticoagulante e logo em seguida, o sangue foi adicionado ao anticoagulante Alsever (citrato de sódio) na proporção 1:2.

Para amostras de soro foi necessária a obtenção de sangue em tubos sem anticoagulante. As amostras de soro foram obtidas de voluntários saudáveis e reunidas para constituir um *pool* de soro humano normal (SHN). Inicialmente, o sangue colhido foi deixado em repouso sob 4°C durante 1 hora para a formação do coágulo e, posteriormente, foi submetido a centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos sob 4°C. Parte deste *pool* de SHN foi submetido ao tratamento pelo calor a 56°C por 30 minutos, para inativação do sistema

complemento (soro humano inativado, SHI). Estes *pools* (SHN e SHI) foram aliquotados, armazenados a -80°C e utilizado como fonte de complemento para a opsonização dos IC e como controle negativo da atividade do complemento, respectivamente.

O volume de sangue colhido 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 da caracterização genotípica dos receptores; a porção restante foi utilizada para o isolamento de neutrófilos e emprego em suas análises funcionais.

Para os *pools* de SHN e SHI foram selecionados doadores voluntários saudáveis somente para esta finalidade, sendo o volume total de 20mL destinado à obtenção de soro.

5.7. Imunocomplexos

Para os ensaios de desgranulação (lisozima e elastase), os neutrófilos humanos foram estimulados com IC, precipitados da zona de equivalência, formados por albumina de soro bovino (BSA, Sigma A 7638) e IgG policlonal de coelho anti-BSA de alta afinidade funcional, previamente preparada e caracterizada no nosso laboratório (Marzocchi-Machado et al., 1999).

O preparo dos imunocomplexos seguiu o seguinte protocolo:

Na véspera do experimento, 250 μL de albumina de soro bovino (BSA) 1mg/mL foi diluída em PBS pH7,4 na proporção 1:2 (v/v). Na mesma quantidade e proporção, IgG policlonal de coelho anti-BSA de alta afinidade funcional foi diluída em PBS. A solução de BSA foi misturada à solução de anticorpo na proporção da equivalência e esta mistura mantida em banho maria a 37°C por 1 hora. Após este período, a mistura foi mantida *overnight* sob refrigeração a 4°C . No dia do experimento, a mistura contendo os IC precipitados foi submetida à centrifugação a 13400xg por 15 minutos a 4°C . Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi lavado em NaCl 0,15M duas vezes e então ressuspenso em 1050 μL de NaCl 0,15M.

Posteriormente, foi realizada a dosagem de proteína por espectrometria, partindo-se de uma alíquota de 50 μL da suspensão de IC. Para isso, foram adicionados 200 μL de PBS à alíquota, a qual foi centrifugada a 13400xg, 10 minutos, 4°C . O precipitado foi ressuspenso em 50 μL de NaOH 0,1N e 950 μL de NaCl 0,15M. A densidade ótica (DO) da amostra foi mensurada em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 280nm (Groves et al., 1968; Stoscheck, 1990).

A massa de IC obtida em um volume de 50 μL de suspensão foi estimada pelo seguinte cálculo:

DO amostra (280nm) x 0,715 = Quantidade de IC (mg).

A partir disto, três diferentes estímulos com IC foram preparados:

- 1- IC + tampão para fixação de complemento (CFD) com gelatina 0,1%,
- 2- IC + SHN + CFD com gelatina 0,1%,
- 3- IC + SHI + CFD com gelatina 0,1%;

sendo que a quantidade de CFD, SHN + CFD e SHI + CFD adicionados seguiu a mesma quantidade de IC (m/v) utilizada na preparação de cada estímulo, por exemplo, para cada 100µg de IC utilizado, foi adicionado um volume de 100µL da diluição do soro em CFD (50µL do SHN/SHI + 50µL do CFD gelatina 0,1%).

Após tal procedimento, os três tubos foram mantidos em banho a 37°C por 30 minutos. Em seguida foram submetidos a centrifugação a 13400xg, 4°C, por 5 minutos e lavados duas vezes com NaCl 0,15M. Finalmente, o precipitado foi ressuspenso em NaCl 0,15M em volume necessário para que se tivesse uma concentração final de 1µg de IC/µL.

Desta forma, três tipos de estímulos foram oferecidos aos neutrófilos: IC contendo IgG (IC-IgG) para estimulação via FcγR, IC opsonizados pelo complemento do SHN (IC-IgG/SHN) para estimulação via cooperação FcγR/CR e IC com SHI (IC-IgG/SHI), como controle negativo da ativação do complemento.

Adicionalmente, o N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (10^{-6} M) foi utilizado como estímulo da desgranulação independente dos FcγR/CR. O fMLP 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 para a concentração de uso.

Para os IC utilizados nos ensaios de fagocitose foi utilizada BSA marcada com o fluorocromo FITC (Sigma A 9771) e o mesmo protocolo de preparo de IC foi utilizado.

5.8. Obtenção de polimorfonucleares neutrófilos

Os neutrófilos foram obtidos a partir da mistura de sangue total com uma solução de gelatina, segundo metodologia descrita por Lucisano e Mantovani (1984). O sangue total foi colhido por punção venosa dos indivíduos doadores, em sistema a vácuo, e adicionados ao anticoagulante Alsever na proporção 1:2 (v/v). Cada amostra de sangue foi submetida a uma primeira centrifugação por 10 minutos a 1065xg e temperatura ambiente (23°C) para que o plasma e os glóbulos brancos pudessem ser descartados.

Posteriormente, uma solução de gelatina 2,5% (p/v) em NaCl 0,15M foi adicionada em quantidade equivalente a duas vezes o volume de células existentes no tubo. Após

homogeneização e repouso em banho maria a 37°C por 15 minutos, a camada de gelatina (camada superior), a qual continha os neutrófilos, foi transferida para outro tubo de centrifugação e adicionado de solução de NaCl 0,15M para uma lavagem da amostra. Esta amostra foi novamente submetida a centrifugação sob as mesmas condições da primeira centrifugação. Desprezou-se o sobrenadante, e o precipitado (neutrófilos e eritrócitos) foi ressuspenso em uma solução de NH₄Cl 0,83% pH 7,2 para que ocorresse a lise dos eritrócitos e colocado em repouso a 37°C por 5 minutos. Foi então realizada outra centrifugação e o precipitado foi lavado e ressuspenso em solução de NaCl 0,15M.

Ao final da preparação as células foram ressuspenso em 1mL de solução balanceada de Hanks com gelatina 0,1%. Essa metodologia assegura uma preparação contendo 80-90% de neutrófilos e viabilidade maior que 95%, como descrito por Lucisano e Mantovani (1984).

Uma alíquota de 10µL foi diluída em líquido de Turk na proporção 1:100 (v/v), para contagem em Câmara de Neubauer. Após contagem, a concentração da suspensão celular foi ajustada pela adição de solução de Hanks pH7,2 e reservada para uso.

Outra alíquota de 10µL da suspensão celular foi utilizada para a avaliação da viabilidade pela exclusão do corante azul de Tripán 0,4% em NaCl 0,15M. Esta 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.

5.9. Ensaio de fagocitose

Para o ensaio de fagocitose, o protocolo foi padronizado de acordo com as metodologias descritas por Lehmann et al. (2000) e Santos (2010) com algumas modificações.

Os neutrófilos (1×10^6 células) foram estimulados com 50µg de IC^{FITC}-IgG, IC^{FITC}-IgG/SHN e IC^{FITC}-IgG/SHI (0,1µg/µL), contendo BSA^{FITC}. Como controle de fluorescência inespecífica, os neutrófilos foram incubados com a mesma massa de BSA^{FITC} contida nos imunocomplexos.

O volume final da reação foi de 500µL. Os neutrófilos foram pré-incubados a 37°C na presença de solução balanceada de Hanks com agitação por 15 minutos. Em seguida foram adicionados os estímulos (50µg) e a mistura de reação foi incubada a 37°C em estufa com agitação contínua por 30 minutos ao abrigo da luz.

Após 30 minutos de reação, a fagocitose foi interrompida pela adição de 200µL de EDTA/NaCl (0,1M, pH4,4) no tubo e foi mantida por mais 5 minutos sob agitação a 37°C.

Os tubos foram centrifugados a 290xg por 10min e posteriormente colocados em banho de gelo e lavados duas vezes com 500µL de PBS gelado. Estes tubos foram submetidos a 290xg por 5 minutos a 4°C e o precipitado foi, finalmente, ressuspensão em 200µL de PBS gelado. Os tubos foram mantidos em gelo até o momento de leitura no citômetro de fluxo.

Cada tubo foi lido duas vezes, a primeira em suspensão em PBS e a segunda acrescentando-se 90µL de uma solução de azul de Tripán 0,4% (PBS/citrato 0,02M, pH4,4). A primeira leitura foi realizada para mensurar a fluorescência total e, após a primeira leitura, a fluorescência extracelular foi bloqueada (*quenching* de fluorescência) pela adição de uma solução de azul de Tripán 0,4% (PBS/citrato 0,02M, pH4,4) e, imediatamente, foi feita a segunda leitura no citômetro de fluxo.

O citograma bidirecional permitiu distinguir e selecionar a população de neutrófilos analisada, como mostrado pela Figura 5A. Os resultados foram analisados quanto à porcentagem de fluorescência por célula e os histogramas das Figuras 5B-D são representativos de um ensaio de fagocitose. A porcentagem de fagocitose foi calculada pela diferença entre os valores de fluorescência obtidos na primeira leitura e na segunda leitura.

Os controles negativos foram feitos pela inibição da fagocitose com citocalasina D (dados não demonstrados).

Figura 5. Citograma e histogramas de fluorescência da fagocitose de imunocomplexos marcados com FITC por neutrófilos. **A:** Citograma bidirecional indicando a população de neutrófilos analisada contida na área P1; separação das células pela complexidade (eixo vertical) e tamanho (eixo horizontal). **B:** Histograma de fluorescência inespecífica (célula + BSA^{FITC}) utilizada para calibrar o aparelho. **C:** Histograma da fluorescência total na ausência de azul de Tripán. **D:** Histograma da fluorescência na presença de azul de Tripán.

5.10. Ensaios de desgranulação

Para os ensaios de desgranulação foi utilizado um volume final de reação de 1000µL.

Para cada amostra foram preparados cinco tubos de reação e em todos eles foi adicionado citocalasina B (2µM), a qual tem a capacidade de imobilizar a membrana do neutrófilo, evitando a formação do fagolisossomo e permitindo que os grânulos sejam liberados no sobrenadante. Em todos os ensaios foram realizados controles para mensurar a desgranulação espontânea.

Para isso foram realizadas as seguintes reações:

- 250µL de células (1×10^6) + 736µL de Hanks/gelatina 0,1% + 14µL citocalasina B (2µM);
- 250µL de células + 711µL de Hanks/gelatina + 14µL de citocalasina B + 25µL IC;
- 250µL de células + 711µL de Hanks/gelatina + 14µL de citocalasina B + 25µL IC/SHN;
- 250µL de células + 711µL de Hanks/gelatina + 14µL de citocalasina B + 25µL IC/SHI;
- 250µL de células + 726µL de Hanks/gelatina + 14µL de citocalasina B + 10µL fMLP;

sendo que previamente à adição do estímulo, os tubos de reação foram deixados em banho maria a 37°C por 15 minutos em presença de citocalasina B. Após adicionados os estímulos, as reações foram mantidas sob 37°C por 45 minutos para que ocorresse a desgranulação e logo em seguida centrifugadas por 10 minutos a 974xg.

Os sobrenadantes das reações foram armazenados sob -80°C para posterior quantificação das enzimas lisozima e elastase.

5.10.1. Quantificação de Lisozima

O método clássico para a determinação da lisozima é baseado na habilidade desta enzima reduzir a densidade ótica de uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (Smolelis, Hartsell, 1949).

Os ensaios foram realizados de acordo com metodologia previamente descrita (Marzocchi-Machado et al., 1999) com algumas modificações. Para cada dia de experimento uma curva padrão contendo diferentes concentrações de lisozima pura (Sigma L6876) foi construída. As concentrações de lisozima utilizadas para elaboração das curvas foram: 0,025µg/mL; 0,05µg/mL; 0,075µg/mL; 0,125µg/mL; 0,2µg/mL; 0,25µg/mL; 0,375µg/mL; 0,5µg/mL; 0,75µg/mL. A mistura tinha uma DO inicial entre 0,6 e 0,8 em 450nm.

Em cada cubeta de reação, contendo a lisozima nas diferentes concentrações (diluída em tampão fosfato - K_2HPO_4 - 0,1M pH 7,0), foi adicionada uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma M3770) 0,25mg/mL em tampão fosfato (K_2HPO_4 - 0,1M pH 7,0), volume a volume, em volume final de 1000 μ L.

A cinética da reação foi acompanhada por 15 minutos em espectrofotômetro em 450nm a 37°C e a variação da densidade ótica (ΔDO) para cada ponto da curva padrão foi calculada. A curva padrão foi construída com os valores de ΔDO em função da concentração de lisozima em ng/ μ L.

Cada sobrenadante proveniente do ensaio de desgranulação teve sua quantidade de lisozima mensurada a partir da curva padrão de lisozima e do valor de ΔDO para cada amostra. A concentração de lisozima liberada foi calculada em ng/ μ L de sobrenadante.

5.10.2. Quantificação de Elastase

O substrato N-succinyl-alanina-valina-p-nitroanilida (SAAVNA, 454454 da Calbiochem, Merck-KGaA, Darmstadt, Hessen, Germany) foi utilizado para a quantificação da elastase, cuja reação libera a p-nitroanilina como um dos produtos e esta pode ser quantificada por espectrofotometria a 405nm. Um ensaio estático foi realizado baseando-se na metodologia descrita previamente por Johansson et al. (2002) e considerando as modificações feitas por Kanashiro et al. (2007).

A reação foi desenvolvida em placas de ensaio imunoenzimático com 96 poços e o volume final de reação foi 250 μ L. Em cada poço de reação foi colocado 215 μ L do sobrenadante proveniente do ensaio de desgranulação e, em seguida, foi adicionado 35 μ L do substrato SAAVNA (100 μ M). A reação foi acompanhada por 30 minutos sob 37°C sendo que as leituras foram realizadas a cada 5 minutos em leitor de microplaca para ensaio imunoenzimático.

Para cada leitura realizada foi gerada uma curva (DO x tempo) e, utilizando-se da área sob a curva de cada reação, foi possível quantificar a liberação de elastase em cada ensaio.

5.11. Análise da expressão dos receptores 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 μ L) de cada indivíduo (LES e controle) foram adicionadas de 5 μ L de anticorpo anti-receptor específico marcado com fluorocromo ou com

anticorpo isotipo controle e posteriormente incubadas por 20 minutos ao abrigo da luz e temperatura ambiente.

O isotipo controle foi utilizado para quantificar a fluorescência proveniente da ligação inespecífica do anticorpo ao neutrófilo. Um tubo contendo somente células foi utilizado para verificar a autofluorescência celular, a qual foi descontada dos valores obtidos em cada leitura.

Após o período de incubação, cada amostra recebeu 2000µL de solução de lise BD[®] para lisar os eritrócitos e foi novamente incubada à temperatura ambiente, ao abrigo de luz, por 10 minutos. Em seguida, as reações foram centrifugadas a 760xg, sob 4°C, por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com 2000µL de PBS/soro bovino fetal (SBF) 2% azida < 0,1% pH 7,2 gelado. As amostras foram então centrifugadas a 760xg, a 4°C, por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 200µL de PBS/formol 1%.

As análises foram realizadas em citômetro de fluxo. O citograma bidirecional permitiu distinguir e selecionar a população de neutrófilos analisada. Os resultados obtidos nos histogramas foram expressos em mediana da fluorescência/célula em escala logarítmica e como porcentagem de células fluorescentes na população total. A Figura 6 ilustra os histogramas obtidos na análise da expressão dos receptores.

Figura 6. Histogramas de fluorescência dos receptores de superfície celular em neutrófilos marcados com anticorpo anti-receptor específico e analisados por citometria de fluxo. **A:** anticorpo não-específico marcado com FITC (fluorescência inespecífica). **B:** anticorpo anti-CD32 (FcγRIIa) marcado com FITC. **C:** anticorpo não-específico marcado com PE (fluorescência inespecífica). **D:** anticorpo anti-CD16 (FcγRIIIb) marcado com PE. **E:** anticorpo anti-CR3 marcado com PE.

5.12. Análises estatísticas

5.12.1. Análise genotípica

Para ambos os grupos, pacientes e controles, os genótipos foram analisados 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.

5.12.2. Análise da expressão dos receptores

O programa utilizado para análise estatística foi o OpenBugs versão 3.2.1.

A análise estatística dos dados baseou-se em modelos de regressão com estimação bayesiana de parâmetros (Spiegelhalter et al., 2000). 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, sendo variável contínua, foi

analisada por modelos lineares de regressão com erro baseado na distribuição normal, com estimação bayesiana. Detalhes sobre este modelo podem ser encontrados em Coelho-Barros et al. (2008).

5.12.3. Análises dos ensaios funcionais dos neutrófilos

Fagocitose

A análise estatística dos dados baseou-se em modelos de regressão com estimação bayesiana (Spiegelhalter et al., 2000) de parâmetros. Considerando a proporção de fagocitose uma variável aleatória que assume valores entre 0% e 100%, utilizou-se um modelo de regressão beta (Ferrari, Cribari-Neto, 2004, Branscum et al., 2007) para as comparações entre grupos de interesse.

Desgranulação

A quantidade de lisozima liberada e a área sob a curva de elastase, 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, 2007, Coelho-Barros, 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.

Resultados

6. Resultados

6.1. Avaliação da integridade do DNA

Para a avaliação da integridade do DNA realizou-se uma corrida das amostras (diluição 50x) em gel de agarose. A Figura 7 é representativa de sete amostras analisadas e característica do total de amostras avaliadas. Todas as amostras se mostraram íntegras e ideais para serem submetidas à PCR.

Figura 7. Amostras de DNA extraídas pelo método de *salting out* após corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE pH 8,3. M, marcador de pares de bases (50pb). Foto de I.C.C. Vigato-Ferreira, arquivo do laboratório do autor.

Todas as amostras apresentaram razão D.O (260nm)/D.O. (280nm) entre 1,8 e 2,0, confirmando a pureza das amostras.

6.2. Análise dos genótipos

Em todas as reações foi observada a amplificação do fragmento de HGH, utilizado como controle positivo interno das reações, o que comprova as amplificações gênicas durante as reações. Para cada amostra de DNA as reações foram realizadas em triplicata.

6.2.1. FCGR2A (CD32a)

A Figura 8 é representativa de um gel de agarose visualizado em fotodocumentador (Bio-Rad - Universal HoodII) contendo produtos de PCR para o polimorfismo de FCGR2A. Indivíduo heterozigoto (HR) e homozigotos (HH ou RR) puderam ser identificados nesta figura. O produto da PCR para ambas as variantes H/R-131 corresponde a 253pb. O HGH foi utilizado como controle interno com 428pb.

Figura 8. Produtos de PCR de indivíduos heterozigoto (HR), homozigoto para o alelo R-131 (RR) e homozigoto para o alelo H-131 (HH) para o polimorfismo de FCGR2A (CD32). Corrida eletroforética em gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3 e coloração com GelRed. M, marcador de pares de bases de 50pb. Foto de I.C.C. Vigato-Ferreira, arquivo do laboratório do autor.

6.2.2. FCGR3B (CD16b)

A Figura 9 é representativa de um gel de agarose visualizado em fotodocumentador (Bio-Rad - Universal HoodII) contendo produtos de PCR para o polimorfismo de FCGR3B. Indivíduos heterozigotos (HNA-1a/1b/1c e HNA-1a/1b) e homozigotos (HNA-1a e HNA-1b) puderam ser identificados nesta figura. O produto da PCR para a variante polimórfica HNA-1a contém 141pb, HNA-1b contém 155pb e HNA-1c 191pb.

Figura 9. Produtos de PCR de indivíduos heterozigotos (HNA-1a/1b/1c e HNA-1a/1b), homozigoto HNA-1a e homozigoto HNA-1b para o polimorfismo de FCGR3B (CD16b). Corrida eletroforética em gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3 e coloração com GelRed. M, marcador de pares de bases de 50pb. Foto de I.C.C. Vigato-Ferreira, arquivo do laboratório do autor.

6.2.3. HNA-4a (CR3)

A Figura 10 é representativa de um gel de agarose visualizado em fotodocumentador (Bio-Rad - Universal HoodII) contendo produtos de PCR para o polimorfismo de HNA-4a. Indivíduos heterozigoto (HNA-4a-positivo/negativo) e homozigotos (HNA-4a-positivo ou HNA-4a-negativo) puderam ser identificados nesta figura. O produto da PCR para ambas as variantes (HNA-4a-positivo ou HNA-4a-negativo) corresponde a 124pb. O HGH foi utilizado como controle interno com 428pb.

Figura 10. Produtos de PCR de indivíduos heterozigoto positivo/negativo (+/-), homozigoto para o alelo negativo (-/-) e homozigoto para o alelo positivo (+/+) para o polimorfismo do HNA-4a. Corrida eletroforética em gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3 e coloração com GelRed. M, marcador de pares de bases de 50pb. S, sem DNA. Foto de I.C.C. Vigato-Ferreira, arquivo do laboratório do autor.

6.2.4. Frequência da variantes polimórficas

A Tabela 3 contém a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos de FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a em pacientes com LES e grupo controle.

Como observado, não houve diferença significativa entre as frequências dos genótipos e alelos do FCGR2A dos grupos controle e LES, embora os valores de p para a frequência alélica tenham sido muito próximos a 0,05.

Com relação ao HNA-4a, as frequências alélicas mostraram-se estatisticamente diferentes entre grupos LES e controle. Os valores de *Odds Ratio* (OR) sugeriram que o alelo positivo confere proteção ao LES e o alelo negativo, suscetibilidade à doença (OR: 0,5563 e 1,7977, respectivamente). Quanto às frequências genotípicas, a homozigose positiva e a heterozigose do HNA-4a mostraram diferença significativa entre os grupos.

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

	Pacientes (n=157)		Controles (n=147)		Valor de <i>p</i>	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
Sem receptor	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

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

6.2.5. Combinações entre os genótipos encontrados

Entre as combinações de genótipos para os polimorfismos de FCGR2A, FCGR3B e do HNA-4a verificou-se que tanto no LES quanto em indivíduos saudáveis, as combinações mais frequentes foram aquelas que continham heterozigose para FCGR2A e FCGR3B associada à homozigose para HNA-4a-positivo.

As frequências das combinações entre FCGR2A, FCGR3B e do HNA-4a para pacientes com LES e para indivíduos saudáveis estão apresentadas na Tabela 4 e as combinações mais frequentes estão mostradas em negrito.

6.2.6. Associação das infecções mais frequentes com os genótipos encontrados

Após consulta aos prontuários dos pacientes, foi observado que as infecções mais frequentes foram: infecção do trato urinário (ITU) (38,3%), pneumonia (29,08%), sinusite (14,18%), celulite (10,64%) e pielonefrite (4,25%). Entre os 166 pacientes com LES analisados, 71 apresentaram pelo menos uma destas infecções e, além destas, alguns pacientes apresentaram quadro de sepse (3,55%). Apenas estas infecções foram consideradas ao fazer a associação com os genótipos encontrados no LES.

Após a separação dos indivíduos pela combinação dos genótipos para os polimorfismos FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a, foi analisada a frequência de infecções em cada grupo de genótipos (Tabela 5). Os resultados mais frequentes estão apresentados em negrito.

Foi observado que as combinações de 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 foram os grupos que apresentaram maior ocorrência de infecções, o que condiz com os grupos mais frequentes no LES (Tabela 4).

Tabela 4. Combinação dos genótipos 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	%
HNA-1a										
Pos/pos	2	1,25	2	1,35	9	5,75	7	4,75	8	5,10
Neg/neg	0	0	0	0	1	0,65	0	0	1	0,65
Pos/neg	0	0	3	2,05	5	3,20	1	0,70	3	1,90
HNA-1b										
Pos/pos	5	3,20	5	3,40	7	4,45	12	8,15	14	8,90
Neg/neg	1	0,65	0	0	1	0,65	0	0	0	0,70
Pos/neg	3	1,90	6	4,05	5	3,20	2	1,35	11	7
HNA-1a/1b										
Pos/pos	3	1,19	9	6,10	12	7,65	13	8,85	17	10,85
Neg/neg	2	1,25	1	0,70	3	1,19	1	0,70	0	0
Pos/neg	5	3,20	3	2,05	9	5,75	2	1,35	12	7,65
HNA-1a/1c										
Pos/pos	0	0	0	0	2	1,25	1	0,70	2	1,25
Pos/neg	0	0	0	0	2	1,25	0	0	2	1,25
HNA-1b/1c										
Pos/pos	1	0,65	0	0	1	0,65	1	0,70	1	0,65
Pos/neg	0	0	0	0	0	0	1	0,70	1	0,65
HNA-1a/1b/1c										
Pos/pos	1	0,65	1	0,70	2	1,25	0	0	1	0,65
Pos/neg	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,65
HNA-ausente*										
Pos/pos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pos/neg	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,70

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

* sem produto de amplificação por PCR.

Tabela 5. Frequência das infecções^g para as combinações dos genótipos 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 ⁺ /posneg	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

*1 paciente apresentou choque séptico.

^gDados registrados nos prontuários do HCFMRP-USP; pode ter ocorrido subnotificação (ver discussão).

Em negrito: mais frequentes.

6.2.7. Ensaio de Fagocitose

Os ensaios de fagocitose foram realizados com neutrófilos de pacientes com LES ativo (n=13), LES inativo (n=13) e de indivíduos saudáveis (n=26).

O cálculo da porcentagem de fagocitose foi realizado baseando-se na fluorescência total obtida em uma primeira leitura na ausência do azul de Tripán (100% de fluorescência) e na fluorescência obtida na presença do azul de Tripán (fluorescência intracelular). Para cada amostra, o aparelho foi calibrado com a fluorescência inespecífica (célula + BSA marcada com FITC) adquirida pelo citômetro de fluxo.

Não houve diferenças significativas para fagocitose entre os grupos estudados LES ativo, inativo e controle, quando comparados sem discriminar os genótipos para os polimorfismos estudados (Figura 11).

Figura 11. Ensaio de fagocitose medido por citometria de fluxo. Neutrófilos de pacientes com LES ativo (A) e LES inativo (I) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC, IC/SHN e IC/SHI. Os controles de fluorescência inespecífica foram descontados dos valores apresentados. Porcentagem de fagocitose determinada a partir da fluorescência total e da fluorescência na presença do azul de Tripán. As barras representam as médias dos valores de fagocitose de cada grupo.

Após análise, os resultados apresentados pelos grupos LES ativo e LES inativo se mostraram iguais estatisticamente, tanto como apresentado na Figura 11 quanto quando analisadas separadamente por genótipos (dados não apresentados), sugerindo que a resposta fagocítica desempenhada pelos neutrófilos não depende da atividade da doença. Assim, consideramos cabível fazer a união dos grupos LES ativo e LES inativo em um único grupo (LES), e a partir disso, manter como variável a doença, para possível comparação entre as

funções efectoras dos neutrófilos desempenhadas pelos diferentes genótipos encontrados em indivíduos saudáveis e com LES. Então, em um segundo momento, os grupos LES e controle foram classificados de acordo com os polimorfismos de FcγRIIIa encontrados. A Figura 12 mostra a fagocitose de neutrófilos estimulada com 50μg de IC-IgG (A) ou 50μg IC-IgG/SHN (B).

Figura 12. Ensaio de fagocitose medido por citometria de fluxo de indivíduos classificados segundo o genótipo encontrado para o polimorfismo de FcγRIIIa: HH, RR, HR. **A:** Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG (IC). **B:** Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG/SHN (IC/SHN). Porcentagem de fagocitose determinada a partir da fluorescência total e da fluorescência na presença do azul de Tripán. As barras representam as médias dos valores de fagocitose de cada grupo. Diferenças significativas: HH-controle vs RR-controle (IC-IgG), $p < 0,05$; HH-controle vs HR-controle (IC-IgG), $p < 0,05$; RR-controle vs HR-LES (IC-IgG), $p < 0,05$.

Para os resultados na Figura 12A foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) entre indivíduos do grupo controle com genótipo HH e RR e entre os genótipos HH e HR quando os neutrófilos foram estimulados com IC-IgG, sendo menor a fagocitose no grupo HH. Ainda, houve diferença entre indivíduos saudáveis RR e pacientes HR, com menor fagocitose no grupo de pacientes HR ($p < 0,05$). Quando foi analisada a fagocitose de neutrófilos utilizando o estímulo IC-IgG/SHN (Figura 12B), houve redução significativa ($p < 0,05$) em indivíduos HH do grupo controle quando comparados com o grupo RR controle.

Para os resultados na Figura 13B foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) entre indivíduos com genótipo HNA-1b e HNA-1a/1b do grupo controle, quando os neutrófilos foram estimulados com IC-IgG/SHN, sendo maior a fagocitose no grupo HNA-1b. Não foi encontrada diferença significativa na fagocitose estimulada por IC-IgG entre os polimorfismos de Fc γ RIIIb estudados (Figura 13A).

Figura 13. Ensaio de fagocitose medido por citometria de fluxo de indivíduos classificados segundo o genótipo encontrado para o polimorfismo de FcγRIIIb: HNA-1a, HNA-1b, HNA-1a/1b, HNA-1a/1c, HNA-1b/1c. **(A)** Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG (IC). **(B)** Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG-SHN (IC/SHN). Porcentagem de fagocitose determinada a partir da fluorescência total e da fluorescência na presença do azul de Tripán. As barras representam as médias dos valores de fagocitose de cada grupo. Diferenças significativas: HNA-1b controle VS HNA-1a/1b controle (IC/SHN), $p < 0,05$.

Não foi encontrada diferença significativa na fagocitose entre os polimorfismos de HNA-4a estudados (Figura 14).

Figura 14. Ensaio de fagocitose medido por citometria de fluxo de indivíduos classificados segundo o genótipo encontrado para o polimorfismo de HNA-4a: HNA-4a-positivo, HNA-4a-negativo e HNA-4a-positivo/negativo. Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG/SHN. Porcentagem de fagocitose determinada a partir da fluorescência total e da fluorescência na presença do azul de Tripán. As barras representam as médias dos valores de fagocitose de cada grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

6.2.8. Ensaio de Desgranulação

Os ensaios de desgranulação foram realizados com neutrófilos de pacientes com LES ativo (n=20), LES inativo (n=10) e de indivíduos saudáveis (n=30).

6.2.8.1. Lisozima

Para o ensaio de lisozima, os indivíduos foram divididos em grupos de LES ativo, LES inativo e controle. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados, porém, foi observado o mesmo perfil de resposta para todos os estímulos oferecidos, sendo que a liberação de lisozima pelo grupo LES inativo se apresentou maior em relação aos outros grupos, como observado na Figura 15

Figura 15. Valores das concentrações de lisozima liberada no ensaio de desgranulação de neutrófilo. Neutrófilos de pacientes com LES ativo (A) e LES inativo (I) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC, IC/SH, IC/SHI e fMLP. Os valores de liberação espontânea de lisozima foram descontados dos valores apresentados. As barras representam as médias dos valores de lisozima liberada de cada grupo.

Posteriormente, os indivíduos foram subdivididos por genótipos para os três polimorfismos estudados. Para o FcγRIIIa não foi encontrada diferença significativa entre os grupos utilizando-se IC-IgG (Figura 16A) e IC-IgG/SHN (Figura 16B).

Para o polimorfismo do FcγRIIIb foi observada diferença significativa tanto para o estímulo com IC-IgG (Figura 17A) quanto para IC-IgG/SHN (17B) entre os grupos LES inativo HNA-1a e LES ativo HNA-1b, com uma maior liberação de lisozima no primeiro.

Além disso, houve diferença significativa entre os grupos LES inativo HNA-1a e controle HNA-1a/1b, para ambos os estímulos.

Figura 16. Valores das concentrações de lisoizima liberada no ensaio de desgranulação de neutrófilo de indivíduos classificados segundo o genótipo encontrado para o polimorfismo de $Fc\gamma RIIa$: HH, RR, HR. **A:** Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG (IC). **B:** Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG-SHN (IC/SHN). Os valores de liberação espontânea de lisoizima foram descontados dos valores apresentados. As barras representam as médias dos valores de lisoizima liberada de cada grupo.

Figura 17. Valores das concentrações de lisoizima liberada no ensaio de desgranulação de neutrófilo de indivíduos classificados segundo o genótipo encontrado para o polimorfismo de $Fc\gamma RIIIb$: HNA-1a, HNA-1b, HNA-1a/1b, HNA-1a/1c, HNA-1b/1c. **A:** Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG (IC). **B:** Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG-SHN (IC/SHN). Os valores de liberação espontânea de lisoizima foram descontados dos valores apresentados. As barras representam as médias dos valores de lisoizima liberada de cada grupo. Diferenças significativas: HNA-1a LES inativo vs HNA-1b-LES ativo, $p < 0,05$ e HNA-1a LES inativo vs HNA-1a/1b-controle, $p < 0,05$ (IC-IgG e IC-IgG/SHN)

Para o polimorfismo do CR3 não foram encontradas diferenças significativas entres os grupos analisados, como observado na Figura 18.

Figura 18. Valores das concentrações de lisozima liberada no ensaio de desgranulação de neutrófilo de indivíduos classificados segundo o genótipo encontrado para o polimorfismo de HNA-4a: HNA-4a-positivo, HNA-4a-negativo e HNA-4a-positivo/negativo. Neutrófilos de pacientes com LES ativo (A) e LES inativo (I) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG/SHN. Os valores de liberação espontânea de lisozima foram descontados dos valores apresentados. As barras representam as médias dos valores de lisozima liberada de cada grupo.

6.2.8.2. Elastase

Para a quantificação de elastase, os indivíduos foram divididos em grupos de LES ativo, LES inativo e controle. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos estudados, porém, foi observado o mesmo perfil de resposta para todos os estímulos oferecidos, sendo que a liberação de lisozima pelo grupo LES inativo se apresentou maior em relação aos outros grupos, como observado na Figura 19.

Figura 19. Valores da área sob a curva de elastase liberada na desgranulação de neutrófilos. Neutrófilos de pacientes com LES ativo (A) e LES inativo (I) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC, IC/SH, IC/SHI e fMLP. Os valores de liberação espontânea de elastase foram descontados dos valores apresentados. As barras representam as médias dos valores de lisozima liberada de cada grupo.

Para o polimorfismo do FcγRIIa não foi encontrada diferença significativa entre os grupos utilizando-se IC-IgG (Figura 20A) e IC-IgG/SHN (Figura 20B).

Figura 20. Valores da área sob a curva de elastase liberada na desgranulação de neutrófilos de indivíduos classificados segundo o genótipo encontrado para o polimorfismo de $Fc\gamma RIIa$: HH, RR, HR. **A:** Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG (IC). **B:** Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG-SHN (IC/SHN). Os valores de liberação espontânea de elastase foram descontados dos valores apresentados. As barras representam as médias dos valores de lisozima liberada de cada grupo.

Para o polimorfismo do $Fc\gamma RIIIb$ não houve diferença significativa tanto para o estímulo com IC-IgG (Figura 21A) quanto para IC-IgG/SHN (Figura 21B) entre os grupos.

Figura 21. Valores da área sob a curva de elastase liberada na desgranulação de neutrófilos de indivíduos classificados segundo o genótipo encontrado para o polimorfismo de FcγRIIIb: HNA-1a, HNA-1b, HNA-1a/1b, HNA-1a/1c, HNA-1b/1c. **A:** Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG (IC). **B:** Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG-SHN (IC/SHN). Os valores de liberação espontânea de elastase foram descontados dos valores apresentados. As barras representam as médias dos valores de lisozima liberada de cada grupo.

Para o polimorfismo do CR3 não foi encontrada diferença significativa entre os grupos IC-IgG/SHN (Figura 22).

Figura 22. Valores da área sob a curva de elastase liberada na desgranulação de neutrófilos de indivíduos classificados segundo o genótipo encontrado para o polimorfismo de HNA-4a: HNA-4a-positivo, HNA-4a-negativo e HNA-4a-positivo/negativo. Neutrófilos de pacientes com LES (LES) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram estimulados por IC-IgG-SHN. Os valores de liberação espontânea de elastase foram descontados dos valores apresentados. As barras representam as médias dos valores de lisozima liberada de cada grupo.

6.2.9. Análise da expressão dos receptores

A Figura 23A-C apresenta a mediana de intensidade de fluorescência por célula dos FcγRIIa (CD32), FcγRIIb (CD16) e CR3 para os diferentes polimorfismos estudados. Os indivíduos foram divididos em grupos de LES ativo, LES inativo e controle de acordo com os genótipos encontrados.

Para a expressão do CD16, indivíduos do grupo LES inativo HNA-1b apresentaram uma diferença significativa de intensidade de fluorescência por célula quando comparado com indivíduos do grupo LES inativo HNA-1a/1b, sendo maior neste último. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de LES ativo, LES inativo e indivíduos controles para a expressão dos receptores CD32 (Figura 23B) e CR3 (Figura 23C).

Figura 23. Expressão dos FcγR e CR nos neutrófilos de indivíduos classificados segundo o genótipo para os polimorfismos estudados. (A): FcγRIIIb (CD16); (B): FcγRIIa (CD32); (C): CR3. Mediana de intensidade de fluorescência por célula. Neutrófilos de pacientes com LES ativo e LES inativo e de controles. As barras representam os valores da mediana para cada grupo. Diferenças significativas: HNA-1b-LES inativo vs HNA-1a/1b-LES inativo, p<0,05 (CD16)

Não houve diferença significativa na porcentagem de células fluorescentes para a expressão dos receptores estudados entre os grupos de pacientes com LES ativo e inativo e o grupo controle (dados não demonstrados).

Discussão

7. Discussão

A associação dos polimorfismos de FcγR com LES tem sido amplamente estudada em muitas populações (Van der Pol, Van der Winkel, 1998, Salmon, Pricop, 2001), as quais têm demonstrado uma associação deles com a doença. O estudo dos FcγR no LES tem uma grande herança de aproximadamente 30 anos, quando foram realizados os primeiros estudos relacionados ao *clearance* mediado por tais receptores. A partir disso, o conhecimento da diversidade estrutural e funcional dos FcγR passou a progredir substancialmente. Baseado na ampliação do conhecimento destes receptores, muitos estudos genéticos têm reforçado a importância funcional destes receptores na patogênese do LES (Li et al., 2009).

Muitos polimorfismos nos receptores Fcγ de baixa afinidade, os quais alteram a afinidade de ligação à IgG têm sido associados ao LES em estudos com seres humanos (Li et al., 2009, Niederer et al 2010). A troca não sinônima de uma guanina (G) por uma adenina (A) no gene FCGR2A resulta em uma alteração de um único aminoácido na posição 131 (R-131 e H-131) no segundo domínio semelhante à Ig extracelular da proteína FcγRIIa. Esta diferença alélica altera o reconhecimento dos ligantes. A variante polimórfica FcγRIIA-H131 (histidina na posição 131) é capaz de se ligar eficientemente à IgG2 enquanto a variante R-131 (arginina na posição 131) não se liga à IgG2. Esta variação de afinidade acarreta uma diferença funcional importante, fagócitos de indivíduos H-131 homozigotos são mais eficientes que aqueles de R-131 homozigotos para a fagocitose de partículas opsonizadas por IgG2 (Bredius et al., 1993).

Muitos estudos têm demonstrado associação entre a variante R-131 e a suscetibilidade ao LES em diferentes populações. Tal associação foi confirmada nas populações holandesa, americana-européia, americana-africana e coreana (Duits et al., 1995, Salmon et al., 1996, Song et al, 1998), enquanto estudos em outros países apresentaram resultados inconsistentes (Manger et al., 1998, Yap et al, 1999, Chen et al., 2004).

Em nosso estudo, não foram encontradas diferenças significativas na frequência dos alelos H-131 e R-131 entre os grupos LES e controle, embora tenha sugerido um papel protetor do alelo H-131 à doença, uma vez que o valor de *p* permaneceu no limiar de significância apesar de não ter atingido o valor limítrofe ($\leq 0,05$). Foi encontrada uma maior frequência do alelo H-131 em indivíduos controles acompanhada pela maior frequência do alelo R-131 em pacientes com LES. O alelo R-131 mostrou conferir uma suscetibilidade de 1,37 vezes ao LES (*OR*: 1,37) quando comparado ao alelo H-131. Nossos resultados estão de acordo com o que têm sido descrito na literatura em relação à suscetibilidade aumentada ao

LES conferida pelo alelo R-131 em diferentes populações, como descrito anteriormente. O fato de não termos obtido resultados estatisticamente diferentes para a frequência alélica do polimorfismo de FCGR2A poderia, provavelmente, ter sido corrigido com o aumento do número de amostras analisadas, o que poderia levar os resultados a atingir o valor limítrofe do intervalo de confiança.

A associação do polimorfismo do FCGR2A no LES também tem sido fundamentada pela revisão da literatura (Pradham al., 2008). Um estudo de Manger et al. (2002) relata que manifestações clínicas e anormalidades hematológicas e imunológicas ocorreram mais precocemente em pacientes com LES com genótipo R-131. Em particular, na nefrite lúpica por imunocomplexos, Bazílio et al. (2004) observaram maior frequência do genótipo R-131 em pacientes brasileiros. Neste contexto, os resultados do presente estudo contribuem para apontar a associação do genótipo R-131 com o LES. Assim, considerando a importância das anormalidades imunes e do depósito de IC no LES, a determinação do polimorfismo do FCGR2A e a identificação da sua influência podem refletir cuidados e terapia específica para os pacientes com LES.

Quanto ao FCGR3B, as três variantes alotípicas, HNA-1a, HNA-1b e HNA-1c codificam três fenótipos diferentes do receptor FcγRIIIb. Quanto ao HNA-1c, este difere do HNA-1b por uma única substituição de aminoácido, o que pode ser devido a um *crossing-over* desigual durante a meiose. Os cinco aminoácidos trocados se localizam no primeiro domínio extracelular do receptor, sendo que a troca do aminoácido da posição 65 gera a perda de um sítio de glicosilação na variante alélica HNA-1b. A capacidade funcional aumentada do alelo HNA-1a já está firmemente estabelecida e alguns estudos têm sugerido diferença na afinidade de ligação à IgG1 e IgG3 entre FcγRIIIb-HNA-1a e FcγRIIIb-HNA-1b, com o fenótipo HNA-1a demonstrando uma ligação mais forte. Além disso, as diferentes variantes podem interagir de maneira diferente com outros receptores de superfície celular, como o CR3 (CD11b/CD18), que pode ser uma interação crítica para o desempenho da função do FcγRIIIb, uma vez que este receptor não possui domínio transmembrana e citoplasmático, sendo ancorado na membrana celular por uma molécula de GPI, e necessita da interação com outros receptores para desempenhar sua função (Niederer et al., 2010).

Ainda em relação ao FCGR3B, inúmeros trabalhos têm descrito um polimorfismo de número de cópias (CNV) para este gene, o qual também tem sido associado ao LES (Morris et al., 2010, Willcocks et al., 2008, Mamtani et al., 2010). Koene et al. (1998) sugerem que a presença da variante polimórfica HNA-1c seja um terceiro alelo do gene FCGR3B, o que indica que indivíduos que apresentam genotipagem positiva para as três variantes alélicas

(1a/1b/1c) contêm, necessariamente, duas ou mais cópias do mesmo gene. Sendo assim, um estudo mais aprofundado sobre o polimorfismo genético deste receptor seria necessário, como o estudo de número de cópias do gene e até mesmo a construção de haplótipos para este gene. Devido à inconsistência das definições trazidas por diversos autores em relação a terceira variante polimórfica do gene FCGR3B (HNA-1c), optamos por não realizar o estudo da frequência alélica para este gene; assim, em nosso trabalho, consideramos apenas a frequência genotípica para este receptor.

Muitos trabalhos têm se preocupado em estudar as associações entre as combinações de HNA-1 e o LES. Em populações asiáticas, o genótipo FCGR3B*02/*02 parece estar associado ao LES, embora tenha sido encontrado um papel protetor na população coreana segundo Hong et al. (2005). Os estudos em populações caucasianas geralmente não têm mostrado alguma associação deste polimorfismo com o LES (Koene et al., 1998, Dijkstra et al., 2000, Manger et al., 2002), embora um estudo na Espanha tenha mostrado associação do genótipo FCGR3B*02/*02 com a doença (Gonzalez-Escribano, 2002).

Em relação às frequências genotípicas para o FCGR3B, não houve diferenças significativas estatisticamente entre os genótipos, o que corrobora com o observado por Yuan et al. (2011) em uma meta-análise onde os resultados mostraram nenhuma associação da distribuição do genótipo nem da frequência do alelo HNA-1b com o LES.

Para a variante polimórfica HNA-1c, nossos resultados estão de acordo com o observado por Terzian et al. (2011) na população brasileira, que mostrou a herança do alelo HNA-1c tanto com o HNA-1a quanto com o HNA-1b e nenhuma evidência para a transmissão independente de HNA-1c. Em nossa população, encontramos que 10,82% dos pacientes com LES e 7,48% dos indivíduos saudáveis apresentaram o alelo HNA-1c, o que se aproxima do valor encontrado por Covas et al. (2005) em brasileiros afro-descendentes. Em outras populações estudadas, os resultados foram bastante divergentes, com o alelo HNA-1c encontrado em 38% dos negros sul-africanos, 5% dos europeus, 22% da população de Gana, 23% dos negros americanos e não encontrado em uma população chinesa (Kissel et al., 2000).

Ainda em relação ao polimorfismo de FCGR3B, um indivíduo com LES (0,63%) e um indivíduo saudável (0,68%) apresentaram reação de PCR negativa para as três variantes polimórficas, o que poderia ser explicado pela deleção do gene ou por representar um novo haplótipo, o qual não permitiu identificação utilizando-se os nossos oligonucleotídeos específicos e também citometria negativa para CD16.

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). O polimorfismo de CR3 consiste em uma substituição de uma arginina por histidina na posição 161 da cadeia CD11b que leva ao genótipo HNA-4a negativo, cuja ocorrência na população é rara (Clague et al., 2003).

Com relação ao polimorfismo do CR3, os resultados apresentados mostraram, pela primeira vez, uma associação dos alelos HNA-4a-positivo e HNA-4a-negativo com LES. Como observado em nossos resultados, o genótipo homozigoto positivo está relacionado com proteção enquanto que a presença do HNA-4a-negativo (heterozigoto positivo/negativo) está associada à suscetibilidade ao LES. Para o grupo de indivíduos homozigotos negativos não foi encontrado resultado significativo estatisticamente, uma vez que o número de indivíduos identificados para este genótipo foi muito baixo.

Há evidência de que a sinalização através de CR3 possa afetar a sinalização via FcγR. Muitos estudos têm reportado que a presença de C3 reduz drasticamente a quantidade de IgG requerida para induzir a internalização de partículas mediada por FcγR. Um outro estudo mostrou que o bloqueio do CR3 reduz a fagocitose mediada por FcγR sem prejudicar a ligação de IgG ao FcγR (Brown et al., 1998).

Como o FcγRIIIb não possui domínio intracelular ou transmembrana, pensa-se que ele esteja associado com o FcγRIIa ou com o CR3 para induzir a sinalização celular. Os polimorfismos no FcγRIIa e na cadeia CD11b do CR3 podem afetar a sinalização via FcγRIIIb (Niederer et al., 2010). A constatação de que dois genes importantes de susceptibilidade ao LES cooperam na mediação de fagocitose e ativação de neutrófilos sugere que esta célula pode ser mais importante no LES do que tenha sido previamente imaginado (Rhodes, Vyse, 2008).

A fagocitose, o *burst* oxidativo, a desgranulação e a produção de citocinas pelos neutrófilos são iniciados pela ligação de imunocomplexos aos receptores para porção Fc da molécula de IgG. Os FcγRIIa e FcγRIIIb são receptores constitutivamente expressos em neutrófilos que induzem a fagocitose mediada por IgG e a sinalização para ativação de fatores nucleares, respectivamente (Rivas Fuentes et al., 2010).

Os resultados de fagocitose em resposta aos diferentes estímulos (IC-IgG e IC-IgG/SHN) nos permitiram verificar que indivíduos com LES ativo e com LES inativo apresentaram valores de porcentagem de fagocitose semelhantes estatisticamente. Desta maneira foi possível inferir que a função fagocítica dos neutrófilos foi independente da

atividade da doença, como observado também por De La Fuente et al. (2001). Assim, consideramos conveniente a criação de um único grupo de LES, sem considerar a atividade da doença, para compararmos com indivíduos saudáveis. De maneira geral, a função fagocítica de neutrófilos foi semelhante entre pacientes com LES e indivíduos controles, diferente do observado por De La Fuente et al. (2001). Desta maneira, os diferentes genótipos constituíram as variáveis a serem consideradas na análise da porcentagem de fagocitose de cada grupo.

Nossos resultados nos permitiram observar que, embora não significativo, quando o estímulo oferecido aos neutrófilos foi opsonizado com complemento (IgG-IC/SHN) houve um aumento na porcentagem de fagocitose, o que demonstra uma cooperação dos receptores de IgG e de complemento para a fagocitose, de acordo com a literatura, que apresenta o importante papel do CR3 em mediar a fagocitose mostrando que a co-estimulação do CR3 com FcγR aumenta a fagocitose mediada por CR3 (Huang et al., 2010).

Quanto ao polimorfismo do receptor FcγRIIa, a fagocitose desempenhada pelo grupo controle homozigoto HH mostrou-se significativamente diminuída em relação ao apresentado pelo grupo controle homozigoto RR e pelo grupo controle heterozigoto HR quando os neutrófilos foram estimulados com IC-IgG. Além disso, com este estímulo foi observada uma diminuição da fagocitose do grupo de LES heterozigoto HR quando comparado ao grupo controle RR. Podemos observar também que, com IC-IgG/SHN como estímulo, os neutrófilos de indivíduos saudáveis HH também apresentaram uma fagocitose menor que de indivíduos saudáveis RR, sugerindo que a presença do alelo R131 estaria aumentando a resposta destes neutrófilos. Como estas diferenças foram observadas dentro do grupo controle, podemos inferir que o padrão apresentado é dependente da biologia dos receptores, e não uma alteração relacionada à doença.

Em relação ao polimorfismo do FcγRIIIb, quando utilizamos como estímulo IC-IgG, não houve diferença significativa na fagocitose dos neutrófilos com diferentes genótipos, embora a fagocitose nos grupos controles tenha se mostrado maior que no grupo LES na maioria dos genótipos analisados, com uma diferença notável entre LES e controle no genótipo HNA-1b. Quando utilizado o estímulo IC-IgG/SHN, foi observada uma diminuição na fagocitose por neutrófilos do grupo controle HNA-1a/1b em relação ao grupo controle homozigoto HNA-1b. Além disso, foi possível observar uma inversão no padrão de resposta entre indivíduos HNA-1b e HNA-1a/1b, sendo que entre indivíduos do genótipo HNA-1b, o grupo controle apresentou uma fagocitose maior que LES e entre os indivíduos HNA-1a/1b, a fagocitose no LES foi maior que no controle. Este resultado corrobora com a literatura que

descreve uma diminuição da fagocitose de IC por Fc γ RIIIb (Salmon et al., 1990, Bredius et al., 1993).

Para o polimorfismo de CR3, não houve diferença significativa na fagocitose dos neutrófilos com diferentes genótipos estimulados com IC-IgG/SHN.

Para o estudo da desgranulação dos neutrófilos, foi realizada a quantificação da liberação de lisozima e elastase frente a diferentes estímulos. Diante do interesse em estudar a influência dos polimorfismos dos Fc γ R e CR3 na desgranulação de neutrófilos de pacientes com LES, foram estabelecidos estímulos dependentes de Fc γ R e CR para os ensaios realizados e estímulos independentes destes receptores estudados. Para isso, o N-Formilmetionina Leucil-Fenilalanina (fMLP) foi incluído em nosso estudo, uma vez que ativa a desgranulação dos neutrófilos por uma via independente de receptores na membrana celular. O fMLP é um peptídeo sintético que mimetiza a atividade de peptídeos derivados de bactérias que são reconhecidos pelos neutrófilos. Este peptídeo, após se ligar ao seu receptor acoplado à proteína G inicia uma cascata de sinalização que ativa vias múltiplas, as quais são importantes para o desencadeamento de respostas funcionais dos neutrófilos, como o *burst* oxidativo, a desgranulação e a fagocitose (Crossley, 2003). A estimulação de neutrófilos com fMLP geralmente requer um pré-tratamento ou um *priming* dos neutrófilos para iniciar o processo de estimulação. Muitos estudos têm utilizado a citocalasina B como agente primador para posterior estímulo com fMLP. A citocalasina B é um composto que gera um rompimento do citoesqueleto celular através da inibição da polimerização da actina, e não induz, por si só, uma resposta nos neutrófilos (Bylund et al., 2004).

Os resultados dos ensaios de desgranulação em resposta aos diferentes estímulos (IC-IgG e Ic-IgG/SHN) nos permitiram verificar que embora os grupos não tenham apresentado diferenças significativas entre si, ocorreu o mesmo perfil de resposta para todos os estímulos, sendo o grupo com LES inativo o de maior liberação de enzimas, tanto elastase quanto lisozima, sugerindo que, embora não significativo este resultado possa ter implicações biológicas e a desgranulação estar associada com a atividade da doença.

Embora não significativo, observou-se um aumento na liberação de elastase e lisozima no grupo de pacientes com LES inativo em relação ao grupo de LES ativo e controle.

A enzima elastase constitui um dos principais componentes dos grânulos azurófilos dos neutrófilos e participa da via não-oxidativa de destruição do patógeno. Esta enzima foi identificada primeiramente como uma enzima de degradação, responsável por eliminar patógenos intracelulares e causar dano tecidual em locais inflamatórios (Janoff, Sherer, 1968) e posteriormente reconhecida como possível alvo molecular para agentes anti-inflamatórios

(Virca et al., 1984). Dentro do fagolisossomo, esta enzima age digerindo microorganismos fagocitados em combinação com peptídeos microbicidas e com o sistema NADPH oxidase associado à membrana, o qual produz espécies reativas de oxigênio (Segal, 2005).

A lisozima é um peptídeo antimicrobiano sintetizada em todos os grânulos dos neutrófilos, com pico de concentração nos grânulos específicos e está relacionada com a degradação dos peptideoglicanos das paredes celulares bacterianas. Quanto à propensão à desgranulação, a lisozima é mais facilmente mobilizada que a elastase, necessitando de um tempo menor para que ocorra a sua liberação dos grânulos (desgranulação) (Wright et al., 2010).

A exposição dos neutrófilos a citocinas e quimiocinas resulta na rápida mobilização dos grânulos azurófilos para a superfície celular, liberação de proteínas dos grânulos e surgimento de elastase na superfície celular (Owen, Campbell, 1999). Assim como as proteases solúveis, a elastase ligada à membrana é cataliticamente ativa contra substratos sintéticos e biológicos (Owen, Campbell, 1999, Korkmaz et al., 2004). Sabe-se que a elastase é encontrada em maior quantidade em pacientes com LES, provavelmente devido a maior atividade do neutrófilo (Zhang et al., 1989, Ohlsson, et al., 2005, Figueredo et al., 2008).

A desregulação do balanço extracelular entre proteases e anti-proteases que ocorre durante a inflamação leva à ativação de mediadores inflamatórios e favorece o recrutamento de mais neutrófilos via produção de interleucina (IL)-8, o que pode explicar o caráter crônico de algumas doenças inflamatórias (Taggart et al., 2005). Mas a razão pela qual as proteases secretadas permanecem enzimaticamente ativas e contribuem para a cronicidade da inflamação por clivar proteínas-alvo extracelulares no ambiente muitas vezes repleto com inibidores ainda não está clara.

Neste estudo as diferenças no perfil de desgranulação de neutrófilos de pacientes com LES ativo e com LES inativo podem refletir o balanço de citocinas, que modula a atividade da doença e influencia as respostas biológicas, como descrito na literatura (Korkmaz et al., 2008, Meyer-Hoffert, Wiedow, 2011). O envolvimento das enzimas dos neutrófilos como mediadores do processo inflamatório constitui um alvo em potencial contra as desordens inflamatórias.

No LES, uma causa comum de complicações são as doenças infecciosas e a suscetibilidade a elas é consequência do desequilíbrio imunológico. A terapia imunossupressora, incluindo glicocorticoides e drogas citotóxicas colaboram para o aumento do risco a infecções. Além disso, a exacerbação da doença sempre é acompanhada por infecções que representam um desafio para o diagnóstico diferencial. O desequilíbrio

imunológico no LES certamente, mas não somente, contribui para o estabelecimento de processos infecciosos. As infecções constituem a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com LES. Os leucócitos são as células primeiramente responsáveis pela manutenção dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra microorganismos invasores. Estas células respondem às infecções pela liberação de componentes tóxicos ou enzimas dos grânulos, cuja função é agir intra ou extracelularmente para destruir e remover agentes infecciosos do organismo (de La Fuente et al., 2001).

Devido à grande importância que a ocorrência de infecções apresenta ao LES, foi realizado o levantamento do número de infecções ocorridas de acordo com o boletim médico oficial de cada paciente com LES e apuramos a média da frequência de infecções entre os indivíduos. Posteriormente, a ocorrência de infecções foi associada aos polimorfismos genéticos estudados para identificação de indivíduos cujo fenótipo determinado pelo polimorfismo dos FcγR e CR3 pudesse conferir suscetibilidade ou proteção às infecções.

A alta incidência de infecções no LES tem sido retratada em vários estudos, os quais trazem as bactérias como principal agente infeccioso (Noel et al., 2001, Gladman et al., 2002). Cervera et al. (1999) analisaram 1000 pacientes por 5 anos e observaram que 27% deles apresentaram algum episódio de infecção neste período. Uma vez que já foi descrito que no LES 80% das infecções são causadas por bactérias (Cuchacovic, Gedalia, 2009), seria importante também investigação do agente etiológico envolvido em cada infecção para uma possível relação com o genótipo encontrado. Porém, as infecções diagnosticadas durante o acompanhamento no HCFMRP-USP foram, em sua maioria, tratadas sem a necessidade de realização de cultura de amostra para identificação do agente patogênico, uma vez que a maioria das infecções apresentadas pelos pacientes com LES era de comunidade; assim, não foi possível a obtenção deste dado.

A associação da homozigose de R131 com a suscetibilidade à doença pneumocócica já foi descrita por alguns autores (Rodriguez et al., 1999; Yee et al., 2000; Yuan et al., 2003). Além disso, há estudos mostrando que neutrófilos de indivíduos homozigotos para H131 têm uma capacidade fagocítica aumentada para *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* opsonizadas por IgG (Rodriguez et al., 1999; Bredius et al., 1994, Fijen et al., 2000). Porém, não há estudos da combinação dos genótipos encontrados para cada polimorfismo estudado (do FcγRIIa, FcγRIIIb e CR3). Assim, consideramos muito importante a associação das combinações dos polimorfismos com a ocorrência de infecções.

A ocorrência de infecções foi mais frequente em indivíduos heterozigotos HR131 e HNA-1a/1b. Foi observada uma associação dos alelos R131 e HNA-1b com a ocorrência de

infecções. Para o HNA-4a, as infecções foram mais frequentes em indivíduos homozigotos positivo, o que pode não caracterizar uma associação à suscetibilidade às infecções, devido à baixa frequência do alelo negativo na população, mas sim refletir a maior frequência do genótipo HNA-4a-positivo na população. A combinação com a maior incidência de infecções foi a heterozigose para os três polimorfismos (HR/HNA-1a/1b/positivo/negativo)

Como as informações sobre a ocorrência de infecções foram obtidas retrospectivamente, desde a data de diagnóstico da doença, não foi possível a obtenção dos dados de maneira fidedigna. O longo período entre as consultas, o que não permite um monitoramento do número de infecções sofridas pelo paciente neste intervalo, ou a subnotificação de infecções no prontuário do paciente pelo profissional médico, uma vez que tais infecções não pertencem à especialidade do tratamento seguido no hospital, podem ter ocasionado a subestimação do número ocorrência de infecções em pacientes com LES.

Com o intuito de finalizar a investigação dos receptores FcγRIIa, FcγRIIb e CR3 em relação aos polimorfismos estudados para estes, nós analisamos a densidade da expressão desses receptores na membrana dos neutrófilos de diferentes genótipos, que foi expressa pela porcentagem de neutrófilos fluorescentes e pela intensidade de fluorescência/célula. Tal estudo foi realizado para que pudéssemos observar se alguma função (fagocitose ou desgranulação) desempenhada pelos neutrófilos dos diferentes genótipos poderia estar comprometida pela expressão reduzida ou aumentada de algum destes receptores na membrana celular; e, além disso, para verificar se os diferentes genótipos bem como a atividade da doença estariam influenciando na expressão de tais receptores.

Em relação à expressão do CD16 observamos que a mediana de intensidade de fluorescência por célula para indivíduos com LES ativo HNA-1b foi menor estatisticamente que para o genótipo HNA-1a/1b no mesmo grupo de indivíduos. Esta constatação sugere que a co-expressão das duas formas polimórficas (1a e 1b) no receptor, dada pelo fenótipo heterozigoto, esteja contribuindo para o aumento da expressão deste receptor na superfície celular.

A ativação e inibição dos FcγR parecem desempenhar um papel importante na fisiopatologia do LES, tanto na autoimunidade, quanto no desenvolvimento da inflamação. A modulação dos FcγR pode influenciar as respostas aos IC e o curso da doença, fazendo destes receptores alvos para a imunoterapia. Assim, a caracterização dos genótipos dos FcγR e sua relação com as funções efetoras mediadas por eles, em conjunto com outros mediadores da

resposta imune, tais como complemento e outros polimorfismos associados à imunidade inata, podem contribuir para a identificação de assinaturas gênicas para a suscetibilidade ao LES.

.....

Conclusão

.....

8. Conclusão

- Nossos resultados mostraram que, para o polimorfismo do CR3, o alelo HNA-4a positivo contribui para a proteção e o alelo negativo para a 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 R-131 de FCGR2A e HNA-1b de FCGR3B estavam presentes.
- Para os ensaios funcionais:
 - neutrófilos dos indivíduos controle com genótipo H-131 apresentaram fagocitose diminuída quando comparados aos neutrófilos com genótipos HR-131 e R-131 quando estimulados com IC-IgG. Quando estimulados com IC-IgG/SHN, os neutrófilos H-131 de indivíduos controle apresentaram fagocitose menor que neutrófilos R-131.
 - neutrófilos de pacientes com LES com genótipo HR-131 apresentaram uma fagocitose diminuída quando comparados aos neutrófilos do grupo controle com genótipo R-131 quando estimulados tanto com IC-IgG quanto com IC-IgG/SHN;
 - no polimorfismo do FcγRIIIb, a fagocitose e a lisozima foram menores em neutrófilos de pacientes com LES com genótipo HNA-1b e maior para HNA-1a/1b comparados aos controles com os respectivos genótipos (IC-IgG/SHN);
 - nenhuma diferença foi observada para o polimorfismo HNA-4a do CR3;
 - nenhuma diferença foi observada para os ensaios de elastase;
- Neutrófilos de pacientes com LES inativo com genótipo HNA-1a/1b apresentaram maior expressão de CD16 que neutrófilos com genótipo HNA-1b do mesmo grupo.
- Este estudo contribui para o entendimento das anormalidades nas funções dos neutrófilos no LES e para a identificação de indivíduos, cujo polimorfismo dos FcγR e CR3 possa conferir suscetibilidade ou proteção às infecções.

Referências Bibliográficas

9. Referências bibliográficas

- Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, et al. Copy number polymorphism in FcγR3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature*. 2006;439:851-5.
- Alves CM, Marzocchi-Machado CM, Louzada-Junior P, Azzolini AE, Polizello AC, de Carvalho IF, Lucisano-Valim YM. Superoxide anion production by neutrophils is associated with prevalent clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2008;27(6):701-8.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu. Rev. Immunol*. 2012;30:459–89.
- Baggiolini M, Schnyder J, Bretz U, Dewald B, Ruch W. Cellular mechanisms of proteinase release from inflammatory cells and the degradation of extracellular proteins. *Ciba Found Symp*. 1979; 105-121.
- Bazílio AP, Viana VST, Toledo R et al. FcγRIIa polymorphism: a susceptibility factor for immune complex-mediated lupus nephritis in Brazilian patients. *Nephrol Dial Transpl*. 2004;19:1427-31.
- Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum*. 1992;35:630–40.
- Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity Review*. 2010;33:657-670.
- 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, de Vries CE, Troelstra A, van Alphen L, Weening RS, van de Winkel JG, et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* type B opsonized with polyclonal human IgG1 and IgG2 antibodies. Functional hFc gamma RIIa polymorphism to IgG2. *J Immunol*. 1993;151:1463–1472.
- Bredius RG, Derkx BH, Fijen C, Wit TPM, Haas M, Weening RS, van de Winkel JGJ, Out TA. Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism in fulminant meningococcal septic shock in children. *J Infect Dis*. 1994;170:848-53.
- Brouwer MC, de Gans J, Heckenberg SG et al. Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:31-44.
- 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;81:365–375.

- Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009;113:3716-25.
- Brunkhorst BA, Strohmeier G, Lazzari K, Weil G, Melnick D, Fleit HB, et al. Differential roles of Fc γ RII and Fc γ RIII in immune complex stimulation of human neutrophils. *J Biol Chem*. 1992;267:20659-66.
- Bux J, Stein E-L, Bierling P, Fromont P, Clay M, Stroncek D, Santoso S. Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fcγ receptor III b. *Blood*. 1997;89:1027-34.
- Bux J, Stein EL, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. NA gene frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion*. 1995;35:54-7.
- Bux J. Human neutrophil alloantigens. *Vox Sang*. 2008; 94:277-85.
- Bylund J, Pellme S, Fu H, Mellqvist UH, Hellstrand K, Karlsson A, et al. Cytochalasin B triggers a novel pertussis toxin sensitive pathway in TNF-α primed neutrophils. *BMC Cell Biol*. 2004;5-21.
- Cardone JD, Bordin JO, Chiba AK, Norcia AM, Vieira-Filho JP. 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, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Aydintug AO, Jedryka-Góral A, de Ramón E, Fernández-Nebro A, Galeazzi M, Haga HJ, Mathieu A, Houssiau F, Ruiz-Irastorza G, Ingelmo M, Hughes GR. *Medicine (Baltimore)*. 1999;78(3):167-75.
- Chen JY, Wang CM, Tsao KC, Chow YH, Wu JM, Li CL, et al. Fcγ receptor IIa, IIIa, and IIIb polymorphisms of systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Ann Rheum Dis*. 2004;63:877-880.
- 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/resol96/RES19696.htm>.
- Coelho-Barros, EA, Simões PA, Achcar JÁ, Martinez EZ, Shimano AC. Methods of estimation in multiple linear regression: application to clinical data. *Revista Colombiana de Estadística*. 2008; 31(1):111-29.
- Covas DT, Kashima S, Guerreiro JF, dos Santos SEB, Zago MA. Variation in the FcγR3B gene among distinct Brazilian populations. *Tissue Antigens*. 2005;65:178-182.
- Crossley LJ. Neutrophil activation by fMLP regulates FOXO (forkhead) transcription factors by multiple pathways, one of which includes the binding of FOXO to the survival factor Mcl-1. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;74:583-592.

- Cuchacovich R, Gedalia A. Pathophysiology and clinical spectrum of infections in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am*. 2009;35:75-93.
- Daëron M. Structural bases of FcγR functions. *Int Rev Immunol* 1997;16:1-27.
- Davies KA, Schifferli JA, Walport MJ. Complement deficiency and immune complex disease. *Springer Semin Immunopathol*. 1994;15:397–416.
- de la Fuente, Richaud-Patin Y, Jakez-Ocampo J. Innate immune mechanisms in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). 2001;77:175–180.
- Dijstelbloem HM, Bijl M, Fijnheer R, Scheepers RH, Oost WW, Jansen MD, et al. Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum* 2000;43:2793–2800.
- Dijstelbloem, H.M. et al. Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum*. 2000; 43: 2793–2800.
- Duits AJ, Bootsma H, Derksen RH, Spronk PE, Kater L, Kallenberg CG, et al. Skewed distribution of IgG Fc receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum*. 1995;38:1832–1836.
- Ehlenberger AG, Nussenzweig V. The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. *J Exp Med*. 1977;145(2):357-71.
- Ehrlich P. [Methodological contributions to physiology and pathology of the various forms of Leukocyte]. *Z. Klin. Med*. 1880;1:553–60. German.
- Enenkel B, Jung D, Frey J. Molecular basis of IgG Fc receptor III defect in a patient with systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol*. 1991;21:659-663.
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microb 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.
- Fessler BJ. Infectious diseases in systemic lupus erythematosus: risk factors, management and prophylaxis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2002; 16:281-91.
- Figueredo CM, Areas A, Sztainbok FR, Miceli V, Miranda LA, Fischer RG, et al. Higher elastase activity associated with lower IL-18 in GCF from juvenile systemic lúpus patients. *Oral Health Prev Dent*. 2008;6(1):75-81.
- Fijen CA, Bredius RG, Kuijper EJ. Polymorphism of IgG Fc receptors in meningococcal disease. *Ann Intern Med*. 1993;119:636.

- Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The cell biology of phagocytes. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2012;7:49-86.
- 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.
- Freire EAM, Souto LM, Ciconelli RM. Assessment measures in systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reumatol.* 2011;51(1):70-80.
- Galon J, Bouchard C, Fridman WH, Sautès C. Ligands and biological activities of soluble Fc γ receptors. *Immunol Lett.* 1995; 44:175-81.
- Gessner JE, Heiken H, Tamm A et al. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol.* 1998;76:231-48.
- 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. *Lupus* 2002;11:234–239.
- Gonzalez-Escribano, M.F. et al. FcgammaRIIA, FcgammaRIIIA and FcgammaRIIIB polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunogenet.* 2002; 29: 301–306.
- Groves W F, Davis Jr FC, Sells BH. Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference. *Anal. Biochem.* 1968;22:195-210.
- Hatta Y, Tsuchiya N, Ohashi J, Matsushita M, Fujiwara K, Hagiwara K, 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;1:53-60.
- Hong, C.H. et al. The association between fcgammaRIIIB polymorphisms and systemic lupus erythematosus in Korea. *Lupus.* 2005;14:346–350.
- Huang ZY, Hunter S, Chien P, Kim MK, Han-Kim TH, Indik ZK, Schreiber AD. Interaction of two phagocytic host defense systems: Fc γ receptors and complement receptor 3. *J Biol Chem.* 2011;286(1):160-8.
- Huizinga TW, Dolman KM, van der Linden NJ et al. Phosphatidylinositol-linked FcRIII mediates exocytosis of neutrophil granule proteins, but does not mediate initiation of the respiratory burst. *J Immunol.* 1990;144:1432-1437.
- 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; 22:811-6.
- Iida K, Mornaghi R, Nussenzweig V. Complement receptor (CR1) deficiency in erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 1982;155:1427-38.
- Iliopoulos AG, Tsokos GC. Immunopathogenesis and spectrum of infections in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 1996; 25:318-36.

- Jancar S, Sánchez Crespo M. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. *Trends Immunol.* 2005;26:48–55.
- Janoff A, Scherer J. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 1968;128:1137-55.
- Johansson S, Göransson U, Luijendijk T, Backlund A, Claeson P, Bohlin L. A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *J Nat Prod.* 2002;65:32–41.
- Jönsen A, Gunnarsson I, Gullstrand B, Svenungsson E, Bengtsson AA, Nived O, et al. Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and FcγRIIIa genes. *Rheumatology.* 2007;46:1417-21.
- Kanashiro A, Kabeya LM, Polizello AC, Lopes NP, Lopes JL, Lucisano-Valim YM. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. *Phytother Res.* 2004;81:61–65.
- Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res.* 2009;43:25–61.
- Kimberly RP, Parris TM, Inman RD et al. Dynamics of mononuclear phagocyte system Fc receptor function in systemic lupus erythematosus. Relation to disease activity and circulating immune complexes. *Clin Exp Immunol.* 1983;51:261-8.
- 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, Lum RF, Nititham J, Taylor K, 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, Daniels G, Bux J. HNA-1a, HNA-1b, and HNA-1c (NA1, NA2, SH) frequencies in African and American Blacks and in Chinese. *Tissue Antigens.* 2000;56:143–148.
- Koene HR, Kleijer M, Roos D, de Haas M, Von dem Borne AE. 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.
- Korkmaz B, Attucci S, Moreau T, Godat E, Juliano L, Gauthier F. Design and use of highly specific substrates of neutrophil elastase and proteinase 3. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;30:801-80.
- Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie.* 2008;90(2):227-42.
- Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol.* 2010; 10(11):1325-34.

- Lee YH, Ji JD, Song GG. Fcγ receptor IIB and IIIB polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Lupus*. 2009; 18:727–734.
- Lehmann AK, Sørnes S, Halstensen A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2000;243:229–42.
- Li X, Ptacek TS, Brown EE, Edberg JC. Fcγ receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun* 2009;10(5):380–389.
- Liu CC, Ahearn JM. The search for lupus biomarkers. *Best Pract Res Clin Rheum*. 2009; 23:507–523.
- 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.
- Mamtani M, Anaya JM, He W, Ahuja SK. Association of copy number variation in the FCGR3B gene with risk of autoimmune diseases. *Genes and Immunity*. 2010;11:55–160.
- Manger K, Repp R, Spriewald BM, Rascu A, Geiger A, Wassmuth R, et al. Fcγ receptor IIa polymorphism in Caucasian patients with systemic lupus erythematosus: association with clinical symptoms. *Arthritis Rheum*. 1998;41:1181–1189.
- Maniatis, T, Fritsch, EF, Sasmbroock, J. *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York: Spring Harbor. 1989.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Rev Immunol*. 2011;11:519:31.
- Mantovani B. Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1975;115:15–7.
- Marzocchi-Machado CM, Alves CM, Azzolini AE, Polizello AC, Carvalho IF, Lucisano-Valim YM. Fcγ receptors 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, Lucisano-Valim YM. Receptores para Imunoglobulina G (FcγR). *Medicina Ribeirão Preto*. 2005;38: 82–95.
- Marzocchi-Machado CM, Polizello AC, Azzolini AE, Lucisano-Valim YM. 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.
- Medof ME, Iida K, Mold C, Nussenzweig V. Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *J Exp Med* 1982;156:1739–54.
- Metchnikoff E. [Lesson on the comparative pathology of inflammation]. *Ann. Inst. Pasteur* 1893;7:348–57. French.
- Meyer-Hoffert U, Wiedow O. Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses. *Curr Opin Hematol*. 2011;18:19–24.

- Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
- Morris DL, Roberts AL, Witherden AS, Tarzi R, Barros P, Whittaker JC, et al. Evidence for both copy number and allelic (NA1/NA2) risk at the FCGR3B locus in systemic lupus erythematosus. *European Journal of Human Genetics.* 2010;18:1027–1031.
- Muschter S, Berthold T, Greinacher A. Developments in the definition and clinical impact of human neutrophil antigens. *Curr Opin Hematol.* 2011;18:452–460.
- Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev.* 2007; 219:88-102.
- Németh T, Mócsai A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunology Letters.* 2012; 143:9-19.
- Niederer HA, Clatworthy MR, Willcocks LC, Smith KG. FcγRIIB, FcγRIIIB, and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1183:69-88.
- Noel V, Lortholary O, Casassus P, et al. *Ann. Rheum. Dis.* 2001;60:1141–1144.
- Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol* 2011;90(2):271-84.
- Ohlsson S, Hellmark T, Pieters K, Sturfelt G, Wieslander J, Segelmark M. Increased monocyte transcription of the proteinase 3 gene in small vessel vasculitis. *Clinic Experim Immunol.* 2005.141;174-182.
- Ohto H, Matsuo Y. Neutrophil-specific antigens and gene frequencies in Japanese. *Transfusion.* 1989;29:654.
- Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis, *J Leukoc Biol.* 1999;65:137-150.
- Pradhan V, Patwardhan M, Ghosh K. Fc gamma receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus and their correlation with the clinical severity of the disease. *Indian J. Hum. Genet.* 2008;14(3):77-81.
- Rascu A, Repp R, Westerdaal NAC et al. Clinical relevance of Fcγ receptor polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;815:282-95.
- Rhodes B, Vyse TJ. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology.* 2008;47:1603-11.
- Rivas-Fuentes S, García-García E, Nieto-Castañeda G, Rosales C. Fcγ receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. *Cellular Immunology.* 2010;
- Rodriguez ME, van der Pol WL, Sanders LA, van de Winkel JG. 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.

- Sachs UJH, Chavakis T, Fung L, Lohrenz A, Bux J, Reil A, Ruf A, Santoso S. Human alloantibody anti-Mart interferes with Mac-1–dependent leukocyte adhesion. 2004;104:727-734.
- Salmon JE, Edberg JC, Kimberly RP. Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest* 1990;85:1287–1295.
- Salmon JE, Millard S, Schachter LA, Arnett FC, Ginzler EM, Gourley MF, Ramsey-Goldman R, Peterson MG, Kimberly RP. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J. Clin. Invest* 1996;97:1348–1354.
- Salmon JE, Millard S, Schachter LA, Arnett FC, Ginzler EM, Gourley MF, et al. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest*. 1996;97:1348–1354.
- Salmon JE, Pricop L. Human receptors for immunoglobulin G: elements in the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Rheum*. 2001;44:739–50.
- Salmon JE, Pricop L. Human Receptors for Immunoglobulin G: Key Elements in the Pathogenesis of Rheumatic Disease. *Arthritis Rheum*. 2001;44(4):739-750.
- Sanders LA, Feldman RG, Voorhorst-Ogink MM, Haas M, Rijkers GT, Capel PJA, Zegers BJM, Van De Winkel JGJ. Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect Immun*. 1995;63:73-81.
- Santos EOL. Mecanismo de ação de flavonóides no metabolismo oxidativo e na fagocitose de neutrófilos humanos desencadeados por receptores Fc-gama e CR [dissertação]. Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; 2010.
- 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.
- Schifferli JA, Taylor RP. Physiological and pathological aspects of circulating immune complexes. *Kidney Int*. 1989;35:993-1003.
- Schreiber AD, Parsons J, McDermott P, Cooper RA. Effect of corticosteroids on the human monocyte IgG and complement receptors. *J Clin Invest*. 1975;56(5):1189-97.
- Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol*. 2005;23:197–223.
- Selvaraj P, Rosse WF, Silber R et al. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature*. 1988;333:565-7.
- Simsek S, van der Schoot CE, Daams M, Huiskes E, Clay M, McCullough J, van Dalen C, Stroncek D, von dem Borne AE. 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.
- Smolelis AN, Hartsell SE. The determination of lysozyme. *J Bacteriol*. 1949;58:731-6.

- Song YW, Han CW, Kang SW, Baek HJ, Lee EB, Shin CH, et al. Abnormal distribution of Fc gamma receptor type IIa polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998;41:421–426.
- Spiegelhalter DJ, Myles JP, Jones DR, Abrams KR. Bayesian methods in health technology assessment: a review. *Health Technol Assess.* 2000;4(38):1-130.
- Stoscheck, CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 1990;182:50-68.
- Szucs G, Kawai M, Kiss E, Csipo I, Szegedi G. Correlation of IgG Fc receptors on granulocytes with serum immune complex level in systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol.* 1995;42:577-580.
- Taggart CC, Greene CM, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG. Elastolytic proteases: inflammation resolution and dysregulation in chronic infective lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:1070-1076.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25(11):1271-7.
- Unkeless JC, Shen Z, Lin CW, DeBeus E. Function of human FcγRIIA and FcγRIIIB. *Semi Immunol.* 1995;7:37-44.
- van der Pol WL, van de Winkel JGJ. IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. *Immunogenetics.* 1998;48:222–32.
- van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG: FcγRIIIA polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens* 2003;61:189–202.
- Virca GD, Metz G, Schnebli HP. Similarities between human and rat leukocyte elastase and cathepsin G *Eur J Biochem* 1984;144:1-9.
- Warmerdan PAM, Van Der Winkel JGJ, Gosseelin EJ, Capel PJA. Molecular basis for a polymorphism of the human Fc receptor II (CD32). *J Exp Med.* 1990;172:19-25.
- Willcocks LC, Lyons PA, Clatworthy MR, Robinson JI, Yang W, Newland SA, 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.
- Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology.* 2010;49:1618–1631.
- 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;8:305–310.
- Yee AM, Ng SC, Sobel RE, Salmon JE. Fc gammaRIIA polymorphism as a risk factor for invasive pneumococcal infections in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1180-2.

Yuan FF, Wong M, Pererva N et al. FcgammaRIIA polymorphisms in Streptococcus pneumoniae infection. Immunol Cell Biol. 2003;81:192-5.

Zhang XR, Yan YH, Liang ZQ, Jiang M. Changes of neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in systemic lupus erithematosus. Proc Chin Acad Sci Peking Union Med Coll. 1989; 4(1):26-9.

Zhou M, Todd RF 3rd, van de Winkel JG, Petty HR. 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.

Zhou MJ, 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.

10. Anexos

10.1. Anexo I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.

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 ERITEMATOSO 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 2195 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail: cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto - SP

10.2. Anexo II: Protocolos para o preparo das principais soluções utilizadas

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
Sol. De NaCl 0,15M qsp	100mL
Aquecer.	

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		

<u>SOLUÇÃO DE ALSÉVER</u>	
Citrato trissódico. 2H ₂ O	8g
Cloreto de sódio (NaCl)	4,2g
Glicose	20,5g
Água deionizada qsp	1000mL
Ajustar pH final para 6,1 com ácido cítrico 10%. Filtrar.	

<u>CLORETO DE SÓDIO 0,15M (0,9%)</u>	
NaCl [PM = 58,44]	8,76g
Água deionizada qsp	1000mL
Autoclavar.	

<u>PBS (SALINA TAMPONADA COM FOSFATO) PH 7,4 (10 X)</u>	
NaCl	80,0g
KCl	2,0g
Na ₂ HPO ₄	11,5g
KH ₂ PO ₄	2,0g
Água deionizada estéril qsp	1000mL
Ajusta pH final para 7,4 a 25°C com HCl.	

<u>TAMPÃO DE AMOSTRA PARA DNA (6X)</u>	
40% sacarose	4g
0,25% azul de bromofenol	0,025mL do 1%
Água deionizada estéril qsp	10mL
Alíquotas de 1mL e armazenar em -20°C.	

<u>LÍQUIDO DE TURK</u>	
Violeta Genciana 1%	1mL
Ácido Acético Glacial	1mL
Água deionizada estéril qsp	100mL

<u>TAMPÃO TRIS-BORATO-EDTA (TBE) 10X CONCENTRADO</u>	
Tris Base	121,1g (1M)
Ácido Bórico Anidro	55,6g (0,9M)
EDTA.Na ₂ .2H ₂ O	3,7g (10mM)
Água deionizada estéril qsp	1000mL

<u>AZUL DE TRIPAN - 0,4% (FAGOCITOSE)</u>	
Azul de Tripán	40mg
PBS/citrato de sódio 0,02M pH 4,4 qsp	10mL
Colocar 30min no sonicador e filtrar com filtro de seringa.	

<u>AZUL DE TRIPAN - 0,1% (VIABILIDADE CELULAR)</u>	
Azul de Tripán	10mg
PBS/citrato de sódio 0,02M pH 4,4 qsp	10mL
Colocar 30min no sonicador e filtrar com filtro de seringa.	

<u>EDTA (0,1M) - FAGOCITOSE</u>	
EDTA	37,2g
NaCl 0,15M qsp.	100mL
Acertar o pH para 4,4.	

<u>TAMPÃO FOSFATO - K_2HPO_4 (0,1M)</u>	
K_2HPO_4	1,74g
H ₂ O estéril qsp.	100mL
Acertar o pH para 7,0 com HCl.	

<u>TAMPÃO DE LISE DE ERITRÓCITOS</u>	
Tris-HCl	1,57g
Água estéril qsp.	1000mL
Acertar o pH para 7,5.	
Sacarose	102,69g
MgCl ₂	0,048g
Solubilizar no Tris-HCl preparado preciamente.	
Triton X-100	10mL
Água estéril qsp.	1000mL
Estocar sob refrigeração (4°C) e protegido da luz.	

<u>TAMPÃO DE LISE DE GLÓBULOS BRANCOS</u>	
NaCl	4,35g
EDTA	8,92g
Água estéril qsp.	1000mL
Acertar o pH para 8,0. Estocar à temperatura ambiente.	

<u>CLORETO DE SÓDIO 6,0M</u>	
NaCl	34,8g
Água estéril qsp.	100mL
Estocar a solução saturada à temperatura ambiente.	