



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

*Programa de Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia*

**“Determinação dos genótipos para o
polimorfismo dos receptores de IgG, Fc γ RIIa
(H/R131) e Fc γ RIIIb (NA1/NA2), e estudo do
burst oxidativo dos neutrófilos em indivíduos
infectados pelo HIV e/ou *Mycobacterium
tuberculosis*”**

CAROLINA MARIA QUINELLO GOMES DE FARIA

ARARAQUARA – SP

2011

**“Determinação dos genótipos para o
polimorfismo dos receptores de IgG, Fc γ RIIa
(H/R131) e Fc γ RIIIb (NA1/NA2), e estudo do
burst oxidativo dos neutrófilos em indivíduos
infectados pelo HIV e/ou *Mycobacterium
tuberculosis*”**

Carolina Maria Quinello Gomes de Faria

Dissertação apresentada ao Programa de
Biotecnologia e Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia (área de Imunologia), da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista, como
requisito para obtenção do título de Mestre

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

ARARAQUARA – SP

2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F224d Faria, Carolina Maria Quinello Gomes de
Determinação dos genótipos para o polimorfismo dos receptores e IgG, FcγRIIIa (H/R131) e FcγRIIIb (NA1/NA2), e estudo do *burst* oxidativo dos neutrófilos em indivíduos infectados pelo HIV e/ou *Mycobacterium tuberculosis* / Carolina Maria Quinello Gomes de Faria. – Araraquara, 2011
131 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociência e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Paulo Inácio da Costa

1. Burst oxidativo. 2. Polimorfismo. 3. Neutrófilos. 5. HIV. 6. *Mycobacterium tuberculosis*. I. Costa, Paulo Inácio, orient. II. Título.

CAPES: 403000005

APRESENTAÇÃO



Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica e no Laboratório de Hematologia Clínica do Departamento de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara.

Fomento: Bolsa CAPES - Mestrado

DEDICATÓRIA



CONFIE SEMPRE

Não percas a tua fé entre as sombras do mundo. Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para a frente, erguendo-a por luz celeste, acima de ti mesmo. Crê e trabalha. Esforça-te no bem e espera com paciência. Tudo passa e tudo se renova na terra, mas o que vem do céu permanecerá. De todos os infelizes os mais desditosos são os que perderam a confiança em Deus e em si mesmo, porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo. Eleva, pois, o teu olhar e caminha. Luta e serve. Aprende e adianta-te. Brilha a alvorada além da noite. Hoje, é possível que a tempestade te amarfanhe o coração e te atormente o ideal, aguilhoando-te com a aflição ou ameaçando-te com a morte. Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia.

(Chico Xavier)

A vocês, meus pais (Arly e Marlene), é que dedico essa obra, por me ensinaram a nunca perder a fé e a paciência. Por muitas vezes renunciarem aos seus sonhos, para que pudessem realizar os meus. A vocês, pelos momentos que, em minha ausência, souberam respeitar e valorizar meus esforços, apesar da saudade. Obrigada pela confiança, pelo apoio e pelos momentos que, em silêncio transmitiram amor e compreensão...

Muito Obrigada.

Vocês são meu alicerce e meu maior exemplo...

Amo vocês!

Também dedico à minha irmã (Camila), que mesmo longe sempre esteve tão presente, apesar de tanta saudade. A distância foi apenas a oportunidade dada pelo tempo para que pudéssemos perceber que podemos traduzir a

nossa relação a tantas palavras, entre elas: AMOR e AFINIDADE. Não importa o tempo, a ausência, os adiantamentos, a distância, as impossibilidades...

Obrigada pelo carinho e apoio de sempre.

Amo você!

Ao meu namorado e grande amor (Benedito) que sempre esteve ao meu lado, me incentivando a nunca desistir apesar das dificuldades, dispondo sempre de muita atenção, carinho e compreensão.

Obrigada pela sua dedicação e seu amor.

Te amo muito!

AGRADECIMENTOS



Agradeço todos aqueles que colaboraram com a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, pela oportunidade, suporte e confiança depositada em mim. Por permitir e colaborar com o meu avanço pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca, por ceder gentilmente as dependências do Laboratório de Hematologia Clínica para que eu pudesse realizar parte deste trabalho. Obrigada por toda a atenção, disponibilidade, ajuda e interesse. Além da participação como membro da banca do exame de qualificação, juntamente com a professora Dr. Iracilda Zeppone Carlos. A vocês, muito obrigada pelas observações e sugestões.

À professora Dr. Fernanda Anibal, pelas correções e sugestões valiosas oferecidas para a conclusão deste trabalho, como membro da banca de defesa. Muito obrigada por estar sempre presente e colaborar com meu crescimento profissional, por dispor do seu tempo, pela atenção, pelos elogios e pela amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.

Ao professor Flávio Henrique da Silva e alunos do Laboratório de Genética da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

Aos funcionários do Hospital Regional Nestor Goulart Reis de Américo Brasiliense.

Aos funcionários do Serviço Especial de Saúde de Araraquara – SESA da Faculdade de Saúde Pública – USP.

Aos funcionários do Laboratório do Hospital Estadual Américo Brasiliense.

Aos funcionários do NAC/FCF Araraquara - UNESP.

Às funcionárias da Fundação para o Desenvolvimento das Ciências Farmacêuticas-FUNDECIF.

*E às funcionárias da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas –
UNESP.*

Muito obrigada por toda ajuda, atenção e disponibilidade oferecida.

Ao Prof. Romeu Magnani por me ajudar com as análises estatísticas.

Obrigada pela gentileza, paciência e solicitude.

*Agradeço a todos os meus amigos e colegas dos Laboratórios de Imunologia
Clínica, Hematologia Clínica, Micologia Clínica, Bioquímica Clínica, Microbiologia
Clínica e Parasitologia; especialmente à Ana Carolina Urbaczek, Thalita Athiê,
Juliana Cristina da Silva, Julio César Rente Ferreira Filho e ao Marcelo Teruyuki
Matsumoto, pela solicitude e todo o tempo que disponibilizaram para me ensinar,
ajudar... Obrigada pela atenção e interesse; vocês são parte essencial deste
trabalho.*

Obrigada pela amizade...

*Agradeço também aos meus amigos (as), os melhores, aqueles que me ajudaram
indiretamente, desprendendo sempre muito carinho, apoio e dedicação.*

Definitivamente, a amizade verdadeira não tem prazo de validade!

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
C	Citoplasmático
CGD	Doença Granulomatosa Crônica
CR	Receptores para Complemento
CR3	Receptores para Complemento tipo 3
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Dinucleotídeo Trifosfato
EC	Extracelular
EDTA-K ₂	Sal Dipotássico do Ácido Etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FcR	Receptor para a porção Fc
Fc γ R	Receptor para a porção Fc da IgG
Fc γ Rn	Receptor neonatal para a porção Fc da IgG
g	Medida da gravidade na Terra
GPI	Glicosil Fosfatidil Inositol
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Imunocomplexo
Ig	Imunoglobulina
kDa	Unidade de massa atômica
IgG	Imunoglobulina de classe G
IL-8	Interleucina-8
IFN- γ	Interferon gamma
ITAM	Motivos de Ativação de Imuno-receptor Baseado em Tirosina
ITIM	Motivos de Inibição de Imuno-receptor Baseado em Tirosina
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M	Molar

MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MPO	Mieloperoxidase
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mRNA	RNA mensageiro
mg	miligramas
mL	mililitro
mm ³	milímetro cúbico
µm	micrômetro
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
NA1	<i>Neutrophil Antigen 1</i>
NA2	<i>Neutrophil Antigen 2</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PBS-D	PBS-Dulbecco's
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPD	Derivado de Proteína Purificado
QL	Quimioluminescência
RNA	Ácido Ribonucléico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	Polimorfismo de um único receptor
SOD	Superóxido Dismutase
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre E Esclarecido
TM	Transmembrana
V	Volts
µ	microlítro
µg	microgramas
°C	graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da migração dos leucócitos através do endotélio.....	31
Figura 2: Representação esquemática da enzima NADPH oxidase.....	33
Figura 3: Reação química da QL dependente de luminol.....	38
Figura 4: Representação esquemática da família de receptores humanos para Fc de Imunoglobulina G (Fc γ R).....	41
Figura 5: Principais funções dos Fc γ R.....	43
Figura 6: Demonstração ilustrativa da separação celular por Histopaque 1077 e 1119.....	59
Figura 7: Câmara de Neubauer, a esquerda, e a direita a representação dos 4 quadrantes utilizados para a contagem de leucócitos (representados com a letra L).....	60
Figura 8: Parte da sequência de DNA encontrada no <i>exon 4</i> , correspondente ao receptor Fc γ RIIa (CD32). Número de acesso NCBI: NM_001136219.1. Em destaque, ponto de polimorfismo correspondente a posição 131. Em vermelho, os oligo-iniciadores <i>sense</i> e <i>anti-sense</i> alinhados, mostrando as posições de anelamento, e que deram origem a sequência de DNA (resultante da PCR) posteriormente sequenciada.).....	66
Figura 9: Parte da sequência de DNA correspondente ao receptor Fc γ RIIIb (CD16). Número de acesso NCBI: X52645.1. Em destaque, os pontos de polimorfismo correspondentes as posições 141, 147, 227, 266 e 277. Em vermelho, os oligo-iniciadores <i>sense</i> e <i>anti-sense</i> alinhados, mostrando as posições de anelamento, e que deram origem a sequência de DNA (resultante da PCR) posteriormente sequenciada.....	67

Figura 10: População de neutrófilos obtida a partir de dois gradientes de densidades diferentes: Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich®) e Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich®). Lâmina preparada por citocentrifugação (cytospin). Coloração de Leishman (microscopia de luz com aumento de 100x).....	75
Figura 11: Câmara de Neubauer (A), onde foram realizadas a contagem dos neutrófilos (B) e o teste de viabilidade celular pela exclusão do corante Azul de Trypan 0,1 %, mostrando células não coradas, ou seja, viáveis (C).....	76
Figura 12: Cinética das integrais e seus <i>backgrounds</i> (controle negativo) de um indivíduo de cada grupo de estudo.....	77
Figura 13: Estatísticas descritivas do <i>burst</i> oxidativo (integral da área sob a curva – mV) em relação aos grupos.....	79
Figura 14: Fotodocumentação do gel de eletroforese para a avaliação qualitativa das amostras de DNA extraídas pelo método de <i>salting out</i>	80
Figura 15: Perfil eletroforético dos produtos da PCR para CD32 (Fc γ RIIa).....	81
Figura 16: Perfil eletroforético dos produtos da PCR para CD16 (Fc γ RIIIb).....	82
Figura 17: Determinação da qualidade do DNA das amostras de vários pacientes que compõem os grupos de estudo.....	83
Figura 18: Quantificação do DNA da amostra de um dos pacientes que compõe o grupo HIV.....	84
Figura 19: Alinhamento da sequência de DNA resultante do sequenciamento para CD32 (H/R) de um indivíduo do grupo Controle.....	88
Figura 20: Análise da sequência predita de resíduos de aminoácidos a partir do sequenciamento dos produtos de PCR de uma amostra do grupo Controle com	

genótipo NA1NA1 de Fc γ RIIIb..... 89

Figura 21: Estatísticas descritivas de contagens de células CD4+ e CD8+ em relação aos grupos HIV e HIV/TB..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pontos de mutação para o polimorfismo de Fc γ RIIIb e os aminoácidos resultantes dessas substituições de bases.....	46
Tabela 2: Análise estatística descritiva do <i>burst</i> oxidativo de cada grupo de estudo.....	78
Tabela 3: Distribuição das frequências relativas absolutas do genótipo para CD32 nos grupos estudados.....	85
Tabela 4: Distribuições de frequências relativas absolutas do genótipo para CD16 nos grupos estudados.....	85
Tabela 5: Análise estatística descritiva do <i>burst</i> oxidativo de cada grupo de estudo em relação ao genótipo dos receptores.....	87
Tabela 6: Distribuição das frequências relativas e absolutas da carga viral de acordo com o grupo.....	90
Tabela 7: Análise estatística descritiva do <i>burst</i> oxidativo os grupos HIV e HIV/TB em relação à carga viral.....	91
Tabela 8: Estatísticas descritivas de contagens de células CD4+ e CD8+ de acordo com o grupo.....	91
Tabela 9: Distribuição de valores relativos e absolutos para o genótipo CD32 entre os grupos HIV e HIV/TB em relação aos níveis detectáveis ou Limite de carga viral.....	93
Tabela 10: Distribuição das frequências relativas e absolutas para o genótipo CD16 do grupo HIV em relação aos níveis detectáveis ou Limite de carga viral.....	93
Tabela 11: Grupo Controle.....	113

Tabela 12: Grupo HIV.....	114
Tabela 13: Grupo Tuberculose.....	115
Tabela 14: Grupo HIV/TB.....	116

RESUMO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ocorre com aumento dos níveis de anticorpos séricos e com grande quantidade de imunocomplexos circulantes. A associação entre as disfunções da fagocitose mediadas por receptores do tipo Fc γ R, na infecção pelo HIV e, principalmente, na co-infecção com o *Mycobacterium tuberculosis*, têm sido amplamente descrita na literatura científica. A tuberculose (TB) é a infecção oportunista mais comum entre pacientes infectados pelo HIV e a causa de morte mais frequente entre os pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Sabe-se que a infecção pelo HIV torna o paciente susceptível às infecções oportunistas, como a tuberculose, e, essas co-infecções aumentam o potencial de replicação viral. A ineficiência do mecanismo de *clearance* de imunocomplexo (IC) e de fagocitose pode contribuir para o aumento da suscetibilidade às infecções oportunistas em indivíduos infectados pelo HIV. Sendo assim, a determinação dos genótipos para as variantes polimórficas funcionais dos receptores para a porção Fc da imunoglobulina de classe G (Fc γ R), bem como das combinações dos diferentes genótipos, pode constituir um marcador importante para a patogênese da infecção pelo HIV, na co-infecção pelo *M. tuberculosis* e em infecções pelo *M. tuberculosis* isoladamente, ou seja, independente da infecção pelo vírus da AIDS. Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar os genótipos para os polimorfismos dos receptores Fc γ RIIa (CD32; H/R131) e Fc γ RIIIb (CD16; NA1/NA2) em portadores da infecção pelo HIV-1, co-infectados pelo *M. tuberculosis* e infectados apenas pelo *M. tuberculosis*, assim como a avaliação da função fagocítica através do *burst* oxidativo (formação de espécies reativas de oxigênio - EROs) induzido por polissacarídeos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, denominado por zymosan, em neutrófilos do sangue periférico desses pacientes. Nossos resultados demonstraram diminuição da capacidade de produção de EROs pelos neutrófilos daqueles pacientes que apresentavam a infecção pelo *M. tuberculosis*, quando comparados com indivíduos do grupo Controle e HIV. No entanto, não foi encontrada relação entre o polimorfismo dos receptores em estudo com a produção de EROS que não fosse dependente da ativação dos neutrófilos através de imunocomplexos de IgG.

Palavras-chave: Fc γ R, *burst* oxidativo, polimorfismo, neutrófilos, HIV, *M. tuberculosis*

ABSTRACT

Infection with human immunodeficiency virus (HIV) occurs along with increased levels of serum antibodies and a large amount of circulating immune complexes. The association between Fc γ R-dependent phagocytosis dysfunction in HIV infection and, especially, when in co-infection with *Mycobacterium tuberculosis*, has been widely described in scientific literature. Tuberculosis (TB) is the most common opportunistic infection among HIV-infected patients and the most frequent cause of death among patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). It is known that HIV infection makes the patient susceptible to opportunistic infections such as tuberculosis, and these co-infections increase the potential for viral replication. The inefficiency of the immune complex (IC) clearance mechanism and phagocytosis may contribute to increased susceptibility to opportunistic infections in HIV-infected individuals. Thus, determination of the functional polymorphic variants' genotypes for class G immunoglobulin Fc receptors (Fc γ R) as well as combinations of different genotypes may be an important marker for the pathogenesis of HIV infection, for co-infection with *M. tuberculosis* and for *M. tuberculosis* infection alone, i.e. independent of infection with AIDS virus. Thus, the aim of this study was to determine the genotypes for Fc γ RIIIa (CD32; H/R131) and Fc γ RIIIb (CD16; NA1/NA2) polymorphisms in patients carrying HIV-1 infection, co-infected with *M. tuberculosis* and infected with *M. tuberculosis* alone, as well as evaluating the phagocytic function via oxidative burst (formation of reactive oxygen species - ROS) induced by cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae*, known as zymosan, in peripheral blood neutrophils from these patients. Our results demonstrated reduced capacity for ROS production in neutrophils from *M. tuberculosis*-infected patients, when compared to patients in the control and HIV groups. However, we couldn't find any connection between the polymorphism of the receptors studied with the ROS production that was not dependent on the activation of neutrophils by IgG immune complexes.

Key words: Fc γ R, oxidative burst, polymorphism, neutrophils, HIV, *M. tuberculosis*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

<i>CAPITULO 1</i>	23
1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1. Imunidade Inata – Neutrófilos.....	30
2.2. Fagocitose e Burst Oxidativo.....	32
2.3. Quimioluminescência.....	36
2.4. Imunoglobulinas de Classe G.....	39
2.5. Fc γ R: Fc <i>gamma</i> receptors.....	39
2.6. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).....	47
2.7. Tuberculose / <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	49
3. JUSTIFICATIVA	52
4. OBJETIVOS	54
4.1. Objetivo Geral.....	55
4.2. Objetivos Específicos.....	55
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS	56
5.1. Casuística.....	57
5.2. Processamento das Amostras.....	58
5.3. Determinação do Burst Oxidativo dos Neutrófilos por Quimioluminescência Dependente de Luminol.....	58
5.3.1. Separação de Neutrófilos com Histopaque 1119 e 1077.....	59
5.3.2. Contagem dos Neutrófilos em Câmara de Neubauer.....	60

5.3.3. Teste de viabilidade com Azul de Trypan.....	60
5.3.4. Preparação do Luminol.....	60
5.3.5. Preparação da suspensão de Zymosan (35 mg/mL).....	61
5.3.6. Ensaio de quimioluminescência dependente do Luminol.....	62
5.4. Extração de DNA Genômico.....	63
5.4.1. Verificação da Qualidade e Integridade do DNA.....	64
5.5. Análise dos Genótipos.....	64
5.5.1. Análise do genótipo <i>FcγRIIA</i>	65
5.5.2. Análise do genótipo <i>FcγRIIB</i>	67
5.6. Eletroforese dos Produtos da PCR	68
5.7. Sequenciamento das Amostras	69
5.7.1. Obtenção dos produtos amplificados por PCR	69
5.7.2. Purificação das Amostras (Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System – Promega).....	69
5.7.3. Sequenciamento das amostras purificadas.....	70
5.8. Imunofenotipagem CD3+/CD4+/CD8+ e Viremia RNA-HIV.....	71
5.8.1. Imunofenotipagem de linfócitos T por Citometria de Fluxo.....	71
5.8.2. Determinação da viremia RNA-HIV.....	72
5.9. Análises Estatísticas.....	73
6. RESULTADOS.....	74
6.1. Medida do <i>burst</i> oxidativo dos neutrófilos por Quimioluminescência dependente de Luminol.....	75
6.2. Caracterização do DNA genômico.....	79
6.3. Alotipagem dos <i>FcγR</i>	80
6.4. Sequenciamento das Amostras.....	82
6.5. Alinhamento das sequências.....	88
6.6. Imunofenotipagem CD3+/CD4+/CD8+ e viremia RNA-HIV.....	89
7. DISCUSSÃO.....	94
8. CONCLUSÃO.....	110

ANEXO 1	112
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
APÊNDICE 1 Parecer de aceitação do Comitê de Ética Médica dos Hospitais e Comitê de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.....	132
APÊNDICE 2 Protocolo para Inclusão de Pacientes.....	138
APÊNDICE 3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	140
APÊNDICE 4 Termo de Doação do Material Biológico.....	144
ANEXO 5 Acesso NCBI FcγRIIa (CD32).....	146
ANEXO 6 Acesso NCBI FcγRIIIb (CD16).....	149
<i>CAPÍTULO 2</i>	151

CAPÍTULO 1



1. INTRODUÇÃO

A reação inflamatória aguda decorrente de infecção é mediada principalmente por leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, monócitos e células endoteliais. Os neutrófilos são células originárias da medula óssea, providas de grânulos contendo várias enzimas proteolíticas. São as células fagocíticas recrutadas mais precocemente, as quais migram do sangue para os tecidos com o objetivo de ingerir e destruir microrganismos (fagocitose) e evitar a infecção (VASSELON, DETMERS, 2002). Possuem vida média relativamente curta e sua principal função é a defesa do organismo contra agentes externos. São células móveis e, devido a expressão de moléculas como selectinas e integrinas as quais promovem a interação dos neutrófilos às células do endotélio capilar, migram por diapedese aos sítios de inflamação. Moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) expressas na superfície das células endoteliais promovem uma maior adesão através da ligação com integrinas expressas na superfície dos neutrófilos, contribuindo para sua migração. E, uma vez no local, os neutrófilos englobam e digerem os microrganismos através da ação de proteínas e enzimas microbicidas digestivas contidas nos seus grânulos citoplasmáticos (FREIRE et al. 1995). Este processo envolve basicamente dois eventos celulares: degranulação no vacúolo fagocítico com a formação de fagolisossomo e o *burst* oxidativo com a produção de espécies reativas de oxigênio (HAMPTON, 1998).

A fagocitose de partículas estranhas pode ser favorecida pela ligação de imunoglobulinas aos receptores para a porção Fc (FcR) nos fagócitos profissionais (neutrófilos e macrófagos). A partícula opsonizada é rapidamente internalizada, dando início a produção das espécies reativas de oxigênio, bem como a liberação de enzimas lisossomais, além de citocinas inflamatórias dos fagócitos. O precursor destes oxidantes reativos é o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e a partir dele, outros produtos são formados. O *burst* oxidativo é acompanhado de um aumento do consumo de oxigênio. Esses eventos dependem da atividade de uma oxidase de membrana que catalisa a redução do oxigênio à radical ânion superóxido, usando como doador de elétrons a NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) (BABIOR, 1999).

As EROs são essenciais na destruição de microrganismos fagocitados. Entretanto, a grande importância deste mecanismo é contraposta pela sua efetiva participação em doenças de cunho inflamatório. Nestes casos, crescentes

evidências sugerem uma efetiva participação do complexo NADPH-oxidase via estimulação crônica de células endoteliais, neutrófilos e macrófagos (JOHNSON et al., 2002).

As EROs geradas podem converter, via oxigenação, sondas quimioluminescentes, como o luminol e a lucigenina, a derivados intermediários instáveis e excitados, induzindo a emissão de luz na forma de fótons. Esta reação ocorre na presença de um catalisador, como por exemplo, a mieloperoxidase (MPO). A quimioluminescência (QL) tem sido um método de grande importância para avaliar o metabolismo oxidativo (*burst*) de neutrófilos e suas alterações em determinadas infecções (GASBARRINI et al., 1998; ALVEZ et al., 2003). Por este motivo, avaliamos a quimioluminescência dependente do luminol a fim de detectar a produção total de EROS pelos neutrófilos em determinadas situações imunológicas, como na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, na infecção pelo HIV e na co-infecção HIV/Tuberculose em relação a indivíduos saudáveis, como grupo controle (*ex vivo*).

Dados publicados pela OMS (Organização Mundial da Saúde) indicam um aumento no número de casos de indivíduos infectados pelo HIV e tuberculose a cada ano (PANDOLF et al., 2007; VERMUND, YAMAMOTO, 2007). A tuberculose é ainda uma das infecções oportunistas mais comuns entre os indivíduos soropositivos para o HIV e a causa de morte mais frequente entre os indivíduos com AIDS. Ainda, além da tuberculose acelerar o curso da AIDS, o HIV promove a patogênese e contribui para a reativação da tuberculose. Desta forma, a diminuição da resposta de neutrófilos pode contribuir para o aumento da suscetibilidade às infecções secundárias (BANDRES et al., 1993; SHALEKOFF et al., 1998).

Os macrófagos, células fagocíticas que também medeiam a imunidade inata, estão presentes na patogenia da tuberculose e são tão importantes quanto os neutrófilos para a contenção da infecção. Macrófagos alveolares participam das respostas iniciais, assim como os neutrófilos que são recrutados na tentativa de erradicar a infecção através da fagocitose. Além disso, macrófagos ativam a resposta imune celular após apresentação do antígeno via MHC de classe II aos linfócitos T CD4+, favorecendo a secreção de citocinas de perfil Th1 e reforçando a morte das micobactérias (NIBBERING et al., 1993; LAPA E SILVA, BOÉCHAT, 2004).

Os receptores para a porção Fc da IgG (Fc γ R) atuam como mediadores de importantes respostas biológicas, especialmente a ativação de neutrófilos. A ativação e a regulação das funções mediadas por eles podem estar envolvidas na fisiopatologia de várias doenças e processos inflamatórios. Vários estudos demonstraram deficiência do *burst* oxidativo após ativação e estimulação de neutrófilos e monócitos via Fc γ R em indivíduos infectados tanto pelo HIV quanto pelo *M. tuberculosis*, sendo essa deficiência muito mais expressiva naqueles infectados pela bactéria (BENDER et al., 1985; BIGGS et al., 1995; FORTHAL et al., 2007).

Dois destes receptores têm sido alvos em várias pesquisas, Fc γ RIIIa (CD32) e Fc γ RIIIb (CD16), os quais apresentam polimorfismos, relacionados às variações de efeitos biológicos dependentes da afinidade e engajamento às diferentes subclasses de IgG. O polimorfismo destes receptores está amplamente associado não somente com a deficiência da fagocitose e *burst* oxidativo, mas também com a progressão de várias doenças como a AIDS (FORTHAL et al., 2007). Segundo Siawaya e colaboradores (2007) a co-infecção com outros patógenos é um importante fator exógeno que influencia a gravidade e a taxa de progressão da doença em indivíduos soropositivos.

Esses resultados sugerem que o engajamento de diferentes Fc γ R pode modular o perfil de resistência e suscetibilidade do hospedeiro tanto na infecção pelo *M. tuberculosis* quanto na infecção pelo HIV. E a determinação destes genótipos pode constituir um importante marcador para a patogênese de tais infecções.

Com base nessas informações, investigamos o efeito do *burst* oxidativo de neutrófilos frente a infecção pelo *M. tuberculosis* e HIV-1, ou com ambos, para apurar as disfunções dessas células. E sabendo da importância dos receptores Fc γ RIIIa e Fc γ RIIIb, os quais fazem importante ligação entre as respostas imunes humoral e celular, participando ativamente da resposta inata, mediando respostas biológicas relacionadas com a eliminação do antígeno (KIMBERLY et al., 1995; RASCU et al., 1997; MARZOCCHI-MACHADO, LUCISANO-VALIM, 2005), optamos pela determinação do genótipo para o polimorfismo das formas alélicas Fc γ RIIIA-H131 e Fc γ RIIIA-R131, Fc γ RIIIIB-NA1 e Fc γ RIIIIB-NA2, a fim de avaliar uma possível relação entre os resultados.

Várias pesquisas evidenciam relação entre fagocitose e produção de EROS pelos neutrófilos (dependente da ativação por imunocomplexos de IgG) e o

polimorfismo de Fc γ R11a e Fc γ R111b e suas variações funcionais (LEEANSYAH et al., 2007; GARCÍA et al., 2009).

No entanto, nossos estudos avaliaram a relação do polimorfismo dos receptores Fc γ R11a e Fc γ R111b e seus alótipos com a produção de EROS pelos neutrófilos que não fosse dependente da ativação por imunocomplexos de IgG, ou seja, o *burst* de modo geral, independente da via de ativação celular.

A diversidade estrutural e funcional dos Fc γ R faz destas moléculas um alvo importante para a imunoterapia. Há um grande interesse científico e clínico no estudo da diversidade das respostas geradas pela interação Fc γ R-IgG, com a expectativa de compreender seu envolvimento na suscetibilidade às doenças, na fisiopatologia das mesmas e na possibilidade de intervenção terapêutica (RASCU et al., 1997; NIMMERJAHN, RAVETCH, 2008).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMUNIDADE INATA – NEUTRÓFILOS

As respostas imunes envolvem, primeiramente, o reconhecimento do patógeno ou antígeno e, em seguida, a elaboração de uma reação dirigida a este elemento, com a finalidade de eliminá-lo do organismo. Entretanto, antes mesmo do encontro com esses patógenos, o sistema imune dispõe de mecanismos de defesa essenciais, como as barreiras epiteliais (pele e mucosas), que impedem a entrada de microrganismos do ambiente externo, e a presença de células efectoras e proteínas plasmáticas, que podem ser rapidamente ativadas na presença desses microrganismos ou de substâncias produzidas na infecção, iniciando reações para sua eliminação. Esses mecanismos constituem a imunidade inata que tem como objetivo principal eliminar o agente infeccioso através da fagocitose e reparar o dano tecidual (PUKA et al., 2005)

A imunidade inata é evolutivamente um sistema que fornece mecanismos imediatos de defesa contra uma ampla variedade de patógenos, sem exigir uma exposição prévia. Uma rápida reação inflamatória que se segue a infecção é principalmente mediada por monócitos, neutrófilos e células endoteliais. Os neutrófilos são as células fagocíticas recrutadas mais precocemente, as quais migram do sangue para os tecidos com o objetivo de ingerir e destruir microrganismos (fagocitose) e evitar a infecção (VASSELON, DETMERS, 2002). Constituem a população mais abundante de leucócitos circulantes, com aproximadamente 50 bilhões de células no sangue ou metade a dois terços de todos os leucócitos circulantes, destinadas a responder rapidamente e em grande número toda vez que houver alguma lesão tecidual. Após sua produção na medula óssea, estimada em mais de 10^{11} células por dia, permanecem retidos como reserva por um período adicional de cinco dias, sendo então liberados na corrente sanguínea, onde, em condições normais, circulam por cerca de 6 a 12 horas em média. Dentro desse período, se não forem recrutados para algum sítio de inflamação, sofrem morte celular programada (apoptose), sendo posteriormente fagocitados por macrófagos residentes no fígado ou no baço. Do contrário, são levados até o local através de uma série de substâncias quimiotáticas para neutrófilos, as quais induzem o aumento do fluxo sanguíneo e a permeabilidade capilar, aumentando o número destas células rapidamente no sítio de infecção. Ao alcançarem este local, aderem rapidamente ao endotélio, devido a expressão de proteínas responsáveis pela

interação entre as células endoteliais dos capilares e os neutrófilos. São as chamadas moléculas de adesão, conhecidas como selectinas e integrinas, que promovem a atração dos neutrófilos pelo endotélio. Dessa maneira, os neutrófilos, que em situações normais ocupam a região central da coluna de sangue dentro do capilar, passam a aproximar-se do endotélio “margeando” e “rolando” sobre as células endoteliais (Figura 1), migrando através das paredes dos vasos, por diapedese, e invadindo os tecidos afetados, onde começam imediatamente a ingerir bactérias, restos celulares ou partículas estranhas presentes (início dos processos de resolução e reparação tecidual). No entanto, morrem após a digestão do material internalizado (PUKA et al., 2005; SGARBI, DA SILVA JUNIOR, HUNGRIA NETO, 2006). Componentes bacterianos estimulam diretamente o aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, contribuindo para o recrutamento de mais leucócitos para o foco da infecção (VASSELON, DETMERS, 2002).

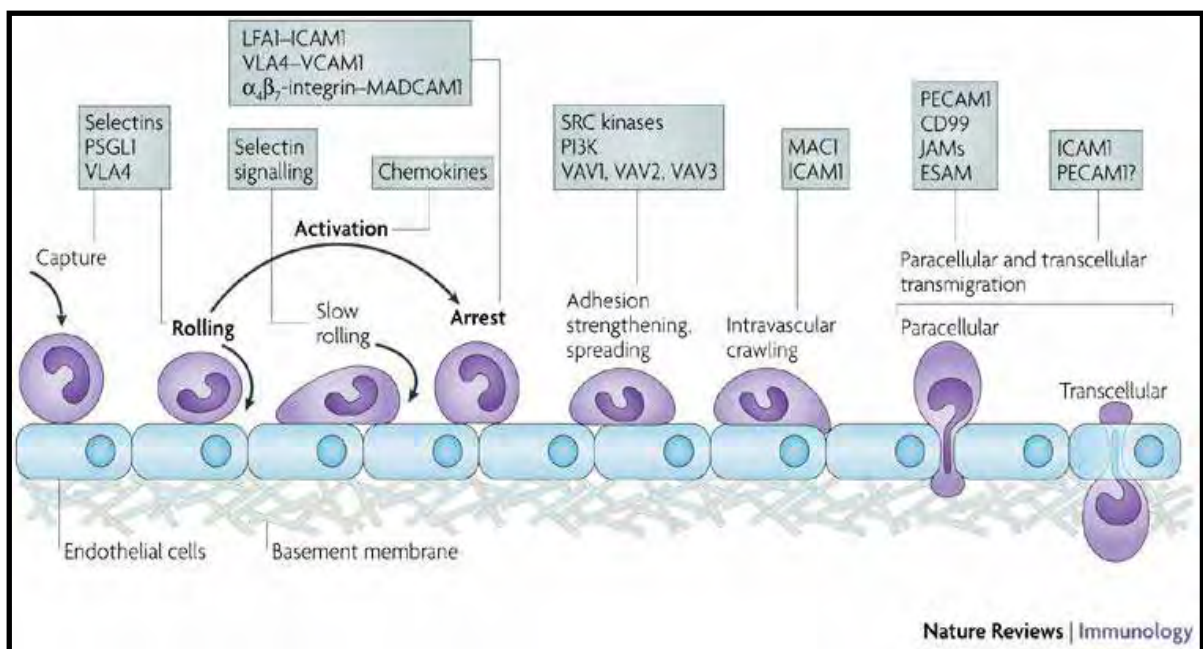
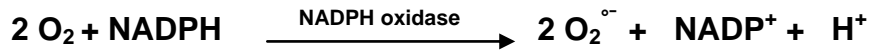


Figura 1: Esquema da migração dos leucócitos através do endotélio. Fonte: ANDRIAN, MACKAY, 2007.

2.2. FAGOCITOSE E *BURST* OXIDATIVO

O revestimento de um microrganismo com moléculas que favorecem sua destruição pelos fagócitos é conhecido como opsonização. As opsoninas (facilitadores da fagocitose) são proteínas que recobrem as bactérias tornando-as mais fagocitáveis. As principais proteínas envolvidas nesta função são: imunoglobulina de classe G (IgG), frações C3b e C3bi do sistema do complemento e fibronectina. O anticorpo também pode ativar o complemento, e quando o anticorpo e C3b opsonizam o patógeno, a ligação é grandemente favorecida. A fagocitose também pode ser potencializada quando as bactérias já ativaram o complemento, pois C3b estará fixado às bactérias permitindo a ligação das células de defesa através dos receptores para C3b. Os organismos que não ativam eficientemente o complemento serão opsonizados pelo anticorpo, que se liga ao receptor para o fragmento cristalizável (Fc) no fagócito, permitindo sua ingestão e destruição – o anticorpo age como opsonina (ROSKAMP et al., 2005).

Em mamíferos, a fagocitose de partículas estranhas é favorecida pela ligação das imunoglobulinas aos receptores para a porção Fc (FcR) nos fagócitos profissionais (neutrófilos e macrófagos). A partícula é opsonizada e rapidamente internalizada. Essa internalização é caracterizada por uma extensão da membrana plasmática ao redor da partícula e é seguida pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como pela liberação de enzimas lisossomais e de citocinas inflamatórias dos fagócitos. O precursor destes oxidantes reativos é o radical ânion superóxido ($O_2^{\circ-}$), que é gerado por determinadas células do sistema imune, como os neutrófilos. Devido a produção destes oxidantes reativos estar associada a um aumento abrupto do consumo de oxigênio, o evento metabólico no qual eles são gerados é chamado de *burst* (“explosão”) respiratório ou *burst* oxidativo. As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas por mecanismos dependentes de mieloperoxidase (MPO), liberada dos grânulos da célula, e por mecanismos independentes da MPO. Tal metabolismo oxidativo é mediado por um complexo enzimático, associado à membrana citoplasmática, chamado nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) oxidase, que catalisa a redução de um elétron de oxigênio a $O_2^{\circ-}$ pela doação de elétrons à custa da NADPH (CHANOCKF et al., 1994; BABIOR, 1988):



O complexo NADPH oxidase, que permanece dormente na célula quiescente, é formado por cinco subunidades. Na célula em repouso duas dessas subunidades permanecem associadas à membrana da célula e três ao citoplasma. Quando os fagócitos são estimulados as cinco subunidades se unem, ativando rapidamente o complexo, como mostra a figura 2 (BABIOR, 1988).

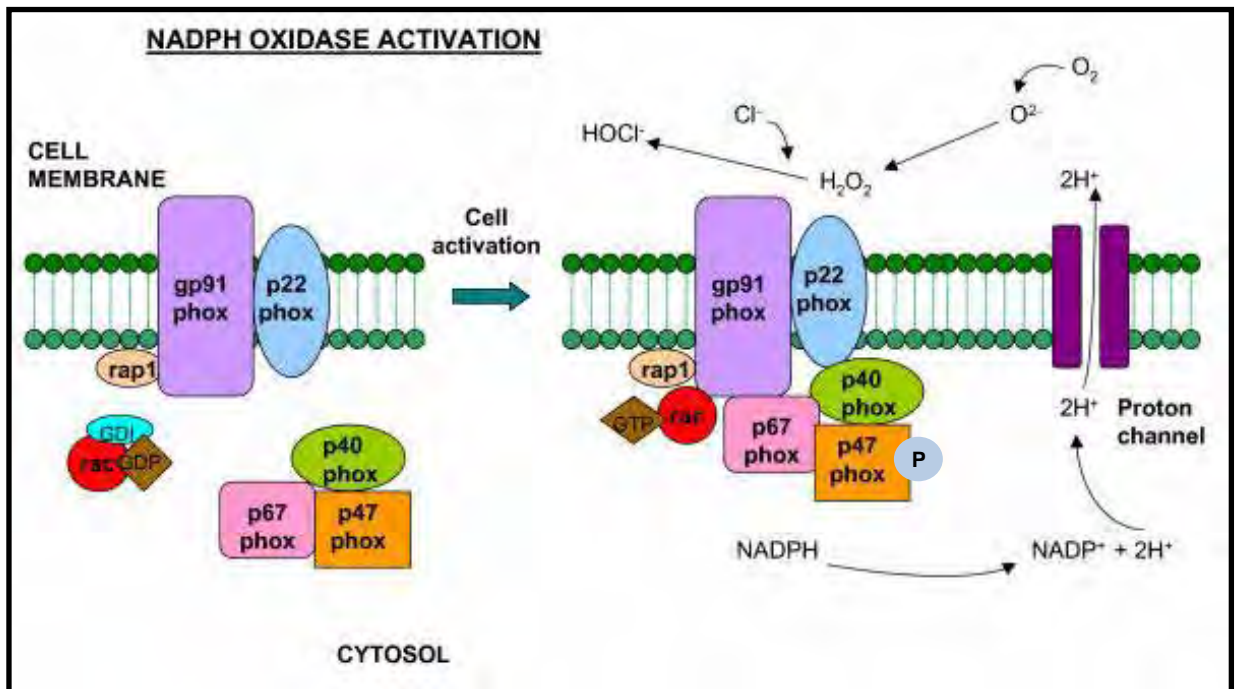
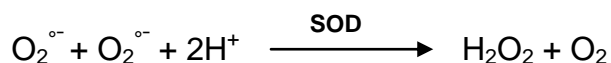


Figura 2: Representação esquemática da enzima NADPH oxidase. A membrana integrante do fagócito consiste em duas subunidades: p22phox e gp91phox, que produzem, respectivamente, a cadeia menor e maior do citocromo b_{558} . Duas subunidades citosólicas: p67phox e p47phox; a p40phox, uma proteína acessória, e a Rac-GTP, uma proteína de ligação que transloca para a membrana celular após a ativação celular para formar o complexo NADPH oxidase, que gera uma explosão respiratória. O ânion superóxido pode reagir para formar peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso que, juntos, participam da morte bacteriana. Fonte: ASSARI, 2006.

Receptores de opsonina reconhecem estímulos opsonizados que ativam a via da fosfolipase produzindo os diglicerídeos que ativarão a proteína C quinase. Após o reconhecimento do agente invasor, ocorre a organização, na membrana plasmática, do complexo NADPH oxidase a partir da fosforilação do componente citosólico p47phox, pela proteína C quinase (SILVA, 2001).

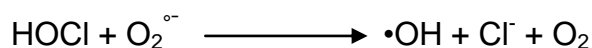
Uma variedade de estímulos solúveis ou particulados induz a produção de $O_2^{\circ-}$ por neutrófilos. A maior parte do $O_2^{\circ-}$ produzido é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por dismutação espontânea, ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD) (BABIOR, 1973):



O H_2O_2 tem atividade bactericida somente em altas concentrações, e o $O_2^{\circ-}$ gerado exogenamente, provavelmente não tem atividade bactericida direta. Portanto, a ação microbicida dos neutrófilos é provavelmente devido à ação de oxidantes secundários, produzidos a partir de ambos. O H_2O_2 pode ser neutralizado por peroxidases ou catalase intracelulares, resultando na produção de água (H_2O) e oxigênio (O_2) (HAMPTON, 1998; SILVA, 2001).

A maior parte do H_2O_2 produzido pelos neutrófilos é convertido a ácido hipocloroso (HOCl) pela ação da enzima MPO. O HOCl é o principal e o mais potente microbicida produzido por essas células (SILVA, 2001).

Existem dois mecanismos possíveis para a produção de radical hidroxila ($\bullet OH$) por neutrófilos: reação de Fenton, onde H_2O_2 reage com um metal de transição apropriado (íons metálicos, como íons férricos); ou pela reação do HOCl com $O_2^{\circ-}$ (RAMOS, 1992):



O oxigênio singlete (1O_2) pode ser produzido por neutrófilos pela reação de H_2O_2 com HOCl. Peroxinitrito ($ONOO^-$) também pode ser produzido a partir do $O_2^{\circ-}$ que reage com óxido nítrico ($NO\bullet$), e pode se decompor dando origem a $\bullet OH$ e ao radical dióxido de nitrogênio ($NO_2\bullet$) (SILVA, 2001).

Os estímulos que desencadeiam o *burst* oxidativo envolvem uma variedade de agentes solúveis e particulados capazes de ativar os fagócitos, e podem estar ou não revestidos por proteínas do hospedeiro. Proteínas como as imunoglobulinas (Ig), formando complexos antígeno-anticorpo, também conhecidos como imunocomplexos (IC) e/ou complemento, que podem aumentar o reconhecimento da partícula pelos fagócitos. A ligação e, conseqüente ativação da célula, é mediada por receptores para a porção Fc da IgG ($Fc\gamma R$: Fc *gamma* receptors) e/ou receptores

para complemento (CR), encontrados na membrana dessas células fagocíticas (MANTOVANI, 1975; OKHURO et al., 1995).

Os neutrófilos desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e determinadas infecções fúngicas. Acredita-se que a diminuição da resposta de neutrófilos pode contribuir a um aumento da suscetibilidade a determinadas infecções e infecções secundárias, como pode ocorrer em indivíduos infectados pelo HIV-1, por exemplo. Estudos têm mostrado defeitos na quimiotaxia de neutrófilos e na morte bacteriana em determinados tipos de infecções (BANDRES et al., 1993; SHALEKOFF et al., 1998).

No entanto, várias patologias podem estar associadas a uma resposta exacerbada e sem controle, que leva a geração de grande quantidade de EROs. O envelhecimento é um evento que também pode estar relacionado. Ferreira e Matsubara (1997) propuseram que o envelhecimento pode ser secundário ao estresse oxidativo, o qual levaria a reação de oxidação lipídica, protéica, e do DNA, que desencadeariam alterações lentas e progressivas dos tecidos e do código genético. Doenças frequentes na velhice e relacionadas com o estresse oxidativo, são a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, o acidente vascular cerebral, a esclerose múltipla e catarata. A LDL também é modificada pelas espécies oxidantes liberadas pelos neutrófilos. Os macrófagos geralmente englobam a LDL por meio de receptores de LDL; entretanto, quando oxidada, não entra na célula por meio deste receptor, mas sim através de um receptor 'scavenger'. A internalização da LDL oxidada, diferentemente da nativa, não é regulada pelo receptor, o que permite que quantidades mais elevadas de LDL sejam englobadas dando origem as células espumosas como parte do processo aterogênico (BABIOR, 2000). Na aterosclerose ocorre o afluxo e liberação de peróxido de hidrogênio e enzimas hidrolíticas, que ao lesarem as células vizinhas estimulam a proliferação de músculo liso subendotelial. A lesão pode ser exacerbada pela fumaça do cigarro que por ser rica em ferro, catalisa a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que estimula a internalização de colesterol nos macrófagos, os quais, conseqüentemente, se convertem em células espumosas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

As complicações cardiovasculares, tais como: o infarto do miocárdio, o derrame cerebral, a ulceração nervosa, e a isquemia com injúria por reperfusão, parecem estar associadas com a ativação de fagócitos na microcirculação e

produção de EROs (MAZZONI, SCHMIDT-SHONBERN, 1996). A injúria por reperfusão, que é um dano provocado após a restauração da circulação em uma área isquêmica, é atribuída às EROs que são produzidas por neutrófilos no sítio da lesão (BALBIOR, 2000).

Dentre os processos pulmonares associados às EROs estão: lesão consequente do tabagismo, asma, enfisema, displasia broncopulmonar, entre outros (BOVERIS et al., 1986; BAST et al., 1991). Estudos mostram que após a chegada dos neutrófilos no interstício pulmonar, a ativação dessas células gera o radical ânion superóxido, que lesa diretamente a membrana das células intersticiais e do endotélio, promovendo conseqüentemente a lesão tissular progressiva, a qual também é induzida pela liberação de enzimas proteolíticas dos neutrófilos, degradando a elastina do arcabouço pulmonar (SEOW et al., 1994; CRYSTAL, 1991). Há fortes indícios de que a formação do edema pulmonar seja resultante da produção exagerada de peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e superóxido pelos neutrófilos (BOVERIS et al., 1986).

Estudos mostraram que há determinadas doenças relacionadas ao hábito de fumar com o aumento dos neutrófilos e macrófagos em tabagistas. Em pulmões saudáveis os macrófagos são células residentes enquanto os neutrófilos são praticamente inexistentes. Entretanto, em indivíduos fumantes existe um grande aumento no número dessas células e com alterações morfológicas, que podem ser as responsáveis pela bronquite crônica e o enfisema (REPINE et al., 1997).

2.3. QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Luminescência é um termo utilizado para descrever a emissão de luz que ocorre quando uma molécula excitada retorna ao seu estado fundamental. Na quimioluminescência (QL) a fonte de energia para obter o estado excitado é uma reação química. Simplificando, quimioluminescência é uma reação química que emite luz.

Quando os neutrófilos são ativados, as EROs geradas podem converter, via oxigenação, sondas quimioluminescentes, como o luminol e a lucigenina, a derivados intermediários instáveis e excitados, induzindo a emissão de luz na forma de fótons. A lucigenina é preferencialmente oxidada pelo ânion superóxido. Portanto,

enquanto a QL dependente do luminol registra a produção total de EROs, a QL-lucigenina registra a produção de ânion superóxido e reflete apenas a atividade da NADPH oxidase na geração do *burst* oxidativo. Desta forma, o luminol e a lucigenina podem ser utilizados como marcadores de estágios diferentes da produção de EROs. (GASBARRINI et al., 1998; ALVEZ et al., 2003).

Diversas EROs (oxigênio, peróxidos, ânion superóxido) podem oxidar derivados do luminol, mas essa reação deve ser catalisada por enzimas ou catalisadores minerais. Um dos biocatalisadores é a mieloperoxidase presente nos neutrófilos (ALVEZ et al., 2003). A figura 3 mostra resumidamente a reação química de QL dependente do luminol.

A QL tem sido muito utilizada para estudar o *burst* oxidativo de neutrófilos, bem como suas alterações em determinadas infecções. A detecção e medição da produção de EROs são de importância crítica para investigar as consequências fisiopatológicas resultantes da alteração dos mecanismos celulares que levam a esse estresse oxidativo (ALVEZ et al., 2003).

2 Formas do luminol: dependentes do pH ácido/básico do meio

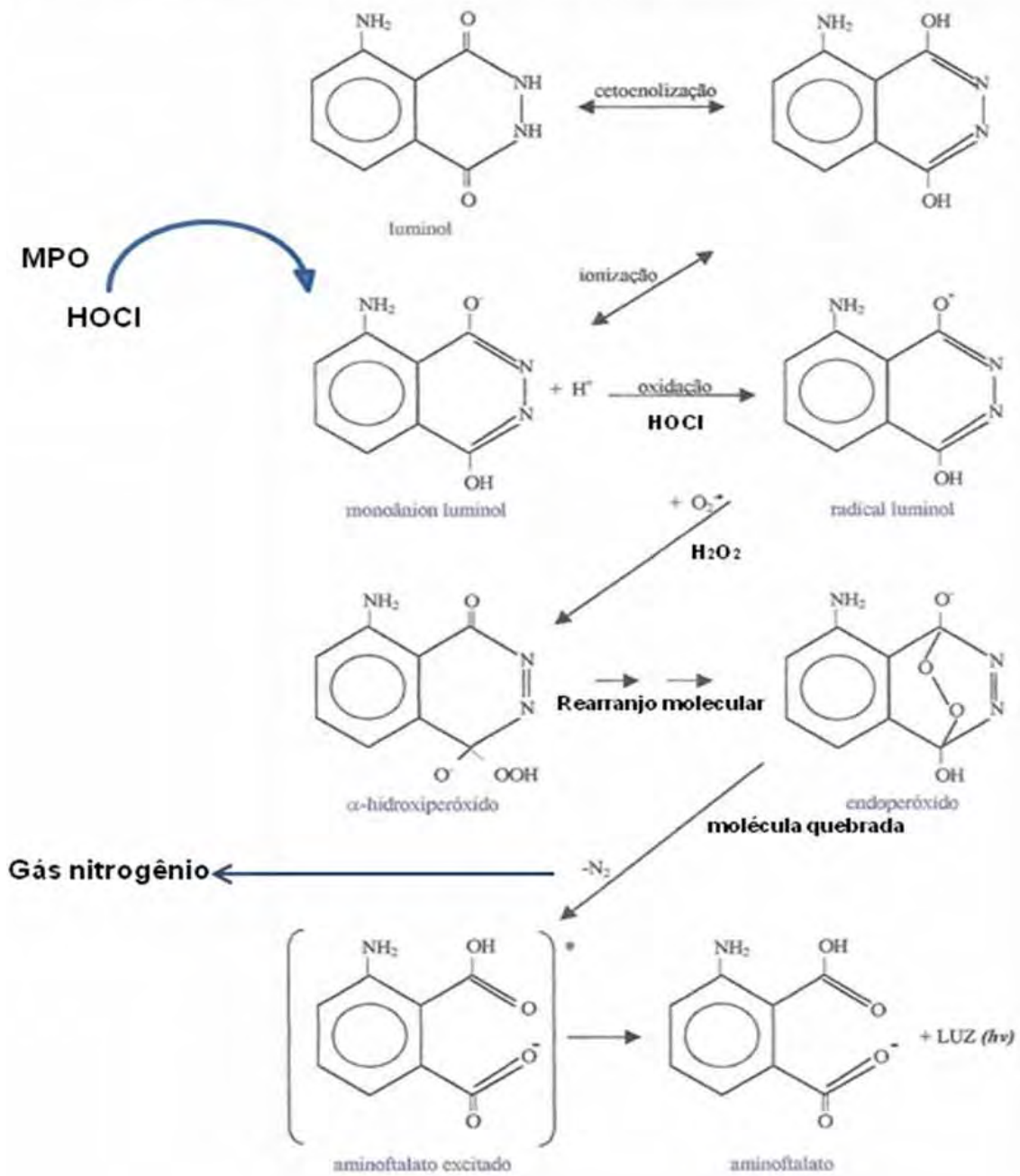


Figura 3: Reação química da QL dependente de luminol: Diversas EROs convertem, via oxigenação, o luminol a intermediários instáveis e excitados, induzindo a emissão de luz na forma de fótons.

2.4. IMUNOGLOBULINAS DE CLASSE G

As imunoglobulinas da classe G (IgG) exercem inúmeras e importantes funções biológicas devido sua capacidade de interagirem com vários tipos celulares. A base desta interação é a ligação dos domínios Fc da IgG aos Fc γ R presentes nas membranas das células do sistema imune, fazendo com que estes receptores (Fc γ R) atuem como reguladores das respostas imunológicas (DAËRON, 1997b; NEMMERJAHN, RAVETCH, 2008).

A IgG constitui 70-75% do total de imunoglobulinas do soro humano, além de ser a classe mais abundante nas respostas imunes secundárias e estar distribuída igualmente entre os espaços intra e extravasculares. Existem quatro subclasses de IgG humana – IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 – as quais possuem cadeias pesadas denominadas γ 1, γ 2, γ 3 e γ 4, respectivamente, que diferem entre si na sequência dos aminoácidos. As subclasses de IgG ocorrem em proporções de aproximadamente 66%, 23%, 7% e 4%, respectivamente (MORELL et al., 1972; SCHUR, 1987).

2.5. Fc γ R: Fc *gamma* receptors

Os receptores para a porção Fc da IgG (Fc γ R) fazem uma importante ligação entre as respostas imunes humoral e celular. Estes receptores medeiam várias respostas biológicas relacionadas com a eliminação de antígenos, tais como: fagocitose, endocitose, captura e *clearance* de imunocomplexos, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC: *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*), geração de espécies reativas de oxigênio (indução do burst oxidativo) e liberação de mediadores inflamatórios. Os Fc γ R humanos pertencem à superfamília das imunoglobulinas e três classes principais destes receptores são descritas, as quais apresentam várias isoformas. Estas moléculas diferem quanto à afinidade e especificidade para os isotipos de IgG, distribuição celular, sinalização intracelular, pesos moleculares e função efetora. A diversidade funcional dos Fc γ R é atribuída ao polimorfismo genético, e que também é responsável por variações entre os indivíduos. Os Fc γ R também participam da imuno-regulação na patogênese de

reações alérgicas, auto-ímmunes, infecciosas e inflamatórias (KIMBERLY et al., 1995; RASCU et al., 1997; MARZOCCHI-MACHADO, LUCISANO-VALIM, 2005).

A caracterização detalhada destes receptores tanto em ratos como em humanos deu início ao endereçamento das bases moleculares para a diversidade de respostas desencadeadas por um ligante comum. A ligação dos complexos ímmunes é mediada por domínios extracelulares (EC) comuns de imunoglobulinas (*Ig-like*) que são conservados entre muitos Fc γ R. A consequência funcional dessa ligação, por outro lado, é mediada por domínios transmembrana (TM) e citoplasmáticos (C) de estrutura variável que são o resultado da duplicação genômica assim como o *splicing* alternativo do mRNA (RAVETCH, PERUSSIA, 1989).

Nos seres humanos, todos os Fc γ R pertencem à superfamília das imunoglobulinas e as três classes principais identificadas são: um receptor de alta afinidade - Fc γ RI (CD64) e, os de baixa afinidade - Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16), além do receptor neonatal para IgG (FcRn) (GALON et al., 1995; DAËRON, 1997b; GESSNER et al., 1998).

As várias isoformas destas classes de Fc γ R são codificadas por oito genes distintos que estão localizados no braço longo do cromossomo 1, nas bandas 1p13 e 1q21 (Fc γ RI), na banda 1q22 (Fc γ RII e Fc γ RIII) e no cromossomo 19 nas bandas 19q13 para o FcRn (GESSNER et al., 1998). 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 RIIIa/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 transmembrana e citoplasmático e, então, a expressão deste receptor na membrana de neutrófilos é mediada por uma molécula âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI) (ZHOU, BROWN, 1994; DAËRON, 1997b; MARZOCCHI-MACHADO, LUCISANO-VALIM, 2005). A Figura 4 ilustra as características estruturais da família de Fc γ R.

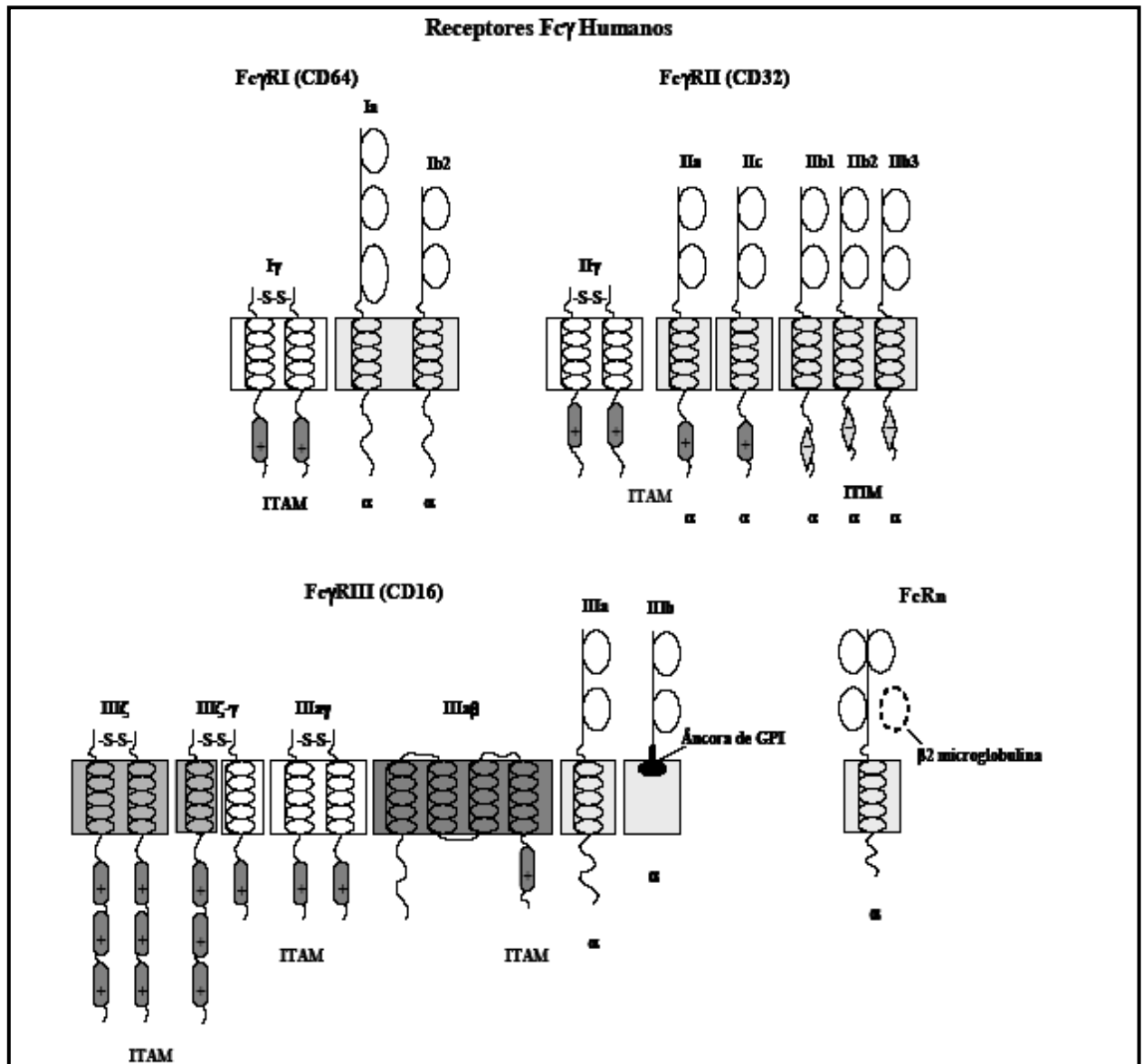


Figura 4: Representação esquemática da família de receptores humanos para Fc de Imunoglobulina G (Fc γ R). S-S: pontes de dissulfeto; ITAM: sequência de ativação de imuno-receptor baseada em tirosina (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*); ITIM: sequência de inibição de imuno-receptor baseada em tirosina (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*); GPI: Glicosil fosfatidil inositol (glycosylphosphatidylinositol). Os domínios Ig-semelhantes (Ig-like) próximos à membrana são os domínios ligantes de IgG. Com exceção do Fc γ RIIIb, todos os Fc γ R são moléculas transmembrana. Os produtos dos genes para cada classe de Fc γ R e suas subunidades individuais estão indicados como: a, b e c; e α , β , γ e ζ , respectivamente. Fonte: MARZOCCHI-MACHADO, LUCISANO-VALIM, 2005.

Sabe-se que apesar destes receptores serem expressos em muitas células, eles não são marcadores de um clone, além disso, uma mesma célula pode expressar mais do que um tipo de Fc γ R. Apesar de não reconhecerem diretamente o antígeno, quando a imunoglobulina se liga ao Fc γ R, confere ao antígeno especificidade para uma grande variedade de células, sendo que a maioria das quais são destituídas de estruturas para o reconhecimento de antígenos (DAËRON, 1997b; BIEZEVELD et al., 2006).

De acordo com as propriedades biológicas dos Fc γ R de membrana, podemos dividi-los em dois grupos principais sob o aspecto funcional: os Fc γ R que induzem a ativação celular e os Fc γ R que não o fazem (a Figura 5 traz exemplos destes mecanismos). Assim, respectivamente, o primeiro grupo de receptores possui um ou mais motivos de ativação citoplasmáticos denominados ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) e incluem os receptores de cadeia única (Fc γ R11a) e os de cadeias múltiplas (Fc γ R1 e Fc γ R11a). O segundo grupo, o dos receptores sem ITAM, inclui os Fc γ R que não estimulam a ativação celular e podem ser divididos em: a) receptores de cadeia única (Fc γ R11b), apresentando ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) no seu domínio C, que inibe a ativação celular mediada pelos receptores com ITAM, b) o Fc γ R11b, que não possui domínio C e por si só não é capaz de ativar a célula, mas contribui para a sinalização graças a co-expressão com outros receptores, o Fc γ R11a e o receptor para complemento tipo 3 (CR3), e c) o Fc γ Rn, que não estimula nem inibe a célula, apenas medeia a transcitose da IgG em células polarizadas e recentemente tem sido sugerido que em neutrófilos este receptor neonatal tenha um papel importante em mediar fagocitose. A interação entre Fc γ R e IgG estimula a rápida fosforilação dos ITAMs dos domínios citoplasmáticos do receptor ou das moléculas acessórias (DAËRON, 1997a; DAËRON, 1997b; VIDARSSON et al., 2006).

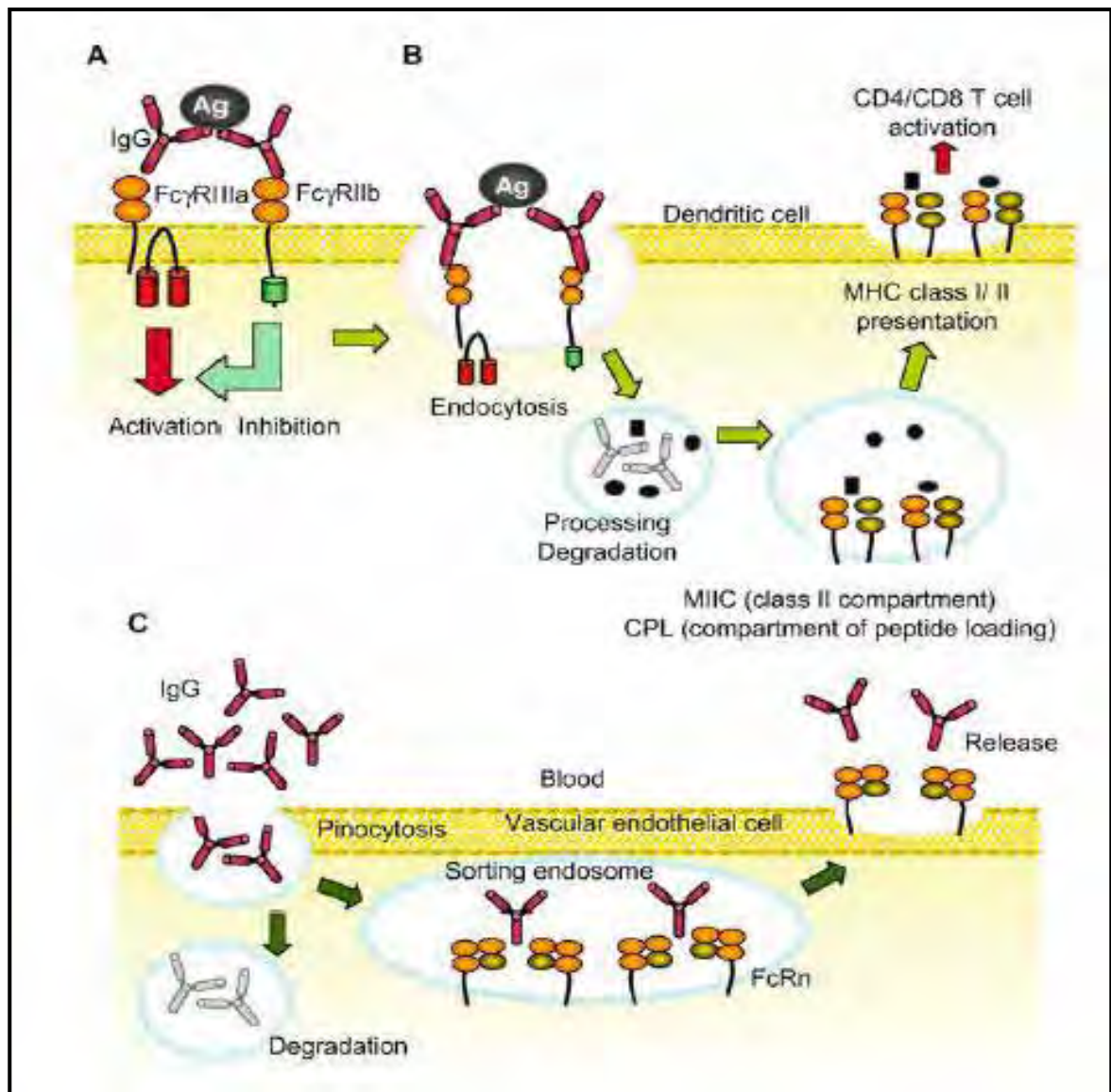


Figura 5: Principais funções dos Fc γ R. (A) Regulação positiva e negativa da sinalização celular. Papel central dos receptores no controle da resposta imune após a interação com os imunocomplexos. A ativação da cascata através da associação do Fc γ R-IC que resulta na ativação celular, induz a fagocitose, ADCC, produção de superóxido e produção e liberação de citocinas e mediadores pró-inflamatórios. Em contraste, Fc γ RIIb que contém ITIM medeia a inibição do ITAM que induziu a ativação da cascata de ativação celular. (B) *Clearance* de IC e apresentação de antígenos restritos ao MHC de classe I e II. Após fagocitose ou endocitose via Fc γ R os ICs são eficientemente degradados intracelularmente e segue então, a apresentação dos antígenos mediados pelas moléculas de MHC. (C) Transporte e reciclagem de IgG. Receptor de Ig transporta Ig transcelularmente e Fc γ R contribui para a regulação da concentração de IgG plasmática. Fonte: TAKAI, 2005.

Os neutrófilos humanos expressam constitutivamente as isoformas Fc γ RIIIa (CD32) e Fc γ RIIb (CD16) (MARZOCCHI-MACHADO, LUCISANO-VALIM, 2005).

O Fc γ RII é uma glicoproteína de 40 kDa e é o receptor para IgG mais amplamente distribuído entre as células. Existem três genes (A, B e C) para este receptor, que codificam respectivamente três isoformas: Fc γ RIIa, Fc γ RIIb e Fc γ RIIc e, seis mRNAs diferentes (a1, a2, b1, b2, b3 e c) são transcritos. No entanto, somente o Fc γ RIIa2 (solúvel), o Fc γ RIIa1 (transmembrana) e duas isoformas do Fc γ RIIb (b1 e b2) têm sido demonstrados *in vivo*. Portanto, esta classe de receptor compreende duas subclasses: Fc γ RIIa e Fc γ RIIb (BROOKS et al., 1989). O Fc γ RII liga IC de IgG1 e IgG3, mas interage muito fracamente com IgG4. A ligação da IgG2 ao Fc γ RIIa depende do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP: *Single nucleotide polymorphism*) no gene Fc γ RIIA, localizado no *exon 4* (A/G), que leva à substituição de um aminoácido, uma histidina (H) ou uma arginina (R), respectivamente, na posição 131, no segundo domínio extracelular da molécula. O alótipo Fc γ RIIa-R131 não interage, ou o faz muito fracamente, com a IgG2. Ao contrário, o alótipo Fc γ RIIa-H131 é o único capaz de ligar IgG2 eficientemente, o que confere a este alótipo um importante papel na imunidade mediada por IgG2 (WARMERDAN et al., 1990; TORKILDSEN et al., 2005; BIEZEVELD et al., 2006).

Os neutrófilos de indivíduos homocigotos para Fc γ RIIa-HH131 fagocitam bactérias opsonizadas por IgG2 significativamente melhor do que as células Fc γ RIIa-RR131 (SANDERS et al., 1995). Além disso, pelo fato de a IgG2 não ser um potente ativador da via clássica do complemento, o Fc γ RIIa-H131 é essencial para uma ligação eficiente de IC de IgG2 já que esta subclasse de IgG é a principal responsável pela resposta contra bactérias encapsuladas (SALMON et al., 1992; BAZÍLIO et al., 2004; TORKILDSEN et al., 2005) tais como *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* (KIMBERLY et al., 1995).

O polimorfismo do Fc γ RIIa (CD32) é o melhor estudado e aparentemente de maior interesse e implicações clínicas. Esta importância do polimorfismo do Fc γ RIIa é reforçada pelos estudos epidemiológicos, que mostram uma baixa incidência de infecções por bactérias encapsuladas na população japonesa, onde o alótipo Fc γ RIIa-HH131 é predominante (OHTO, MATSUO, 1989; BREDIUS et al., 1994).

Quanto aos Fc γ RIII (CD16) nos seres humanos, estes receptores são proteínas altamente glicosiladas e com pesos moleculares que variam entre 50 a 80 kDa. Estes receptores ligam IgG na forma de IC, com especificidade para IgG1 e

IgG3 e mínima ligação para IgG4 e IgG2 (KIMBERLY, SALMON, EDBERG, 1995; GESSNER et al., 1998).

O Fc γ RIII é codificado por dois genes distintos altamente homólogos: os genes Fc γ RIIIA e Fc γ RIIIB. O produto do gene Fc γ RIIIA é o Fc γ RIIIa, um receptor transmembrana em células *natural killer* (NK) e macrófagos, enquanto que o gene Fc γ RIIIB codifica o Fc γ RIIIb, um receptor ligado por âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI) em neutrófilos. Este é o único Fc γ R que não apresenta domínio TM (SELVARAJ et al., 1988; ZHOU, BROWN, 1994; TORKILDSEN et al., 2005). O gene Fc γ RIIIB apresenta um polimorfismo, que determina a ocorrência dos seguintes alótipos de antígenos nos neutrófilos: NA1 (*neutrophil antigen 1*) e NA2 (*neutrophil antigen 2*), os quais diferem entre si apenas pelo maior número de sítios de glicosilação em NA2 (SALMON et al., 1990). Um novo alo-antígeno, chamado SH, foi localizado no Fc γ RIIIb e é resultante de uma mutação no gene Fc γ RIIIB-NA2 de uma única base C/A na posição 266, que resulta na substituição de uma alanina por um ácido aspártico (BUX et al., 1997). Portanto, três genes são identificados: Fc γ RIIIB-NA1, Fc γ RIIIB-NA2 e Fc γ RIIIB-SH (KOENE et al., 1998).

A expressão do Fc γ RIIIb é predominante no neutrófilo, com $1-3 \times 10^6$ moléculas/célula, comparada ao Fc γ RIIIa com $1-2 \times 10^4$ moléculas/célula (UNKELESS et al., 1995). Embora o Fc γ RIIIb 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 Fc γ RIIIb com o Fc γ RIIIa e o receptor para complemento tipo 3 (CR3) é necessária para a fagocitose, ADCC e degranulação eficientes (HUNDT, SCHIMDT, 1992).

A sequência de nucleotídeos dos genes de NA1 e NA2 codifica uma proteína contendo 233 resíduos de aminoácidos, entretanto, ao nível de DNA, os alelos NA1 e NA2 diferem em cinco nucleotídeos (G/C, C/T, A/G, G/A e G/A, respectivamente nas seguintes posições 141, 147, 227, 277 e 349), dentro do exon 3. Quando estes nucleotídeos são traduzidos, resultam em quatro aminoácidos diferentes entre os alótipos NA (R/S-36, N/S-65, D/N-82 e V/I-106) localizados nos domínios EC1, com mutações nas posições 65 e 82, como mostra a Tabela 1, dando origem a dois sítios extras de glicosilação (seis ao invés de quatro) no Fc γ RIIIb-NA2 (BREDIUS et al., 1994; BUX et al., 1997; KUWANO et al., 2000).

Tabela 1: Pontos de mutação para o polimorfismo de Fc γ RIIIb e os aminoácidos resultantes dessas substituições de bases

Form	Fc γ RIIIb											
	cDNA						Amino Acid					
	141	147	227	266	277	349	36	38	65	78	82	106
NA1	G	C	A	C	G	G	Arg	Leu	Asn	Ala	Asp	Val
NA2	C	T	G	C	A	A	Ser	Leu	Ser	Ala	Asn	Ile
SH	C	T	G	A	A	A	Ser	Leu	Ser	Asp	Asn	Ile

Fonte: BUX et al., 1997.

Os neutrófilos de indivíduos com o alótipo Fc γ RIIIb-NA2 são menos eficientes para fagocitar eritrócitos sensibilizados com IgG1 e IgG3, bem como bactérias opsonizadas com IgG1, quando comparados com os neutrófilos de indivíduos do alótipo Fc γ RIIIb-NA1. 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 Fc γ RIIIb, há uma associação altamente significativa entre o fenótipo combinado Fc γ RIIa-RR131 e Fc γ RIIIb-NA2NA2 e infecções meningocócicas em indivíduos com deficiência de componentes da via terminal do sistema complemento (FIJEN et al., 1993). Desta forma, o Fc γ RIIA e o Fc γ RIIIB podem ser simultaneamente ligados, levando a uma colaboração na inicialização das funções integradas da célula. O polimorfismo Fc γ RIIIB-NA1NA2, apresenta influência sob a função do Fc γ RIIA de forma alelo-específica. Já o Fc γ RIIIB-NA2NA2, apresenta uma menor ativação da fagocitose mediada por Fc γ RIIa, quando comparada com o Fc γ RIIIB-NA1NA1 (OMI et al., 2002).

O polimorfismo dos genes para os Fc γ R está associado a uma variedade de doenças auto-imunes e infecciosas (KIMBERLY et al., 1995; DEO, 1997, NIMMERJAHN, RAVETCH, 2008). Clinicamente, o interesse para o estudo dos Fc γ R tem origem nos mecanismos de *clearance* de IC. A ineficiência destes mecanismos pode levar à deposição de IC em órgãos vulneráveis. Um exemplo clássico de doença auto-imune mediada por IC é o lúpus eritematoso sistêmico (LES). A disfunção dos Fc γ R correlaciona-se com a atividade da doença, nefrite e com os

níveis séricos de IC (KIMBERLY et al., 1983; MARZOCCHI-MACHADO et al., 2002; BAZÍLIO et al., 2004). Uma associação significativa entre o alótipo Fc γ RIIa-RR131 e nefrite lúpica já foi descrita (DUITS et al., 1995; RASCU et al., 1997).

Na infecção pelo HIV, embora a produção de anticorpos seja ineficiente, ocorre um aumento dos níveis de anticorpos, o que resulta em grandes quantidades de imunocomplexos circulantes (MORROW et al., 1986). O efeito biológico dos IC depende do seu engajamento aos Fc γ R na superfície das células fagocíticas, neutrófilos e macrófagos, e de células dendríticas (RAVETCH, BOLLAND, 2001). Forthal e colaboradores (2007) observaram que monócitos de indivíduos infectados pelo HIV, homocigotos HH131 para o Fc γ RIIa, fagocitaram IC mais eficientemente quando comparados aos indivíduos RR131. Quanto ao estudo da fagocitose, Bender e colaboradores (1985) observaram o *clearance* ineficiente de eritrócitos opsonizados por IgG em indivíduos infectados por HIV, sugerindo que a fagocitose mediada por Fc γ R estava defeituosa. Uma associação entre a infecção pelo HIV e a redução da fagocitose também foi relatada por Biggs e colaboradores (1995). Além disso, na infecção pelo HIV, uma modulação negativa da expressão de cadeias acessórias dos Fc γ R, que resultou na redução da fagocitose por monócitos, foi descrita por Kedzierska e colaboradores (2002). A perda dessas moléculas, responsáveis pela transdução de sinais, não afetou a expressão dos Fc γ R, o que indica uma estratégia específica usada pelo HIV para modular as defesas do hospedeiro (LEEANSYAH et al., 2007). A ineficiência do mecanismo de fagocitose pode contribuir para o aumento da suscetibilidade às infecções oportunistas em indivíduos infectados pelo HIV.

2.6. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) / SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)

O HIV é um retrovírus capaz de provocar infecção latente a longo prazo e efeitos citopáticos a curto prazo, induzindo a uma doença progressiva e fatal, incluindo síndromes debilitantes e degeneração do sistema nervoso central. O vírus consiste de duas fitas de RNA, acondicionadas no centro de proteínas virais e cercadas por um envelope de bicamada fosfolipídica derivada da camada celular do hospedeiro, mas incluindo proteínas de membrana codificadas viralmente. A entrada

do vírus na célula hospedeira é mediada por glicoproteínas do envelope viral (gp120/gp41). A subunidade gp120 interage com o receptor da célula CD4+ causando uma mudança conformacional necessária para a interação com outra proteína da célula hospedeira, o receptor de quimiocina CCR5 ou CXCR4. Após essa interação a gp41 promove um mecanismo que insere o vírus na membrana celular da célula hospedeira promovendo a fusão e entrada do vírus. Isolados de HIV que utilizam CCR5 para a entrada na célula hospedeira, normalmente se replicam mais lentamente e persistem ao longo da doença assintomática, enquanto aquele que tem tropismo pelo CXCR4 são encontrados durante a infecção mais tardia do HIV (COLLINS et al., 2002).

A produção do vírus maduro está associada ao mecanismo de lise da célula que foi utilizada para sua replicação - efeito citopático do HIV. De acordo com o curso tradicional da doença, a fase aguda é controlada parcialmente por uma resposta da imunidade adquirida, acompanhada por uma rápida diminuição transitória das células T CD4+ do sangue periférico e uma rápida recuperação parcial dessa perda. Após o contato, o vírus penetra na célula (T CD4+, macrófagos e até mesmo células dendríticas) por eventos de fusão mediados pelos receptores celulares do vírus, gp120 e gp41 – infecção primária. Dentro de dias após a exposição ao HIV, pode ser detectada abundante replicação viral nos linfonodos, induzindo viremia. Fato que é acompanhado por uma variedade de manifestações inespecíficas de sinais e sintomas típicos de muitas infecções virais. À medida que a infecção se dissemina, o sistema imune específico produz respostas humorais e celulares dirigidas para os antígenos virais. Isso reflete uma queda da viremia para níveis baixos, porém detectáveis. Inicia-se, então, uma fase de latência clínica, onde baixos níveis de vírus são produzidos e o sistema imune permanece competente para controlar a maioria das outras infecções por outros microrganismos. Entretanto, ocorre uma destruição maciça de células T CD4+ nos tecidos linfóides, que é a principal razão pela qual os indivíduos infectados por este vírus ficam suscetíveis a tantas infecções. Quando a destruição do tecido linfóide periférico está essencialmente completa e o número de células T CD4+ do sangue cai para menos de 200 células/mm³, damos o nome então de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) Portanto, a infecção crônica é caracterizada por um declínio gradual e profundo dessas células, levando, eventualmente, a um colapso da função

imune. A ativação imune durante a infecção crônica pelo HIV inclui então, a ativação de células B policlonais, o aumento de células T, uma alta frequência no fenótipo de células T ativadas e o aumento dos níveis de citocinas, quimiocinas e outros mediadores pró-inflamatórios. Entre outros efeitos, inclui-se também a restauração das células T de memória e a imunocompetência. Em contraste a tais efeitos, pode ocorrer o aparecimento de fibrose nos linfonodos, a retenção de células T efetoras nos mesmos, disfunção do timo, exaustão clonal, drenagem dos *pools* de células de memória e a geração de mais células alvo para o HIV, permitindo o curso de replicação viral, fazendo a doença progredir para a fase final e quase invariavelmente fatal (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2003; DOUEK, 2007).

A co-infecção com outros patógenos é um importante fator exógeno que influencia a gravidade e a taxa de progressão da doença em indivíduos soropositivos (SIAWAYA et al., 2007).

2.7. TUBERCULOSE / *Mycobacterium tuberculosis*

Mundialmente, a tuberculose (que se caracteriza por uma inflamação crônica intensa, necrose e caseificação do tecido pulmonar) é a infecção oportunista mais comum entre indivíduos soropositivos para o HIV e a causa de morte mais frequente entre os indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (MENEZES, SILVA et al., 2006; CORBETT et al., 2003), sendo responsável por pelo menos 13% (de 8.900.000 dos casos de tuberculose ativa em todo o mundo em 2004, segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS) e talvez 30% de todos os casos de morte em países em desenvolvimento, segundo Vermund e Yamamoto (2007). Não apenas o HIV promove a patogênese da tuberculose, contribuindo consideravelmente também para a sua reativação, mas dados clínicos sugerem que o *M. tuberculosis* acelera o curso da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Além disso, o risco de indivíduos duplamente infectados com *M. tuberculosis* e HIV adquirirem infecções oportunistas é aumentado quando comparados com indivíduos infectados apenas pelo HIV (SHALEKOFF et al., 1998).

Para se desenvolver no organismo, o bacilo da tuberculose necessita tanto de fatores intrínsecos como extrínsecos, tais como a imunodebilidade e a desnutrição, promovendo a suscetibilidade do indivíduo à infecção. A principal via de transmissão

da tuberculose se dá através de partículas infectantes presente nas gotículas de 1,0 a 5,0 µm de diâmetro exaladas pelos portadores de tuberculose pulmonar ou laringea ao tossir, espirrar ou falar. Num primeiro momento, os bacilos inalados são fagocitados por macrófagos alveolares, podendo ser eliminados, e quando não, se multiplicam no interior das células originando lesões localizadas chamadas tubérculos. A multiplicação da bactéria dentro da célula é possível porque o *M. tuberculosis* apresenta um mecanismo de fuga que impede a fusão das vesículas fagocíticas com os lisossomas após sua fagocitose. Após duas a seis semanas da infecção ocorre o estabelecimento da imunidade mediada por células, seguida de infiltração de linfócitos e fagócitos ativados na lesão, o que resulta na eliminação da maior parte da carga bacteriana e no término da infecção primária. Nestes casos, a única evidência de infecção prévia é dada pelo teste da tuberculina (PPD - Derivado de Proteína Purificado), também conhecido como Teste de Mantoux, ou diagnosticada através do raio-X do tórax. Portanto, a infecção pode permanecer dormente durante décadas, mas sofrer recidiva perante uma condição de baixa imunidade do indivíduo. (PANDOLFI et al., 2007; LOPES et al., 2008).

Cerca de 15% dos indivíduos com a doença ativa podem apresentar tuberculose extra-pulmonar, acometendo principalmente a pleura, os linfonodos, o fígado, o baço, os ossos e as articulações, o coração, o cérebro, o sistema genito-urinário, as meninges, o peritônio ou a pele. O *M. tuberculosis* estimula tanto respostas humorais quanto celulares, embora os anticorpos circulantes não forneçam resistência ao organismo. Os bacilos podem permanecer vivos no interior do granuloma por toda a vida do indivíduo (infecção latente), reativando-se diante de condições favoráveis (PANDOLFI et al., 2007).

Dados publicados pela OMS revelam que no ano de 2006 ocorreram 9,2 milhões de novos casos de tuberculose no mundo, e desse número, 709.000 indivíduos (7,7%) são portadores do HIV. A tuberculose é responsável pela morte anual de duas a três milhões de pessoas no mundo e por prejuízos econômicos globais de aproximadamente 12 bilhões de dólares ao ano (PANDOLFI et al., 2007).

O aumento de casos de indivíduos infectados pelo HIV e tuberculose pode ser devido ao fato de que atualmente os anti-retrovirais têm oferecido um aumento na expectativa de vida, favorecendo o aumento do número de indivíduos com HIV em curso, gerando continuamente um grupo de pessoas em risco. Além disso, a idade

avançada de pessoas infectadas aumenta o risco da infecção ou reativação do *M. tuberculosis* devido à maior imunossupressão (VERMUND, YAMAMOTO, 2007).

Estudos mostram que indivíduos infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* não tem necessariamente a capacidade fagocítica de seus neutrófilos prejudicada, mas que o *burst* oxidativo é reduzido. Resultados de quimioluminescência mostraram que a intensidade de fluorescência de grupos de indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* e duplamente infectados com HIV e tuberculose foi significativamente reduzida quando comparada com grupo de indivíduos infectados apenas pelo HIV e voluntários saudáveis (SHALEKOFF et al., 1998).

A fagocitose eficiente e a subsequente produção de intermediários reativos de oxigênio são importantes para a morte de microrganismos intracelulares e, defeitos em uma ou ambas dessas funções podem levar à deficiência da morte destes microrganismos predispondo o indivíduo com tuberculose pulmonar a ainda mais infecções oportunistas (SHALEKOFF et al., 1998; SIAWAYA et al., 2007).

Quanto aos Fc γ R, anteriormente, a imunidade humoral era considerada pouco relevante para a defesa contra *M. tuberculosis*. Por este motivo, apenas recentemente os estudos envolvendo os Fc γ R têm sido realizados. Maglione e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos deficientes da cadeia acessória de sinalização para o Fc γ R, foram mais suscetíveis à infecção por *M. tuberculosis* e apresentaram uma patologia mais exacerbada, contrário às observações em camundongos deficientes de Fc γ R de inibição celular. Esses resultados sugerem que o engajamento de diferentes Fc γ R pode modular o perfil de resistência e suscetibilidade do hospedeiro à infecção por *M. tuberculosis*.

3. JUSTIFICATIVA

Pelo fato de os Fc γ R mediarem importantes respostas biológicas, especialmente a ativação de neutrófilos, a ativação e a regulação das funções mediadas por eles podem estar envolvidas na fisiopatologia de várias doenças e processos inflamatórios (revisado em MARZOCCHI-MACHADO, LUCISANO-VALIM, 2005). Portanto, o estudo da influência do polimorfismo dos Fc γ R pode contribuir (i) para o entendimento da fisiopatologia de doenças infecciosas, inflamatórias e de caráter auto-imune; e (ii) para identificar indivíduos, cujo fenótipo determinado pelo polimorfismo dos Fc γ R possa conferir suscetibilidade ou proteção para determinadas doenças.

Diante do exposto, podemos considerar que: a) o polimorfismo dos Fc γ R afeta a ligação e o *clearance* dos imunocomplexos, b) a ocorrência do polimorfismo do Fc γ R11a-R131 pode predispor a infecções por encapsulados, c) as combinações das variantes alélicas dos Fc γ R H/R e NA1/NA2 podem levar à produção de EROs ineficiente, d) a infecção pelo HIV predispõe às infecções, em especial à tuberculose, e) a formação de IC na infecção pelo HIV é uma característica marcante, f) tanto na infecção pelo HIV, quanto por *Mycobacterium tuberculosis*, a redução ou ausência das cadeias acessórias de sinalização para os Fc γ R modulam mecanismos de defesa do hospedeiro, e g) há um interesse crescente na descoberta de marcadores de prognóstico da infecção pelo HIV .

Assim, a determinação dos genótipos para as variantes polimórficas funcionais dos Fc γ R, bem como das combinações dos diferentes genótipos, pode constituir um importante marcador para a patogênese da infecção pelo HIV e tuberculose.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é determinar os genótipos para os polimorfismos dos receptores Fc γ RIIa (H/R131) e Fc γ RIIIb (NA1/NA2) em portadores da infecção pelo HIV-1 e/ou por *M. tuberculosis*, assim como a avaliação do *burst* oxidativo (formação de espécies reativas de oxigênio - EROs) em neutrófilos para análise da associação entre estes receptores e a eficiência fagocítica.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliação do *burst* oxidativo de neutrófilos de indivíduos voluntários infectados pelo HIV e/ou pelo *M. tuberculosis* (*ex vivo*);
- b) determinação dos genótipos para os alelos Fc γ RIIa-H/R131, Fc γ RIIIb-NA1/NA2 através da extração do DNA genômico das diferentes amostras de sangue total, amplificação por PCR e purificação dos produtos correspondentes aos Fc γ R para sequenciamento de DNA;
- c) avaliar possível relação entre os genótipos H/R131 e NA1/NA2, o *burst* oxidativo dos neutrófilos, carga viral e contagem de células CD4+ e CD8+ dos indivíduos, entre cada grupo de estudo.

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1. CASUÍSTICA

O protocolo de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP e aos Comitês de Ética Médica do Hospital Regional Nestor Goulart Reis de Américo Brasiliense – SP, Hospital Estadual Américo Brasiliense, Serviço Especial de Saúde de Araraquara – SESA da Faculdade de Saúde Pública – USP e ao Hemonúcleo de Araraquara – UNESP, autorizando a coleta do material conforme os documentos apresentados no Apêndice 1.

Através de um Protocolo de Caracterização (Apêndice 2), os indivíduos que se encontravam dentro dos parâmetros desejáveis para a pesquisa, foram convidados a participarem da mesma e após o esclarecimento sobre o projeto receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 3) para que fosse assinado caso o convite fosse aceito, além do termo de aceite para a doação do material biológico (sangue) (Apêndice 4).

O grupo de estudo foi constituído por indivíduos em seguimento no Hospital Regional Nestor Goulart Reis de Américo Brasiliense – SP, no Hospital Estadual Américo Brasiliense, no Serviço Especial de Saúde de Araraquara - SESA da Faculdade de Saúde Pública - USP e voluntários saudáveis doadores de sangue do Hemonúcleo de Araraquara – UNESP. A população de estudo consistiu de 76 voluntários, sendo 27 indivíduos soropositivos para HIV, de ambos os sexos e adultos, subdivididos em dois grupos compostos por: Grupo HIV - indivíduos infectados pelo HIV (n=20, média de idade=43 anos) e Grupo HIV/TB - indivíduos co-infectados por *Mycobacterium tuberculosis* ativo e pelo HIV (n=7, média de idade=40 anos). Ainda, o Grupo TB - composto por indivíduos infectados apenas pelo *Mycobacterium tuberculosis* ativo (n=24, média de idade=33 anos) e o Grupo Controle, formado por indivíduos saudáveis (n=25, média de idade=30 anos). Todos os grupos foram compostos por indivíduos de ambos os sexos e adultos, com idades variando entre 18 e 60 anos.

Para os indivíduos dos grupos HIV/TB e TB, exames de rotina foram realizados pelos próprios hospitais ou posto de saúde de procedência para a confirmação da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. A metodologia utilizada foi a Baciloscopia por meio da coloração de Ziehl Neelsen (detecção de bactérias

álcool-ácido-resistentes – Bacilos de Koch), cultura e raio X do pulmão. O teste da tuberculina (PPD) também foi realizado a fim de confirmar a evidência de infecção prévia pelo *M. tuberculosis*.

5.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O material biológico, sangue periférico, foi colhido após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por cada voluntário. As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa, utilizando-se sistema de coleta a vácuo ou seringas descartáveis, em tubos estéreis e descartáveis, contendo o sal dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-K₂) como anticoagulante. A colheita do sangue foi realizada no próprio ambiente hospitalar, Serviço Especial de Saúde de Araraquara - SESA da Faculdade de Saúde Pública – USP para amostras do Grupo HIV, Hospital Regional Nestor Goulart Reis de Américo Brasiliense – SP, Hospital Estadual Américo Brasiliense para as amostras do Grupo HIV/TB, Hospital Regional Nestor Goulart Reis de Américo Brasiliense – SP para amostras do Grupo TB e Hemonúcleo de Araraquara – UNESP para amostras do Grupo Controle; e, imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular da Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapia do Centro de Referência Diagnóstica “Prof. Antônio Longo”- NAC/FCF Araraquara-UNESP, seguindo as normas de biossegurança.

O volume de sangue colhido foi de 10 mL, destinados à separação de leucócitos para a análise do *burst* oxidativo dos neutrófilos e extração de DNA para a realização das genotipagens dos FcγR.

5.3. DETERMINAÇÃO DO BURST OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA DEPENDENTE DE LUMINOL

A avaliação do *burst* oxidativo de neutrófilos do sangue periférico foi realizada em 76 indivíduos de ambos os sexos, sendo 22 % do sexo feminino e 78 % do sexo masculino, com idades entre 18 e 60 anos.

Cinco mililitros do sangue colhido do indivíduo em tubo contendo EDTA-K₂

como anticoagulante foram utilizados para a obtenção dos neutrófilos e posteriormente submetidos à quimioluminescência dependente do luminol para a medida do burst oxidativo dos neutrófilos, *ex vivo*.

5.3.1. Separação de Neutrófilos com Histopaque 1119 e 1077

Em um tubo *falcon* limpo e estéril de 15 mL foram adicionados cuidadosamente 3 mL de Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich[®]), 3 mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich[®]) e 5 mL do sangue total do indivíduo. Centrifugou-se a 700 g durante 30 minutos.

O soro, a camada de mononucleares e o Histopaque foram desprezados utilizando uma pipeta Pasteur. A camada de polimorfonucleares foi transferida para novo tubo *falcon* limpo e estéril de 15 mL, onde foram adicionados 10 mL de Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) estéril, pH 7,4 e em seguida centrifugada à 250 g durante 10 minutos. Esta etapa corresponde a 1ª lavagem.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Dez mililitros de PBS estéril foram adicionados e a centrifugação foi feita novamente a 250 g durante 10 minutos (2ª lavagem).

Desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 0,5 mL de PBS. A Figura 6 ilustra a metodologia utilizada para a separação de neutrófilos do sangue total através da centrifugação com o Histopaque de diferentes gradientes de densidade.

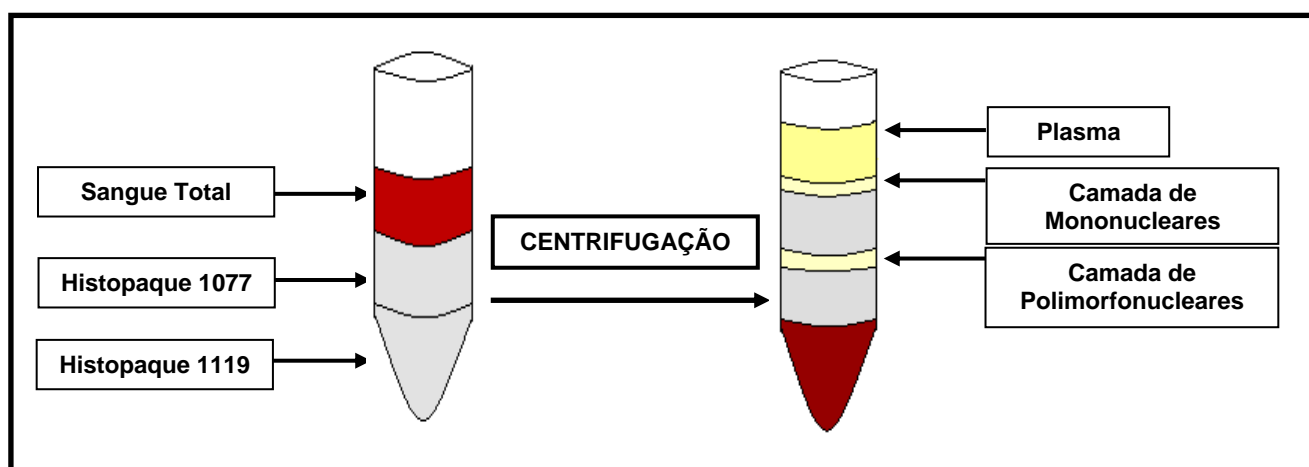


Figura 6: Demonstração ilustrativa da separação celular por Histopaque 1077 e 1119. Após a centrifugação ocorre a separação de determinadas linhagens celulares dando origem a uma camada de células mononucleares e a outra camada de células polimorfonucleares.

5.3.2. Contagem dos Neutrófilos em Câmara de Neubauer

Para a contagem das células na Câmara de Neubauer foi feita uma diluição 1/10, sendo 10 μL da solução contendo os polimorfonucleares e 90 μL do Líquido de Lázarus. Foram contadas as células presentes nos 4 quadrantes utilizados para a contagem de leucócitos, que de acordo com a ilustração abaixo (Figura 6), se referem aos quadrantes discriminados com a letra L. A partir do número de células contadas foi feito um ajuste para que no ensaio de quimioluminescência estivessem presentes 1×10^6 células/mL.

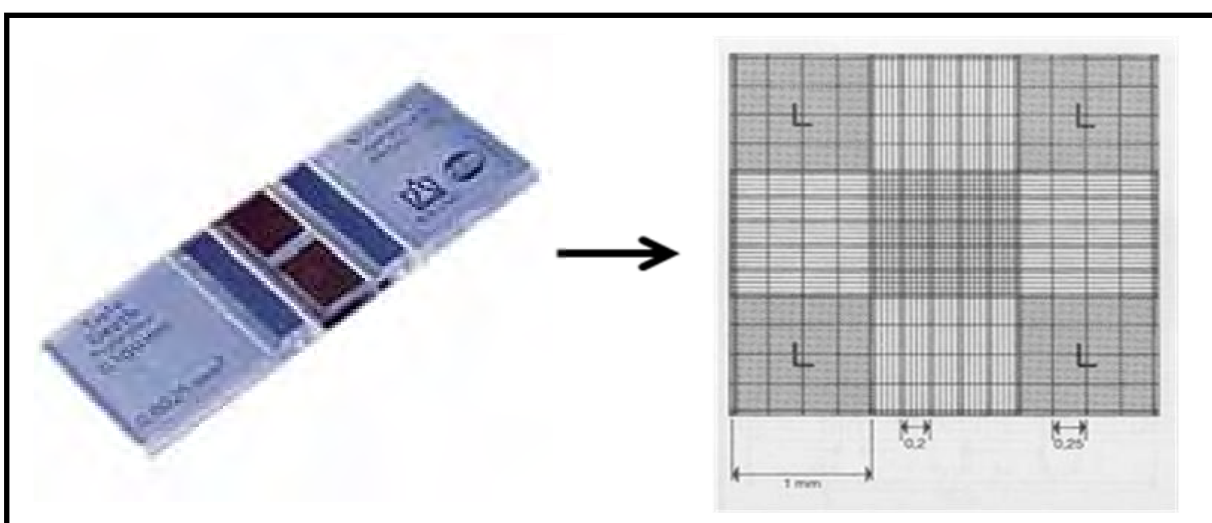


Figura 7: Câmara de Neubauer, a esquerda, e a direita a representação dos 4 quadrantes utilizados para a contagem de leucócitos (representados com a letra L).

5.3.3. Teste de viabilidade com Azul de Trypan

Para o teste de viabilidade foram utilizados 90 μL de Solução corante Azul de Trypan e 10 μL da suspensão de células. Foram contadas 100 células e a partir do resultado, obteve-se a porcentagem de células vivas (não coradas, portanto íntegras e viáveis) e mortas (aquelas que se apresentavam azuis, devido à permeabilização da membrana que permite a entrada do corante).

5.3.4. Preparação do Luminol

- Solução 10^{-2} M de Luminol:

Foram dissolvidos 0,002 g de luminol sódico em 1 mL de tampão PBS Dulbecco's (PBS-D) estéril. A solução foi aliquotada e armazenada em tubos tipo *ependorf*, mantidos à -20°C e ao abrigo da luz. Todo o procedimento foi realizado

em cabine de fluxo laminar para garantir a esterilidade da solução.

A solução de uso foi preparada no momento da realização do ensaio e a partir da seguinte fórmula:

$$C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$$

Onde:

C_{inicial} = concentração inicial, que corresponde a concentração da solução estoque (10^{-2}).

C_{final} = concentração final, que equivale a 2×10^{-4} .

V_{inicial} = volume inicial, que é o que se deseja saber.

V_{final} = volume final, equivalente a quantidade de solução de trabalho que se deseja fazer, sabendo que são utilizados 100 μL da mesma por amostra.

Para a solução de trabalho, a diluição foi feita novamente em PBS-D.

5.3.5. Preparação da suspensão de Zymosan (35 mg/mL)

Suspendeu-se 0,175 g de Zymosan em 5 mL de água deionizada estéril. Ferveu-se em banho-maria até a formação de uma pasta, onde o zymosan estivesse completamente dissolvido. Centrifugou-se por 1 minuto a 700 g e o sobrenadante foi desprezado. Ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL de tampão PBS-D.

- Opsonização do Zymosan:

Foram adicionados 5 mL de um pool de soro e deixado em banho-maria à 37°C. Decorridos 20 minutos, a mistura foi centrifugada a 200 g durante 5 minutos a 0°C. Desprezou-se o sobrenadante, 1 mL de PBS-D foi adicionado e novamente submetido a centrifugação. Esta lavagem foi feita duas vezes. Em seguida, o sedimento foi ressuspendido em 5 mL de PBS-D.

Foram feitas alíquotas em tubos tipo *ependorf* que foram armazenados à -20°C até o momento do uso.

Esse procedimento foi realizado em cabine de fluxo laminar para garantir a esterilidade da solução.

Para a solução de trabalho, no momento do uso, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$$

Onde:

$C_{inicial}$ = concentração inicial, que corresponde à concentração da solução estoque (35 mg/mL), portanto, 35000 µg/mL.

C_{final} = concentração final, que equivale a 7000 µg/mL.

$V_{inicial}$ = volume inicial, que é o que se deseja saber.

V_{final} = volume final, equivalente a quantidade de solução de trabalho que se deseja fazer, sabendo que são utilizados 100 µL da mesma por amostra.

Para a solução de trabalho, a diluição foi feita novamente em PBS-D.

5.3.6. Ensaio de quimioluminescência dependente do Luminol

Foram utilizadas três cubetas estéreis para cada indivíduo, onde uma delas correspondia ao *background* ou controle negativo, a qual era composta de 100 µL de luminol, a quantidade necessária para que estivessem presentes 1×10^6 células/mL, a quantidade necessária de PBS-D para completar 1000 µL e não continha o estímulo, ou seja, o zymosan opsonizado.

As outras duas cubetas correspondiam à amostra e sua duplicata, as quais continham as mesmas quantidades de componentes que o *background*, mais 100 µL de zymosan opsonizado.

O estímulo foi adicionado apenas quando todos os outros componentes já estavam presentes na cubeta e esta já mantida dentro do luminômetro (BioOrbit - 1251 Luminometer). Este ensaio foi realizado no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

As quantidades de células, luminol e zymosan para a análise foram definidas através da padronização da técnica no próprio Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, por meio de vários trabalhos (SILVA, I.M., 2000; BONACORSI, C., 2009) que comprovaram que 1×10^6 células/mL é a quantidade suficiente para que o Luminômetro fosse capaz de realizar uma leitura fidedigna do *burst* oxidativo dos neutrófilos e que tal dado fosse estatisticamente significativo e, que as concentrações de luminol e zymosan, já citadas, fossem ideais para a análise.

5.4. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído de leucócitos do sangue periférico pela técnica de *salting out* descrita por Miller et al. (1988) e Abdel-Rahman (1994) com algumas modificações.

Para esta análise, foram utilizados 5 mL do sangue do voluntário colhido em tubo contendo EDTA-K₂. Após a coleta, o sangue total foi centrifugado a 1000 g durante 10 minutos.

O plasma foi descartado e a camada leucocitária foi cuidadosamente retirada, utilizando-se uma pipeta Pasteur, e colocada em um tubo tipo *ependorf* de 2,0 mL. Um mililitro de Tampão de Lise de Eritrócitos contendo 27,4 g de Sacarose, 2,5 mL de Triton-X, 1,25 mL de MgCl₂.6H₂O (1 M) e 3,0 mL de Tris HCl (pH 8,0), (5 vezes concentrado), foi adicionado e a homogeneização foi feita por inversão durante 30 segundos. Em seguida a mistura foi submetida à centrifugação por 1 minuto a 15000 g. Desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de água Milli-Q estéril e centrifugou-se a 15000g novamente por 1 minuto. O sobrenadante foi desprezado. Trezentos e sessenta e seis microlitros de uma mistura contendo 80 µL de Tampão Proteinase K (5 vezes concentrado), 40 µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 10%, 216 µL de água Milli-Q estéril e 30 µL de Proteinase K (10 mg/mL) foram adicionados ao tubo (*ependorf*) que foi mantido em banho à 56°C por 30 minutos. Após ser resfriada à temperatura ambiente, 132 µL de Cloreto de Sódio (NaCl) 5 M foram adicionados e após homogeneização, centrifugou-se a 15000 g por 6 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo tipo *ependorf* limpo e estéril de 1,5 mL, que foi submetido à centrifugação novamente por 3 minutos a 15000 g. Novamente foi feita a transferência do sobrenadante para outro tubo tipo *ependorf* limpo e estéril e a este foi adicionado 1 mL de Etanol Absoluto. Após homogeneização deixou-se precipitar (em repouso) por 2 minutos à temperatura ambiente e submetido à centrifugação por 2 minutos a 15000 g. Após a remoção do sobrenadante 1 mL de Álcool 70% (em água Milli-Q estéril) foi adicionado e centrifugou-se novamente a 15000 g durante 2 minutos. O tubo (*ependorf*) foi invertido cuidadosamente para que o sobrenadante fosse desprezado, e assim mantido sobre um papel de filtro durante 5 minutos para secagem completa.

O DNA presente no precipitado foi solubilizado em 100 µL de água Milli-Q estéril e homogeneizado durante 30 segundos em vórtex.

Neste mesmo tubo, então, o DNA solubilizado foi mantido armazenado a uma temperatura de 4 a 8°C, até o momento do uso.

5.4.1. Verificação da Qualidade e Integridade do DNA

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Para a preparação do gel foram utilizados 0,8 g de agarose em 100 mL de tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) (1x) pH 8,3, nas dimensões de 11 x 14 cm. Foram feitos poços de um milímetro de espessura utilizando um pente, o qual era retirado após a solidificação do gel.

Tampão TBE pH 8,3 foi colocado até o gel e os eletrodos ficarem totalmente submersos, na cuba eletroforética.

Foram utilizados 10 µL da amostra de DNA diluída 50 vezes juntamente com 5 µL de uma solução corante de Azul de Bromofenol contendo GelRed (Uniscience).

Foi utilizado também um padrão de pares de bases (*Low DNA Mass Ladder* – Invitrogen ou GeneRuler™ 50 pb DNA Ladder - Fermentas), onde, pelo qual era possível a determinação da concentração de DNA de cada amostra a partir de uma tabela trazida na bula do reagente. Foram utilizados 5 µL do corante de Azul de Bromofenol contendo GelRed (Uniscience) e de 6 a 8 µL do *Ladder*.

A eletroforese das amostras foi acompanhada pela migração do Azul de Bromofenol e, o GelRed permitiu a visualização da migração do DNA das amostras através de um transluminador de luz ultravioleta (InGenius – SYNGENE) utilizando o software GeneSnap para a fotodocumentação. A eletroforese foi realizada a 100 volts/h.

5.5. ANÁLISE DOS GENÓTIPOS

A fim de esclarecer a nomenclatura apresentada, as formas “FcγRIIA” e “FcγRIIB”, designam os genes para os receptores, enquanto que as formas “FcγRIIa” e “FcγRIIb”, os produtos dos respectivos genes.

A análise do polimorfismo alélico dos FcγR foi realizada pela técnica de amplificação do DNA genômico auxiliada pela polimerase (PCR: Reação em Cadeia

da Polimerase), utilizando-se oligo-iniciadores.

Como controle de contaminação dos reagentes com DNA, dois controles, contendo toda a mistura de reação, mas sem DNA, também foram incluídos e submetidos às mesmas condições de reações dos outros tubos com as amostras de DNA.

Para todas as reações de PCR, a mistura de reação foi composta por: DNA da amostra (exceto o controle) (1/100), oligo-iniciadores *sense* e *anti-sense* (10 pmol/μL), a enzima *Taq* polimerase (5 U/μL), os desoxinucleotídeos (10 mM), solução tampão com quantidades adequadas de cloreto de potássio (KCl) (10x), solução de cloreto de magnésio (MgCl₂) (50 mM) e água destilada estéril para completar o volume de reação.

As Figuras 8 e 9 mostram parte da sequência de DNA correspondente aos receptores FcγRIIIa (CD32) e FcγRIIIb (CD16), respectivamente, disponíveis no NCBI (GenBank), os oligo-iniciadores *sense* e *anti-sense* em suas regiões de anelamento na sequência, e os pontos de polimorfismo correspondentes a cada receptor.

5.5.1. Análise do genótipo FcγRIIA

As formas alélicas FcγRIIA-H131 e FcγRIIA-R131 resultam nas variantes: H131 e R131. Assim, para a análise do polimorfismo alélico do FcγRIIA uma PCR foi realizada para cada amostra de DNA utilizando um par de oligo-iniciadores – *sense*, específico para uma localização anterior ao ponto de polimorfismo e *anti-sense*, específico para uma posição posterior ao polimorfismo (que se faz presente na posição 131 do *exon* 4). Os produtos das PCRs foram sequenciados como descrito mais adiante. As sequências dos oligonucleotídeos foram desenhadas utilizando programas de computador específicos (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*, Gene Runner) após a verificação da sequência de DNA do fragmento do *exon* 4 disponível no GenBank ou NCBI (Apêndice 5). O par de oligo-iniciadores foi sintetizado pela Bioneer. O tamanho dos fragmentos obtidos após a amplificação totalizou 210 pares de bases (pb). Segue abaixo as sequências dos oligo-iniciadores utilizados:

Sense: 5' cag gag gga gaa acc atc 3'

Anti-sense: 5' gat ggt cac agg ctt gga 3'

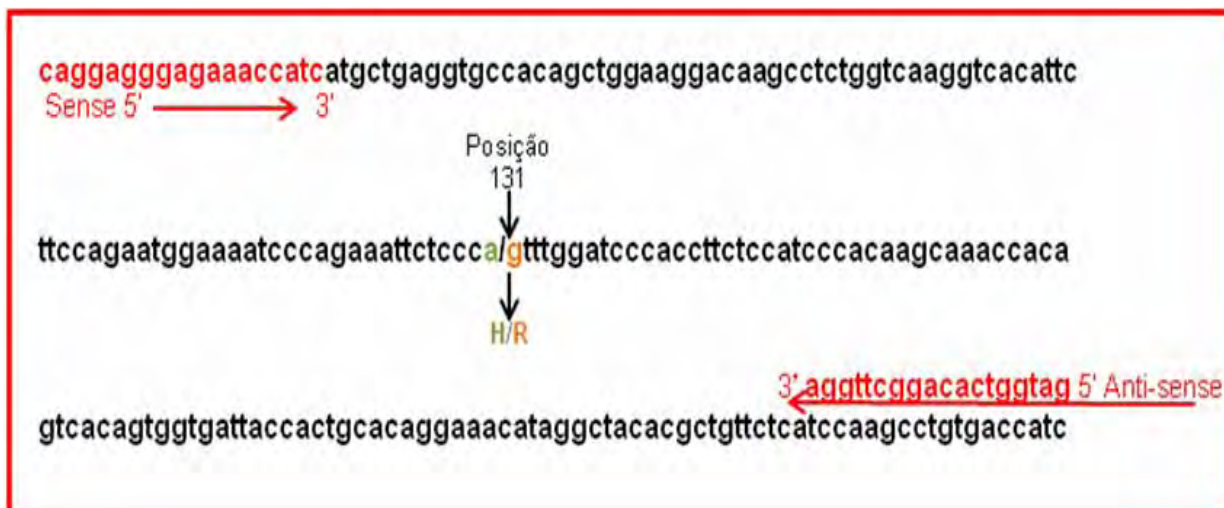


Figura 8: Parte da sequência de DNA encontrada no *exon 4*, correspondente ao receptor *FcγRIIIa* (CD32). Número de acesso NCBI: NM_001136219.1. Em destaque, ponto de polimorfismo correspondente a posição 131. Em vermelho, os oligo-iniciadores *sense* e *anti-sense* alinhados, mostrando as posições de anelamento, e que deram origem a sequência de DNA (resultante da PCR) posteriormente sequenciada.

Para cada reação foram utilizados 2,5 µL de tampão contendo KCl (Invitrogen - 10 vezes concentrado), 1 µL de MgCl₂ (Invitrogen - 50 mM), 0,5 µL do mix de dinucleotídeo trifosfato (dNTP) (dNTP Mix - Promega - 10 mM), 2,5 µL de oligo-iniciador *sense* (Bioneer - 10 pmol/µL), 2,5 µL de oligo-iniciador *anti-sense* (Bioneer - 10 pmol/µL), 0,1 µL de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen - 5 U/µL) e 13,9 µL de água destilada estéril, suficiente para completar 23 µL de *Mix*, que foram adicionados a um tubo tipo *ependorf* contendo 2 µL de amostra de DNA, totalizando 25 µL de reação por amostra.

As reações foram realizadas em um ciclador automático de temperatura Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) nas seguintes condições padronizadas no laboratório:

Hot start: 95°C x 4 minutos

30 ciclos: 95°C x 1 minuto

52°C x 2 minutos

72°C x 1 minuto

Extensão: 72°C x 1 minuto

4°C x ∞

5.5.2. Análise do genótipo FcγRIIIB

As formas alélicas FcγRIIIB-NA1 e FcγRIIIB-NA2 resultam nas variantes polimórficas: os alo-antígenos NA1 e NA2, respectivamente.

Assim, para a análise do polimorfismo alélico do FcγRIIIB uma PCR foi realizada para cada amostra de DNA utilizando um par de oligo-iniciadores – *sense*, específico para uma localização anterior ao primeiro ponto de polimorfismo a ser avaliado (posição 141) e *anti-sense*, específico para uma posição posterior ao polimorfismo da posição 277. Os produtos das PCRs foram sequenciados como descrito mais adiante. As sequências dos oligonucleotídeos foram desenhadas segundo Covas et al (2005). A sequência de DNA para este receptor e seus pontos de polimorfismo são mostrados no Apêndice 6. O par de oligo-iniciadores foi sintetizado pela IDT (Integrated DNA Technologies). O tamanho dos fragmentos obtidos após a amplificação totalizou 254 pb. Segue abaixo as sequências dos oligo-iniciadores utilizados:

Sense: 5' aag atc tcc caa agg ctg tgg 3'

Anti-sense: 5' atg gac ttc tag ctg cac 3'



Figura 9: Parte da sequência de DNA correspondente ao receptor FcγRIIIB (CD16). Número de acesso NCBI: X52645.1. Em destaque, os pontos de polimorfismo correspondentes as posições 141, 147, 227, 266 e 277. Em vermelho, os oligo-iniciadores *sense* e *anti-sense* alinhados, mostrando as posições de anelamento, e que deram origem a sequência de DNA (resultante da PCR) posteriormente sequenciada.

Para cada reação foram utilizados 5,0 µL de tampão contendo KCl (Invitrogen - 10 vezes concentrado), 1,5 µL de MgCl₂ (Invitrogen – 50 mM), 1,0 µL do mix de dinucleotídeo trifosfato (dNTP) (dNTP Mix – Promega – 10 mM), 5,0 µL de oligo-iniciador *sense* (IDT *Integrated DNA Technologies* – 10 pmol/µL), 5,0 µL de oligo-iniciador *anti-sense* (IDT *Integrated DNA Technologies* – 10 pmol/µL), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen – 5 U/µL) e 30,3 µL de água destilada estéril, suficiente para completar 48 µL de *Mix*, que foram adicionados a um tubo tipo *ependorf* contendo 2 µL de amostra de DNA, totalizando 50 µL de reação por amostra.

As reações foram realizadas em um ciclador automático de temperatura Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) nas seguintes condições padronizadas no laboratório:

Hot start: 94°C x 5 minutos

35 ciclos: 94°C x 1 minuto

57°C x 1 minutos

72°C x 1 minuto

Extensão: 72°C x 10 minuto

4°C x ∞

5.6. ELETROFORESE DOS PRODUTOS DA PCR

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR, para as variantes polimórficas do FcγR, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE pH 8,3. Para a preparação de cada amostra foram usados 2,5 µL de uma solução corante contendo Azul de Bromofenol e GelRed (Uniscience) e 5 µL do produto de PCR. A eletroforese das amostras foi acompanhada pela migração do Azul de Bromofenol.

Para a marcação do número de pares de bases, em cada gel foi adicionado ao primeiro poço uma solução contendo 5 µL da solução corante (Azul de Bromofenol + GelRed) e 8 µL do padrão de pares de bases (*Low DNA Mass Ladder* – Invitrogen, ou GeneRuler™ 50 pb DNA *Ladder* - Fermentas).

A eletroforese teve duração de aproximadamente uma hora e meia a 100 V.

Em seguida o gel foi levado para revelação em um transluminador de luz ultravioleta (InGenius – SYNGENE) onde a fotodocumentação foi realizada através do software GeneSnap.

O gel foi preparado utilizando 1,5 g de agarose em 100 mL de tampão TBE (1x) pH 8,3 nas dimensões de 11 x 14cm. Para a aplicação das amostras foram feitos poços de um milímetro de espessura utilizando um pente que era sempre retirado após a solidificação do gel. Tampão TBE pH 8,3 também foi colocado até o gel e os eletrodos ficarem totalmente submersos, na cuba eletroforética.

5.7. SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS

5.7.1. Obtenção dos produtos amplificados por PCR

Nova eletroforese em gel de agarose 1,5% foi feita para a purificação dos produtos da PCR e posterior sequenciamento das amostras.

Em cada poço do gel foi adicionado o produto da PCR (20 μ L) juntamente com 4 μ L de Solução corante contendo Azul de Bromofenol (um poço por amostra).

Para o padrão de pares de bases utilizou-se 8 μ L de *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) ou GeneRuler™ 50 pb DNA *Ladder* (Fermentas) juntamente com 4 μ L de Solução corante contendo Azul de Bromofenol. Tampão TBE (1x) foi adicionado na cuba até que os eletrodos ficassem submersos. A eletroforese teve duração de aproximadamente uma hora e meia a 100 V. Em seguida o gel foi corado com Solução Brometo de Etídeo (0,5 μ g/mL) durante 10 a 15 minutos.

Com a ajuda de um transluminador, cada banda revelada no gel foi recortada utilizando uma lâmina de bisturi estéril e armazenada em tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL.

5.7.2. Purificação das Amostras (Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System – Promega)

Cada tubo (*ependorf*) de 1,5 mL contendo as bandas recortadas foi pesado. A solução de ligação (*Bind Solution*) foi adicionada na mesma proporção do peso de cada tubo, subtraindo o valor do peso do tubo vazio, conforme instrução do fabricante, e mantido em banho a 62°C, sob agitação, até solubilização completa.

O conjunto (coluna + tubo coletor) foi submetido à centrifugação por um minuto a 16000 g. O líquido dos tubos de coleta foi descartado. Foram adicionados 700 µL de Solução de Lavagem, previamente diluída com etanol, na coluna de cada conjunto. Centrifugou-se o conjunto novamente. O líquido dos tubos de coleta foi desprezado e nova lavagem foi feita adicionando 500 µL de Solução de Lavagem.

A coluna de cada conjunto foi transferida para um tubo tipo *ependorf* limpo e estéril de 1,5 mL. Cinquenta microlitros de água livre de nuclease foram adicionados em cada coluna. Deixou-se a temperatura ambiente durante 3 minutos e em seguida fez-se a última centrifugação a 16000 g, por um minuto. O armazenamento foi feito a 4°C até o momento do uso.

5.7.3. Sequenciamento das amostras purificadas

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Genética do Professor Flávio Henrique da Silva, na Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

Uma eletroforese em gel de agarose 1,0% foi realizada para avaliar a qualidade do DNA das amostras. Em seguida, cada amostra (1 µL) foi quantificada pelo espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop).

Após a verificação da qualidade e quantificação do DNA nas amostras o produto de PCR purificado foi sequenciado através do método de terminação da cadeia (SANGER et al., 1977). O kit DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (MegaBACE™ - GE Healthcare) foi utilizado conforme orientação do fabricante. Em combinação, os mesmos oligonucleotídeos utilizados para a realização da PCR para as formas alélicas Fc γ RIIA-H131 e Fc γ RIIA-R131, Fc γ RIIB-NA1 e Fc γ RIIB-NA2 foram usados neste procedimento:

Sense: 5' cag gag gga gaa acc atc 3'

Anti-sense: 5' gat ggt cac agg ctt gga 3' - Fc γ RIIA

Sense: 5' aag atc tcc caa agg ctg tgg 3'

Anti-sense: 5' atg gac ttc tag ctg cac 3' - Fc γ RIIB

A amplificação foi realizada a partir das seguintes condições: um ciclo inicial de 96°C durante 2 minutos seguidos por 30 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 50°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto e 15 segundos. A reação foi precipitada em etanol e acetato de amônio 7,5 M segundo instruções do fabricante. O produto gerado em cada reação foi submetido à separação e detecção usando o sequenciador automático MegaBACE™ 1000 Flex (GE Healthcare). A análise das sequências foi realizada pelo software Sequence Analyser-Base Caller Cimarron 3.12 (GE Healthcare).

5.8. IMUNOFENOTIPAGEM CD3+/CD4+/CD8+ E VIREMIA RNA-HIV

Para os grupos HIV e HIV/TB foram feitas a tipagem de linfócitos T CD4/CD8 e a determinação da viremia plasmática – RNA-HIV (Carga Viral - cópias/mL) com o propósito de determinar a situação imunológica dos indivíduos diante da infecção e assim estabelecer uma relação entre esses dados e os resultados obtidos na pesquisa. Tal metodologia é seguida de acordo com as técnicas padronizadas e rotineiras do Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular-CRD-NAC/Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP.

Ainda, para estes grupos, os exames confirmatórios para a infecção pelo HIV foram anteriormente realizados dentro dos hospitais de procedência, onde cada paciente faz seguimento do tratamento, de acordo com a Portaria nº 151/Ministério da Saúde, de 14 de outubro de 2009. Esta tem como propósito implantar um programa de controle da qualidade analítica do diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV, na necessidade de padronizar o conjunto de procedimentos sequenciados para detecção de anticorpos anti-HIV, com o objetivo de realizar o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV em indivíduos acima de 18 meses de idade.

5.8.1. Imunofenotipagem de linfócitos T por Citometria de Fluxo

A tipagem linfocitária foi realizada conforme procedimentos padronizados para a detecção de células CD45 do sangue periférico associadas aos fenótipos CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺, através do método de Citometria de Fluxo no sistema BD® FACSCalibur (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems Califórnia-USA). Para a realização da técnica foram utilizados anticorpos monoclonais específicos ligados

aos fluorocromos: CD4 – APC, CD8 – PE, CD3 – FITC, CD45 - PerCP onde as fluorescências foram avaliadas através do Software Multiset ou Cell Quest (BD).

Para cada indivíduo utilizou-se um tubo “trucount” identificado com o nome e o número da amostra. Foram pipetados 20 µL do MultTest (CD4-APC/ CD8-PE/ CD3-FITC/ CD45-PerCP), e 50 µL de sangue total. Homogeneizou-se e incubou-se por 15 minutos no escuro. Decorrido esse tempo, foram adicionados 450 µL de *Facsllysing Solution* 1/10, homogeneizado e incubado por mais 15 minutos no escuro. Em seguida, a leitura das amostras foi realizada pelo citômetro de fluxo. Foram realizadas as calibrações e os controles internos para validação dos testes.

5.8.2. Determinação da viremia RNA-HIV

Essa metodologia foi utilizada para quantificar o RNA viral em amostras de plasma e sobrenadantes de cultura celular, através da técnica de bDNA, segundo as especificações do sistema VERSANT[®] Ensaio HIV-1 3.0 – Bayer. Este procedimento é utilizado para quantificação direta do vírus através da amplificação de um sinal pelas sondas ligadas ao RNA-HIV capturados, usando o System 340 bDNA Analyser BAYER.

O procedimento baseou-se na preparação de um precipitado viral, hibridação das sondas e na detecção da luminescência produzida.

Para a precipitação do vírus foram adicionados 50 µL de solução precipitante (partículas de poliestireno inerte em solução tamponada com azida sódica < 0,1% e outros preservantes) em 1 mL de plasma, nos tubo já identificados e mantidos no gelo até centrifugação. Centrifugou-se a 23500 g por 1 hora entre 2 e 8 ° C. Após centrifugação, o sobrenadante foi aspirado, deixando aproximadamente 20 µL no tubo. Esse precipitado foi então congelado a – 80°C por no mínimo 30 minutos. Os precipitados foram descongelados à temperatura ambiente por 5 minutos e 120 µL do reagente de trabalho de lise (solução de proteinase K com azida sódica < 0,1% e outros preservantes) foram adicionados em cada tubo, os quais foram agitados no vórtex por 5 a 10 segundos. Em seguida, os tubos foram colocados no banho seco à 63°C durante 2 horas.

Decorrido este tempo, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente por 10 minutos. Transferiu-se 100 μ L de cada tubo para o respectivo micropoço na placa (composta por tiras contendo poços de captura), seguindo o diagrama de identificação pela ordem e nome do indivíduo. As sondas de captura e sondas alvo presentes na placa são oligonucleotídeos sintéticos em solução tamponada com azida sódica < 0,1%. Com o luminômetro preparado, as reações foram incubadas por 16 - 18 horas.

Em seguida, iniciou-se o processo de lavagem automática pelo instrumento, onde foram utilizadas soluções A e B. Na sequência foram realizadas duas incubações, com duração de 30 minutos cada uma, utilizando 100 μ L do reagente do pré-amplificador e 100 μ L do reagente de amplificação, intercaladas por ciclos de resfriamento e lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 μ L do reagente de trabalho de marcação (oligonucleotídeos sintéticos marcados com enzimas) e incubados por 45 minutos. Após outro ciclo de lavagem, foram adicionados 80 μ L do reagente com substrato (substrato quimioluminescente – Lumi-PhosPlus) e uma incubação de 30 minutos foi feita novamente. Decorrido este tempo, a leitura das amostras foi realizada, sendo que a calibração do teste foi feita utilizando 6 amostras controle com valores diferentes e conhecidos de carga viral.

5.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As avaliações de associações entre duas das variáveis categóricas: Grupos de estudo (Controle, HIV, TB e HIV/TB), CD32, CD16 e Carga Viral, foram realizadas pelo teste do quiquadrado ou pelo teste exato de Fisher. As comparações entre duas variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste Mann-Whitney enquanto que, para mais de duas variáveis quantitativas, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, complementado, quando significativo, por comparações múltiplas pelo teste de Dunn. Para quantificar correlações entre variáveis quantitativas empregou-se o coeficiente Spearman, com a sua significância determinada pelo teste de Student. Em todos os procedimentos estatísticos adotou-se o nível de significância de 5% para a tomada de decisão.

6. RESULTADOS

6.1. MEDIDA DO BURST OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA DEPENDENTE DE LUMINOL

Para a realização da medida do *burst* oxidativo dos neutrófilos por quimioluminescência (QL) foi necessária a separação celular desta linhagem a partir das amostras de sangue total dos voluntários. Os neutrófilos foram obtidos utilizando dois gradientes de densidades diferentes: Histopaque 1077 e Histopaque 1119, conforme ilustra a Figura 6 (item 5.3.1. - Casuística e Métodos).

A qualidade da suspensão celular foi avaliada pela citocentrifugação em cytopspin (Figura 10).

A citocentrifugação comprovou que a separação celular foi eficaz, apresentando valores maiores ou iguais a 99% de neutrófilos da população de células separadas.

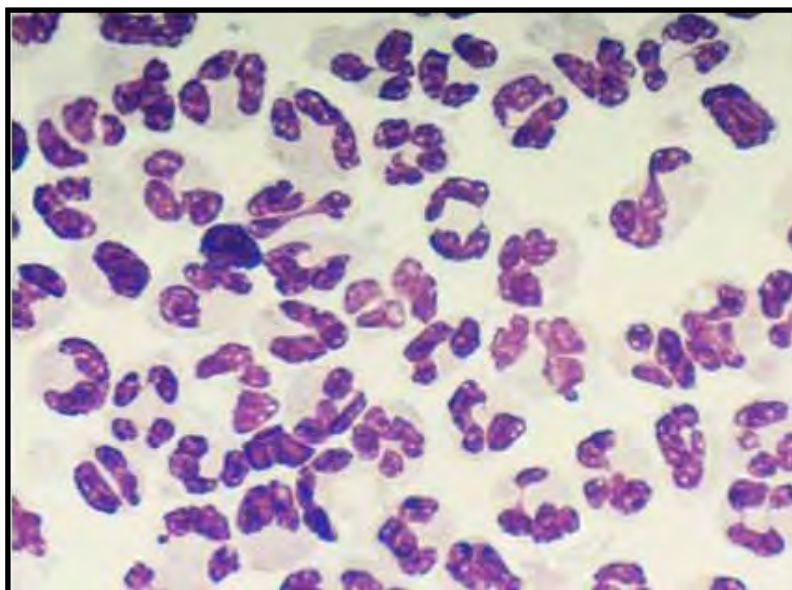


Figura 10: População de neutrófilos obtida a partir de dois gradientes de densidades diferentes: Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich®) e Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich®). Lâmina preparada por citocentrifugação (cytopspin). Coloração de Leishman (microscopia de luz com aumento de 100x).

O teste de viabilidade celular das amostras, após a separação, foi realizado como controle da integridade da membrana celular de neutrófilos, reduzindo a interferência da morte celular sobre os procedimentos de avaliação funcional pelo *burst* oxidativo. Conforme mostra a Figura 11, 99 % dos neutrófilos apresentavam-se

viáveis. Sendo assim, a técnica de separação celular por Histopaque nos ofereceu ótima viabilidade celular para que a próxima etapa da metodologia fosse desenvolvida.

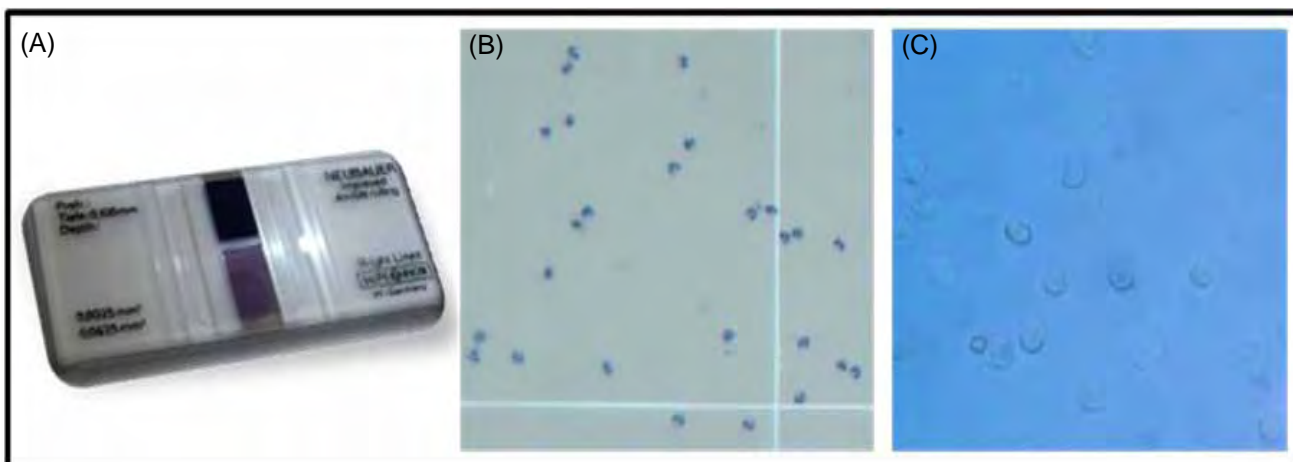


Figura 11: Câmara de Neubauer (A), onde foram realizadas a contagem dos neutrófilos (B) e o teste de viabilidade celular pela exclusão do corante Azul de Trypan 0,1 %, mostrando células não coradas, ou seja, viáveis (C).

O *burst* oxidativo dos neutrófilos foi avaliado através da reação quimioluminescente dependente do luminol, onde a quantidade de células utilizadas para o procedimento foi de 1×10^6 células/mL. As células foram estimuladas com 100 μ L de zymosan opsonizado que resultou em uma concentração final de 7,0 mg/mL de reação. Foram realizadas duplicatas de cada amostra para um controle interno. E como controle negativo (*background*) os mesmos componentes foram adicionados a cada cubeta com exceção ao estímulo.

Os resultados que seguem são apresentados independentemente do tipo de polimorfismo para $Fc\gamma RIIa$ e $Fc\gamma RIIIb$ que estes voluntários apresentam.

A Figura 12 mostra a representação da cinética da quimioluminescência do *burst* oxidativo dos neutrófilos de quatro indivíduos, um de cada grupo de estudo. Através destes quatro exemplos é possível observar a diferença entre as respostas, a um mesmo estímulo, de cada indivíduo, de acordo com a infecção que este apresenta ou não. O indivíduo do grupo TB, infectado por tuberculose ativa, e aquele que apresenta a co-infecção mostraram um valor de quimioluminescência menor comparado aos indivíduos dos grupos HIV e Controle, indicando uma deficiência do *burst* oxidativo dos neutrófilos na presença da infecção pela micobactéria.

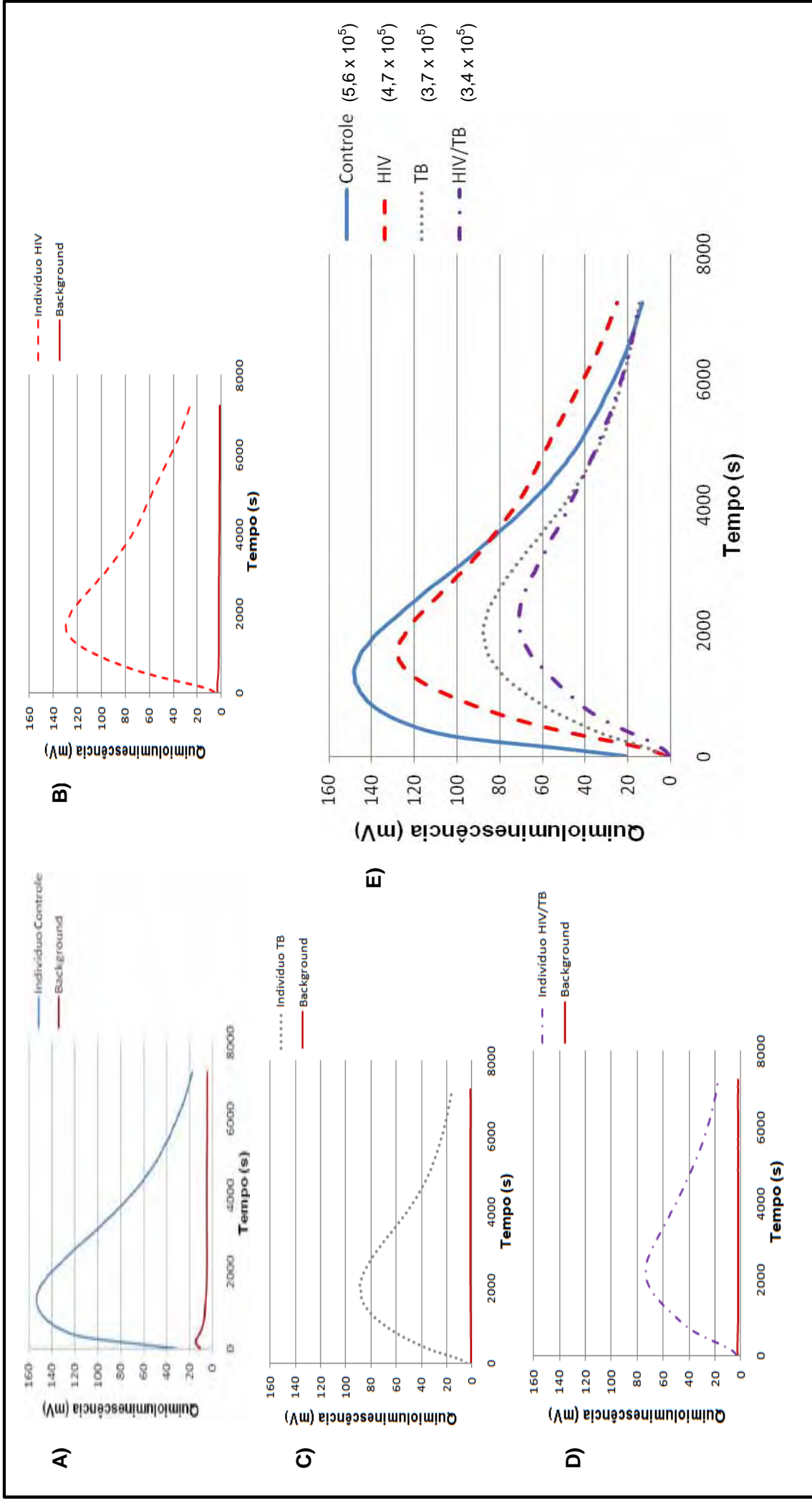


Figura 12: Cinética representativa da emissão de luz e seus backgrounds (controle negativo) de um indivíduo de cada grupo de estudo. A) Indivíduo Controle; B) Indivíduo HIV; C) Indivíduo TB; D) Indivíduo HIV/TB; E) Comparação entre a integral das cinéticas (área sob a curva do perfil de QL-mV) apresentadas pelos quatro indivíduos, onde Integral = Amostra - Background.

Na Tabela 2 estão detalhadas as estatísticas descritivas (mediana, valores mínimo e máximo) do *burst* oxidativo dos neutrófilos de cada grupo avaliado. Para detalhar a análise dos casos em que o teste de Kruskal-Wallis apontou diferença significativa ($p < 0,05$), aplicou-se o teste de comparações múltiplas não paramétricas de Dunn, com os resultados resumidos na mesma tabela.

Tabela 2: Análise estatística descritiva do *burst* oxidativo de cada grupo de estudo

Grupo	Nº	Burst oxidativo	p*
		mediana (mínimo; máximo) (mV)	
Controle	25	517013 (283008; 851948)	b
HIV	20	471770 (329915; 783460)	ab
TB	24	393322 (239296; 672499)	a
HIV/TB	7	356322 (261836; 430302)	a

* Valor p do teste de Kruskal-Wallis (significativo se $p < 0,05$ - medianas com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Dunn). Nº: Número de indivíduos.

Como mostra a Tabela 2 e a Figura 13, o grupo Controle apresentou valores mais elevados de *burst* oxidativo, enquanto o grupo HIV apresentou um valor não significativo em relação aos grupos Controle, TB e HIV/TB ($p > 0,05$). Entretanto, os grupos TB e HIV/TB foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), sendo que o grupo HIV/TB apresentou a menor estimulação do *burst* oxidativo pelo zymosan chegando a 31 % de redução em relação ao Controle. Enquanto que os grupos HIV e TB apresentaram diminuição de 8,7 % e 23,9 %, respectivamente, em relação aos valores do *burst* oxidativo resultante do grupo de indivíduos saudáveis.

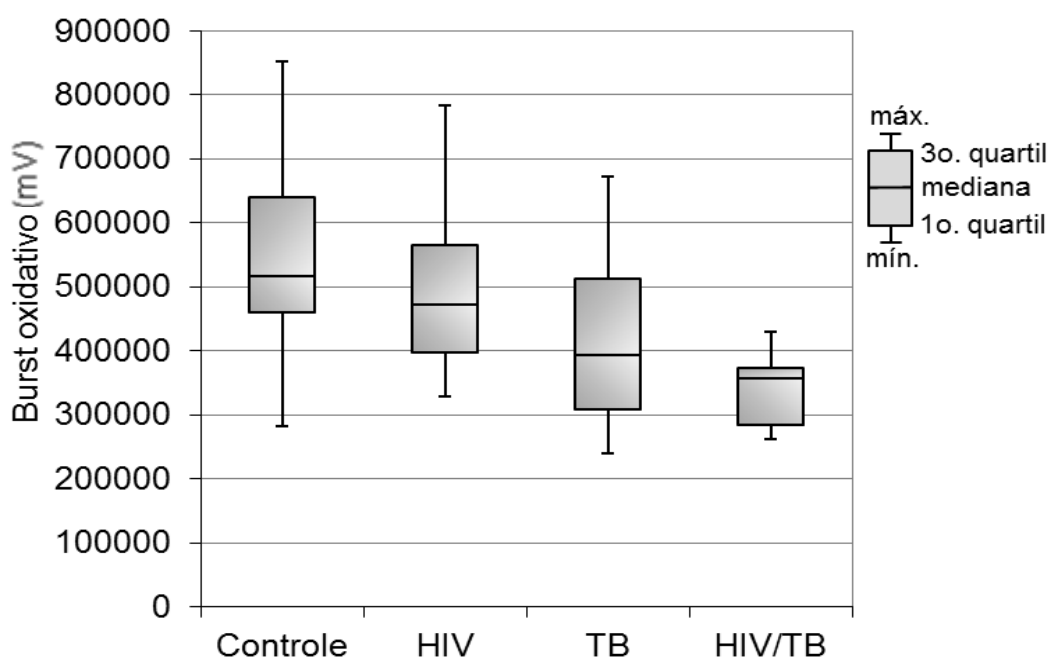


Figura 13: Estatísticas descritivas do *burst* oxidativo (integral da área sob a curva – mV) em relação aos grupos.

6.2. CARACTERIZAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A verificação da qualidade das amostras de DNA extraídas do sangue dos voluntários foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE pH 8,3, onde as amostras foram diluídas 50 vezes.

A Figura 14 representa a eletroforese das amostras de DNA extraídas de alguns dos indivíduos voluntários. O padrão de pares de bases (*Low DNA Mass Ladder* – Invitrogen ou *GeneRuler™ 50 pb DNA Ladder* - Fermentas) utilizado nos permitiu determinar a concentração de DNA presente em cada amostra. As diferentes intensidades de cor entre as bandas devem-se as diferentes concentrações de DNA presente em cada amostra (de acordo com a tabela trazida na bula do reagente oferecida pelo fabricante). E após a análise das bandas visualizadas no gel de agarose, foi concluído que as amostras de DNA apresentavam qualidade e integridade adequadas para serem utilizadas nas etapas seguintes.

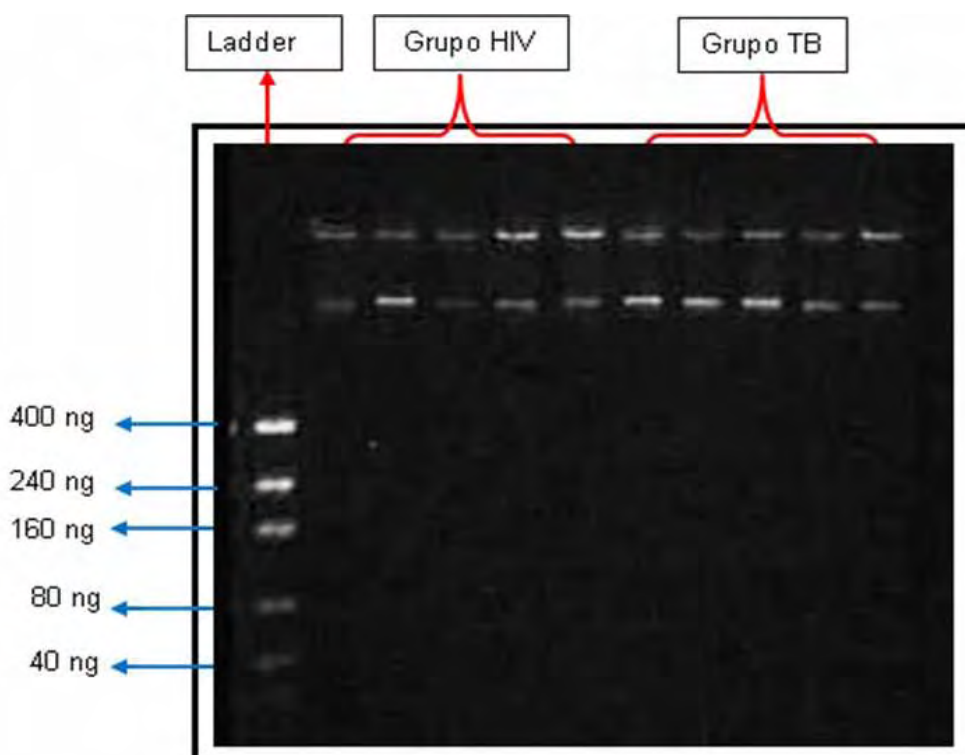


Figura 14: Fotodocumentação do gel de eletroforese para a avaliação qualitativa das amostras de DNA extraídas pelo método de *salting out*. Representação do perfil eletroforético das amostras de DNA de cinco indivíduos voluntários do grupo HIV e cinco indivíduos do grupo TB.

6.3. ALOTIPAGEM DOS Fc γ R

A padronização da técnica de amplificação do DNA por PCR, para a identificação do genótipo para o Fc γ RIIa, foi realizada previamente utilizando os oligo-iniciadores já citados anteriormente.

Os fragmentos amplificados para as formas alélicas Fc γ RIIA-H131 e Fc γ RIIA-R131 apresentavam 210 pb (Figura 15).

A fotodocumentação nos permitiu analisar o perfil eletroforético desses produtos da PCR, tanto para o alelo H-131 quanto para R-131. Através da fotodocumentação do gel de agarose 1,5% foi possível observar bandas contendo 210 pb. Na Figura 15 cada poço apresenta a amostra de um indivíduo a qual foi posteriormente sequenciada para a avaliação do seu genótipo, ou seja, a determinação do polimorfismo do Fc γ RIIa.

O ultimo poço, sem amostra de DNA, representa o controle de reação, e este não apresentou nenhuma amplificação, assim, podemos concluir que os reagentes utilizados nos procedimentos estavam isentos de qualquer contaminação com DNA.

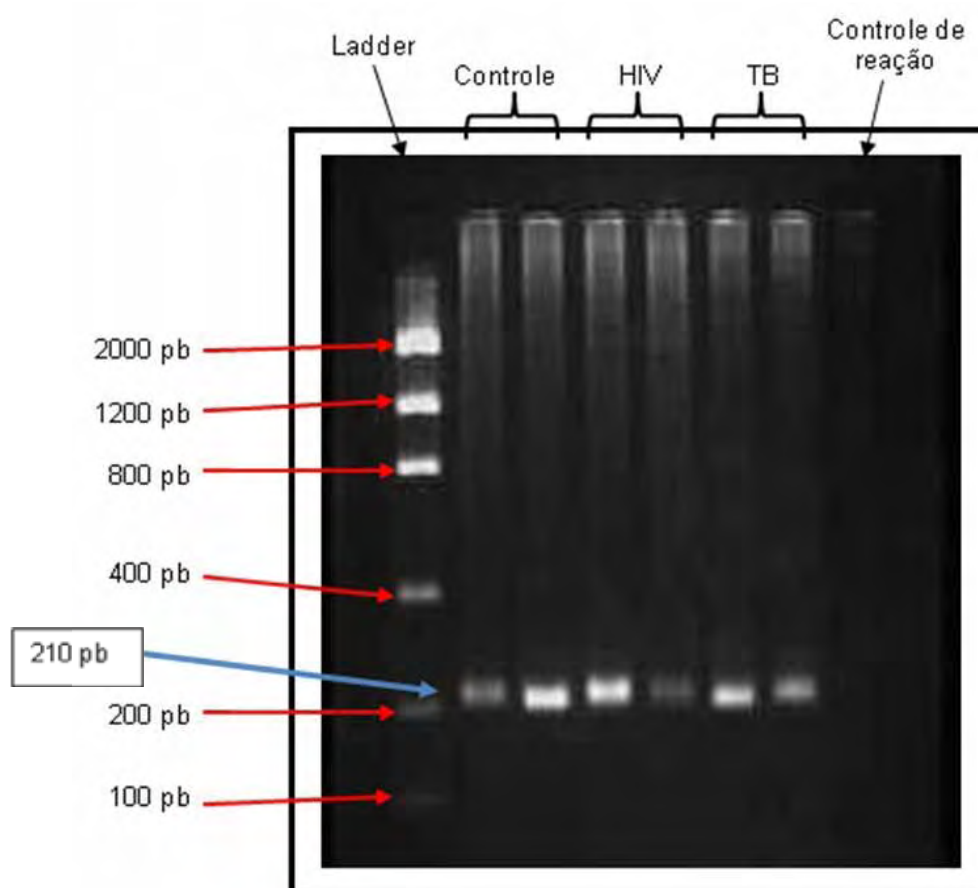


Figura 15: Perfil eletroforético representativo dos produtos da PCR para CD32 ($Fc\gamma RIIa$). Amostras de dois indivíduos do grupo Controle (saudáveis), dois indivíduos do grupo HIV e dois indivíduos do grupo TB apresentadas pela fotodocumentação do gel de agarose 1,5% em TBE pH 8,3. No primeiro poço do gel observa-se a marcação do padrão de pares de bases (pb) que nos orienta quanto ao tamanho do fragmento amplificado pela PCR (210 pb). O ultimo poço, sem DNA, representa o controle de reação.

Para a identificação do genótipo do receptor $Fc\gamma RIIIb$, também foi realizada previamente a padronização da técnica de amplificação do DNA por PCR, utilizando os oligo-iniciadores citados anteriormente.

Os produtos amplificados apresentaram 254 pb. A Figura 16 apresenta a análise dos produtos da PCR, tanto para o alelo NA1 quanto para NA2, de alguns voluntários. Cada poço apresenta a amostra de um indivíduo a qual foi

posteriormente sequenciada para a avaliação do seu genótipo, ou seja, para a determinação do polimorfismo para o Fc γ RIIIb.

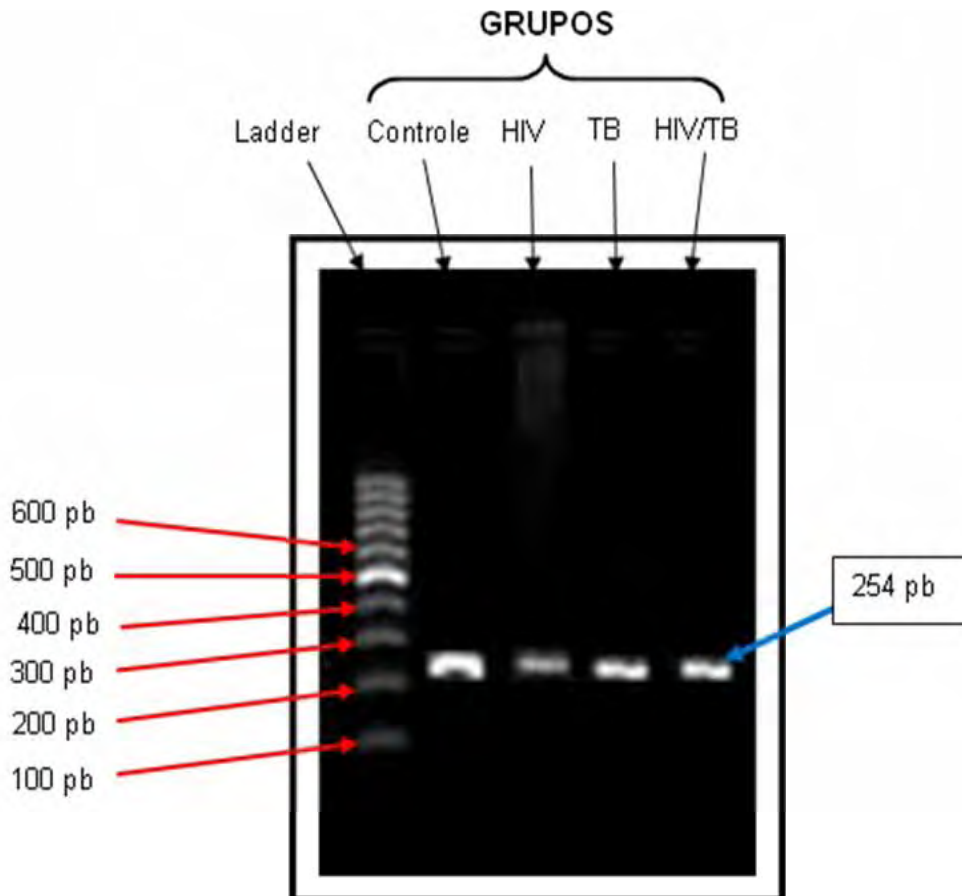


Figura 16: Perfil eletroforético dos produtos da PCR para CD16 (Fc γ RIIIb). Representação das amostras, de um indivíduo de cada grupo de estudo, em gel de agarose 1,5% em TBE pH 8,3. No primeiro poço do gel observa-se a marcação do padrão de pares de bases (pb) que nos orienta quanto ao tamanho do fragmento amplificado pela PCR (entre 200 e 300 pb).

6.4. SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS

Para que fosse possível a realização da reação de sequenciamento para a genotipagem tanto das formas alélicas do Fc γ RIIA - H/R131 quanto para Fc γ RIIIB - NA1/NA2, foi necessário quantificar e avaliar a qualidade do DNA de cada amostra após a purificação do produto da PCR. Para isso, foi feita uma eletroforese em gel

de agarose 1,0%, onde cada amostra pôde ser verificada quanto a sua qualidade (Figura 17).

A quantificação do DNA de cada amostra foi realizada através da leitura em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop). A Figura 18 representa a quantificação da amostra de um indivíduo do grupo HIV, onde foi possível observar o pico máximo de absorbância (2,667) da amostra lida a 260 nm. Sabendo que a leitura do DNA de dupla fita numa densidade ótica de 260 nm correspondente a 50 µg/mL, através do pico máximo de absorbância foi possível calcular a quantidade de DNA da amostra (no caso, 133,4 ng/µL). A leitura também nos permitiu avaliar a pureza da amostra, 1,92, demonstrando estar livre de proteínas. Valores acima de 1,8 foram considerados adequados para a realização do sequenciamento.

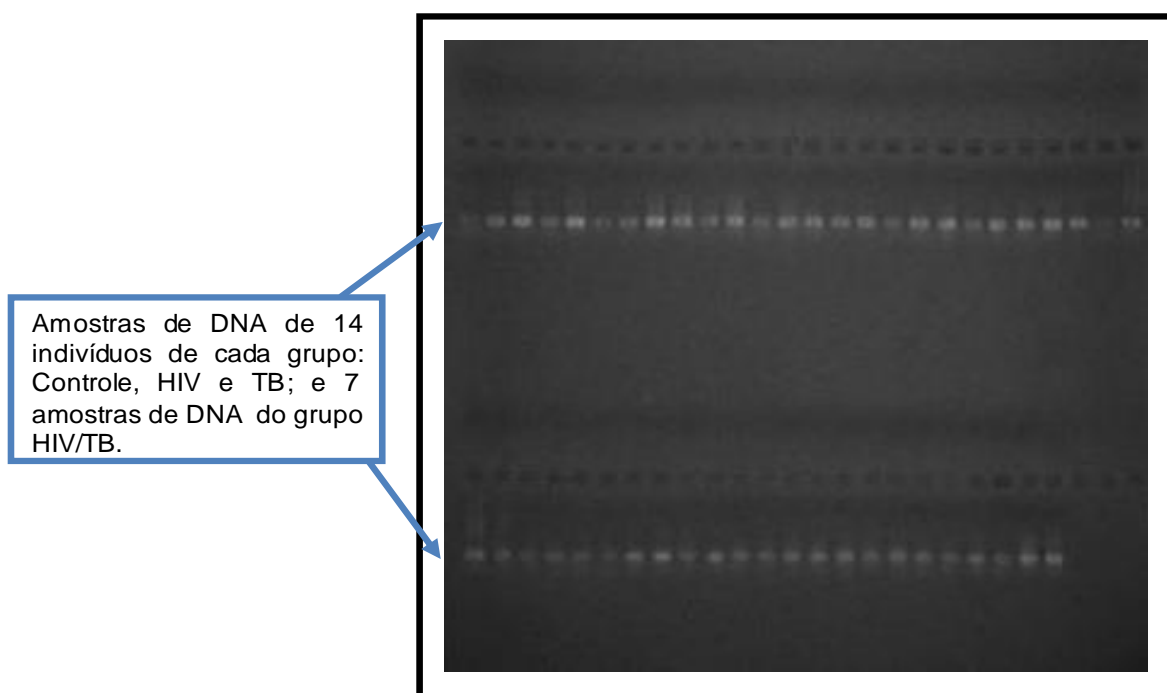


Figura 17: Determinação da qualidade do DNA das amostras de vários indivíduos que compõem os grupos de estudo. Fotodocumentação da eletroforese em gel de agarose 1,0%.

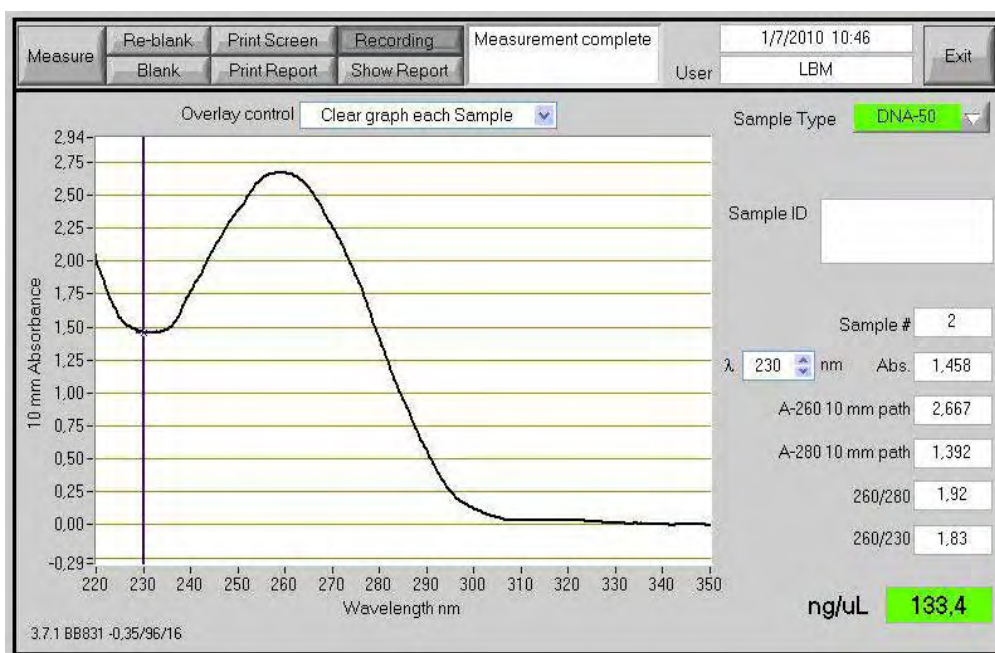


Figura 18: Quantificação do DNA da amostra de um dos indivíduos que compõe o grupo HIV.

A genotipagem de cada indivíduo quanto aos receptores CD16 e CD32 e seus diferentes alótipos estão especificados nas Tabelas 11,12,13 e 14 no Anexo 1. Devido aos valores baixos de purificação de DNA apresentados por algumas amostras, não foi possível a determinação dos diferentes genótipos, para estes receptores, de todos os indivíduos dos grupos de estudo. Para estes casos, a reação de sequenciamento não foi realizada e na tentativa de realizar a leitura, o resultado não se apresentou fidedigno.

Setenta e seis indivíduos participaram do estudo; dos 25 indivíduos pertencentes ao grupo Controle, 18 foram genotipados para FcγRIIIa (CD32) e 19 para FcγRIIIb (CD16). Dos 20 indivíduos pertencentes ao grupo HIV, 14 foram genotipados para FcγRIIIa (CD32) e 11 para FcγRIIIb (CD16). De 24 indivíduos que pertenceram ao grupo TB, 12 foram genotipados para FcγRIIIa (CD32) e 9 para FcγRIIIb (CD16). Apenas 7 indivíduos constituíram o grupo HIV/TB. Esse número reduzido de amostras reporta a baixa incidência desses indivíduos diagnosticados com a co-infecção mesmo em centros regionais de referência e especializados no tratamento dessas infecções. Desses 7, 5 indivíduos foram genotipados para FcγRIIIa (CD32) e nenhum para CD16.

As Tabela 3 e 4 mostram as distribuições de frequências relativas e absolutas dos genótipos para CD32 e CD16, respectivamente, de acordo com cada grupo de estudo.

Não foi possível analisar as combinações entre os genótipos, pois nem todos os indivíduos tiveram a genotipagem para os dois receptores (CD32 e CD16) realizada. Este detalhe pode ser observado no Anexo 1, que detalha os resultados do sequenciamento de cada indivíduo, para os dois receptores.

Tabela 3: Distribuição das frequências relativas e absolutas do genótipo para CD32 nos grupos estudados

Grupo	Nº	CD32	
		RR (%)	HR (%)
Controle	18	16 (89)	2 (11)
HIV	14	10 (71)	4 (29)
TB	12	12 (100)	0 (0)
HIV/TB	5	5 (100)	0 (0)
TOTAL	49	43 (88)	6 (12)

Nº: número de indivíduos.

Tabela 4: Distribuição das frequências relativas e absolutas do genótipo para CD16 nos grupos estudados

Grupo	Nº	CD16		
		NA1NA1 (%)	NA1NA2 (%)	NA2NA2 (%)
Controle	19	9 (47)	7 (37)	3 (16)
HIV	11	5 (45)	2 (18)	4 (36)
TB	9	2 (22)	2 (22)	5 (56)
TOTAL	39	16 (41)	11 (28)	12 (31)

Nº: Número de indivíduos

Dos 49 indivíduos genotipados para o CD32, 43 (88 %) apresentaram genótipo RR e apenas 6 (12 %) apresentaram HR (Tabela 3). Nenhum indivíduo com genótipo HH foi observado na população estudada. Enquanto que para o CD16, dos 39 indivíduos estudados, a frequência de homozigose para NA1 foi de 41 % (16 indivíduos), seguida de 28 % (11 indivíduos) de homozigose para NA2 e 31 % (12 indivíduos) para heterozigose (Tabela 4).

A Tabela 5 mostra primeiramente as análises estatísticas descritivas referentes as formas alélicas $Fc\gamma RIIA-H131$ e $Fc\gamma RIIA-R131$ que resultam nas variantes: H131 e R131 (CD32) em relação ao *burst* oxidativo de cada grupo de estudo. Em seguida, estão apresentadas as análises referentes as formas alélicas $Fc\gamma RIIB-NA1$ e $Fc\gamma RIIB-NA2$ que resultam nas variantes polimórficas NA1 e NA2 (CD16) em relação ao *burst* apresentado pelos grupos de estudo.

Considerando os grupos de estudo e o genótipo para CD32, o grupo Controle também apresentou valores maiores de *burst* oxidativo, mas a única diferença significativa foi entre os indivíduos do grupo Controle que apresentaram o alótipo HR e do grupo HIV/TB que apresentaram o alótipo RR. O teste de Kruskal-Wallis somente não identificou diferença significativa ($p > 0,05$), quanto ao *burst*, entre cruzamentos de grupo e alelos do genótipo para CD16. Para detalhar a análise dos casos em que o teste de Kruskal-Wallis apontou diferença significativa ($p < 0,05$), aplicou-se o teste de comparações múltiplas não paramétricas de Dunn.

A partir destes resultados foi possível determinar que o polimorfismo dos receptores CD32 e CD16 não tem relação com o aumento e diminuição do *burst* oxidativo dos neutrófilos, quando a fagocitose e estimulação do metabolismo oxidativo ocorre via receptor de complemento e não via $Fc\gamma R$.

Tabela 5: Análise estatística descritiva do *burst* oxidativo de cada grupo de estudo em relação ao genótipo dos receptores

Grupo	Genótipo	Nº	Burst oxidativo		p*	
			mediana (mínimo; máximo) (mV)			
CD32						
Controle	RR	16	510767 (289719; 773345)		ab	0,018
	HR	2	506025 (445959; 566091)		b	
HIV	RR	10	471770 (332877; 783460)		ab	
	HR	4	455318 (329915; 555802)		ab	
TB	RR	12	393322 (239296; 570000)		ab	
HIV/TB	RR	5	290847 (261836; 430302)		a	
CD16						
Controle	NA1NA1	9	532034 (289719; 851948)		a	0,279
	NA1NA2	7	664068 (459866; 773345)		a	
	NA2NA2	3	445959 (283008; 522786)		a	
HIV	NA1NA1	5	405688 (344781; 595005)		a	
	NA1NA2	2	487136 (382742; 591530)		a	
	NA2NA2	4	516394 (468410; 555802)		a	
TB	NA1NA1	2	444607 (379214; 510000)		a	
	NA1NA2	2	455898 (239296; 672499)		a	
	NA2NA2	5	358690 (242760; 590000)		a	

* Valor p do teste de Kruskal-Wallis (significativo se $p < 0,05$ - medianas com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Dunn). Nº: Número de indivíduos.

6.5. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

Cada sequência resultante do sequenciamento de cada indivíduo foi alinhada de acordo com a sequência conhecida correspondente ao receptor.

Para tanto, foram utilizados programas oferecidos pelo NCBI, onde é possível fazer o alinhamento de duas ou mais sequências utilizando o BLAST.

A sequência de DNA apresentada na Figura 19, referente a um indivíduo do grupo Controle, apresentou uma guanosina (G) na posição polimórfica, o que significa que o indivíduo é homozigoto para o alótipo R, no que se refere ao FcγRIIa.

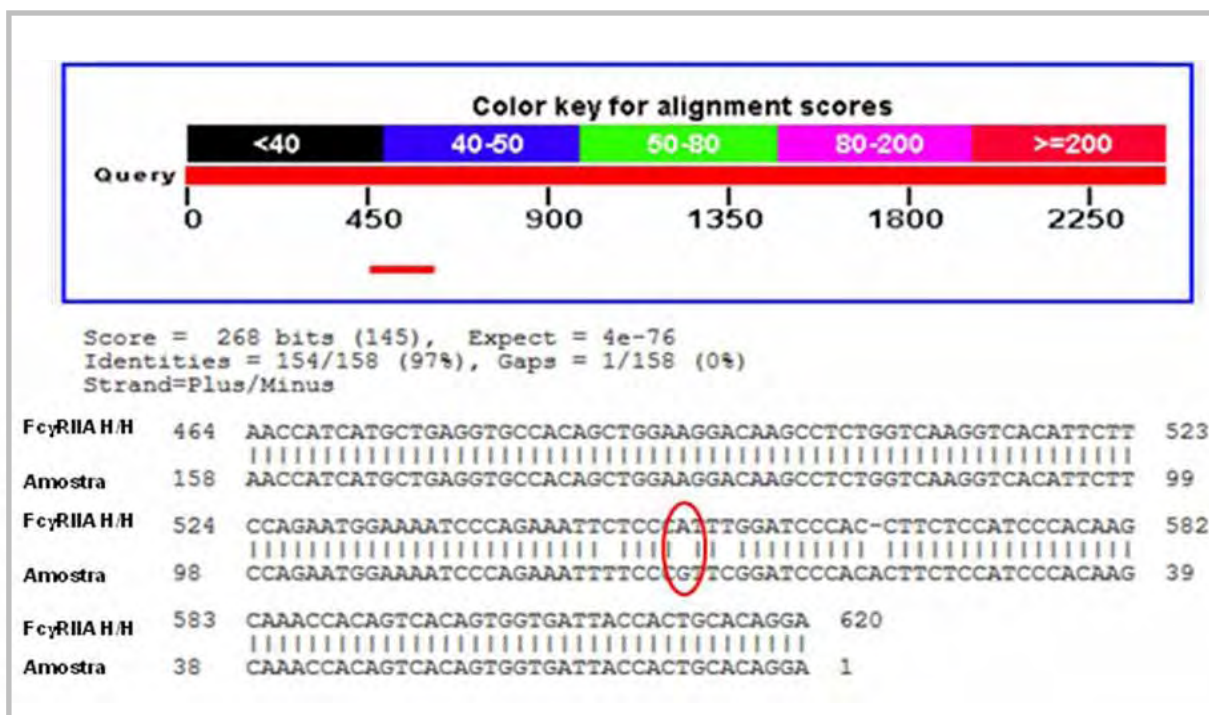


Figura 19: Alinhamento da sequência de DNA resultante do sequenciamento para CD32 (H/R) de um indivíduo do grupo Controle. A sequência dada pelo GenBank para este receptor corresponde ao alótipo HH (A=H). O círculo em vermelho corresponde ao ponto de polimorfismo.

Para o CD16, devido ao grande número de pontos polimórficos encontrados na sequência (posições 141, 147, 227, 277 e 349), após o alinhamento, foi feita a tradução do DNA através do programa *Translate a DNA Sequence* para que fosse possível a determinação dos alelos NA1/NA2 através da análise dos aminoácidos correspondentes a cada posição polimórfica.

A Figura 20 mostra a tradução do fragmento de DNA resultante do sequenciamento da amostra de um indivíduo do grupo Controle. A partir da análise dos resíduos de aminoácidos preditos correspondentes a cada posição polimórfica foi possível determinar o genótipo do indivíduo para o FcγRIIIb, no caso, NA1NA1 (Arginina - Leucina - Asparagina - Alanina - Ácido Aspártico).

The screenshot shows a web-based DNA translation tool. At the top, a text area contains the DNA sequence:


```

    1 GTACAGGGTGCTCGAGAAGGACAGTGTGACTCTGAAGTGCCAGGGAGCCTACTCCCCTGA
    61 GGACAATTCCACACAGTGGTTTCACAATGAGAACCTCATCTCAAGCCAGGCCTCGAGCTA
    121 CTTCAATTGACGCTGCCACAGTCGACGACAGTGGAG
    
```

 Below the text area are three buttons: "Translate DNA", "Clear DNA", and "Get Demo DNA". A yellow status bar indicates "Input DNA is 155 bp in length". The interface has two tabs: "Graphic Output" (selected) and "Text Output". Under "Graphic Output", there are dropdown menus for "Forward frame 2", "Three letter codes", "Amino acids and DNA", and "60 chars/line". The main display area shows the translated amino acid sequence:


```

    Forward Frame 2:
    1 TyrArgValLeuGluLysAspSerValThrLeuLysCysGlnGlyAlaTyrSerProGlu
    2 TACAGGGTGCTCGAGAAGGACAGTGTGACTCTGAAGTGCCAGGGAGCCTACTCCCCTGAG
    21 AspAsnSerThrGlnTrpPheHisAsnGlnAsnLeuIleSerSerGlnAlaSerSerTyr
    62 GACAATTCCACACAGTGGTTTCACAATGAGAACCTCATCTCAAGCCAGGCCTCGAGCTAC
    41 PheIleAspAlaAlaThrValAspAspSerGly
    122 TTCATTGACGCTGCCACAGTCGACGACAGTGGAG
    
```

 The amino acids Arg, Val, Leu, and Asn in the first line are circled in red.

Figura 20: Análise da sequência predita de resíduos de aminoácidos a partir do sequenciamento dos produtos de PCR de uma amostra do grupo Controle com genótipo NA1NA1 de FcγRIIIb.

6.6. IMUNOFENOTIPAGEM CD3+/CD4+/CD8+ E CARGA VIRAL RNA-HIV

Os valores referentes à imunofenotipagem por citometria de fluxo e a determinação da carga viral de cada indivíduo dos grupos HIV e HIV/TB estão especificados nas tabelas de resultados no Anexo 1. A sensibilidade para o teste de

carga viral foi de até 50 cópias/mL de sangue (limite de detecção). Valores abaixo do nível de detecção foram denominados “Limite”.

A Tabela 6 mostra os valores obtidos nos grupos HIV e HIV/TB de indivíduos dentro da classificação de carga viral. Não houve evidência de associação significativa entre as variáveis em análise, no entanto, pode ter havido influência do pequeno número de indivíduos no grupo HIV/TB.

Tabela 6: Distribuição das frequências relativas e absolutas da carga viral de acordo com o grupo

Grupo	Nº	Carga viral		p*
		Limite (%)	D (%)	
HIV	20	12 (60)	8 (40)	0,077
HIV/TB	7	1 (14)	6 (86)	

* Valor p do teste de Fisher (associação não significativa se $p > 0,05$);
D: Detectável. Nº: Número de indivíduos.

A Tabela 7 apresenta a análise estatística descritiva detalhada do *burst* oxidativo dos grupos HIV e HIV/TB em relação aos valores da carga viral.

Em relação à carga viral, foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) somente em relação aos indivíduos do grupo HIV com carga viral detectável e os indivíduos do grupo HIV/TB com carga viral detectável. Somente um indivíduo com HIV/TB foi identificado com carga viral limite, impedindo a realização de uma análise estatística (Tabela 7). Apesar destes resultados de significância, observamos que os valores de carga viral não têm relação com os valores do *burst* oxidativo, pois a carga viral de ambos os grupos é Detectável, porém os valores do *burst* são discrepantes, ou seja, ocorre diminuição do *burst* respiratório na presença da infecção por *M. tuberculosis*.

Tabela 7: Análise estatística descritiva do *burst* oxidativo os grupos HIV e HIV/TB em relação à carga viral

Grupo	Carga viral (cópias/mL)	Nº	Burst oxidativo		p*
			mediana (mínimo; máximo) (mV)		
HIV	Limite	8	417341 (329915; 536985)		ab
	Detectável	12	541848 (332877; 783460)		b
HIV/TB	Limite	1	261836 (261836; 261836)		-
	Detectável	6	364540 (276852; 430302)		a

* Valor p do teste de Kruskal-Wallis (significativo se $p < 0,05$ - medianas com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Dunn). Nº: Número de indivíduos.

Para detalhar a análise dos casos em que o teste de Kruskal-Wallis apontou diferença significativa ($p < 0,05$), aplicou-se o teste de comparações múltiplas não paramétricas de Dunn.

A Tabela 8 apresenta as análises estatísticas descritivas das contagens de CD4+ e CD8+ obtidas de indivíduos dos grupos HIV e HIV/TB. O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa ente esses dois grupos, tanto em relação ao CD4+ como ao CD8+.

A Figura 21 mostra as medianas, valores máximo e mínimo da contagem de células CD4+ e CD8+ dos grupos HIV e HIV/TB.

Tabela 8: Estatísticas descritivas de contagens de células CD4+ e CD8+ de acordo com o grupo

Grupo	Nº	CD4+ (cél/mm ³)		p*	CD8+ (cél/mm ³)	
		Mediana (mínimo; máximo)			Mediana (mínimo; máximo)	
HIV	20	549 (316; 1220)		<0,001	1046 (597; 2205)	
HIV/TB	7	34 (4; 345)			617 (191; 1032)	

* Valor p do teste de Mann-Whitney (as duas medianas são significativamente diferentes se $p < 0,05$).

Nº: Número de indivíduos.

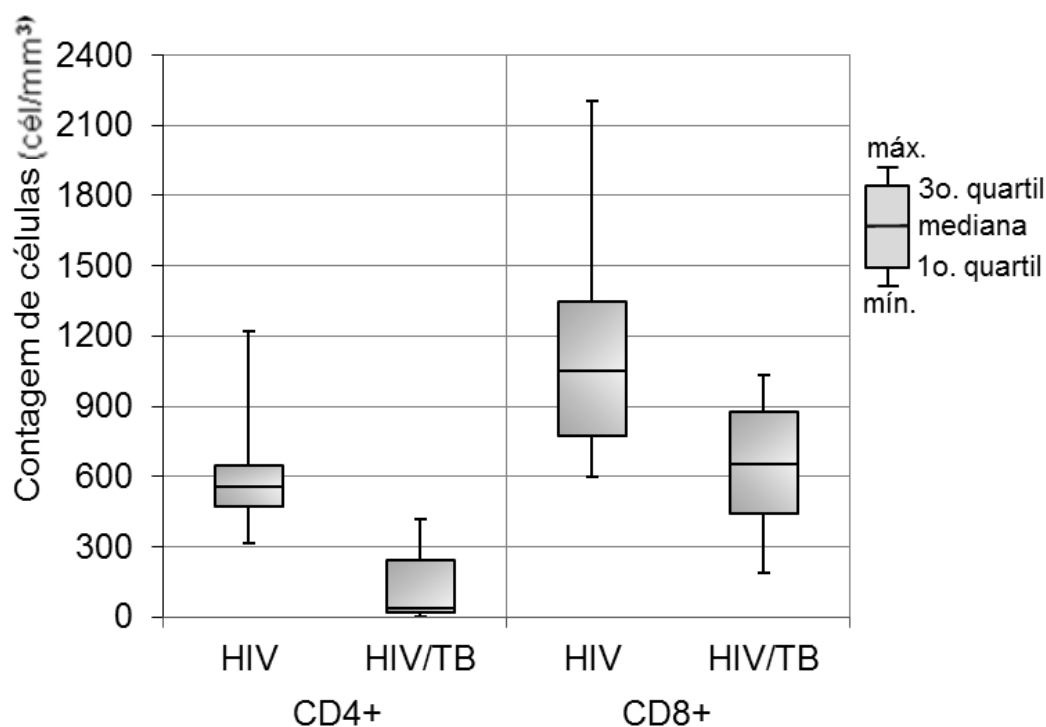


Figura 21: Estatísticas descritivas de contagens de células CD4+ e CD8+ em relação aos grupos HIV e HIV/TB.

Através destes resultados foi possível observar uma maior deficiência imunológica, no que diz respeito a imunidade celular, quando a infecção por TB está presente. Foi detectada maior diminuição tanto no número de células CD4+ quanto no número de células CD8+ no grupo de indivíduos infectados por *M. tuberculosis* em relação aos indivíduos infectados apenas por HIV, apontando mais um fator importante no aumento da suscetibilidade imunológica desses indivíduos.

Os coeficientes de correlação de Spearman entre os valores do *burst* oxidativo e as contagens tanto de células CD4+ como de células CD8+ dentro dos grupos de indivíduos HIV e HIV/TB não foram significativos pelo teste t de Student. Entretanto, não isolando os dois grupos de indivíduos, o coeficiente de correlação entre *burst* oxidativo e CD4+ é significativo e igual a 0,533, um grau não muito acentuado.

A Tabela 9 mostra a distribuição de frequências absolutas e percentuais para o genótipo CD32 dos grupos HIV e HIV/TB em relação aos níveis detectáveis ou Limite de carga viral. Não houve diferença significativa entre as variáveis. E o fato do grupo HIV/TB apresentar apenas um indivíduo com carga viral Limite impediu que fosse feito qualquer análise estatística.

Tabela 9: Distribuição de valores relativos e absolutos para o genótipo CD32 entre os grupos HIV e HIV/TB em relação aos níveis detectáveis ou Limite de carga viral

Grupo	Nº	Carga viral (cópias/mL)	CD32		p*
			RR (%)	HR (%)	
HIV	8	Limite	5(63)	3 (38)	0,580
	6	Detectável	5 (83)	1 (17)	
HIV/TB	1	Limite	1 (100)	0 (0)	-
	4	Detectável	4 (100)	0 (0)	

* Valor p do teste de Fisher (associação não significativa se $p > 0,05$).
Nº: Número de indivíduos.

A Tabela 10 apresenta a distribuição de valores relativos e absolutos para o genótipo CD16 do grupo HIV em relação aos níveis detectáveis ou Limite de carga viral. Também não foi encontrada diferença significativa entre as variáveis. Não foi possível realizar a genotipagem do grupo HIV/TB para este receptor, como descrito anteriormente.

Tabela 10: Distribuições de frequências absolutas e percentuais para o genótipo CD16 do grupo HIV em relação aos níveis detectáveis ou Limite de carga viral

Grupo	Carga viral (cópias/mL)	CD16			Total (%)	p
		NA1NA1 (%)	NA1NA2 (%)	NA2NA2 (%)		
HIV	Limite	3 (60)	2 (40)	2 (40)	5 (100)	0,758
	Detectável	2 (100)	0 (0)	2 (100)	2 (100)	

* Valor p do teste de Fisher (associação não significativa se $p > 0,05$)

7. DISCUSSÃO

A resposta imune inata envolve a elaboração de uma reação dirigida ao patógeno através de mecanismos de defesa essenciais, como as barreiras epiteliais (pele e mucosas), que impedem a entrada de microrganismos do ambiente externo, e a presença de células efectoras e proteínas plasmáticas, que podem ser rapidamente ativadas na presença desses microrganismos ou de substâncias produzidas na infecção, iniciando reações para sua eliminação através da fagocitose seguida de reparação do dano tecidual (PUKA et al., 2005).

Os neutrófilos são as células fagocíticas recrutadas mais precocemente, as quais migram do sangue para os tecidos (através de uma série de substâncias quimiotáticas para neutrófilos, as quais induzem o aumento do fluxo sanguíneo e a permeabilidade capilar, aumentando o número destas células rapidamente no sítio de infecção), com o objetivo de ingerir e destruir microrganismos (fagocitose) e evitar a infecção (VASSELON, DETMERS, 2002). A expressão de moléculas de adesão, (selectinas e integrinas) é responsável pela interação entre as células endoteliais dos capilares e os neutrófilos, promovendo a atração entre ambos (PUKA et al., 2005; SGARBI, DA SILVA JUNIOR, HUNGRIA NETO, 2006).

Sabe-se que componentes bacterianos estimulam diretamente o aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, contribuindo para o recrutamento de mais leucócitos para o foco da infecção (VASSELON, DETMERS, 2002).

Em mamíferos, a fagocitose de partículas estranhas é favorecida pela ligação das imunoglobulinas aos receptores para a porção Fc (FcR) nos fagócitos profissionais (neutrófilos e macrófagos). Após a internalização do patógeno ocorre a produção de EROs, bem como a liberação de enzimas lisossomais e de citocinas inflamatórias.

As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas por mecanismos dependentes de mieloperoxidase (MPO), liberada dos grânulos da célula, e por mecanismos independentes da MPO. Tal metabolismo oxidativo é mediado pela NADPH oxidase, um complexo enzimático, associado à membrana citoplasmática, que catalisa a redução de um elétron de oxigênio a $O_2^{\circ-}$ pela doação de elétrons à custa da NADPH (CHANOCKF et al., 1994; BABIOR, 1988)

O precursor destes oxidantes reativos é o $O_2^{\circ-}$. A maior parte deste radical produzido é convertido a H_2O_2 . Este pode ser neutralizado por peroxidases ou

catalase intracelulares, resultando na produção de H₂O e O₂. No entanto, a maior parte do H₂O₂ produzido pelos neutrófilos é convertido a HOCl pela ação da enzima MPO. Além disso, ocorre também a produção de •OH, ¹O₂, ONOO⁻, NO₂• (BABIOR, 1973; HAMPTON, 1998; SILVA, 2001).

Já se sabe que os neutrófilos desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e determinadas infecções fúngicas. Acredita-se que a diminuição da resposta de neutrófilos pode contribuir a um aumento da suscetibilidade a determinadas infecções e infecções secundárias, como pode ocorrer em indivíduos infectados pelo HIV-1, por exemplo. Estudos têm mostrado defeitos na quimiotaxia de neutrófilos e na morte bacteriana em determinados tipos de infecções (BANDRES et al., 1993; SHALEKOFF et al., 1998).

O luminol e a lucigenina tem sido muito utilizados como marcadores de estágios diferentes da produção de EROs (GASBARRINI et al., 1998; ALVEZ et al., 2003). Quando os neutrófilos são ativados, as EROs geradas podem converter, via oxigenação, estas sondas quimioluminescentes, a derivados intermediários instáveis e excitados, induzindo a emissão de luz na forma de fótons. Diversas EROs (oxigênio, peróxidos, ânion superóxido) podem oxidar derivados do luminol, onde a reação é catalisada pela MPO presente nos neutrófilos (ALVEZ et al., 2003).

Neste estudo, optamos pela utilização do luminol para a determinação do *burst* oxidativo de neutrófilos, pois ele registra a produção total de EROs, enquanto a lucigenina registra a produção de ânion superóxido refletindo apenas a atividade da NADPH oxidase na geração do *burst* oxidativo. Assim, foi possível avaliar as alterações do *burst* oxidativo de neutrófilos frente a determinadas infecções, no caso, indivíduos infectados pelo HIV, pelo *Mycobacterium tuberculosis* e durante a co-infecção HIV/*M. tuberculosis*.

Investigamos o efeito do *burst* oxidativo de neutrófilos frente a infecção com *M. tuberculosis* e HIV-1, ou com ambos, para apurar possíveis disfunções dessas células. Em seguida, fizemos a genotipagem para o polimorfismo dos receptores FcγRIIIa e FcγRIIIb, os quais fazem uma importante ligação entre as respostas imunes humoral e celular, participando ativamente da resposta inata, mediando respostas biológicas relacionadas com a eliminação do antígeno, a fim de avaliar uma possível relação com os resultados.

Shalekoff e seus colaboradores (1998) avaliaram grupos de estudo semelhantes, e mostraram que não existem diferenças significativas entre qualquer um dos grupos no percentual de granulócitos capazes de sofrer o estresse oxidativo. No entanto, a capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio foi consideravelmente diferente entre os grupos, mostrando diferenças significativas entre o grupo Controle e aquele composto de indivíduos infectados pelo HIV/TB ($p < 0,001$), entre o grupo Controle e o grupo composto por indivíduos infectados apenas pelo *M. Tuberculosis* ($p < 0,001$), o grupo HIV comparado ao grupo TB ($p < 0,05$) e entre o grupo HIV e o grupo composto por indivíduos co-infectados (HIV/TB) ($p < 0,05$). Essa relação não foi encontrada entre os grupos Controle e HIV ($p > 0,05$).

Esses dados reforçam nossos resultados, pois também demonstramos uma relação entre a diminuição da capacidade de produção de EROs pelos neutrófilos daqueles indivíduos que apresentavam a infecção pelo *M. tuberculosis*. A Tabela 2 e a Figura 13 expressam esses resultados, onde foi possível observar que o grupo Controle apresentou valores mais elevados de *burst* oxidativo, enquanto o grupo HIV apresentou um valor intermediário equivalente aos valores de todos os outros grupos. Enquanto que os grupos TB e HIV/TB apresentaram valores de *burst* equivalentes e significativamente menores quando comparados ao grupo Controle ($p < 0,002$).

O fato dos neutrófilos serem capazes de eliminar a micobactéria ainda é discutível. Segundo Cortés e colaboradores (2009), diversos autores que detectaram essa atividade metabólica não encontraram associação com o *burst* oxidativo. No entanto, devido a fagocitose eficiente e a subsequente produção de EROs serem mecanismos importantes para a morte de microrganismos pelos neutrófilos, defeitos em uma ou ambas dessas funções pode levar a deficiência da morte intracelular de patógenos, predispondo o indivíduo infectado por TB a outras infecções oportunistas; como mostram os resultados obtidos por Gomma e outros (2004) através da análise de células fagocíticas por citometria de fluxo durante a tuberculose pulmonar ativa.

A morte do *M. tuberculosis* por neutrófilos ocorre via mecanismos não oxidativos, como já havia sido relatado por Jones e colaboradores em 1990, quando utilizaram neutrófilos de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (CGD) (os

quais apresentam defeito na via NADPH oxidase e, portanto são incapazes de produzirem EROs) em combinação com o *M. tuberculosis*, para verificar se a morte da bactéria era ainda menos eficaz nessas células. Se as EROs estivessem envolvidas na morte da bactéria, a capacidade microbicida diminuiria nestas células defeituosas quando comparada a neutrófilos normais. No entanto, nenhuma evidência de diferença na viabilidade bacteriana foi observada, pelo contrário, os neutrófilos de indivíduos com CGD foram tão eficazes na morte da bactéria quanto neutrófilos normais; e em conjunto com outras análises, concluiu-se que a morte do *M. tuberculosis* ocorre através de mecanismos independentes de radicais livres. Estudos têm proposto que a morte dessas bactérias é reforçada por citocinas como *interferon gamma* (IFN- γ) e Interleucina-8 (IL-8), sugerindo que a deficiência do *burst* oxidativo não teria necessariamente algum impacto na capacidade do neutrófilo matar a micobactéria uma vez que esta foi internalizada (NIBBERING et al., 1993; SHALEKOFF et al., 1998).

Wadee e colaboradores (1987) mostraram que uma glicoproteína de 25 kDa do *Mycobacterium tuberculosis* tem um papel direto na supressão da morte bacteriana, aparentemente através da redução do *burst* oxidativo dependente de oxigênio.

Portanto, além de apresentarem mecanismos de escape, impedindo que as vesículas fagocíticas se fundam com os lisossomas (após sua fagocitose), favorecendo sua multiplicação intracelular, a micobactéria expressa varias proteínas que conferem resistência as EROs, um dos motivos pelo qual o *burst* oxidativo não prejudica sua multiplicação intracelular.

É possível que a depressão das funções em polimorfonucleares desses indivíduos também seja resultado da terapia anti-TB e não da tuberculose por si só, uma vez que a duração do tratamento não pareceu resultar em melhora da função (já que nossos voluntários faziam uso da medicação para TB a 3 meses ou mais). Além disso, estudos mostraram que a capacidade fagocítica de neutrófilos estava aumentada significativamente em indivíduos com TB pulmonar ativa antes do tratamento (RIEGER et al., 1979). Nossas análises também confirmam estes resultados, pois não existiu relação entre o tempo de terapia anti-TB com o aumento dos níveis do *burst* oxidativo dos neutrófilos desses indivíduos. Shalekoff e seus colaboradores (1998) ainda sugerem que devido ao fato de neutrófilos de indivíduo

infectados pelo HIV não terem tais funções prejudicadas, os mecanismos de morte não oxidativa podem estar deficientes, aumentando a predisposição desses indivíduos à infecção pela micobactéria e a maior susceptibilidade dos indivíduos com a co-infecção, quando comparados com aqueles apenas portadores de TB. Em nosso estudo, apesar de não observarmos diferenças estatísticas significativas quando comparamos o grupo HIV e o grupo HIV/TB em relação ao *burst*, quando analisamos a cinética das integrais (exemplo de um indivíduo de cada um desses grupos foi ilustrado na Figura 12) e o gráfico da Figura 13, tanto as medianas quanto os valores máximos são diferentes. O grupo da co-infecção apresentou valores menores, em relação ao grupo HIV. E ainda, o grupo HIV/TB apresentou valores máximos menores, quando comparados ao grupo TB, indicando uma maior deficiência na função neutrofílica do que o outro grupo. No entanto, devemos levar em consideração o pequeno número de indivíduos que compõem o grupo da co-infecção.

Estudos retrospectivos sugerem que a taxa de mortalidade de indivíduos com HIV-1 associados a tuberculose é maior do que naqueles infectados apenas pela TB, mas ainda não está claro se isto é devido a falha do tratamento anti-tuberculose ou devido as complicações da infecção pelo HIV-1. Este estudo de coorte em pacientes com tuberculose foi realizado em Nairobi e no Quênia, para comparar as taxas de mortalidade, fatores de risco e causas de morte nesses indivíduos. Cento e sete indivíduos HIV-1/TB e 174 indivíduos infectados apenas por TB foram selecionados e acompanhados mensalmente. A mortalidade foi significativamente maior no grupo de pacientes com HIV-1/TB do que no grupo de infectados apenas com tuberculose, dentro de 6 meses do início do tratamento anti-tuberculose. A maior parte do excesso de mortalidade ocorreu após o primeiro mês de tratamento e foi devido a infecções não tuberculosas. A mortalidade foi maior em indivíduos HIV-1/TB tratados com o esquema "padrão" (duração de 9 meses ou mais) para a tuberculose do que em indivíduos TB que receberam um regime "de curta duração" (6 meses de duração) (NUNN et al., 1991). Tendo em vista nossos resultados, e aqueles obtidos em trabalhos anteriores, propõe-se que a terapia anti-TB seja reavaliada, apesar da prometida eficácia dos medicamentos atuais utilizados na terapia. Nossos estudos ainda mostraram uma resposta biológica importante na defesa contra microrganismos muito deficiente e ineficaz, e que tal mecanismo,

apesar de não ser o responsável pela extinção do *M. tuberculosis*, poderia ser eficaz na proteção contra outros patógenos advindos da suscetibilidade promovida pela tuberculose nesses indivíduos.

Segundo Cortés e colaboradores (2009) alguns agentes, como a *Rickettsia rickettsii* e *Chlamidiae spp.* inibem a morte celular para que a célula hospedeira seja um ambiente viável para se reproduzir e prosperar. Outros, como o *Bacillus anthracis* e a bactéria *Bordetella pertussis* induzem a morte das células do sistema imunológico para subverter os mecanismos de defesa do hospedeiro. Quanto ao *M. tuberculosis*, vários investigadores têm demonstrado que a micobactéria induz a morte celular em neutrófilos, mas a relação entre a apoptose e a atividade antimicobacteriana não foi analisada. Tem sido postulado que a fagocitose por macrófagos, de neutrófilos apoptóticos infectados, induz uma resposta pró-inflamatória, e que também pode ser um mecanismo útil de ativação de macrófagos contra as micobactérias. Além disso, estudos mostraram que a apoptose em neutrófilos infectados pelo *M. tuberculosis* é dependente de oxigênio (PERSKVIST et al., 2002).

Segundo Leeansyah e colaboradores (2007) seu estudo feito em macrófagos mostrou que após a infecção pelo HIV-1, muitas funções destes fagócitos, como quimiotaxia, fagocitose, morte intracelular, e produção de citocinas, são interrompidas. Estudos realizados, tanto ex vivo como in vitro, mostraram fagocitose defeituosa mediada por FcR em humanos após a infecção pelo vírus, o que pode contribuir para o aumento da suscetibilidade a infecções oportunistas causadas por determinados microrganismos – estas que normalmente poderiam ser controladas pelos macrófagos.

Sabe-se que, abaixo de um valor crítico de $3-4 \times 10^5$ neutrófilos/mL de sangue, o crescimento de bactérias é maior do que a capacidade microbicida dos neutrófilos. A concentração celular é um fator importante nessa atividade neutrofílica, no entanto, isso havia sido testado apenas para outros agentes patogênicos, e não para as micobactérias. Sendo assim, Cortés e colaboradores (2009) demonstraram através de testes *in vitro* que o aumento da densidade celular de neutrófilos não induz atividade antimicobacteriana. Este resultado pode explicar porque a grande quantidade de neutrófilos encontrados em lavados broncoalveolar de doentes com tuberculose é insuficiente por si só para controlar a doença. Além disso, a produção

de EROs induz apoptose, mas não aumenta a atividade antimicrobiana contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Nossas análises foram realizadas *ex vivo*, e a quantidade de células (1×10^6 células/mL) e estímulo (zymosan) utilizados durante a quimioluminescência foi a mesma para todos os indivíduos, e isso nos permitiu demonstrar que apesar das mesmas condições utilizadas durante a avaliação do *burst* oxidativo dos neutrófilos, a diferença entre tais níveis foi nítida, provando que a deficiência estava presente naqueles indivíduos que apresentavam a infecção ou co-infecção pela micobactéria, independente da concentração celular, já que os indivíduos que apresentavam apenas a infecção pelo HIV não apresentaram deficiência tão aparente.

Apesar disso, a análise do hemograma (dados não mostrados) dos indivíduos do grupo TB mostrou que a porcentagem de neutrófilos em relação aos leucócitos totais se apresentava alta ou dentro dos valores de referência, ao contrário do que sugeriu o hemograma dos indivíduos do grupo HIV, enquanto o grupo da co-infecção HIV/TB apresentou valores intermediários. Mas o interessante é que apesar da grande quantidade de neutrófilos presentes no sangue desses indivíduos com TB em relação a quantidade de neutrófilos presentes no sangue dos indivíduos com HIV, nos indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* o rendimento celular - após separação com Histopaque - foi muito menor, sugerindo talvez uma anormalidade na densidade dessas células, haja vista que a separação destas foi realizada por gradientes de diferentes densidades. Este é um fato interessante e que poderia ser melhor avaliado.

Schäfer e colaboradores (1994) avaliaram a influência da infecção pelo HIV na atividade fagocítica de granulócitos através de citometria de fluxo, e seus resultados mostraram que o número dessas células está relativamente alto nessa infecção, independente do estágio da doença, e os dados sugerem que a alta suscetibilidade dos indivíduos HIV positivos a infecções secundárias não está ligada a uma perda da capacidade fagocítica. Diante disto, podemos sugerir que essa suscetibilidade está associada à uma maior debilidade da imunidade específica, tendo que vista que o vírus do HIV infecta quase predominantemente linfócitos T CD4+, promovendo a destruição maciça dessas células nos tecidos linfóides, levando a um colapso do sistema imune.

Quanto ao *burst* oxidativo de indivíduos infectados apenas pelo HIV, apesar da discreta diminuição, não observamos diferenças que fossem significativas estatisticamente quando comparadas com os níveis daqueles indivíduos do grupo Controle. Esse resultado pode representar a hipótese proposta por Bandres e colaboradores (1993), indicando que estímulos associados com início da infecção pelo HIV-1 (fase assintomática) melhoram a resposta inespecífica de células fagocíticas - nosso grupo de voluntários foi composto apenas por indivíduos sintomáticos, ou seja, que não se apresentam no início da infecção, e por isso não demonstraram qualquer aumento ou melhora do *burst*, e sim valores relativamente parecidos ou pouco menores quando comparados ao grupo Controle.

Segundo Dobmeyer e outros (1995) existe uma relação entre a contagem de células CD4+ e a diminuição da função de granulócitos durante a infecção pelo HIV-1, onde indivíduos com AIDS, quando comparados com indivíduos assintomáticos, apresentaram uma redução significativa da fagocitose e do *burst* oxidativo que se correlacionou com o número de células CD4+. Nossos grupos compostos por indivíduos infectados pelo HIV apresentaram apenas indivíduos sintomáticos, ou seja, com AIDS, e quando comparamos a contagem absoluta das células CD4+ dos grupos HIV e HIV/TB, observamos que indivíduos co-infectados apresentaram valores abaixo ou muito abaixo de 350 células/mm³ (Tabela 8, Figura 21), seguindo a mesma linha dos níveis apresentados durante o *burst* oxidativo (Tabela 2, Figura 13), ou seja, aparente diminuição (apesar de não haver significância estatística entre essas duas variáveis); enquanto todos os indivíduos que compõe o grupo HIV apresentaram contagem absoluta de CD4+ sempre acima de 300 células/mm³ (Tabela 8, Figura 21) e *burst* oxidativo aparentemente normal (Tabela 2, Figura 13). Collins e colegas (2002) também observaram essa diminuição da contagem absoluta de células T CD4+ em indivíduos com a co-infecção quando comparados com indivíduos infectados apenas pelo HIV, reforçando nossos resultados.

Apesar do número muito inferior de voluntários que compõe o grupo HIV/TB em comparação com os demais grupos de estudo, no caso, o grupo HIV, podemos sugerir que essa diminuição de células CD4+ pode ser devido ao aumento da suscetibilidade e debilidade imunológica desses indivíduos frente a co-infecção e devido a retirada da terapia antiretroviral, que pode ocasionar o aumento de cópias virais e deficiência na resposta mediada pelas células em questão. Além disso,

alguns indivíduos HIV/TB também apresentaram contagem absoluta de CD8+ muito inferiores às encontradas em indivíduos do grupo HIV. A Tabela 8 apresenta as análises estatísticas descritivas das contagens de CD4+ e CD8+ obtidas de indivíduos dos grupos HIV e HIV/TB. Essas análises mostraram diferença significativa entre esses dois grupos, tanto em relação ao CD4+ ($p < 0,001$) como ao CD8+ ($p = 0,007$).

Linfócitos CD4+ são o principal alvo na infecção pelo HIV e seu número tende a declinar com o passar do tempo. É um dos mais importantes parâmetros usados como prognóstico, progressão da doença e para definir o estado imunológico do paciente. O progressivo declínio está associado ao aumento da carga viral e a deterioração clínica no curso da infecção. Ainda, a contagem de linfócitos T CD4+ < 200 células/mm³ está associada ao aumento da suscetibilidade a infecções oportunistas.

Ao analisarmos a distribuição dos valores absolutos e percentuais para os genótipos CD32 e CD16 dos grupos HIV e HIV/TB em relação aos níveis detectáveis ou Limite de carga viral verificamos que não houve diferença significativa entre estas variáveis. E o fato do grupo HIV/TB apresentar apenas um indivíduo com carga viral Limite impediu que fosse feita qualquer análise estatística.

Quando se trata da carga viral e do *burst* oxidativo, não foi encontrada uma relação que pudesse confirmar uma possível correlação entre essas variáveis e que fosse relevante ao estudo.

Quanto aos FcR, a ligação de partículas opsonizadas por IgG nesses receptores induz a fosforilação de tirosinas por Src tirosina quinase dos ITAMs, quer no domínio citoplasmático ou na cadeia γ comum aos FcR. O ITAM fosforilado serve de sítio de ancoragem para Syk, um membro da família ZAP70 das proteínas tirosina quinases, que após autofosforilação é absolutamente necessária para a fagocitose mediada pelos Fc γ R, e portanto pode ser usado como leitura bioquímica para o início do sinal de transdução fagocítica destes receptores. A ativação de Syk modula direta ou indiretamente uma série de mediadores posteriores a essa sinalização.

Os estudos prévios de Leeansyah e outros (2007) mostraram que a deficiência da fagocitose mediada pelos FcR, em macrófagos de indivíduos infectados pelo HIV (sintomáticos), está associada com uma baixa regulação da expressão de proteínas da cadeia γ , embora a expressão desse receptor não seja

alterada. Eles afirmam ainda, que apesar da presença de ITAM na sua região citoplasmática, a sinalização do Fc γ R1a não é dependente deste, e sugerem que a infecção pelo HIV-1 inibe especificamente a sinalização via cadeia γ associada aos receptores, a partir da diminuição da sua síntese, inibindo sua expressão a nível pós transcricional, mas sem afetar a sinalização independente dessa cadeia γ . Para tanto, eles mediram a ativação de Syk; e para determinar os mecanismos que promovem este defeito na expressão da cadeia γ , mediram os níveis de mRNA, os quais não se mostraram afetados. No entanto, quanto a síntese e quantidade de proteínas, afirmaram que a diminuição da expressão da cadeia γ é resultado da diminuição da sua síntese protéica. Quanto a ativação de Syk, esta foi inibida no Fc γ RI de macrófagos de pacientes infectados pelo HIV-1, no entanto, essa inibição não ocorreu em Fc γ R1a. É possível que o HIV-1 afete fatores de iniciação de tradução, especialmente necessários para a biossíntese da cadeia γ , por exemplo, o fator de iniciação 4GI, que é clivado pela protease do HIV-1 (PERALES, CARRASCO, VENTOSO, 2003; ALVAREZ, MENENDEZ-ARIAS, CARRASCO, 2003) Estudos indicam que Nef (proteína viral responsável por promover o aumento da infectividade e replicação, além de modular negativamente proteínas presentes na superfície da célula do hospedeiro) não é necessária ou responsável pela inibição da fagocitose, e portanto, nem a produção de proteínas codificadas pelo HIV-1 agindo dentro do macrófago (KEDZIERSKA et al., 2001). Provavelmente os macrófagos infectados estimulem a secreção de fatores inibitórios, como o TGF- β 1, uma citocina envolvida no crescimento e diferenciação celular, assim como na imunossupressão, e que se apresenta bastante elevada na infecção pelo HIV-1. Tridandapani e colegas (2003), mostraram que esta citocina inibi a expressão da cadeia γ em vários tipos celulares.

Outros autores tem descrito que a infecção pelo HIV-1 tem sido associada a diminuição da expressão do TCR (receptor de célula T) associado ao CD3 ζ , e a funcionalidade de células CD4+, CD8+ e células NK. E esses dados tem sido relacionados com a progressão da doença e a perda da citotoxicidade das células T e a citólise mediada pelas células NK, indicando estratégias específicas usadas pelo vírus para modular uma variedade de defesas imune do hospedeiro (TRIMBLE, LIEBERMAN, 1998).

Apesar de tantos estudos indicarem diminuição da capacidade fagocítica ou do *burst* oxidativo de macrófagos em indivíduos infectados pelo HIV, nossos resultados não apontaram tal significância em se tratando de neutrófilos. No entanto, a pequena diminuição da produção de EROs observada nos neutrófilos dos nossos voluntários pode ser resultado da deficiência dos mesmos mecanismos apresentados pelos macrófagos (LEEANSYAH et al., 2007) e que foram descritos acima, quando se trata de indução do *burst* oxidativo mediado por FcR em indivíduos soropositivos, já que os estudos avaliaram o mesmo receptor (FcγRIIIa) e os mecanismos de ativação das células envolvidos mediados por este receptor também ocorrem pelas mesmas vias, ou seja, em neutrófilos, FcγRIIIa e FcγRIIIb ativam isoformas específicas de Src da família quisase (GARCÍA et al., 2009).

Está bem descrito que os alótipos FcγRIIIa H/R 131 e FcγRIIIb NA1/NA2 se diferem quanto a sua capacidade funcional. Foi sugerido por Bredius e colaboradores (1994), que as diferenças biológicas da atividade funcional entre os alótipos NA1 e NA2 se aplicam a IgG1 e IgG3 da seguinte maneira: a capacidade fagocítica de homocigotos NA2 contra bactérias opsonizadas com IgG1 e IgG3 é menor quando comparada a NA1. Isso pode ser devido às diferenças na ligação da imunoglobulina ao receptor; Salmon (1990) não encontrou capacidade de ligação com IgG1 idêntica entre os alelos. Ainda, em citometria de fluxo, quando as bactérias eram marcadas com fluorescência, observaram uma quantidade maior dessas bactérias em neutrófilos que apresentavam homocigose para o alótipo NA1, sugerindo que NA1 tem a internalização mais ativa. Em nosso estudo, dos 76 voluntários envolvidos, 39 indivíduos foram genotipados para este receptor, onde 16 indivíduos (independente dos grupos) apresentaram o alótipo NA1NA1, 11 apresentaram o alótipo NA1NA2 e 12 apresentaram o alótipo NA2NA2 (Tabela 4).

Quanto ao FcγRIIIb, é difícil dizer como está envolvido nas diferenças de internalização, já que ele está ligado a membrana celular através de moléculas de GPI e não possui domínios transmembrana e citosólico. No entanto, induzem respostas intracelulares através da interação com outras proteínas de membrana. Mas se sabe que entre outros fatores de risco para doenças infecciosas, o alótipo RR 131 inclui um fator adicional na defesa contra bactérias encapsuladas e vírus quando estes são dependentes de IgG2 e IgG3, respectivamente. Além disso, o clearance de imunocomplexos de IgG2 e IgG3 pode ser afetado em indivíduos RR

131, e isso pode ser o motivo pelo qual a maior proporção de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) possuem pelo menos um alelo R. Em geral, vários estudos fornecem evidências de que IgG2 e IgG3 interagem mais facilmente com Fc γ RIIa-H131 quando comparado ao seu alótipo R131, e IgG1 e IgG3 interage mais facilmente com Fc γ RIIIb-NA1 do que seu alótipo NA2 (BREDIUS et al., 1994).

Forthal e colaboradores (2007), pesquisaram a possibilidade de o Fc γ RIIa estar associado a progressão da infecção pelo HIV. Pois vários pesquisadores já haviam evidenciado a relação do polimorfismo com varias doenças, entre outras reações imunes. Por exemplo, indivíduos com o genótipo RR têm um risco cerca de 1,5 vezes maior de desenvolver lúpus eritematoso sistêmico do que indivíduos com genótipo HH. Indivíduos que apresentam o genótipo RR podem ser protegidos de malaria grave. Em doenças associadas a imunocomplexos infecciosos ou patogênicos, o genótipo menos eficiente na fagocitose (RR) é desvantajoso. Entretanto, o genótipo de alta afinidade, HH, pode ser desvantajoso quando patógenos de complexos imunes estabelecem infecção dentro dos fagócitos. Com relação ao HIV, Brouwer e colegas (2004) relataram um risco duas vezes maior de infecção perinatal em recém-nascidos HH comparado com os infantes RR.

Nos estudos de Forthal e seus colaboradores (2007) a progressão da infecção pelo HIV foi definida pela contagem de CD4+ <200 células/mm³. Apesar de não terem evidências concretas de um mecanismo específico pelo qual o polimorfismo do Fc γ RIIa afeta a progressão do HIV, foi visto que indivíduos homozigotos para RR apresentavam um perigo relativo em comparação aqueles indivíduos que apresentavam pelo menos um alelo H. Ou seja, a homozigose para R indicou uma taxa mais rápida de progressão da doença. Além disso, indivíduos com o genótipo RR mostraram internalizar complexos imunes de HIV menos eficientemente do que HH, e a presença desses ICs têm uma série de consequências patológicas, pois promovem a ativação de células T, situação que está fortemente relacionada com a progressão da doença. Assim, a eficiência da internalização do IC pode, portanto, ter um papel na ativação imune, e na perda de células CD4+. Nesse mesmo estudo, foi relatado que indivíduos infectados cronicamente, desenvolveram uma resposta substancial de IgG2 específica para gp120, e isso apresentou um papel potencial na participação de fenômenos biológicos desencadeados por Fc γ R, como a fagocitose e a endocitose. O

interessante é que apesar desses resultados, indivíduos com o genótipo RR para o Fc γ RIIa foram associados a um menor risco de adquirirem certas doenças que caracterizam a AIDS. Por exemplo, esses indivíduos apresentaram 2,5 vezes menos chance de adquirir pneumonia por *Pneumocystis jiroveci (carinii)* – uma doença considerada indicadora de AIDS – do que indivíduos com o genótipo HH.

Em nosso estudo 49 indivíduos foram genotipados para CD32, onde 43 indivíduos apresentaram o alótipo RR e 6 indivíduos apresentaram o alótipo HR (Tabela 3).

Ao procurarmos uma relação significativa entre o *burst* oxidativo dos neutrófilos dos nossos voluntários em relação a genotipagem tanto para CD32 quanto para CD16, encontramos significância apenas entre indivíduos do grupo Controle com alótipo HR em relação ao grupo HIV/TB com alótipo RR. Nenhuma relação também foi encontrada entre os alótipos para CD16 e o *burst* oxidativo. Isso pode ser resultado da metodologia usada, que avalia o *burst* como um todo, de modo geral, e não a produção de EROS resultante apenas da ativação dos neutrófilos por imunocomplexos opsonizados por IgG.

Quanto a tuberculose em relação aos Fc γ R, Maglione e outros estudiosos (2008) mostraram que em modelos murinos as células B podem influenciar a suscetibilidade e a progressão patológica da infecção pelo *M. tuberculosis*. Além disso, a eficácia de anticorpos específicos indica que a biologia das células B pode ajudar a aumentar e promover a proteção durante a TB. Essas células influenciam a maturação de APCs e o desenvolvimento da imunidade celular. Em seu estudo, foram utilizados murinos que apresentavam deleção do gene do receptor de inibição (Fc γ RIIB), e estes, manifestaram melhora do controle da patologia bacteriana e diminuição do *M. tuberculosis*. Em contraste, murinos que eram deficientes na subunidade da cadeia γ dos FcR apresentaram um aumento na produção de imunossupressores (IL-10), agravando a imunopatologia da TB e o aumento na quantidade de bactérias em órgãos como o pulmão e baço, aumentando a suscetibilidade à infecção. Isso sugere que a modulação da via imuno-humoral mediada pelos receptores Fc γ R pode fornecer novos meios para aumentar a imunidade contra a infecção aguda da tuberculose, limitando sequelas patológicas da resposta do hospedeiro a uma infecção crônica. Até mesmo em humanos essa relação foi feita, onde a ausência do Fc γ RIIB conduziu a uma maior ativação das

APCs e reforçaram as respostas de células T (*in vitro*) (DESAI et al., 2007). Nos modelos murinos foi observado um aumento na produção de IFN- γ e o aumento da resposta Th1 com aumento na frequência de células T nos pulmões de murinos que apresentavam deleção do gene para Fc γ RIIB. Já foi demonstrado que IFN- γ é uma citocina crucial para a imunidade inata e adaptativa contra vírus e infecções bacteriana intracelulares e sua expressão descontrolada está associada com uma série de doenças autoimunes. A importância do IFN- γ no sistema imune resulta em parte da sua capacidade de inibir a replicação viral, e o mais importante, seus efeitos estimuladores e imunomoduladores (COOPER et al, 1993; CONDOS, ROM, SCHLUGER, 1997). Maglione e seus colaboradores (2008) mostraram ainda que os murinos que não apresentavam a deleção no gene do receptor de inibição limitava os níveis de B7-1, B7-2 e MHC de classe II, reduzindo a imunidade Th1 nos pulmões desses camundongos, conseqüentemente permitindo a persistência das micobactérias. Nos camundongos que apresentavam a deleção da subunidade da cadeia γ , foi constatado um aumento na produção de IL-10, uma citocina imunossupressora, o que pode ser o motivo pelo qual esse murinos foram incapazes de conter a infecção pelo *M. tuberculosis*.

Em humanos, o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias é regulada em parte pela ativação dos Fc γ R, incluindo o Fc γ RIIa, e o Fc γ RIIb de inibição, por isso a importância de se estudar esses receptores e seus mecanismos pelos quais eles promovem a imunoregulação.

A sinergia entre o HIV e a tuberculose pode assumir diversas formas. Por exemplo, a imunossupressão induzida pelo HIV aumenta a probabilidade de reativação do *M. tuberculosis* quiescente. A TB, por si só, modula o sistema imune do hospedeiro, e uma célula T que é ativada em resposta a infecção pela micobactéria produz mais HIV do que uma célula quiescente (inativa), de tal modo que a expressão do HIV aumenta a probabilidade de co-infecção. A elevação da carga viral aumenta a taxa de progressão da doença e também a infectividade do HIV. A infecção por TB, em pessoas não infectadas pelo HIV pode resultar em células T ativadas mais suscetíveis ao vírus após a exposição. Portanto, devido a essa sinergia, a prevenção e o tratamento de uma das infecções pode resultar no controle e/ou na prevenção da outra (VERMUND, YAMAMOTO, 2007).

Sabemos que as infecções citadas aqui, e que foram foco deste estudo são ainda um grande problema de saúde pública mundial, apesar do tratamento tanto anti-retroviral como anti-TB estarem bem estabelecidos. Para tanto, o estudo da influência do polimorfismo dos Fc γ R pode contribuir para a identificação de indivíduos, cujo fenótipo determinado pelo polimorfismo dos Fc γ R possa conferir suscetibilidade ou proteção para uma variedade de doenças, auxiliando no prognóstico de tais infecções e ajudando no controle de agentes oportunistas de indivíduos vulneráveis às co-infecções (como a tuberculose), associadas ao HIV. Isso permitirá construir novas estratégias terapêuticas para os portadores de fenótipos de receptores de imunoglobulinas relacionados a menor resistência a infecções.

8. CONCLUSÃO

- A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* pode induzir maior suscetibilidade ao indivíduo quanto as demais infecções, visto que a função neutrofílica nesses indivíduos é prejudicada. Esta deficiência foi reportada através da análise dos valores da quimioluminescência do grupo TB, que mostraram uma diminuição significativa da indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando comparados aos demais grupos.

- Indivíduos infectados pelo HIV também apresentaram uma diminuição relativa do *burst* oxidativo, mas que não mostrou ser significativamente variável quanto aos indivíduos infectados com TB quando comparados com os resultados do *burst* oxidativo dos neutrófilos dos indivíduos do grupo Controle.

- Quanto aos receptores FcγRIIa e FcγRIIIb e seus alótipos, não encontramos relação com a produção de EROS que não fosse dependente da ativação dos neutrófilos através de imunocomplexos de IgG, ou seja, o polimorfismo dos receptores CD32 e CD16 não tem relação com o aumento e diminuição do *burst* oxidativo dos neutrófilos, quando a fagocitose e estimulação do metabolismo oxidativo ocorre via receptor de complemento e não via FcγR.

- Indivíduos que apresentam a infecção pelo *M. tuberculosis* devem ser monitorados com grande cautela, principalmente aqueles que apresentam os fenótipos para o polimorfismo de CD32 e CD16 que conferem menor eficiência fagocítica (RR e/ou NA2NA2, respectivamente). Estes indivíduos são duplamente prejudicados, pois além de portarem o(s) fenótipo(s) que conferem a deficiência na fagocitose e, portanto maior suscetibilidade a demais infecções, portam também uma infecção que por si só garante a diminuição do *burst* oxidativo dos neutrófilos, metabolismo importante na erradicação e controle de agentes oportunistas.

- Os números de células CD4+ e CD8+ estão inteiramente relacionadas com a presença da infecção pelo HIV e/ou HIV/TB. E assim como o *burst* oxidativo dos indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* mostrou-se diminuído, as contagens tanto de células CD4+ quanto CD8+ também mostraram aparente diminuição, sugerindo uma deficiência imunológica tanto da imunidade inata quanto da imunidade mediada por células de perfil Th1, durante a tuberculose.

ANEXO 1

Tabela 11: GRUPO CONTROLE

Indivíduo	Integral do <i>Burst</i> Oxidativo	FcγRIIA (CD32) H/R	FcγRIIIB (CD16) NA1/NA2
1.	479482	RR	NA1NA1
2.	664068	RR	NA1NA2
3.	773345	RR	NA1NA2
4.	566091	HR	NA1NA1
5.	532034	RR	NA1NA1
6.	484788	RR	NA1NA1
7.	689869	RR	NA1NA2
8.	735520	RR	NA1NA1
9.	459866	RR	NA1NA2
10.	445959	HR	NA2NA2
11.	626166	RR	NA1NA1
12.	460128	RR	NA1NA2
13.	535444	RR	-
14.	498864	-	-
15.	517013	-	NA1NA2
16.	289719	RR	NA1NA1
17.	445746	RR	-
18.	298188	-	-
19.	394163	RR	NA1NA1
20.	283008	-	NA2NA2
21.	726570	RR	NA1NA2
22.	851948	-	NA1NA1
23.	489500	RR	-
24.	522786	-	NA2NA2
25.	640619	-	-

- : genotipagem não realizada.

Tabela 12: GRUPO HIV

Indivíduo	Integral do <i>Burst</i> Oxidativo	FcγRIIA (CD32) H/R	FcγRIIIB (CD16) NA1/NA2	CD3+/CD4+/CD8+ (μL)	Carga Viral (cópias/mL)
1.	527894	HR	-	2038 / 1220 / 680	Limite
2.	475130	RR	NA1NA1	1230 / 541 / 611	238
3.	555802	HR	NA2NA2	1640 / 468 / 960	Limite
4.	649441	RR	-	2506 / 967 / 1401	Limite
5.	382742	HR	NA1NA2	2213 / 774 / 1339	Limite
6.	344071	RR	-	1111 / 316 / 772	31993
7.	402767	RR	NA1NA1	999 / 380 / 597	51
8.	468410	RR	NA2NA2	1852 / 320 / 1423	77
9.	329915	HR	-	1468 / 578 / 803	1551
10.	495802	-	NA2NA2	1617 / 511 / 1077	Limite
11.	591530	RR	NA1NA2	1550 / 477 / 1052	Limite
12.	536985	-	NA2NA2	2589 / 738 / 1805	65
13.	422827	RR	-	1605 / 556 / 1039	556
14.	405688	-	NA1NA1	2005 / 647 / 1348	Limite
15.	344781	-	NA1NA1	1668 / 476 / 1176	Limite
16.	411855	-	-	1434 / 418 / 927	154
17.	332877	RR	-	2874 / 646 / 2205	Limite
18.	783460	RR	-	1421 / 624 / 721	Limite
19.	596698	RR	-	1416 / 589 / 770	Limite
20.	595005	-	NA1NA1	1628 / 460 / 1121	Limite

- : genotipagem não realizada.

Tabela 13: GRUPO TUBERCULOSE

Indivíduo	Integral do <i>Burst</i> Oxidativo	FcγRIIA (CD32) H/R	FcγRIIIB (CD16) NA1/NA2	Localização Tuberculose
1.	520112	RR	-	TB Pulmonar
2.	420554	RR	NA2NA2	TB Pulmonar
3.	355460		-	TB Pulmonar
4.	239296	RR	NA1NA2	TB Pulmonar
5.	297505	RR	-	TB Pulmonar
6.	407430	RR	-	TB Pulmonar
7.	242760	-	NA2NA2	TB Pulmonar
8.	312014	-	NA2NA2	TB Pulmonar
9.	379214	RR	NA1NA1	TB Pulmonar
10.	590000	-	NA2NA2	TB Pulmonar
11.	358690	-	NA2NA2	TB Pulmonar
12.	322782	-	-	TB Pulmonar
13.	510000	-	NA1NA1	TB Pulmonar
14.	570000	RR	-	TB Pulmonar
15.	672499	-	NA1NA2	TB Pulmonar
16.	614434	-	-	TB Pulmonar
17.	635427	-	-	TB Pulmonar
18.	495376	RR	-	TB Pulmonar
19.	438563	-	-	TB Pulmonar
20.	290916	RR	-	TB Pulmonar
21.	325819	RR	-	TB Pulmonar
22.	277269	-	-	TB Pulmonar
23.	446215	RR	-	TB Pulmonar
24.	242924	RR	-	TB Pulmonar

- : genotipagem não realizada.

Tabela 14: GRUPO HIV + TUBERCULOSE

Indivíduo	Integral do <i>Burst</i> Oxidativo	Fc γ RIIA (CD32) H/R	Fc γ RIIIB (CD16) NA1/NA2	CD3+/CD4+/CD8+ (μ L)	Carga Viral (cópias/mL)	Localização Tuberculose
1.	374314	-	-	242 / 34 / 191	342730	TB Pulmonar
2.	372758	-	-	1299 / 209 / 1032	3833	TB Pulmonar
3.	356322	RR	-	665 / 4 / 617	64164	TB Pulmonar e Ganglionar
4.	430302	RR	-	1064 / 345 / 691	69	TB Pulmonar
5.	261836	RR	-	339 / 5 / 284	Limite	TB Pulmonar
6.	290847	RR	-	920 / 41 / 855	113367	Neurotuberculose
7.	276852	RR	-	553 / 20 / 494	23140	TB Pulmonar

- : genotipagem não realizada.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**; 4ª Edição; Livraria e Editora Revinter Ltda.; Rio de Janeiro; 454-66, 2003.
- ABDEL-RAHMAN, S.Z. Isolation of DNA using saltin-out procedure. **J Biochem Toxicol.** 9: 191-8, 1994.
- ALVAREZ, E.; MENENDEZ-ARIAS, L.; CARRASCO, L. The eukaryotic translation initiation factor 4GI is cleaved by different retroviral proteases. **J. Virol.** 77: 12392–12400, 2003.
- ALVES, C.M.O.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; CARVALHO, I.F.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fc γ and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. **Talanta.** 60: 601-8, 2003.
- ANDRIAN, U.H.; MACKAY, C.R. T-Cell Function and Migration. **Nature Reviews Immunology** 7. p. 679, 2007.
- ASSARI, T. Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. **Medical Immunology.** 5:4, 2006.
- BABIOR, B. M.; COHEN, H. J. Phagocytes and oxidative stress. **Am J. Med.** 109: 33-44, 2000.
- BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J.T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J. Clin. Invest.** 52: 741-4, 1973.
- BABIOR, B.M. NADPH Oxidase: an Update **Blood.** 93: 1464-76, 1999.
- BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidase. **Basic Life Sci.** 49: 815-21, 1988.

- BANDRES, J.C.; TRIAL, J.; MUSHER, D.M.; ROSSEN, R.D. Increased phagocytosis and generation of reactive oxygen products by neutrophils and monocytes of men with stage 1 human immunodeficiency virus infection. **J Infect Dis.** 168: 75-83, 1993.
- BAST, A. HAENEM G. R. M. M.; DOELMAN C. J. A. Oxidants and antioxidants: state of the art. **Am .J. Med.** 91: 2-13, 1991.
- BAZÍLIO, A.P.; VIANA, V.S.T.; TOLEDO, R.; WORONIK, V.; BONFÁ, E.; MONTEIRO, R.C. Fc γ RIIa polymorphism: a susceptibility factor for immune complex-mediated lupus nephritis in Brazilian patients. **Nephr Dial Transpl.** 19: 1427-31, 2004.
- BENDER, B.S.; FRANK, M.M.; LAWLEY, T.J.; SMITH, W.J.; BRICKMAN, C.M.; QUIN, T.C. Defective reticuloendotelial system Fc-receptor function in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **J Infect Dis.** 152: 409-12, 1985
- BIEZEVELD, M.; GEISLER, J.; MERKUS, M.; KUIPERS, I.M.; OTTENKAMP, J.; KUIJPERS, T. The involvement of Fc gamma receptor gene polymorphisms in Kawasaki disease. **Clinical and Experiment Immunology.** 147: 106-11, 2006.
- BIGGS, B.A.; HEWISH, M.; KENT, S.; HAYES, K.; CROWE, S.M. HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.** 154: 6132-9, 1995.
- BONACORSI, C. **Atividade anti-*Helicobacter pylori* e potencial antioxidante de espécies vegetais do Cerrado brasileiro.** 2009. 217f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

- BOVERIS, A.; CADENAS, E.; REITER, R.; CHANCE, B.; JAMIEESON, D. The relation of free radical production to hyperoxia. **Annu Rev Physiol.** 48: 703-719, 1986.
- BREDIUS, R.G.; DERKX, B.H.; FIJEN, C.A.; DE WIT, T.P.; DE HAAS, M.; WEENING, R.S.; VAN DE WINKEL, J.G.; OUT, T.A. Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism in fulminant meningococcal septic shock in children. **J Infect Dis.** 170: 848-53, 1994.
- BREDIUS, R.G.; FIJEN, C.A.; DE HAAS, M.; KUIJPER, E.J.; WEENING, R.S.; VAN DE WINKEL, J.G.; OUT, T.A. Role of neutrophil Fc gamma RIIa (CD32) and Fc gamma RIIIb (CD16) polymorphic forms in phagocytosis of human IgG1-and IgG3-opsonized bacteria and erythrocytes. **Immunology.** 83: 624-30, 1994.
- BROOKS, D.G.; QIU, W.Q.; LUSTER, A.; RAVETCH, J.V. Structure and expression of human IgG FcRII (CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. **J Exp Med.** 170: 1369-85, 1989.
- BROUWER, K.C.; R. LAL,B.; MIREL, L.B.; YANG, C.; VAN EIJK, A.M.; AYISI, J.; OTIENO, J.; NAHLEN, B.L.; STEKETEE, R.; LAL, A.A.; SHI, Y.P. Polymorphism of Fc receptor IIa for IgG in infants is associated with susceptibility to perinatal HIV-1 infection. **AIDS.** 18: 1187–1194, 2004.
- 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 Fc gamma receptor IIIb. **Blood.** 89: 1027-34, 1997.
- CHANOCKF, S.J.; BENNAS, J.E.L.; SMITHLL, R.M.; BABIOR, B.M. Minireview. The Respiratory Burst Oxidative. **The Journal of Biological Chemistry.** 269: 24519-22, 1994.

- COLLINS, K.R.; QUIÑONES-MATEU, M.E.; TOOSI, Z.; ARTS, E.J. Impact of Tuberculosis on HIV-1 Replication, Diversity, and Disease Progression. **AIDS Reviews**. 4: 165-176, 2002.
- CONDOS, R.; ROM, W.N.; SCHLUGER, N.W. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon- γ via aerosol. **Lancet**. 349: 1513-1515, 1997.
- COOPER, A.M.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A.; GRIFFIN, J.P.; RUSSELL, D.G.; I. ORME, M. Disseminated tuberculosis in interferon γ gene-disrupted mice. **J. Exp. Med**. 178: 2243-2244, 1993.
- CORBETT, E.L.; WATT, C.J.; WALKER, N.; MAHER, D.; WILLIAMS, B.G.; RAVIGLIONE, M.C.; DYE, C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. **Archives of Internal Medicine**. 163: 1009-21, 2003.
- CORTÉS, C.G.; RUVALCABA, D.R.; TASCÓN, C.D.; LEZCANO, O.M.R. Apoptosis and oxidative burst in neutrophils infected with *Mycobacterium* spp. **Immunology Letters**. 126: 16-21, 2009.
- CRYSTAL, R. G. Oxidants and respiratory tract epithelial injury pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. **Am J. Med**. 91: 39-44, 1991
- DAËRON, M. Fc receptor biology. **Annu Rev Immunol**. 15: 203-34, 1997a.
- DAËRON, M. Structural bases of Fc γ R functions. **Int Rev Immunol**. 16: 1-27, 1997b.
- DEO, Y.M.; GRAZIANO, R.F.; REPP, R.; VAN DE WINKEL, J.G. Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc γ R-directed immunotherapies. **Immunol Today**. 18: 127-35, 1997.

DESAI, D.D.; S. HARVERS, O.; FLORES, M.; COLONNA, L.; DOWNIE, M.P.; BERGTOLD, A.; JUNG, S.; CLYNES, R. Fc γ receptor IIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses. **J. Immunol.** 178: 6217-6226, 2007.

DOBMEYER T.S.; RAFFEL B.; DOBMEYER J.M.; FINDHAMMER S.; KLEIN S.A.; KABELITZ D.; HOELZER D.; HELM E.B.; ROSSOL R. Decreased function of monocytes and granulocytes during HIV-1 infection correlates with CD4 cell counts. **Eur J Med Res.** 1 (1): 9-15, 1995.

DOUEK, D. Perspective – HIV disease progression: immune activation microbes, and a leaky gut. **Topics in HIV Medicine.** 15 (4): 114-7, 2007.

DUIJS, A.J.; BOOTSMA, H.; DERKSEN, R.H.; SPRONK, P.E.; KATER, L.; KALLENBERG, C.G.; CAPEL, P.J.; WESTERDAAL, N.A.; SPIERENBURG, G.T.; GMELIG-MEYLING, F.H. et al. Skewed distribution of IgG Fc receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus erythematosus patients. **Arthr Rheum.** 38: 1832-6, 1995.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.** 43: 61-8, 1997.

FIJEN, C.A.; BREDIUS, R.G.; KUIJPER, E.J. Polymorphism of IgG Fc receptors in meningococcal disease. **Ann Intern Med.** 119: 636, 1993.

FORTHAL, D.N.; LANDUCCI, G.; BREAM, J.; JACOBSON, L.P.; PHAN, T.B.; MONTOYA, B. Fc γ RIIa genotype predicts progression of HIV infection. **J Immunol.** 179: 7916-23, 2007.

FREIRE, B.F.A.; QUELUZ, T.H.A.T. Neutrófilo: morfologia, cinética e funções. **J Pneumol.** 21: 180-184, 1995.

- GALON, J.; BOUCHARD, C.; FRIDMAN, W.H.; SAUTÈS, C. Ligands and biological activities of soluble Fc γ receptors. **Immunol Lett.** 44: 175-81, 1995.
- GARCÍA, E.G.; CASTAÑEDA, G.N.; SALDAÑA, M.R.; MORA, N.; ROSALES, C. Fc γ RIIA and Fc γ RIIIB Mediate Nuclear Factor Activation through Separate Signaling Pathways in Human Neutrophils. **J Immunol.** 182: 4547-4556, 2009.
- GASBARRINI, A.; PASINI, P.; NARDO, B.; DE NOTARIIS, S.; SIMONCINI, M.; CAVALLARI, A.; RODA, E.; BERNARDI, M.; RODA, A. Chemiluminescent real time imaging of post-ischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. **Free Radic Biol Med.** 15: 211-16, 1998.
- GESSNER, J.E.; HEIKEN, H.; TAMM, A.; SCHMIDT, R.E. The IgG Fc receptor family. **Ann Hematol.** 76: 231-48, 1998.
- GOMAA N.I.; AHMED A.S.; EL-HADIDY G.S.; MANSOUR M.K. Flow cytometric analysis of the phagocytic cells in active pulmonary tuberculosis. **Egypt J. Immunol.** 11(2):133-40, 2004.
- HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.** 186: 01-85, 1990.
- HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. **Blood.** 92: 3007-17, 1998.
- HUNDT, M.; SCHMIDT, R.E. The glycosylphosphatidylinositol-linked Fc gamma receptor III represents the dominant receptor structure for immune complex activation of neutrophils. **Eur J Immunol.** 22: 811-6, 1992.
- JOHNSON, D.K.; SCHILLINGER, K.J.; KEAIT, D.M.; HUGHES, C.V.; MCNAMARA, E.J.; ISHMAEL, F.; O'DONNEALL, R.W.; CHANG, M.M.; HOGG, M.G.; DORDICK, J.S.; SANTHANAM, L.; ZIEGLIER, L.M.; HOLLAND, J.A. Inhibition of NADPH

oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium**. 9: 191-203, 2002.

JONES G.S.; AMIRALTA H.J.; ANDERSEN B.R. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by neutrophils: a nonoxidative process. **J Infect Dis**. 162(3):700-4, 1990.

KEDZIERSKA, K.; ELLERY, P.; MAK, J.; LEWIN, S.R.; CROWE, S.M.; JAWOROWSKI, A. HIV-1 down-modulates γ signaling chain of Fc γ R in human macrophages: a possible mechanism for inhibition of phagocytosis. **J Immunol**. 168: 2895-2903, 2002.

KEDZIERSKA, K.; MAK, J.; JAWOROWSKI, A.; GREENWAY, A.; VIOLO, A.; CHAN, H.T.; HOCKING, J.; PURCELL, D.; SULLIVAN, J.S.; MILLS, J.; CROWE, S. *Nef*-deleted HIV-1 inhibits phagocytosis by monocyte-derived macrophages in vitro but not by peripheral blood monocytes in vivo. **AIDS**. 15: 945–955, 2001.

KIMBERLY, R.P.; PARRIS, T.M.; INMAN, R.D.; MCDUGAL, J.S. Dynamics of mononuclear phagocyte system Fc receptor function in systemic lupus erythematosus. Relation to disease activity and circulating immune complexes. **Clin Exp Immunol**. 51: 261-8, 1983.

KIMBERLY, R.P.; SALMON, J.E.; EDBERG, J.C. Receptors for immunoglobulin G. Molecular diversity and implications for disease. **Arthritis Rheum**. 38: 306-14, 1995.

KOENE, H.R.; KLEIJER, M.; ROOS, D.; DE HAAS, M.; VON DEM BORNE, A.E. Fc γ RIIIB gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct Fc γ RIIIB genes in NA (1⁺, 2⁺) SH (+) individuals. **Blood**. 91: 673-9, 1998.

KUWANO, S.T.; BORDIN, J.O.; CHIBA, A.K.; MELLO, A.B.; FIGUEIREDO, M.S.; VIEIRA-FILHO, J.P.B.; FABRON, J.R.A.; KERBAUY, J. Allelic polymorphism of human Fc γ receptor IIa and Fc γ receptor IIIb among distinct groups in Brazil.

Transfusion. 40: 1388-92, 2000.

LAPA E SILVA, J.R; BOÉCHAT, N. The resurgence of tuberculosis and the impact of the study of pulmonary immunopathogenesis. **J Bras Pneumol.** 30 (4): 478-84, 2004.

LEEANSYAH, E.; WINES, B.D.; CROWE, S.M.; JAWOROWSKI, A. The mechanism underlying defective Fc γ Receptor-mediated phagocytosis by HIV-1-infected human monocyte-derived macrophages. **J Immunol.** 178: 1096-1104, 2007.

LOPES, L.K.O.; TELES, S.A.; SOUZA, A.C.S.; RABAHI, M.F.; TIPPLE, A.F.V. Tuberculosis risk among nursing professionals from Central Brazil. **Am J Infect Control.** 36: 148-151, 2008.

MAGLIONE, P.J.; XU, J.; CASADEVALL, A.; CHAN, J. Fc γ receptors regulate immune activation and susceptibility during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol.** 180: 3329-38, 2008.

MANTOVANI, B. Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. **J Immunol.** 115: 15-7, 1975.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ALVES, C.M.; AZZOLINI, A.E.; POLIZELLO, A.C.; CARVALHO, I.F.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Fc γ and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. **Lupus.** 11: 240-8, 2002.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Receptores para Imunoglobulina G (Fc γ R). **Medicina (Ribeirão Preto).** 38: 82-95, 2005.

MAZZONI, M. C.; SCHMIDT-SHONBERN, G. W. Mechanisms and consequences of cell activation in microcirculation. **Cardiovascular Research.** 32: 709-719, 1996.

MENEZES E SILVA, C.H.P.; NEUFELD, P.M.; LEITE, C.Q.F.; SATO, D.N. **Bacteriologia e Micologia: Para o Laboratório Clínico**. Livraria e Editora Revinter Ltda.: Rio de Janeiro; 317–333, 2006.

MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.** 16: 1215, 1988.

MORELL, A.; SKVARIL, F.; HITZIG, W.H.; BARANDUN, S. IgG subclasses: development of the serum concentrations in “normal” infants and children. **J. Pediatr.** 80: 34-47, 1972.

MORROW, W.J.; WHARTON, M.; STRICKER, R.B.; LEVY, J.A. Circulating immune complexes in patients with acquired immune deficiency syndrome contain the AIDS-associated retrovirus. **Clin Immunol Immunopathol.** 40: 515-24, 1986.

NIBBERING, P.H., POS, O.; STEVENHAGEN, A.; FURTH R.V. Interleukin-8 enhances nonoxidative intracellular killing of *Mycobacterium fortuitum* by human granulocytes. **Infect. Immun.** 61:3111–3116, 1993.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J.V. Fc γ receptors as regulators of immune responses. **Nature Immunol.** 8: 34-47, 2008.

NUNN P.; BRINDLE R.; CARPENTER L.; ODHIAMBO J.; WASUNNA K.; NEWNHAM R.; GITHUI W.; GATHUA S.; OMWEGA M.; MCADAM K. Cohort study of human immunodeficiency virus infection in patients with tuberculosis in Nairobi, Kenya. Analysis of early (6-month) mortality. **Am Rev Respir Dis.** 146(4):849-54, 1992.

OHKURO, M.; OGURA-MASAKI, M.; KOBAYASHI, K.; SAKAI, M.; TAKAHASHI, K.; NAGASAWA, S. Effect of iC3b binding to immune complexes upon the phagocytic response of human neutrophils: synergistic functions between Fc γ R and CR3. **FEBS Lett.** 373: 189-92, 1995.

- OHTO, H.; MATSUO, Y. Neutrophil-specific antigens and gene frequencies in Japanese. **Transfusion**. 29: 654, 1989.
- OMI, K.; OHASHI, J.; PATARAPOTIKUL, J.; HANANANTHACHAI, H.; NAKA, I.; LOOAREESUWAN, S.; TOKUNAGA, K. Fc γ receptor IIA and IIIB polymorphisms are associated with susceptibility to cerebral malaria. **Parasitology International**. 51: 361-66, 2002.
- PANDOLFI, J.R.; MALASPINA, A.C.; SANTOS, A.C.B.; SUFFYS, P.N.; OELLEMANN, M.A.C.; VALENTINI, S.R.; LEITE, C.Q.F. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. 28 (3): 251-257, 2007.
- PERALES, C.; CARRASCO, L.; VENTOSO, I. Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: effects on translation. **FEBS Lett**. 533: 89–94, 2003.
- PERSKVIST, N.; LONG, M.; STENDAHL, O.; ZHENG, L. *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Apoptosis in Human Neutrophils by Activating Caspase-3 and Altering Expression of Bax/Bcl-x_L Via an Oxygen-Dependent Pathway. **The Journal of Immunology**. 168: 6358-6365, 2002.
- PUKA, J.; MATTOS, H.H.R.V.; GAVRON, C.; VIANNA, S.O.; VAZ, R.S. Origem e tipos de fagócitos. **RUBS**. 1 (1): 25-35, 2005.
- RAMOS, C.L.; POU, S.; BRITIGAN, B.E.; COHEN, M.S.; ROSEN, G.M. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. **J. Biol. Chem**. 267: 8307-12, 1992.
- RASCU, A.; REPP, R.; WESTERDAAL, N.A.C.; KALDEN, J.R.; VAN DE WINKEL, J.G.J. Clinical relevance of Fc γ receptor polymorphisms. **Ann N Y Acad Sci**. 815: 282-95 1997.
- RAVETCH, J.V.; BOLLAND, S. IgG Fc receptors. **Annu Rev Immunol**. 19: 275-90,

2001.

REPINE, J. E.; BAST, A.; LANKHORST, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 156: 341-357, 1997.

RIEGER, M.; TRNKA L.; SKVOR J.; MISON P. Immunoprofile studies in patients with pulmonary tuberculosis. III. Study of haemolytic complement in serum and phagocytic activity of blood neutrophils. **Scand. J. Respir. Dis.** 60:172–175, 1979.

ROSKAMP, L.; PEGORARO, M.; LUZ, P. R.; CRESTANI, S.; VAZ, R. S. Uma revisão sobre receptores opsônicos e não opsônicos. **RUBS.** 1 (3): 12-16,2005.

SALMON, J.E.; EDBERG, J.C.; BROGLE, N.L.; KIMBERLY, R.P. Allelic polymorphisms of human Fc γ receptor IIA and Fc γ receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. **J Clin Invest.** 89: 1274-81, 1992.

SALMON, J.E.; EDBERG, J.C.; KIMBERLY, R.P. Fc γ RIII on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. **J Clin Invest.** 85: 1287-95, 1990.

SANDERS, L.A.; FELDMAN, R.G.; VOORHORST-OGINK, M.M.; DE HAAS, M.; RIJKERS, G.T.; CAPEL, P.J.; ZEGERS, B.J.; VAN DE WINKEL, J.G. Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. **Infect Immun.** 63: 73-81, 1995.

SANGER F.; NICKLEN S.; COULSON A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** 74: 5463-5467, 1977.

SCHÄFER, V.; KREUTER, J.; RUBSAMEN-WAIGMANN, H.; GERTE, S.; VON BRIESEN, H. Influence of HIV-infection on the phagocytic activity of monocytes/macrophages and granulocytes. **Clin Diagn Virol.** 1(5-6):279-87, 1994.

SCHUR, P.H. IgG subclasses – a review. **Ann. Allergy**. 58: 89-96, 1987.

SELVARAJ, P.; ROSSE, W.F.; SILBER, R.; SPRINGER, T.A. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **Nature**. 333: 565-7, 1988.

SEOW, W. K.; THONG, Y. H.; NELSON, R. D.; MACFARLANE, G. D.; HERZBERG, M. C. Nicotine-induced release of elastase and eicosonoids by human neutrophils. **Inflammation**. 18: 119-127, 1994.

SGARBI, M.W.M.; DA SILVA JUNIOR, B.A.; HUNGRIA NETO, J.S. Importância da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) no prognóstico dos pacientes politraumatizados. **Revista Brasileira de Ortopedia**, 2006.

SHALEKOFF, S.; TIEMESSEN, C.T.; GRAY, C.M.; MARTIN, D.J. Depressed phagocytosis and oxidative burst in polymorfonuclear leukocytes from individuals with pulmonary tuberculosis with or without human immunodeficiency virus type 1 infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 5: 41-4, 1998.

SIAWAYA, J.F.D.; RUHWALD, M.; EUGEN-OLSEN, J.; WALZL, G. Correlates for disease progression and prognosis during concurrent HIV/TB infection. **Int J Infect Dis**. 11: 289-99, 2007.

SILVA, I.M. **Avaliação de estímulos solúveis e particulado no burst respiratório de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos de exsudato peritoneal estéril de rato (*Ratus albinus norvegicus*) por quimiluminescência dependente de luminol e lucigenina**. 2000. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

SILVA, S.O. **Oxidação de melatonina catalisada por mieloperoxidase em neutrófilos ativado**s. 2001. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TAKAI, T. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. **Journal of Clinical Immunology**. p.25, 2005.

TORKILDSEN, O.; UTSI, E.; MELLGREN, S.I.; HARBO, H.F.; VEDELER, C.A.; MYHR, K.M. Ethnic variation of Fc γ R polymorphism in Sami and Norwegian populations. **Immunology**. 115: 416-21, 2005.

TRIDANDAPANI, S.; WARDROP, R.; BARAN, C.P.; WANG, Y.; OPALEK, J.M.; CALIGIURI, M.A.; MARSH, C.B. TGF- β 1 suppresses myeloid Fc γ receptor function by regulating the expression and function of the common γ -subunit. **J. Immunol**. 170: 4572–4577, 2003.

TRIMBLE, L.A., LIEBERMAN, J. Circulating CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals have impaired function and down-modulate CD3 ζ , the signaling chain of the T-cell receptor complex. **Blood**. 91: 585–594, 1998.

UNKELESS, J.C.; SHEN, Z.; LIN, C.W.; DEBEUS, E. Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIB. **Semi Immunol**. 7: 37-44, 1995.

VASSELON, T.; DETMERS, P.A. Minireview. Toll Receptors: A Central Element In Innate Immune Responses. **Infection and Immunity**. 70: 1033-41, 2002.

VERMUND, S.; YAMAMOTO, N. Co-infection with human immunodeficiency virus and tuberculosis in Asia. **NIH-PA Author Manuscript**. 87: 18-25, 2007.

VIDARSSON, G.; STEMERDING, A.M.; STAPLETON, N.M.; SPLIETHOFF, S.E.; JANSSEN, H.; REBERS, F.E.; DE HAAS, M.; VAN DE WINKEL, J.G. Fc γ Rn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. **Blood**. 108: 3573-79, 2006.

WADEE, A.A., COHEN, J.D., RABSON, A.R. Gamma interferon reverses inhibition of leukocyte bactericidal activity by a 25-kilodalton fraction

from *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** 55: 2777–2782, 1987.

WARMERDAN, P.A.M.; VAN DER WINKEL, J.G.J.; GOSSEELIN, E.J.; CAPEL, P.J.A. Molecular basis for a polymorphism of the human Fc receptor II (CD32). **J Exp Med.** 172: 19-25, 1990.

ZHOU, M.J.; BROWN, E.J. CR3 (Mac-1, $\alpha\beta 2$ CD11b/CD18) and Fc γ RIII Cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc γ RII and tyrosine phosphorylation. **J Cell Biol.** 125: 1407-16, 1994.



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 13/2009

Interessado: CAROLINA MARIA QUINELLO GOMES DE FARIA

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Projeto: Determinação de Genótipos para o Polimorfismo dos Receptores de IgG, FcγRIIA (H/R 131) e FcγRIIB (NA1/NA2), e estudo de funções efetoras dos neutrófilos em indivíduos infectados pelo HIV e/ou Mycobacterium tuberculosis


Parecer nº 49/2009 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto "Determinação de Genótipos para o Polimorfismo dos Receptores de IgG, FcγRIIA (H/R 131) e FcγRIIB (NA1/NA2), e estudo de funções efetoras dos neutrófilos em indivíduos infectados pelo HIV e/ou Mycobacterium tuberculosis", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos manifestando-se FAVORAVELMENTE à sua execução.

O relatório final do projeto de pesquisa deverá ser entregue em agosto de 2010, no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 09 de novembro de 2009.


Prof.ª Dr.ª AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
SERVIÇO ESPECIAL DE SAÚDE DE ARARAQUARA – SESA
Rm. 1010 - 1533 - Centro - Cx. Postal 27 - Tel. (016) 3334-6000 - Fax (016) 3322-5121
CEP 13.801-350 - Araraquara - SP



Ofício SESA nº 0109/2009

Araraquara, 14 de maio de 2009

Prezado Senhor

Com relação à solicitação de realização dos projetos de pesquisa sob sua orientação **“Determinação dos genótipos para o polimorfismo dos receptores de IgG, FcγRIIIa (H/R131) e FcγRIIIb (NA1/NA2), e estudo de funções efetoras dos neutrófilos em indivíduos infectados pelo HIV e ou Mycobacterium tuberculosis”** e **“Influência do Mycobacterium tuberculosis sobre a modulação das funções de Linfócitos TCD4+ e expressão de p24 na infecção pelo HIV”** nesta instituição, temos a informar que após análise do seu conteúdo por nossa Comissão de Ética e a possibilidade de aplicação de seus resultados na qualificação da assistência prestada aos nossos usuários, nada temos a opor para a sua realização.

Atenciosamente



Dr. Walter Manso Figueiredo
Diretor Técnico

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
Faculdade de Ciências Farmacéuticas de Araraquara – UNESP
Araraquara - SP



Governo do Estado de São Paulo
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE SAÚDE
HOSPITAL NESTOR GOULART REIS
Rua Pedro Figheri, nº 10 - Bairro Santa Terezinha - Américo Brasiliense, SP
CEP: 14620-000 - FAX: (16) 3394-1914 - CNPJ: 46.374.506/0023-00 - INSC. EST.: Isento
DIRETORIA TÉCNICA - Telefone (16) 3392-1246 - dsahngr@saude.sp.gov.br

Américo Brasiliense, 17 de abril de 2009

Ofício DT nº 92/09
Ref.: Projeto de Pesquisa Aprovado

Prezada Senhora:

Conforme solicitado e proposto, informamos à Vossa Senhoria, que o Projeto de Pesquisa "Determinação dos genótipos para o polimorfismo dos receptores de IgG, FcγRIIIa (H/R131) e FcγRIIIb (NA1/NA2), e estudo de funções efetoras dos neutrófilos em indivíduos infectados pelo HIV e/ou *Mycobacterium tuberculosis*", foi aprovado neste Hospital, pelas Comissão de Ensino e Pesquisa e Comissão de Ética Médica.

Informamos, outrossim, que os dados levantados durante a pesquisa são de propriedade exclusiva deste Hospital e que lhe serão disponibilizados, bem como, utilizados para melhoria no atendimento aos pacientes aqui internados e em publicações futuras.

Certos da concordância, e no aguardo da realização da pesquisa, aproveitamos a oportunidade de manifestar a Vossa Senhoria nossos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,


p/ **MARIA ELIANA GONÇALVES LUIZ**
Diretor Técnico de Divisão de Saúde

Ilustríssima Senhora
CAROLINA MARIA QUINELLO GOMES FARIA
Araraquara, SP

MEGL/vl



Américo Brasileiro, 14 de Abril de 2009

PARECER SOBRE VIABILIDADE DE PROJETO DE PESQUISA

PROJETO DE PESQUISA:

*Determinação do genótipo para o polimorfismos dos receptores de IgG, FcγRIIIa (H/R131) e FcγRIIIb (NA1/NA2) em indivíduos infectados pelo HIV, co-infectados por *Mycobacterium tuberculosis* e infectados com *Mycobacterium tuberculosis* isoladamente.

PESQUISADORA:

Carolina Quinello Gomes de Faria

Informamos que o projeto de pesquisa proposto é de interesse científico e compatível com a linha de pesquisa deste hospital.

Informamos também, que os dados levantados durante a pesquisa são de prioridade exclusiva do Hospital e serão disponibilizados à pesquisadora solicitante e utilizados para melhoria do atendimento aos pacientes aqui internados e em publicações futuras.

Dessa forma, o projeto de pesquisa em questão foi aprovado pela Comissão de Ética Médica.

Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Diretor de Assistência à Saúde
Hospital Estadual Américo Brasileiro

Araraquara, 27 de Abril de 2009.


À Coordenação de Análises Clínicas e Hemoterapia.

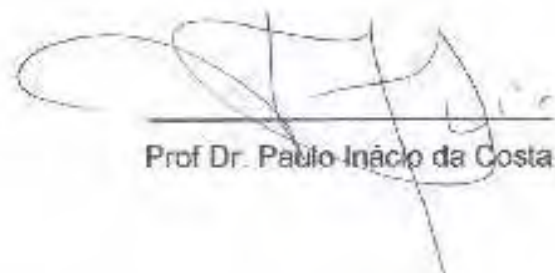
O trabalho intitulado "Influência da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* associada ou não a infecção pelo HIV sobre a modulação das funções efetoras de linfócitos TCD4+ e o polimorfismo de receptor de imunoglobulina G (FcγR) relacionado à atividade fagocítica de neutrófilos do sangue periférico", o qual será desmembrado em dois projetos: "**Influência do *Mycobacterium tuberculosis* sobre a modulação das funções de Linfócitos TCD4+ e expressão de p24 na infecção pelo HIV**" e "**Determinação dos genótipos para o polimorfismo dos receptores de IgG, FcγRIIIa (H/R131) e FcγRIIIb (NA1/NA2), e estudo de funções efetoras dos neutrófilos em indivíduos infectados pelo HIV e/ou *Mycobacterium tuberculosis***", solicita a colaboração do Hemonúcleo de Araraquara para disponibilizar voluntários saudáveis, doadores de sangue, a fim de compor o grupo controle do trabalho, que deverá ser constituído por no mínimo 20 voluntários, de ambos os sexos, com idades entre 18 e 60 anos.

Termos em que, pede deferimento.

Atenciosamente.


Juliana Cristina da Silva


Carolina Maria Quinello Gomes de Faria


Prof Dr. Paulo Inácio da Costa

PROTOCOLO PARA INCLUSÃO DE PACIENTES

Paciente _____

Nome: _____

Número do registro: _____

Data de Nascimento: _____

Endereço: _____

Cidade: _____

Filiação: Pai _____

Mãe _____

Forma de transmissão: _____

Escolaridade: _____

Data do diagnóstico (HIV): _____

Tratamento ARV: Início: _____

Término: _____

Medicação em uso: _____

Outras co-infecções associadas: _____

Tratamento das co-infecções: Início: _____

Término: _____

Medicação em uso: _____

Lista de problemas: _____

Último CD4 _____ Carga viral _____

Hemograma: (Glóbulos Brancos): _____

(Glóbulos Vermelhos): _____

Tabagista: () Sim () Não

Contraceptivos Hormonais: () Sim () Não

Antecedente de doença auto-imune: () Sim () Não Qual? _____

APÊNDICE 3



Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

R. Expedicionários do Brasil, 1621 – Telefone: (16) 3301-6549
14801-902 – Araraquara – SP – Brasil

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, RG _____, Estado Civil _____,
Idade _____ anos, Residente na _____, n.º _____,
Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____,

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

- 1 O trabalho tem por finalidade estudar os tipos de respostas imunes desenvolvidas por indivíduos infectados pelo HIV, ou Mycobacterium tuberculosis, ou co-infecção HIV/Mycobacterium tuberculosis.
- 2 Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para um estudo que pretende avaliar minha resposta imune; as características virais que possam conduzir para progressão da doença; o tipo de receptor para anticorpos e se as células são eficazes na defesa contra os microrganismos, podendo auxiliar na melhoria do tratamento e prognóstico.
- 3 Doarei para a realização dessa pesquisa, 20 mL de sangue, o qual será obtido através de punção venosa, utilizando-se um sistema de coleta a vácuo, em tubos estéreis e descartáveis;
- 4 A minha participação como voluntário deverá ter duração de 30 minutos;
- 5 Estou ciente de que os riscos do procedimento dessa pesquisa são os mesmos de qualquer coleta de sangue de rotina. Podendo ocorrer reações locais como hematomas e muito raramente inflamação da veia onde foi feita a coleta. Como precaução, serei devidamente orientado por profissionais qualificados quanto aos cuidados necessários para me prevenir dessas reações pós-punção;
- 6 Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo, pois todas as vezes que houver necessidade de retorno para uma nova punção venosa devido ao aproveitamento de uma quantidade pequena de sangue da minha primeira coleta, voltarei ao Hospital

Estadual Américo Brasiliense, Hospital Nestor Goulart Reis – Américo Brasiliense/SP, Serviço Especial de Saúde de Araraquara-SESA da Faculdade de Saúde Pública-USP, ou Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular da Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapia do Centro de Referência Diagnóstica “Prof. Antônio Longo”-NAC/FCF Araraquara-UNESP no dia do meu retorno médico, ou seja, a pedido do mesmo, caso eu não esteja internado;

- 7 Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos (a não ser aqueles citados no item 5) ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou da Instituição (Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP, Hospital Estadual Américo Brasiliense, Hospital Regional Nestor Goulart Reis, Américo Brasiliense – SP, Serviço Especial de Saúde de Araraquara-SESA da Faculdade de Saúde Pública-USP);
- 8 Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
- 9 Estou ciente de que o material a ser doado será utilizado exclusivamente nesta pesquisa, a qual será desmembrada em dois projetos: “Influência do *Mycobacterium tuberculosis* sobre a modulação das funções de Linfócitos TCD4+ e expressão de p24 na infecção pelo HIV” e “Determinação dos genótipos para o polimorfismo dos receptores de IgG, Fc γ RIIA (H/R131) e Fc γ RIIIB (NA1/NA2), e estudo de funções efectoras dos neutrófilos em indivíduos infectados pelo HIV e/ou *Mycobacterium tuberculosis*”, não podendo ser armazenado para uso posterior sem o meu consentimento;
- 10 Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização, isto é, sem nenhuma interrupção do meu tratamento;
- 11 Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica pelos telefones: UNESP (16) 3301-6100 (ramal 6109); Juliana Cristina da Silva: pessoal (16) 9714-5813, Carolina Maria Quinello Gomes de Faria: pessoal (16) 91116684, Paulo Inácio da Costa: (16)33016549;
- 12 Para notificação de qualquer situação de anormalidade que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP (16)

33016897, Hospital Regional Nestor Goulart Reis, Américo Brasiliense – SP (16)
33921914 e Serviço Especial de Saúde de Araraquara – SESA (16) 33223090.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar da pesquisa:

“Influência da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* associada ou não a infecção pelo HIV sobre a modulação das funções efetoras de linfócitos TCD4+ e o polimorfismo de receptor de imunoglobulina G (Fc γ R) relacionado à atividade fagocítica de neutrófilos do sangue periférico”.

Araraquara, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do Voluntário

Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
Orientador

Juliana Cristina da Silva
Pesquisadora Responsável

Carolina Maria Quinello Gomes de Faria
Pesquisadora Responsável

Via do Voluntário

APÉNDICE 4

Termo de doação de material biológico

Eu,....., RG
....., Nacionalidade, maior e responsável,
estado civil, Profissão,
Residente....., Cidade,

Estado, no pleno gozo de minhas faculdades mentais e de minha livre e espontânea vontade autorizo a retirar amostra de meu sangue, a qual será doada e utilizada na pesquisa “Determinação dos genótipos para o polimorfismo dos receptores de IgG, Fc γ RIIa (H/R131) e Fc γ RIIIb (NA1/NA2), e estudo do *burst* oxidativo dos neutrófilos em indivíduos infectados pelo HIV e/ou *Mycobacterium tuberculosis*”, sob a responsabilidade do(a)

Araraquara,/...../.....

.....

APÉNDICE 5

FcγRIIa (CD32)

NCBI Reference Sequence: NM_001136219.1

Homo sapiens Fc fragment of IgG, low affinity Ila, receptor (CD32) (FCGR2A), transcript variant 1, mRNA

ORIGIN

```
1 ctcttttcta agcttgtctc ttaaaccaca ctggacgttg gcacagtgct
gggatgacta
61 tggagaccca aatgtctcag aatgtatgtc ccagaaacct gtggctgctt
caaccattga
121 cagttttgct gctgctggct tctgcagaca gtcaagctgc agctcccca
aaggctgtgc
181 tgaaacttga gccccgtgg atcaacgtgc tccaggagga ctctgtgact
ctgacatgcc
241 agggggctcg cagccctgag agcgactcca ttcagtgggt ccacaatggg
aatctcattc
301 ccaccacac gcagcccagc tacaggttca aggccaaca caatgacagc
ggggagtaca
361 cgtgccagac tggccagacc agcctcagcg accctgtgca tctgactgtg
ctttccgaat
421 ggctggtgct ccagaccct cacctggagt tccaggaggg agaaaccatc
atgctgaggt
481 gccacagctg gaaggacaag cctctggtca aggtcacatt cttccagaat
ggaaaatccc
541 agaaattctc cca/gtttgat cccaccttct ccatcccaca agcaaaccac
agtcacagtg
601 gtgattacca ctgcacagga aacataggct acacgctggt ctcatccaag
cctgtgacca
661 tcactgtcca agtgcccagc atgggcagct cttaccaat ggggatcatt
gtggctgtgg
721 tcattgcgac tgctgtagca gccattgttg ctgctgtagt ggccttgatc
tactgcagga
781 aaaagcggat ttcagccaat tccactgatc ctgtgaaggc tgcccaattt
gagccacctg
841 gacgtcaaat gattgccatc agaaagagac aacttgaaga aaccaacaat
gactatgaaa
901 cagctgacgg cggctacatg actctgaacc ccagggcacc tactgacgat
gataaaaaca
961 tctacctgac tcttctccc aacgaccatg tcaacagtaa taactaaaga
gtaacgttat
1021 gccatgtggt catactctca gcttgctgag tggatgacaa aaagagggga
attgttaaag
1081 gaaaatttaa atggagactg gaaaaatcct gagcaaaca aaccacctgg
cccttagaaa
1141 tagctttaac tttgcttaa ctacaaacac aagcaaaact tcacggggtc
atactacata
```

1201 caagcataag caaaacttaa cttggatcat ttctggtaaa tgcttatggt
 agaaataaga
 1261 caaccccagc caatcacaag cagcctacta acatataatt aggtgactag
 ggacttttcta
 1321 agaagatacc tcccccaaa aaacaattat gtaattgaaa accaaccgat
 tgccttttatt
 1381 ttgcttccac attttcccaa taataacttg cctgtgacat tttgccactg
 gaacactaaa
 1441 cttcatgaat tgcgcctcag atttttcctt taacatcttt tttttttttg
 acagagtctc
 1501 aatctgttac ccaggctgga gtgcagtggt gctatcttgg ctactgcaa
 acccgctcc
 1561 caggtttaag cgatttctcat gcctcagcct cccagtagct gggattagag
 gcatgtgccca
 1621 tcatacccag ctaatttttg ttttttttat tttttttttt tagtagagac
 agggtttcgc
 1681 aatgttggcc aggccgatct cgaacttctg gcctctagcg atctgcccgc
 ctcggcctcc
 1741 caaagtgctg ggatgaccag catcagcccc aatgtccagc ctctttaaca
 tcttctttcc
 1801 tatgccctct ctgtggatcc ctactgctgg tttctgcctt ctccatgctg
 agaacaaaat
 1861 cacctattca ctgcttatgc agtcggaagc tccagaagaa caaagagccc
 aattaccaga
 1921 accacattaa gtctccattg ttttgccttg ggatttgaga agagaattag
 agaggtgagg
 1981 atctggtatt tcctggacta aattcccctt ggggaagacg aagggatgct
 gcagttccaa
 2041 aagagaagga ctcttccaga gtcatctacc tgagtcccaa agctccctgt
 cctgaaagcc
 2101 acagacaata tgggcccaaa tgactgactg caccttctgt gcctcagccg
 ttcttgacat
 2161 caagaatctt ctgttccaca tccacacagc caatacaatt agtcaaacca
 ctggtattaa
 2221 cagatgtagc aacatgagaa acgcttatgt tacaggttac atgagagcaa
 tcatgtaagt
 2281 ctatatgact tcagaaatgt taaaatagac taacctctaa caacaaatta
 aaagtgattg
 2341 tttcaagggtg atgcaattat tgatgaccta ttttattttt ctataatgat
 catatattac
 2401 ctttgtaata aaacattata accaaaaca

Em azul: oligo-iniciadores sense e anti-sense.

Em vermelho: ponto de polimorfismo **A→H G→R**

FcγRIIIb (CD16)

NCBI Reference Sequence: X52645.1

Human Fc-gamma RIII-2 cDNA for Fc-gamma receptor III-2

ORIGIN

```
1 tctttggtga cttgtccact ccagtgtggc atcatgtggc agctgctcct cccaactgct
61 ctgctacttc tagtttcagc tggcatgcgg actgaagatc tcccaaaggc
tgtggtgttc
121 ctggagcctc aatggtacag g/cgtgctc/tgag aaggacagtg tgactctgaa
gtgccaggga
181 gcctactccc ctgaggacaa ttccacacag tggtttcaca atgagag/aacct
catctcaagc
241 caggcctcga gctacttcat tgacgc/ctgcc acagtcg/aacg acagtggaga
gtacagggtgc
301 cagacaaacc tctccaccct cagtgaccgg gtgcagctag aagtccata/gt
cggctggctg
361 ttgctccagg cccctcggtg ggtgttcaag gaggaagacc ctattcacct
gaggtgtcac
421 agctggaaga aactgctct gcataaggtc acatatttac agaatggcaa
aggcaggaag
481 tattttcatc ataattctga cttctacatt ccaaagcca cactcaaaga
cagcggctcc
541 tacttctgca gggggctttt tgggagtaaa aatgtgtcct cagagactgt
gaacatcacc
601 atcactcaag gtttggcagt gtcaaccatc tcatcattct ttccacctgg
gtaccaagtc
661 tctttctgct tggatgatgg actccttttt gcagtggaca caggactata
tttctctgtg
721 aagacaaaca ttcgaagctc aacaagagac tgggaaggacc ataaatttaa
atggagaaaag
781 gaccctcaag acaaatgacc cccatcccat gggggtaata agagcagtag
cagcagcatc
841 tctgaacatt tctctggatt tgcaacccca tcatcctcag gcctctc
```

Em verde: NA1

Em amarelo: NA2

Em vermelho: oligo-iniciadores segundo COVAS et al., 2004 (254b).

CAPÍTULO 2



Elsevier Editorial System(tm) for Human Immunology
Manuscript Draft

Manuscript Number: HIM-D-11-00011

Title: Determination of the genotypes for the FcγRIIa (H/R131) and FcγRIIIb (NA1/NA2) IgG receptors polymorphism and study of neutrophil effector functions in HIV and/or Mycobacterium tuberculosis -infected individuals

Article Type: Research Article

Keywords: Key words: polymorphism; neutrophils; oxidative burst; FcγR

Corresponding Author: Mr. Carolina Maria Quinello Gomes de Faria,

Corresponding Author's Institution: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP

First Author: Carolina Maria Quinello Gomes de Faria

Order of Authors: Carolina Maria Quinello Gomes de Faria

Abstract: The FcγR mediates important biological responses, especially the activation of neutrophils and the activation and regulation of their functions may be involved in the pathophysiology of various diseases and inflammatory processes. Our studies investigated the effect of neutrophils's oxidative burst against infection with M. tuberculosis, HIV-1, or co-infection by both to investigate possible dysfunctions of these cells. Then we did the genotyping to the polymorphism of FcγRIIa and FcγRIIIb receptors, which are an important link between the humoral and cellular immune responses, participating actively in innate response, mediating biological responses related to the elimination of antigens, in order to assess a possible relation with our results. The results were unable to show any relationship between ROS (reactive oxygen species) and the different allelic forms for the receptors CD32 and CD16 when activation of neutrophils was not induced by IgG immune complexes.

Suggested Reviewers: Cristina R Oliveira
Universidade Federal de Goiás
oliveira.criss@gmail.com

Marc Daeron
Dept. d'Immunologie, Institut Pasteur
daeron@pasteur.fr

Jane E Salmon
Hospital for Special Surgery
salmonj@hss.edu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



January, 2011

To

Editor-in-Chief: Human Immunology

Dear Sir,

I'm sending the manuscript "**Determination of the genotypes for the Fc γ RIIa (H/R131) and Fc γ RIIIb (NA1/NA2) IgG receptors polymorphism and study of neutrophil effector functions in HIV and/or *Mycobacterium tuberculosis* –infected individuals**" to be submitted for publication. The paper was read and approved by all authors. The study was performed according to the international and institutional rules considering human experiments, clinical studies and biodiversity rights.

With best wishes,

Dr. Paulo Inácio da Costa,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
Departamento de Análises Clínicas, Rua Expedicionários
do Brasil, No. 1621, Araraquara, SP, Brasil, CEP 14.801-
902
Phone: + 55 16 3301-5713
E-mail: costapi@fctfar.unesp.br

Determination of the genotypes for the FcγRIIa (H/R131) and FcγRIIIb (NA1/NA2) IgG receptors polymorphism and study of neutrophil effector functions in HIV and/or *Mycobacterium tuberculosis* -infected individuals

Carolina Maria Quinello Gomes de Faria^a, Ana Carolina Urbaczek^a, Luiz Marcos da Fonseca^a, Paulo Inácio da Costa^a

^aDepartamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Centro, Araraquara-SP, CEP 14801-360, Brasil

Corresponding author: Carolina Maria Quinello Gomes de Faria

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Centro, Araraquara-SP, CEP 14801-360, Brasil

TEL: +55 16 3301 5713 carolruiva_6@hotmail.com

carolina.quinello@gmail.com

Key words: polymorphism, neutrophils, oxidative burst, FcγR

FcγR polymorphism and oxidative burst

Abstract

The Fc γ R mediates important biological responses, especially the activation of neutrophils and the activation and regulation of their functions may be involved in the pathophysiology of various diseases and inflammatory processes. Our studies investigated the effect of neutrophils's oxidative burst against infection with *M. tuberculosis*, HIV-1, or co-infection by both to investigate possible dysfunctions of these cells. Then we did the genotyping to the polymorphism of Fc γ RIIa and Fc γ RIIIb receptors, which are an important link between the humoral and cellular immune responses, participating actively in innate response, mediating biological responses related to the elimination of antigens, in order to assess a possible relation with our results. The results were unable to show any relationship between ROS (reactive oxygen species) and the different allelic forms for the receptors CD32 and CD16 when activation of neutrophils was not induced by IgG immune complexes.

Key words: polymorphism, neutrophils, oxidative burst, Fc γ R

Abbreviations: reactive oxygen species, ROS; tuberculosis, TB; immune complexes, IC; receptors for the Fc portion of class G immunoglobulin, Fc γ R; Polymerase Chain Reaction, PCR; dinucleotide triphosphate, dNTP; Solução Salina Tamponada com Fosfato, PBS; PBS-Dulbecco's, PBS-D; Tris-Borato-EDTA, TBE; Neutrophil Antigen 1, NA1; Neutrophil Antigen 2, NA2.

1. Introduction

The association between phagocytosis dysfunction mediated by Fc γ R in HIV infection and, especially, in co-infection with *Mycobacterium tuberculosis*, has been widely described in scientific literature (ref). Tuberculosis (TB) is the most common opportunistic infection among HIV-infected patients and the most frequent cause of death among patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). It is known that HIV infection makes the patient susceptible to opportunistic infections such as tuberculosis, and these co-infections increase the potential for viral replication. The inefficiency of the immune complexes (IC) clearance mechanism and then phagocytosis may contribute to increased susceptibility to opportunistic infections in HIV-infected individuals. The determination of the genotypes for the polymorphic variants of functional receptors for the Fc portion of class G immunoglobulin (Fc γ R) and combinations of different genotypes, may constitute an important marker for the pathogenesis of HIV infection in co-infection with *M. tuberculosis* or *M. tuberculosis* alone, i.e. independent of infection by AIDS virus. Thus, the aim of this study was to determine the genotypes for the Fc γ RIIA (CD32; H/R131) and polymorphisms of Fc γ RIIIb (CD16; NA1/NA2) receptor in patients with HIV-1 co-infected with *M. tuberculosis* or infected by *M. tuberculosis* only, as well as evaluating the phagocytic function via the cell wall polysaccharides-induced oxidative burst from *Saccharomyces cerevisiae*, known as zymosan, in neutrophils from peripheral blood of these patients.

2. Material and methods

2.1. Study groups

The study group consisted of patients undergoing treatment at the Regional Hospital Nestor Goulart Reis of Américo Brasiliense - SP, State Hospital of Américo Brasiliense, the Special Health Service of Araraquara - SESA School of Public Health - USP volunteers and donors Blood Hemonúcleo Araraquara - UNESP. The study population consisted of 76 adult individuals, 27 of those being HIV positive patients of both sexes, divided into two groups: Group HIV - HIV-infected patients (n = 20) and Group HIV/TB - patients co-infected with active *Mycobacterium tuberculosis* and HIV (n = 7). There was also the TB Group - comprised of patients infected with active *Mycobacterium tuberculosis* alone (n = 24) and the control group of healthy individuals of both sexes (n = 25). The study was approved by the ethics committee, with the authorization of the hospitals and patients.

2.2. Determination of neutrophils oxidative burst by luminol-dependent chemiluminescence

Five milliliters of blood collected from each patient into a tube containing EDTA-K2 as anticoagulant were used to obtain the neutrophils, which were subsequently subjected to luminol-dependent chemiluminescence in order to measure neutrophils oxidative burst. Separation of neutrophils was performed by Histopaque 1119 and Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. We used two sterile buckets for each patient, one of which corresponded to the background or negative control, which was composed of 100 µL of Luminol, the amount of cell suspension required to contain 1x10⁶ cells/mL and the required amount of PBS-D to achieve 1000 uL. The other bucket corresponded to the sample and possessed the same components as the background, plus 100

µL of opsonized zymosan. The reading was held for 1 hour in luminometer BioOrbit - 1251 Luminometer.

2.3. Extraction of genomic DNA

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by salting out technique described by Miller et al. (1988) and Abdel-Rahman (1994) with some modifications. We subsequently evaluated the DNA quality and integrity by electrophoresis in 0.8% agarose gel.

2.4. Analysis of genotypes

The analysis of FcγR allelic polymorphism was performed by polymerase-aided amplification of genomic DNA (PCR: Polymerase Chain Reaction), using allelespecific oligonucleotides (primers). As a control for DNA contamination of reagents, two controls containing all the reaction mixture except DNA, were also included and subject to the same reaction conditions of the other tubes with the DNA samples. For all PCR reactions, the reaction mixture consisted of: DNA sample (except control), allelespecific sense and anti-sense oligonucleotides, the Taq polymerase enzyme, the deoxynucleotides, buffer solution with appropriate amounts of chloride potassium (KCl), magnesium chloride solution (MgCl₂) and sterile distilled water to complete the reaction volume. FcγRIIA-H131 and FcγRIIA-R131 allelic forms result in the following variants: H131 and R131. This way, for the analysis of FcγRIIA allelic polymorphism a PCR was performed for each DNA sample using a pair of allele-specific primers – sense (5 'cag gga gag gaa acc atc 3') specific to a position prior to the polymorphism point and anti-sense (5 'ggt cac agg gat ctt gga 3') specific to a position posterior to the polymorphism (which is present at position 131 of exon 4). For each reaction

we used 2.5 μL of buffer containing KCl (Invitrogen - concentrated 10 times), 1 μL of MgCl_2 (Invitrogen - 50 mM), 0.5 μL of dinucleotide triphosphate mix (dNTP) (dNTP Mix - Promega - 10 mM), 2.5 μL of sense primer (Bioneer - 10 pmol / μL), 2.5 μL of antisense primer (Bioneer - 10 pmol / μL), 0.1 μL of recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen - 5 U/ μL) and 13.9 μL of sterile distilled water, enough to complete 23 μL of Mix, which were added to an eppendorf tube containing 2 μL of DNA sample, totaling 25 μL of volume per sample. The reactions were performed in a cycler Gene Amp automatic temperature PCR System 2400 (Perkin Elmer) in the following standardized conditions in the laboratory, Hot start: 95 ° C x 4 minutes, followed by 30 cycles: 95 ° C x 1 min, 52 ° C x 2 minutes, 72 ° C x 1 min, and extension: 72 ° C x 1 min, 4 ° C x ∞ . The allelic forms Fc γ RIIIB-NA1 and Fc γ RIIIB-NA2 result in the polymorphic variants: the NA1 and NA2 allo-antigens, respectively. Thus, for the analysis of Fc γ RIIIB allelic polymorphism a PCR was performed for each DNA sample using a pair of allele-specific primers - sense (5 'aag atc tcc caa agg ctg tgg 3') specific to a position previous to the first polymorphism point to be evaluated (position 141) and antisense (5 'atg gac ttc ctg cac tag 3') specific to a position after the position 277 polymorphism. For each reaction we used 5.0 μL of buffer containing KCl (Invitrogen – 10 times concentrated), 1.5 μL MgCl_2 (Invitrogen - 50 mM), 1.0 μL of the dinucleotide triphosphate mix (dNTP) (dNTP Mix - Promega - 10 mM), 5.0 μL of sense primer (IDT Integrated DNA Technologies - 10 pmol/ μL), 5.0 μL of anti-sense primer (IDT Integrated DNA Technologies - 10 pmol/ μL), 0.2 μL Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen - 5 U/ μL) and 30.3 μL of sterile distilled water, enough to complete 48 μL of Mix, which were added to an eppendorf tube containing 2 μL of DNA sample, totaling 50 μL reaction per sample. The reactions were performed in a cycler Gene Amp automatic temperature PCR System 2400 (Perkin Elmer) in the following standardized conditions in the laboratory, and the Hot start: 94 ° C x 5 minutes followed by 35

cycles: 94 ° C x 1 min, 57 ° C x 1 minute, 72 ° C x 1 min, and extension: 72 ° C x 10 minutes, 4 ° C x ∞.

2.5. Electrophoresis of PCR products

The DNA fragments amplified by PCR, for FcγR polymorphic variant, were subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gel in TBE buffer pH 8.3. For marking the number of base pairs in each gel was added to the first well a solution containing 5 μL of dye (Bromophenol Blue GelRed +) and 8 μL of the standard base pairs (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen, GeneRuler™ or 50 bp DNA Ladder - Fermentas). The race lasted about an hour and half to 100 V. Then the gel was taken to a revelation in translu ultraviolet (ingenius - Syngene) where the photo documentation was performed using the software GeneSnap.

2.6. Samples sequencing

The products of PCRs were purified by Wizard® SV Gel kit and PCR Clean-Up System (Promega), according to the manufacturer's instructions for subsequent sequencing. Electrophoresis in 1.0% agarose gel was performed to evaluate the quality of DNA samples. Then, each sample (1 uL) was quantified by spectrophotometer ND- 1000 (Nanodrop). After checking the quality and quantification of DNA in the samples purified PCR product was sequenced by the chain termination method (SANGER et al., 1977). The ET Dye Terminator kit DYEnamic™ Cycle Sequencing Kit (MegaBACETM – GE Healthcare) was used with the manufacturer. In combination, the same primers used for PCR analysis for the allelic forms FcγRIIA-H131 and FcγRIIAR131 and FcγRIIIB-NA1 and FcγRIIIB-NA2 were used in this procedure: The amplification was performed from the following conditions: an initial cycle of 96 °C for 2 minutes followed by 30 cycles of 95 °C for 20 seconds, 50 °C for 15

seconds and 60 °C for 1 minute and 15 seconds. The reaction was precipitated in ethanol and ammonium acetate 7.5 M under the instructions of the manufacturer. The product generated in each reaction was subjected to separation and detection using an automatic sequencer MegaBACE™ 1000 Flex (GE Healthcare). The sequence analysis was performed by the software Sequence Analyser Base Caller Cimarron 3.12 (GE Healthcare).

2.7. Statistical analyses

The assessments of associations between two categorical variables: Study groups (Control, HIV, TB and HIV / TB), CD32, CD16 and viral load were analyzed by chisquare test or Fisher's exact test. Comparisons between two quantitative variables were performed by Mann-Whitney test, whereas for more than two quantitative variables, we used the Kruskal-Wallis test, complemented, when significant, multiple comparisons by the Dunn test. To quantify the correlations between quantitative variables was employed Spearman's coefficient with their significance determined by Student's test. In all statistical procedures we adopted the significance level of 5% for decision making.

3. Results

3.1. Extent of neutrophils oxidative burst luminol-dependent chemiluminescence

Figure 1 shows the kinetics of the integrals of four patients, one from each study group. Through these four examples it's possible to see the difference between the responses to the same stimulus for each patient, according to the infection presented or not by these patients. The TB patient group, infected with active tuberculosis, and one that presents co-infection showed a lower value of chemiluminescence compared to patients from HIV and

control groups. Table 1 presents detailed descriptive statistics (median, minimum and maximum values) of neutrophils oxidative burst in each study group. To further analyze the cases in which the Kruskal-Wallis test showed significant difference ($p < 0.05$), we applied the nonparametric multiple comparison Dunn test, with the results summarized in the Table below. It was observed that the Control group showed higher levels of oxidative burst, while the HIV group presented an intermediate value, equivalent to the values of all other groups. TB and HIV/TB groups showed similar burst values, both significantly lower when compared to control group. A good view of these results is shown in Figure 2.

3.2. Extraction and characterization of genomic DNA

Figure 3 presents the electrophoresis of DNA samples taken from some of the volunteer patients. After analysis of the bands in the agarose gel, it was concluded that DNA samples had integrity and quality suitable for use in the following steps. The different color intensities among the bands are due to the different concentrations of DNA present in each sample.

3.3. Alotyping of Fc γ R

The amplified fragments for Fc γ RIIA-H131 and Fc γ RIIA-R131 allelic forms both had 210 bp. Figure 4 shows the analysis of PCR products for H-131 and R-131 alleles from some volunteer patients and allows us to observe the electrophoretic profile of PCR products. Through photo documentation of the 1.5% agarose gel is possible to observe bands containing 210 bp. Each well has an individual sample which was subsequently sequenced for the evaluation of its genotype, i.e. for determining the Fc γ RIIa polymorphism. The amplified fragments had 254 bp. Figure 5 shows the analysis of PCR products, both for NA1 and NA2

alleles of some volunteer patients. Each well has an individual sample which was subsequently sequenced for the evaluation of its genotype, i.e. for determining the FcγRIIIb polymorphism. Seventy-six patients participated in the study; from 25 patients in the control group, 18 were genotyped for FcγRIIa (CD32) and 19 for FcγRIIIb (CD16). From 20 patients in the HIV group, 14 were genotyped for FcγRIIa (CD32) and 11 for FcγRIIIb (CD16). Of 24 patients who belonged to the TB group, 12 were genotyped for FcγRIIa (CD32) and 9 to FcγRIIIb (CD16). Only seven patients constituted the group with HIV/TB. This reduced number of samples indicates the low incidence of patients diagnosed with co-infection even in regional centers of reference and expertise in treating these infections. Of these seven, five patients were genotyped for FcγRIIa (CD32) and none for CD16.

Tables 2 and 3 show the distributions of absolute frequencies and percentages of CD32 and CD16 genotypes, respectively, according to each study group. Table 4 first shows the descriptive statistical analysis for FcγRIIA-H131 and FcγRIIAR131 allelic forms which result in the variants H131 and R131 (CD32) in relation to the oxidative burst in each study group. Then it's presented the analysis concerning the FcγRIIIB-NA1 and FcγRIIIB-NA2 allelic forms that result in NA1 and NA2 (CD16) polymorphic variants in relation to the burst showed by the study groups. Considering the study group and genotype for CD32, the Control group also showed higher oxidative burst, but the only significant difference was between the patients in the control group, who presented the HR allotype, and the HIV/TB group who presented the RR allotype.

The Kruskal-Wallis test failed to identify significant differences ($p > 0.05$) relating to the burst, between groups and alleles for CD16 genotype. To detail the analysis of cases where the Kruskal-Wallis test showed significant difference ($p < 0.05$), we applied the Dunn nonparametric multiple comparison test.

3.4. Alignment of sequences

Each sequence resulting from the sequencing of each patient was aligned according to the known sequence corresponding to the receptor. To this end, we used programs offered by the NCBI, where it's possible to make the alignment of two or more sequences using the BLAST. For CD16, due to the numerous polymorphic points found in the sequence (positions 141, 147, 227, 277 and 349), after alignment, we proceeded the DNA translation through the "Translate a DNA Sequence" program for the determination NA1/NA2 alleles to be possible, through the analysis of corresponding amino acids for each polymorphic position.

4. Discussion

In mammals, phagocytosis of foreign particles is favored by the binding of immunoglobulin receptors for the Fc portion (FcR) in professional phagocytes (neutrophils and macrophages). After the internalization of the pathogen there's production of ROS and release of lysosomal enzymes and cytokines. The reactive oxygen species can be generated by mechanisms dependent on myeloperoxidase (MPO) released from cell granules, and by mechanisms independent of MPO. Such oxidative metabolism is mediated by an enzyme complex associated with the cytoplasmic membrane, called nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH) oxidase, which catalyzes the reduction of an electron from the oxygen to $O_2^{\circ-}$ by donating electrons at the expense of NADPH (CHANOCKF et al. 1994; Babior, 1988).

The precursor of these reactive oxidants is the $O_2^{\circ-}$. Most of this radical production is converted to H_2O_2 . This can be counteracted by intracellular peroxidases or catalase, resulting in the production of H_2O and O_2 . However, most of the H_2O_2 produced by neutrophils is converted to HOCl by the action of the enzyme MPO. Moreover, there is also the production

of $\bullet\text{OH}$, 1O_2 , ONOO^- , $\text{NO}_2\bullet$ (Babior, 1973; HAMPTON, 1998; Silva, 2001). It is believed that the decrease in neutrophil response may contribute to increased susceptibility to certain secondary infections, as may occur in patients infected with HIV-1, for example. Studies have shown defects in neutrophil chemotaxis and death in certain types of bacterial infections (Bandra et al. 1993; SHALEKOFF et al., 1998). Shalekoff and colleagues (1998) evaluated these same study groups, and obtained no significant differences between any of the groups in the percentage of granulocytes capable of undergoing oxidative stress. However, the capacity of reactive oxygen species production was significantly different between groups, showing significant differences between the control group and the one composed of patients infected by HIV/TB ($p < 0.001$), between the control group and the group composed of patients only infected with *M. Tuberculosis* ($p < 0.001$), the HIV group compared to the TB group ($p < 0.05$) and between the HIV group and the group composed of patients infected by both HIV and TB (HIV/TB group) ($p < 0.05$). Significant difference was not found between the control group and the HIV group ($p > 0.05$). These data from the literature corroborate our results, because our research has also shown a relationship between the impairment of ROS production by neutrophils from patients who presented infection by *M. tuberculosis*. Table 1 and Figure 2 express these results. It was possible to observe that the Control group showed higher levels of oxidative burst, while the HIV group presented an intermediate value equivalent to the values of all other groups. While TB and HIV/TB groups showed equivalent burst values and were both significantly lower when compared to control group ($p < 0.002$). The fact that neutrophils are able to eliminate the mycobacteria is still debatable. According to Cortés and colleagues (2009) several authors who found this metabolic activity were unable to find an association with the oxidative burst. However, due to efficient phagocytosis and subsequent ROS production being important mechanisms for the killing of microorganisms by neutrophils, defects in one or both of these functions may lead to impairment of intracellular

killing of pathogens, predisposing the individual infected with TB to even more opportunistic infections, as shown by studies conducted by Gomma and others (2004) through analysis of phagocytic cells by flow cytometry during active pulmonary tuberculosis. It is possible that depression of polymorphonuclear functions in these patients is also a result of anti-TB therapy and not of tuberculosis alone, since the duration of treatment did not appear to result in improvement of their function (since our patients were using TB medication for 3 months or longer). Furthermore, studies have shown that the phagocytic ability of neutrophils increase significantly in patients with active pulmonary TB before treatment (RIEGER et al., 1979).

Our analysis also confirms these results because there was no correlation between the time of anti-TB therapy with increased levels of oxidative burst of neutrophils in these patients. Shalekoff and colleagues (1998) also suggested that because neutrophils from patients infected with HIV do not have such impaired functions, the non-oxidative killing mechanisms may be impaired and therefore the greater predisposition of these patients to infection by mycobacteria and greater susceptibility of patients with co-infection compared to those with TB only. In our studies, although there were no statistically significant differences when comparing the HIV and HIV/TB groups in relation to the burst, when we observe the kinetics of the integrals (example of a patient from each group is illustrated in Figure 1) and the graph in Figure 2 both the median and maximum values are different. The co-infection group has always showed lower values in relation to the HIV group. Yet, the HIV/TB group showed lower maximum values when compared to the TB group, indicating a greater deficiency in neutrophil function than the other group. However, we must take into account the small number of patients who compose the group of co-infection. It is well described that Fc γ RIIa H/R 131 and Fc γ RIIIb NA1/NA2 allotypes differ regarding their functional capacity. It was suggested by Bredius et al. (1994) that the biological differences of the functional activity between NA1 and NA2 allotypes apply to IgG1 and IgG3 as follows: phagocytic

capacity of NA2 homozygous against bacteria opsonized with IgG1 and IgG3 is lower than that of NA1. This may be due to differences in immunoglobulin binding to the receptor, as Salmon did not find an identical binding capacity to IgG1 between the alleles. Also, when using flow cytometry it was possible to observe a greater amount of bacteria in neutrophils which showed homozygosity for NA1 allotype, suggesting that NA1 has greater active internalization.

In our study, from the 76 patients enrolled, 39 patients were genotyped for this receptor, where 16 patients (independent groups) showed the NA1NA1 allotype, 11 presented the NA1NA2 allotype and 12 showed the NA2NA2 allotype. Table 3 shows the distributions of absolute frequencies and percentages of CD16 allotypes according to each study group. While pursuing a significant relationship between our patients' neutrophils oxidative burst in relation to genotyping for both CD32 and CD16, we were able to find significance only between patients from the control group with HR allotype when compared to those of the HIV/TB group with RR allotype. Also, no connection was found between allotypes for CD16 and oxidative burst. This may be the result of the methodology used, which assess the burst as a whole, not ROS production resulting from activation of neutrophils by IgG-opsonized immune complexes only.

Acknowledgements: This study was supported by grants from CAPES.

References:

- [1] Collins, K.R.; Quiñones-Mateu, M.E.; Toossi, Z.; Arts, E.J. Impact of Tuberculosis on HIV-1 Replication, Diversity, and Disease Progression. *AIDS Reviews* 2002. 4: 165-176.
- [2] Vermund, S.; Yamamoto, N. Co-infection with human immunodeficiency virus and tuberculosis in Asia. *NIH-PA Author Manuscript* 200787: 18-25.
- [3] Bredius, R.G.; Derkx, B.H.; Fijen, C.A.; DE Wit, T.P.; De Haas, M.; Weening, R.S.; Van De Winkel, J.G.; Out, T.A. Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism in fulminant meningococcal septic shock in children. *J Infect Dis.* 1994. 170: 848-53.
- [4] Forthal, D.N.; Landucci, G.; Bream, J.; Jacobson, L.P.; Phan, T.B.; Montoya, B. FcγRIIa genotype predicts progression of HIV infection. *J Immunol.* 2007. 179: 7916- 23.
- [5] Shalekoff, S.; Tiemessen, C.T.; Gray, C.M.; Martin, D.J. Depressed phagocytosis and oxidative burst in polymorfonuclear leukocytes from individuals with pulmonary tuberculosis with or without human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 1998. 5: 41-4.
- [6] Douek, D. Perspective – HIV disease progression: immune activation microbes, and a leaky gut. *Topics in HIV Medicine.* 2007. 15 (4): 114-7.
- [7] Siawaya, J.F.D.; Ruhwald, M.; Eugen-Olsen, J.; Walzl, G. Correlates for disease progression and prognosis during concurrent HIV/TB infection. *Int J Infect Dis.* 2007. 11: 289-99.
- [8] Corbett, E.L.; Watt, C.J.; Walker, N.; Maher, D.; Williams, B.G.; Raviglione, M.C.; Dye, C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Archives of Internal Medicine.* 2003. 163: 1009-21.
- [9] Menezes E Silva, C.H.P; Neufeld, P.M.; Leite, C.Q.F.; SATO, D.N. *Bacteriologia e Micologia: Para o Laboratório Clínico.* Livraria e Editora Revinter Ltda.: Rio de Janeiro; 2006. 317–333.

- [10] Pandolfi, J.R.; Malaspina, A.C.; Santos, A.C.B.; Suffys, P.N.; Oellemann, M.A.C.; Valentini, S.R.; Leite, C.Q.F. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007. 28 (3): 251-257.
- [11] Lopes, L.K.O.; Teles, S.A.; Souza, A.C.S.; Rabahi, M.F.; Tipple, A.F.V. Tuberculosis risk among nursing professionals from Central Brazil. *Am J Infect Control.* 2008. 36: 148-15.
- [12] Nimmerjahn, F.; Ravetch, J.V. Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nature Immunol.* 2008. 8: 34-47.
- [13] Salmon, J.E.; Edberg, J.C.; Kimberly, R.P. Fc γ RIII on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest.* 1990. 85: 1287-95.
- [14] Kimberly, R.P.; Salmon, J.E.; Edberg, J.C. Receptors for immunoglobulin G. Molecular diversity and implications for disease. *Arthritis Rheum.* 1995 38: 306.

Tables

Table 1: Descriptive statistical analysis of the oxidative burst in each study group

Group	N ^o	Oxidative Burst		p*
		median (minimum; maximum)		
Control	25	517013 (283008; 851948)		b
HIV	20	471770 (329915; 783460)		ab
TB	24	393322 (239296; 672499)		a
HIV/TB	7	356322 (261836; 430302)		a

* P value of Kruskal-Wallis test (significant if $p < 0.05$ - medians with the same letters are not significantly different by Dunn's test).

N^o: Number of patients

Table 2: Distributions of absolute frequencies and percentages of CD32 genotype according to each group

Group	CD32		Total (%)
	RR (%)	HR (%)	
Control	16 (89)	2 (11)	18 (100)
HIV	10 (71)	4 (29)	14 (100)
TB	12 (100)	0 (0)	12 (100)
HIV/TB	5 (100)	0 (0)	5 (100)

Table 3: Distributions of absolute frequencies and percentages of CD16 genotype according to each group

Group	CD16			Total
	NA1NA1 (%)	NA1NA2 (%)	NA2NA2 (%)	
Control	9 (47)	7 (37)	3 (16)	19 (100)
HIV	5 (45)	2 (18)	4 (36)	11 (100)
TB	2 (22)	2 (22)	5 (56)	9 (100)

Table 4: Descriptive statistical analysis of the oxidative burst of each group in relation to the receptor's genotype

Group	Genotype	N°	Oxidative burst		p*	
			median (minimum; maximum)			
CD32						
Control	RR	16	510767 (289719; 773345)		ab	0,018
	HR	2	506025 (445959; 566091)		b	
HIV	RR	10	471770 (332877; 783460)		ab	
	HR	4	455318 (329915; 555802)		ab	
TB	RR	12	393322 (239296; 570000)		ab	
HIV/TB	RR	5	290847 (261836; 430302)		a	
CD16						
Control	NA1NA1	9	532034 (289719; 851948)		a	0,279
	NA1NA2	7	664068 (459866; 773345)		a	
	NA2NA2	3	445959 (283008; 522786)		a	
HIV	NA1NA1	5	405688 (344781; 595005)		a	
	NA1NA2	2	487136 (382742; 591530)		a	
	NA2NA2	4	516394 (468410; 555802)		a	
TB	NA1NA1	2	444607 (379214; 510000)		a	
	NA1NA2	2	455898 (239296; 672499)		a	
	NA2NA2	5	358690 (242760; 590000)		a	

* P value of Kruskal-Wallis test (significant if $p < 0.05$ - medians with the same letters are not significantly different by Dunn's test).

N°: Number of patients

Figure Legends

Figure 1: Kinetics of integrals and their backgrounds (negative control) from one patient in each study group. A) Control Patient; B) HIV Patient; C) TB Patient; D) HIV/TB Patient; E) Comparison of the kinetics of the integrals presented by the four patients.

Figure 2: Descriptive statistics of the oxidative burst (integral area under the curve - mV) compared to the groups.

Figure 3: Photodocumentation of the gel electrophoresis for the qualitative assessment of DNA samples extracted by the method of salting out. Electrophoretic profile representation of the of DNA samples from five patients involved in the HIV group and five patients in the TB group.

Figure 4: Electrophoretic profile of PCR products for CD32 (Fc γ RIIa) samples of two patients in the control group (healthy subjects), two patients in the HIV group and two patients in the TB group. Photodocumentation submitted for the 1.5% agarose gel in TBE pH 8.3. The base pairs (bp) standard can be observed in the gel's first well and indicates the size of the fragments amplified by PCR (210 bp). The last well has no DNA and therefore represents the control for contamination of reagents.

Figure 5: Electrophoretic profile of PCR products for CD16 (Fc γ RIIIb) samples from four patients (one from each study group) presented by the photodocumentation of the 1.5% agarose gel in TBE pH 8.3. The base pairs (bp) standard can be observed in the gel's first well and indicates the size of the fragments amplified by PCR (between 200 and 300 bp).

Figures

Figure 1

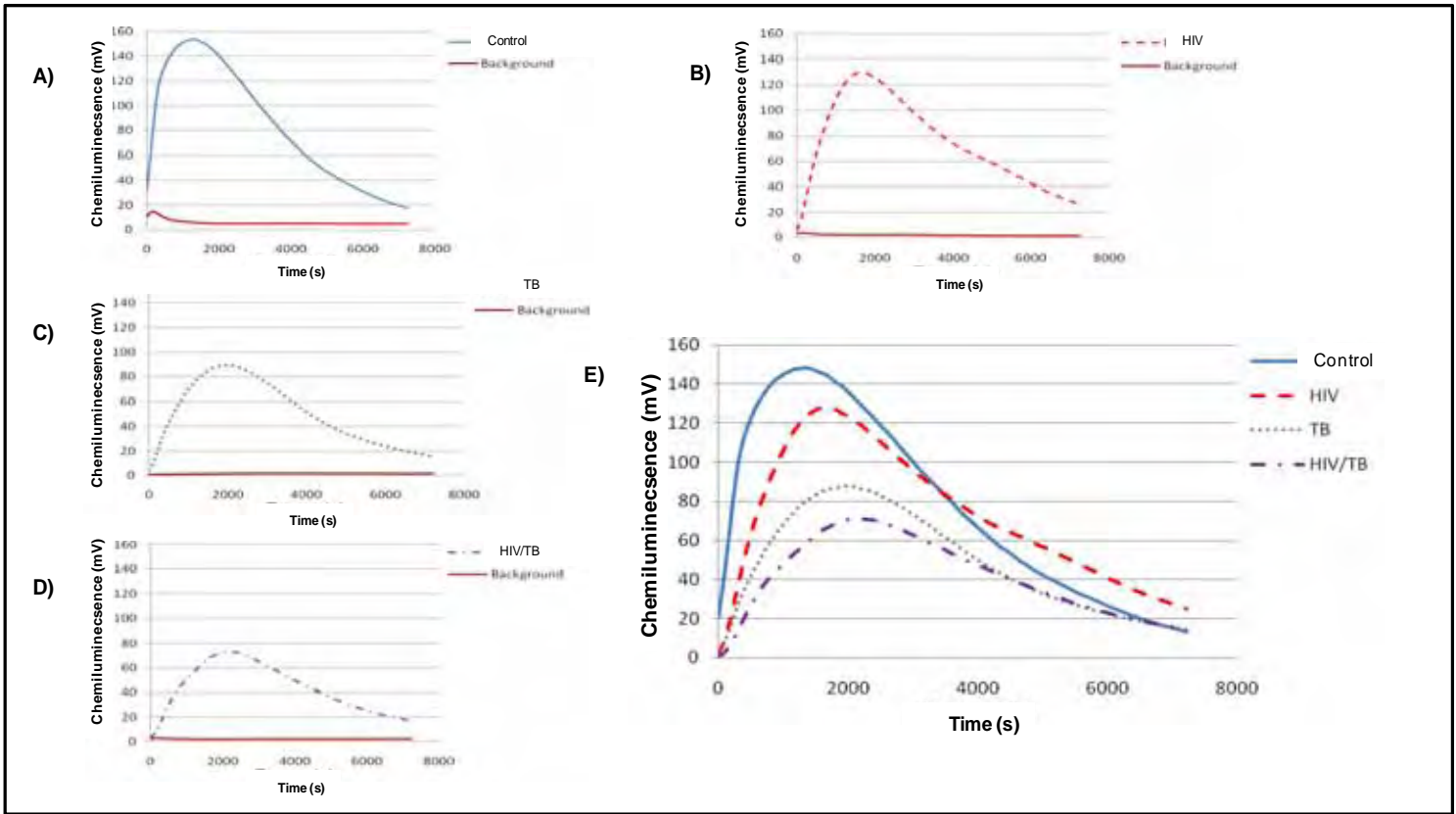


Figure 2

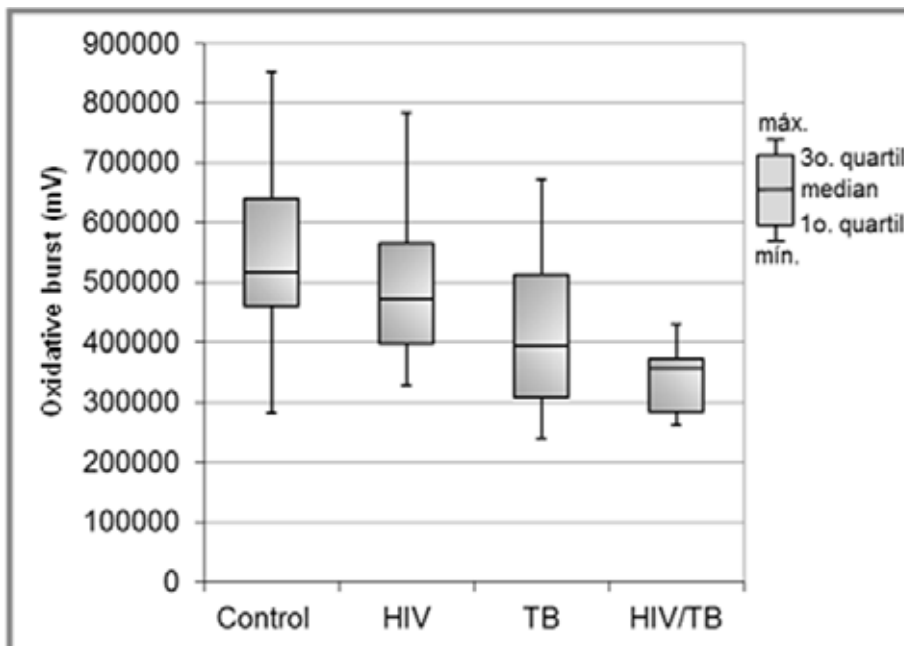


Figure 3

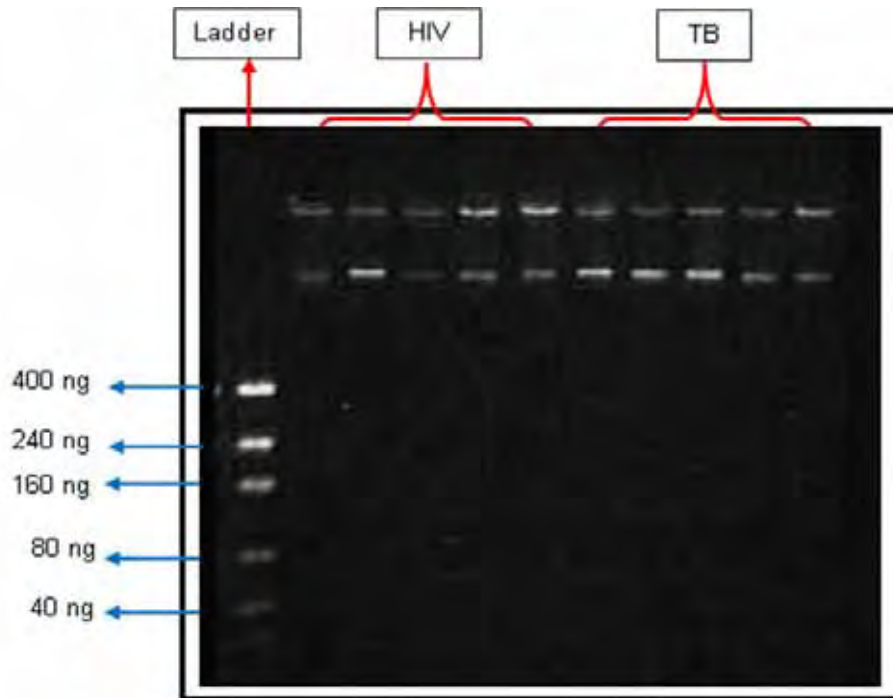


Figure 4

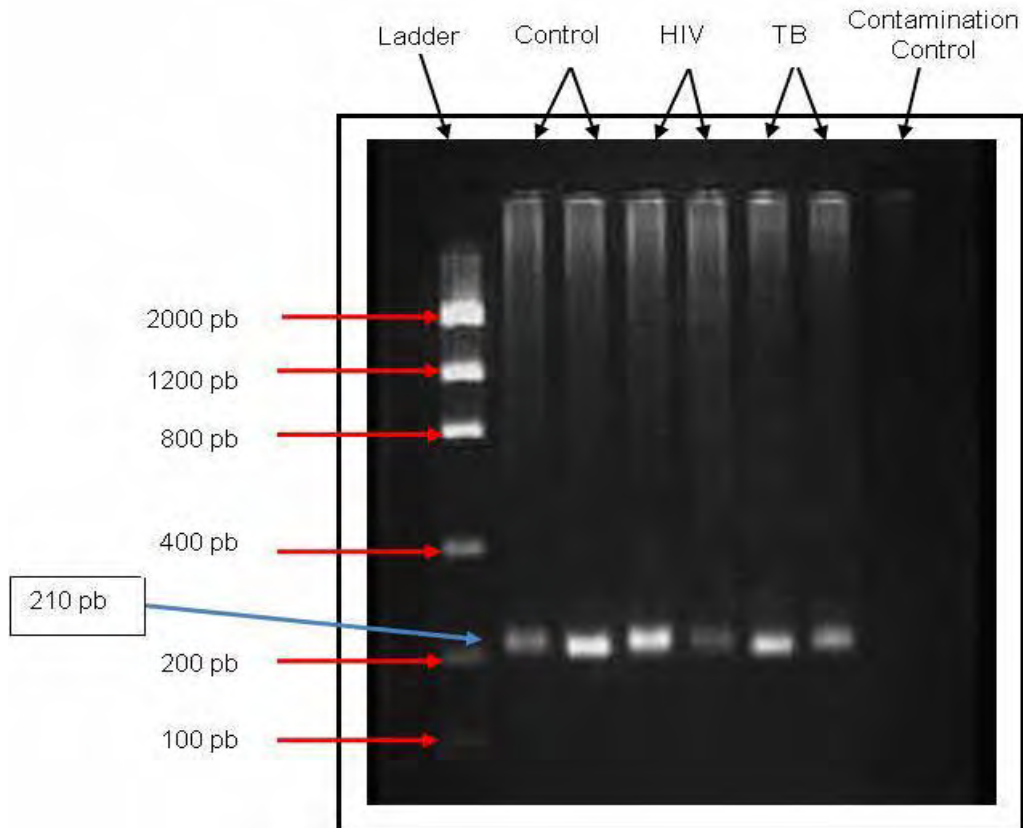


Figure 5

