



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara  
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas

**ANA CAROLINA URBACZEK**



**“*Burst* oxidativo dos neutrófilos humanos:  
estudo da influência do polimorfismo do receptor para IgG  
FcγRIIb na cooperação com os receptores para complemento”**

**Orientador: Prof. Dr. LUIZ MARCOS DA FONSECA**

**Co-orientadora: Profa. Dra. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO**

**Araraquara – SP**

**2008**

**ANA CAROLINA URBACZEK**

***“Burst oxidativo dos neutrófilos humanos:  
estudo da influência do polimorfismo do receptor para IgG FcγRIIIb  
na cooperação com os receptores para complemento”***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de mestre em Análises Clínicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

Araraquara - SP

2008

### **Ficha Catalográfica**

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

Urbaczek, Ana Carolina

U12b *Burst* oxidativo dos neutrófilos humanos: estudo da influência do polimorfismo do receptor para IgG Fc $\gamma$ RIIIb na cooperação com os receptores para complemento. / Ana Carolina Urbaczek. – Araraquara, 2008. 127 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Luiz Marcos da Fonseca

Co-orientador: Cleni Mara Marzocchi Machado

1.Receptores de IgG. 2.Neutrófilos. 3.Burst oxidativo. Hematologia. I.Fonseca, Luiz Marcos, orient.. II.Machado, Cleni Mara Marzocchi, co-orient.. III.Título.

**CDD: 616.1507**

**CAPES: 40300005**

## COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi  
(Membro da banca)

---

Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa  
(Membro da banca)

9 de Maio de 2008

*“Não importa onde você parou...  
Em que momento da vida você cansou...  
O que importa é que sempre é possível e necessário*

*RECOMEÇAR.*

*Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...*

*É renovar as esperanças na vida*

*E o mais importante...*

*Acreditar em você de novo.*

*Sofreu muito neste período?*

*Foi aprendido...*

*Chorou muito?*

*Foi limpeza da alma...*

*Ficou com raiva das pessoas?*

*Foi para perdoá-las um dia...*

*Sentiu-se só por diversas vezes?*

*Foi porque fechaste a porta até para os anjos...*

*Acreditou naquilo que estava perdido?*

*Era o início da tua melhora...*

*Onde você quer chegar?*

*Ir alto?*

*Sonhe alto...*

*Queira o melhor do melhor...*

*Se pensarmos pequeno*

*Coisas pequenas teremos...*

*Mas, se desejarmos fortemente o melhor...*

*E, principalmente...*

*Lutarmos pelo melhor...*

*O melhor vai acontecer em nossa vida.*

*Porque sou do tamanho daquilo que vejo,*

*E não do tamanho da minha altura.”*

*(Carlos Drummond de Andrade)*

*Para meus **amigos**...*

*Saudade...*

*Um dia a maioria de nós irá se separar.*

*Sentiremos saudades de todas as conversas jogadas fora, das descobertas que fizemos, dos sonhos que tivemos, dos tantos risos e momentos que compartilhamos.*

*Saudades até dos momentos de lágrimas, da angústia, das vésperas de finais de semana, de finais de ano, enfim... do companheirismo vivido.*

*Sempre pensei que as amizades continuassem para sempre. Hoje não tenho mais tanta certeza disso.*

*Em breve cada um vai pra seu lado, seja pelo destino, ou por algum desentendimento, segue a sua vida, talvez*

*continuemos a nos encontrar quem sabe... nos e-mails trocados. Podemos nos telefonar conversar algumas bobagens...*

*Aí os dias vão passar, os meses... os anos... até este contato tornar-se cada vez mais raro. Vamos nos perder no tempo.*

*Um dia nossos filhos verão aquelas fotografias e nos perguntarão: "Quem são essas pessoas?"*

*Diremos que eram nossos amigos e isso vai doer tanto!...*

*Foram meus amigos, foi com eles que vivi os melhores anos de minha vida!*

*A saudade vai apertar bem dentro do peito...*

*Vai dar uma vontade de ligar, ouvir aquelas vozes novamente...*

*Quando o nosso grupo estiver incompleto... nos reuniremos para um último adeus de amigo...*

*E entre lágrimas nos abraçaremos . Faremos promessas de nos encontrarmos mais vezes daquele dia em diante.*

*Por fim, cada um vai para o seu lado para continuar a viver a sua vidinha isolada do passado.*

*E nos perderemos no tempo...*

*Por isso, fica aqui um pedido deste humilde amigo: não deixes que a vida passe em branco, e que pequenas adversidades sejam a causa de grandes tempestades...*

*Adoro todos vocês...*

*Autor desconhecido*

## **I CORÍNTIOS 13**

*AINDA que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, se não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.*

*E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, se não tivesse amor, nada seria.*

*E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, se não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.*

*O amor é paciente, é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.*

*O amor não arde em ciúmes, não se ufana, não se conduz inconvenientemente, Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se exaspera, não se ressentido do mal;*

*Não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade;*

*Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.*

*O amor nunca falha e jamais acaba...*

*Se eu não tivesse amor, eu nada seria...*

*“Minha bondade é tão ilimitada quanto o mar, e tão profundo como este, é o meu amor. Quanto mais te dou, mais tenho, pois ambos são infinitos”.*

*(Shakespeare)*

## **DEDICATÓRIA**

*Esta dissertação é dedicada a todos aqueles que fazem parte da minha vida... àqueles que me apoiam e me incentivam..., a Deus, aos meus pais Tercilha e Raimundo Urbaczek, à minha família, ao meu namorado Antonio Carlos Moro, aos meus amigos, aos doadores das amostras, aos funcionários da universidade e aos meus mestres Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca e Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado... ou seja... todos aqueles que contribuem para que cada vez eu alcance vôos mais altos...*

## **AGRADECIMENTOS...**

*Agradeço primeiramente a **Deus**,*

*Por ter guiado meus caminhos e por ter me conduzido até aqui...*

*Por sempre ter me dado fé, força e coragem e nunca ter me deixado desistir, pois só*

*Ele sabe como não foi fácil chegar até onde cheguei...*

*Por ter me incentivado a seguir sempre em frente, de cabeça erguida...*

*Pela sua infinita bondade, me proporcionando capacidade e oportunidade de poder estudar até muito além do que estuda a maioria da população deste país, onde a educação muitas vezes é o último item da lista de prioridades daqueles que estão à frente da nação...*

*Por ter me oferecido a oportunidade de pesquisar e quem sabe, algum dia, tentar fazer algo por aqueles que sofrem com suas enfermidades, amenizando seus sofrimentos, e desta forma retribuir à Ele, mesmo que de forma muito pequena e simples, tudo aquilo que Ele fez e faz por mim...*

*Por ter colocado em meu caminho profissionais talentosos (meus mestres), pessoas maravilhosas! que se dedicaram imensamente a minha formação...*

*Por ter me dado amigos e um namorado adorável... pessoas que sempre me ofereceram a mão quando precisei...*

*Por ter compreendido os meus anseios e de minha família, e desta forma ter me dado a necessária coragem e ousadia para atingir meus objetivos...*

*Por ter me colocado a frente de diversas provações, mas para que através delas eu aprendesse, me tornasse mais forte e capaz de superá-las... Foram muitas lições...*

*Pela serenidade que me deu diante de todas as adversidades para que eu pudesse aceitá-las com resignação, mesmo que fosse para compreendê-las muito depois...*

*Pois hoje tenho plena certeza de que tudo tem uma razão de ser...*

*Agradeço aos meus pais, que através de muito sacrifício, incentivo e paciência, me ofereceram a oportunidade do conhecimento... abrindo as portas do meu futuro e me dando o apoio necessário para que eu caminhasse com minhas próprias pernas na trilha que me levaria aos meus objetivos, coisa que nunca foi muito fácil, pois a estrada da vida é tortuosa e cheia de pedras... mas ao longo dela aparecem pessoas tão maravilhosas que a tornam muito mais bonita e que nos fazem prosseguir.*

*Agradeço, por terem me mostrado durante toda a minha existência que o caminho do sucesso está no trabalho, na verdade e na dedicação.*

*Agradeço também, por sempre terem acreditado em mim e por nunca terem medido esforços para a minha formação pessoal e profissional, deixando muitas vezes seus próprios sonhos de lado para viverem os meus e torná-los reais.*

*Agradeço ainda, por tantas as vezes que suportaram a minha ausência e silenciosamente assumirem meus medos e emoções. Foi através de seus exemplos de vida, que aprendi a lutar com amor e perseverança pelos meus ideais.*

*E por terem estado sempre presentes nos momentos bons e difíceis de minha caminhada posso dizer que este trabalho também é uma conquista de vocês!*

*Agradeço a minha família, em especial, tia Edith e Penha, por todo o apoio, incentivo, generosidade e por acreditarem em mim, saibam que o caminho até aqui não foi nada fácil, mas vocês contribuíram para que ele se tornasse suportável, a conquista deste trabalho também é dedicada a vocês... obrigada por tudo...*

*Às primas Heloísa e Thaís, pelo apoio nas horas de desânimo e por toda a torcida mesmo de tão longe.*

*Ao meu namorado, Antonio Carlos Moro, meu amor e um grande ser humano, sinto muito orgulho por estar ao seu lado, sei que posso contar sempre com você pra tudo, muito obrigada pelo amor, carinho, compreensão, cumplicidade, apoio e incentivo nos momentos em que a vontade era jogar tudo pra cima e fugir, nestas horas você me trazia à realidade novamente e com uma simples palavra tudo parecia estar bem de novo. "Foi assim como ver o mar... a primeira vez que meus olhos... se viram no seu olhar... não tive a intenção de me apaixonar... mera distração e já era o momento de se gostar..." (Todo azul do mar)*

*Agradeço também aos meus avós (in memoriam), que sempre torceram por mim e intercediam a Deus pelas minhas conquistas, acredito que hoje vocês continuam a interceder por mim, só que agora muito mais de perto de Deus...*

*Deixo aqui minha lembrança e meu carinho...*

*Aos meus grandes amigos conquistados ao longo da vida, Patrícia (“cabeça” – minha grande amiga-irmã dos anos de faculdade, saudades...), Camila Tita (amiga de faculdade e agora de pós), Kelin (amiga, conselheira e guia em Ribeirão Preto rs...), Fabiana, Ariane, Mari, Fábio, Gi, Rafa e Paty (estes últimos 5, amigos de churrasco, de piscina, de passeios, de comilanças... amigos pra todas as horas...). Vocês que sempre torceram por mim, que me deram conselhos valiosos, que me ofereceram uma palavra amiga quando eu mais precisava... sintam-se aqui lembrados com muito amor e carinho... que nossa amizade seja mais do que eterna...*

*À Carol (ruiva), minha “anexa”, estagiária, amiga, companheira e psicóloga rs... quantas foram as PCRs hein Carol??? Quantas horas de termociclador??? Quantos géis??? Mas entre uma coisa e outra sempre havia tempo para uma história, uma fofoquinha, uma brincadeira... muito obrigada pelo companheirismo... você é uma grande parceira!!! Obrigada!!!*

*Aos amigos da Hematologia, Max, Pâmela, Débora, Karina e Marília, foi muito bom conviver com vocês...*

*Às amigas de pós, Aline Tansini e Mariana Santoro de Camargo, pelo companheirismo durante as aulas, pelas conversas jogadas fora e pelas angústias divididas.*

*Às amigas da Imuno, Dani Maia (a mais engraçada e despachada!), Marisa (aquela que de certa forma sempre cuidou da gente, e quem mais torceu pelo meu romance rs...), Paulinha (sempre sorridente), Micheli Sassá, Michelão (uma amiga muito querida, conselheira, muito bem humorada e companheira das saidinhas para comer, as “gordotes” rs... pena que hoje ela esteja longe), Ira, Djamile (minha amiga e companheira de rua 2, quantas foram as comprinhas hein amiga!), Camila (a consultora de moda do laboratório rs...), Marcela (uma amiga muito especial e um pouco vidente rs...), Flávia (saudades da Esquina da Esfiha!), Cleso (só você pra me encher com essa história de Polaka, com K), Dani Serinoli, Lucas (meu amigo de planos para dominar o universo!!! rs), Lívia, Alexandre, Sandra (minha amiga apaixonada por orquídeas), Alessandra, Maristela, Oedem, Ana Cláudia e Jú, muito obrigada pela convivência... apesar de oficialmente não fazer parte do laboratório de imuno, foi lá ao lado de vocês que passei talvez os melhores anos da minha vida, muitos foram os aniversários, as brincadeiras, as palhaçadas, até de cupido vocês atacaram... mas valeu por tudo... jamais me esquecerei de vocês... sempre os levarei em um lugar muito especial no meu coração.*

*À Janessa, minha amiga muito especial... a menina dos peixinhos... foi uma ótima parceria!!!... saiba que você poderá contar comigo sempre, tanto para as pesquisas como para desabafar naqueles imensos e-mails, que por sinal eu adoro ler e responder,... sua amizade é uma das boas coisas que a vida acadêmica me proporcionou... sempre fazendo parte da comunidade “as cientistas mais gatas” rs...*

*À Ângela Mikawa, uma grande amiga da ciência... muito obrigada pela ajuda inicial com os DNAs... valiosas foram as suas dicas... foi muito bom ter te conhecido.*

*Aos colegas da Micologia, Julhiany, Tati, Marcelo, Rô e Elaine, pelo auxílio durante os experimentos.*

*Às funcionárias da Faculdade, Rosemira, Rita, Angélica e Márcia, pelo alegre “bom dia” de sempre, pelas brincadeiras, pelos papos e pela amizade.*

*Às funcionárias do Hemonúcleo que me auxiliaram na coleta das amostras de sangue.*

*Aos funcionários do NAC, em especial Vera Lúcia Correa e José Edson Casterete, pelo auxílio na coleta das amostras.*

*Às funcionárias da pós-graduação, Sônia, Laura e Cláudia, pela atenção e auxílio.*

*Às funcionárias da biblioteca pela correção desta dissertação.*

*À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini, por ter autorizado a utilização do termociclador e do capturador de imagens, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.*

*À Profa. Dra. Yara e à Aninha, pelo grande auxílio para que esta pesquisa acontecesse, não tenho palavras para agradecer, muito obrigada por tudo.*

*Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Beatriz Maria Machado de Medeiros e Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, que gentilmente contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.*

*À todos os professores da minha graduação e pós-graduação pelas contribuições à minha formação e pelo incentivo à carreira acadêmica. Hoje acredito que o conhecimento seja uma das poucas coisas que se leva para sempre na vida, pois ele não tem preço e não pode ser tirado, por isso é a maior riqueza que podemos possuir.*

*À todos os doadores de sangue deste trabalho, sem os quais não haveria pesquisa, muitos deles meus amigos, que quando me viam no corredor já correriam pois sabiam que iria sobrar para eles rs... obrigada por tudo... nada se faz sem amigos...*

*Ao Prof. Dr. Roberto Passeto Falcão e a Biomédica Aglair Garcia, do laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e à Fabiana Rossetto de Moraes, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pela utilização do citômetro de fluxo.*

*À Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi-Machado, minha co-orientadora e um pouco mãe, pelo incentivo, paciência, carinho e dedicação. Muito obrigada por tudo, não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim durante todos estes anos. Foi um grande prazer e uma inesquecível lição conviver ao lado de um ser humano tão especial, possuidor de admirável conhecimento e competência como você... obrigada!!!!*

*Ao Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca, meu orientador e um pouco pai, cuja compreensão, sabedoria e simplicidade encerram sem dúvida, as principais qualidades de um grande mestre e ser humano... muito obrigada pela orientação, pelo apoio e incentivo, foi muito bom poder trabalhar ao seu lado e aprender e também ver o carinho, atenção e respeito com os quais os alunos são tratados...*

*Ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, pelo apoio e incentivo para que esta pesquisa acontecesse, obrigada pelas valiosas dicas sobre biologia molecular...*

*À CAPES pela bolsa concedida.*

*“Vivemos esperando  
Dias melhores  
Dias de paz, dias a mais  
Dias que não deixaremos  
Para trás*

*Vivemos esperando  
O dia em que  
Seremos melhores  
Melhores no amor  
Melhores na dor  
Melhores em tudo*

*Vivemos esperando  
O dia em que seremos  
Para sempre*

*Vivemos esperando  
Dias melhores pra sempre*

*Vivemos esperando...”*

*(Rogério Flausino)*

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
|       | RESUMO .....   | 20 |
|       | ABSTRACT .....   | 22 |
|       | LISTA DE FIGURAS .....   | 24 |
|       | LISTA DE TABELAS .....   | 26 |
|       | LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....   | 27 |
| 1     | INTRODUÇÃO .....   | 30 |
| 2     | OBJETIVOS .....  | 50 |
| 3     | MATERIAL E MÉTODOS .....   | 52 |
| 3.1   | Amostras de sangue .....   | 53 |
| 3.2   | Extração e caracterização do DNA genômico .....  | 53 |
| 3.2.1 | Extração por método de <i>salting out</i> .....  | 53 |
| 3.2.2 | Quantificação de DNA na amostra e avaliação qualitativa da pureza .....  | 55 |
| 3.2.3 | Verificação da qualidade e da integridade do DNA .....   | 55 |
| 3.3   | Análise dos genótipos .....  | 56 |
| 3.3.1 | Análise do genótipo FcγRIIA .....  | 57 |
| 3.3.2 | Análise do genótipo FcγRIIB .....  | 58 |
| 3.3.3 | Análise do genótipo SH .....   | 60 |
| 3.4   | Eletroforese dos produtos da PCR .....   | 62 |
| 3.5   | Determinação da expressão dos receptores para IgG (FcγRIIa/CD32 e FcγRIIb/CD16) e para complemento (CR1 e CR3) nos neutrófilos ..... | 62 |
| 3.6   | Medida do <i>burst</i> oxidativo dos neutrófilos .....   | 64 |
| 3.6.1 | Obtenção dos neutrófilos .....   | 64 |
| 3.6.2 | Fonte de complemento .....   | 65 |
| 3.6.3 | Imunocomplexos .....   | 65 |
| 3.6.4 | Medida do <i>burst</i> oxidativo por quimioluminescência dependente de luminol .....   | 66 |
| 3.7   | Forma de análise dos resultados .....  | 67 |
| 3.7.1 | Análises Estatísticas .....  | 67 |
| 4     | RESULTADOS .....   | 68 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 4.1 | Extração e caracterização do DNA genômico .....  | 69  |
| 4.2 | Alotipagem do Fc $\gamma$ RI .....   | 69  |
| 4.3 | Análise da frequência dos alótipos NA1, NA2 e SH .....   | 74  |
| 4.4 | Análise da frequência dos genes H-131 e R-131.....   | 76  |
| 4.5 | Análise das combinações dos genótipos .....  | 76  |
| 4.6 | Medida do <i>burst</i> oxidativo dos neutrófilos .....   | 77  |
| 4.7 | Quantificação dos Fc $\gamma$ R (Fc $\gamma$ RIIa/CD32 e Fc $\gamma$ RIIIb/CD16) e dos receptores para complemento (CR1 e CR3) nos neutrófilos por citometria de fluxo ..... | 85  |
| 5   | CONCLUSÕES .....   | 98  |
| 6   | DISCUSSÃO .....  | 100 |
| 7   | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 112 |

## RESUMO

Os receptores para a porção Fc das IgG (Fc $\gamma$ R) estão amplamente expressos nas células do sistema imune e podem estimular uma variedade de respostas efetoras. Três classes de Fc $\gamma$ R são descritas nos humanos: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII e Fc $\gamma$ RIII. O neutrófilo expressa constitutivamente as isoformas Fc $\gamma$ RIIIa (CD32) e Fc $\gamma$ RIIIb (CD16), as quais apresentam um polimorfismo funcional decorrente do polimorfismo alélico. No Fc $\gamma$ RIIIa, a substituição da histidina (H) pela arginina (R) na posição 131 resulta nas variantes polimórficas Fc $\gamma$ RIIIa-R131 e Fc $\gamma$ RIIIa-H131, que diferem quanto à capacidade de ligação à IgG2 humana. Quanto ao Fc $\gamma$ RIIIb (CD16), o polimorfismo genético é responsável pela expressão dos antígenos de neutrófilo (NA)1, NA2 e SH e resulta em um maior número de sítios de glicosilação em NA2. O Fc $\gamma$ RIIIb é responsável pela aproximação dos ligantes na membrana para o Fc $\gamma$ RIIIa e também interage com o receptor para complemento tipo 3 (CR3) na superfície celular.

A cooperação entre os Fc $\gamma$ RIIIa/IIIb com o CR3 promove a estimulação máxima das respostas do neutrófilo, dentre elas o *burst* oxidativo. Uma vez que a interação Fc $\gamma$ RIIIb/CR3 ocorre via sítio de ligação lectina-sacarídeo, o objetivo deste estudo foi avaliar se o polimorfismo alélico do Fc $\gamma$ RIIIb poderia afetar a cooperação entre os Fc $\gamma$ R e os CR em mediar o *burst* oxidativo dos neutrófilos. As freqüências dos alelos H/R-131 e NA1/NA2/SH foram analisadas por genotipagem com oligonucleotídeos alelo-específicos e reação em cadeia da polimerase e a densidade de expressão dos receptores (Fc $\gamma$ RIIIa, Fc $\gamma$ RIIIb, CR1 e CR3) foi determinada por citometria de fluxo. A distribuição dos genótipos para o Fc $\gamma$ RIIIb (n=169) foi NA1/NA2 (52,1%), NA2 (27,8%) e NA1 (20,1%). Dentre 174 indivíduos, apenas 6,3% apresentaram o gene SH. Quanto aos genótipos para o Fc $\gamma$ RIIIa (n=143), a distribuição mostrou R-131 (41,2%), H/R-131 (38,5%) e H-131 (20,3%). Os neutrófilos foram estimulados com imunocomplexos (IC) de IgG opsonizados ou não por complemento e o *burst* oxidativo medido por quimioluminescência. De um modo geral, a opsonização com complemento aumenta o *burst* oxidativo confirmando os dados da literatura. A cooperação

dos CR com os Fc $\gamma$ RIIIb em indivíduos NA2/NA2 não foi tão eficiente quanto nos outros genótipos para NA. O genótipo R/NA2 apresentou uma melhor cooperação entre os receptores para gerar o *burst*. Quanto à expressão de CD16, observou-se uma diferença significativa na expressão de CD16 entre os grupos R/NA2 e HR/NA1/2. Observou-se uma correlação positiva e significativa entre CR3 e CD16. A correlação entre os receptores estudados, em alguns casos, pode ser influenciada pelas diferentes combinações de genótipos.

**Palavras-chave:** Receptores de IgG; neutrófilos; *burst* oxidativo.

## ABSTRACT

Receptors for immunoglobulin G (Fc $\gamma$ R) are known to be expressed on many cells of the immune system and they can trigger a variety of biological responses. Human Fc $\gamma$ R belong to the Ig superfamily and three classes of these receptors have been recognized: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIII, with different affinities and specificities for IgG subclasses. Neutrophils express the Fc $\gamma$ RIIIa (CD32) and Fc $\gamma$ RIIIb (CD16) isoforms, which display a functional polymorphism due to biallelic polymorphisms. In the case of Fc $\gamma$ RIIIa, an arginine (Fc $\gamma$ RIIIa-R131) or histidine (Fc $\gamma$ RIIIa-H131) at amino acid position 131 determines receptor affinity for IgG2, Fc $\gamma$ RIIIa-H131 being the isoform with highest affinity. On neutrophils, the Fc $\gamma$ RIIIb bears the neutrophil antigen (NA) polymorphism, NA1, NA2 and SH, NA2 being the more glycosylated isoform. Cooperation of Fc $\gamma$ RIIIb with Fc $\gamma$ RIIIa and CR3 (complement receptor type 3) is necessary for efficient neutrophil responses, including the oxidative burst. Since the Fc $\gamma$ RIIIb/CR3 cooperation occurs via lectin-sacharide-like interaction, the aim of this study was to evaluate whether the allelic polymorphism, NA1 and NA2, could influence the cooperation of Fc $\gamma$ RIIIb with CR3 in mediating the oxidative burst of neutrophils. Fc $\gamma$ RIIIa and Fc $\gamma$ RIIIb genotyping analysis were performed by polymerase chain reaction with allele-specific primers and surface expressions of Fc $\gamma$ RIIIa, Fc $\gamma$ RIIIb, CR1 and CR3 on neutrophils were determined by flow cytometry. The Fc $\gamma$ RIIIb genotype distribution (n=169) was NA1/NA2 (52.1%), NA2 (27.8%) and NA1 (20.1%). SH gene was found in 11 (6.3%) volunteers from 174 subjects. With respect to the Fc $\gamma$ RIIIa genotype (n=143), the distribution observed was R131 (41.2%), H/R131 (38.5%) and H (20.3%). Neutrophils were stimulated with immune complexes (IC)-IgG opsonized or not with complement and the oxidative burst was measured by chemiluminescence. Overall the opsonization with complement increased the oxidative burst, as described in literature. In neutrophils homozygous for NA2, the cooperation of CR3 with Fc $\gamma$ RIIIb was not efficient, in contrast with those observed in other genotypes for NA. The most efficient cooperation between Fc $\gamma$ R and CR in mediating the

oxidative burst was observed in neutrophils with the combination of the homozygosity R and NA2. Analysis of combinations of the FcγRIIIa (R/H) and FcγRIIIb (NA1/NA2) gene variants revealed that the FcγRIIIb (CD16) expression on neutrophils was significantly different between R/NA2 and HR/NA1/NA2 groups. In addition, overall there was a positive correlation between CD16 and CR3 expressions on neutrophils, but the combinations of the HR/NA alleles may influence the correlation between the receptors studied.

**Key words:** Receptors for IgG; polymorphism; complement receptors; neutrophils; oxidative burst.

## LISTA DE FIGURAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1  | Esquema representativo do complexo NADPH oxidase na membrana da célula e suas subunidades.....   | 32 |
| Figura 2  | Representação esquemática da família de receptores humanos para Fc de Imunoglobulina G (FcγR).....   | 39 |
| Figura 3  | Representação esquemática das variantes polimórficas dos receptores humanos para Fc de imunoglobulina G (FcγR).....  | 43 |
| Figura 4  | Avaliação qualitativa das amostras de DNA extraídas pelo método de <i>salting out</i> .....  | 69 |
| Figura 5  | Perfil eletroforético dos produtos da PCR para amplificação do DNA com os oligonucleotídeos <i>sense</i> e <i>anti-sense</i> alelos-específicos para NA1 (141pb) e NA2 (221pb) em gel de agarose 2% em TBE pH 8,3. ....          | 70 |
| Figura 6  | Perfil eletroforético dos produtos da PCR para amplificação do DNA com os oligonucleotídeos <i>sense</i> e <i>anti-sense</i> alelos-específicos para SH (191pb), em gel de agarose 2% em TBE pH 8,3.....                         | 72 |
| Figura 7  | Perfil eletroforético dos produtos da PCR para amplificação do DNA com os oligonucleotídeos “sense” e “anti-sense” alelos-específicos para H-131 e R-131 (253pb) em gel de agarose 2% em TBE pH 8,3. ....                        | 73 |
| Figura 8  | População de neutrófilos obtida a partir do método de gelatina. Lâmina preparada por citocentrifugação. Coloração de Leishman (microscopia de luz com aumento de 100x).....  | 78 |
| Figura 9  | Padronização da concentração de imunocomplexos. Medida do <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos ( $2 \times 10^6$ ) estimulados com diferentes concentrações de IC-IgG. Ensaio representativo de 3 experimentos individuais..... | 78 |
| Figura 10 | Representação do perfil de QL registrado (mV) para os diferentes estímulos. Neutrófilos ( $2 \times 10^6$ ) de um indivíduo homocigoto para o genótipo FcγRIIB-NA1 para 60μg de diferentes estímulos.....                        | 79 |

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| Figura 11    | Medida da QL-dependente de luminol.....   | 80 |
| Figura 12    | QL dos neutrófilos agrupados segundo as diferentes combinações dos genótipos do FcγRIIIb e do FcγRIIa.....  | 81 |
| Figura 13    | Cooperação dos CR para aumentar o <i>burst</i> oxidativo dos neutrófilos. ....  | 82 |
| Figura 14    | Análise da cooperação dos CR com os FcγR em mediar o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos, de indivíduos com genótipos NA1, NA2 e NA1/2, mediado por FcγR (IC-IgG) e/ou FcγR/CR (IC-IgG/SHN).....  | 83 |
| Figura 15    | Perfil de QL dentro do grupo NA2, separado de acordo com as combinações dos genótipos HR para FcγRIIa.....  | 84 |
| Figura 16    | Perfil de QL dentro do grupo HR, separado de acordo com as combinações de genótipos para NA.....  | 85 |
| Figura 17    | Histogramas representativos dos ensaios de citometria de fluxo para determinação da expressão dos FcγR, FcγRIIa (CD32) e FcγRIIIb (CD16), nos neutrófilos (PMN) humanos de 83 amostras.....         | 86 |
| Figura 18    | Histogramas representativos dos ensaios de citometria de fluxo para determinação da expressão dos receptores para complemento, CR1 (CD35) e CR3, nos neutrófilos (PMN) humanos de 55 amostras. .... | 87 |
| Figura 19A-B | Análise da expressão de CD16 e CD32 por citometria de fluxo, nos neutrófilos de indivíduos com diferentes combinações dos genótipos para HR/NA.....   | 88 |
| Figura 20A-B | Análise da expressão de CR3 e CR1, por citometria de fluxo, nos neutrófilos de indivíduos com diferentes combinações dos genótipos para HR/NA.....  | 89 |
| Figura 21A-F | Análise da correlação da expressão dos receptores CD16, CD32, CR3 e CR1.....  | 90 |
| Figura 22A-I | Análise da correlação entre CD16 e CR3 nas diferentes combinações de genótipos HR/NA.....   | 92 |
| Figura 23A-I | Correlações entre CR1 e CD16 nas diferentes combinações de genótipos HR/NA.....   | 94 |
| Figura 24A-I | Correlações entre CD32 e CD16 nas diferentes combinações de genótipos HR/NA.....  | 96 |

## LISTA DE TABELAS

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Tabela 1  | Distribuição e propriedades dos Fc $\gamma$ R humanos.....   | 34  |
| Tabela 2  | Seqüências dos oligonucleotídeos e das condições de PCR para a alotipagem dos Fc $\gamma$ R.....   | 61  |
| Tabela 3  | Distribuição dos genótipos Fc $\gamma$ R $\text{IIIB}$ e SH e freqüência dos alelos NA1/2.....   | 75  |
| Tabela 4  | Freqüência das combinações dos genótipos NA1/2 e SH.....   | 75  |
| Tabela 5  | Distribuição dos genótipos e freqüência dos alelos Fc $\gamma$ R $\text{IIA}$ .....  | 76  |
| Tabela 6  | Freqüência das combinações observadas para os genótipos Fc $\gamma$ R.....   | 77  |
| Tabela 7  | Comparação entre as freqüências dos genótipos para Fc $\gamma$ R $\text{IIIb}$ entre diferentes populações.....  | 109 |
| Tabela 8  | Comparação entre as freqüências dos genótipos para SH entre diferentes populações.....   | 109 |
| Tabela 9  | Comparação entre as freqüências dos genótipos para Fc $\gamma$ R $\text{IIa}$ entre diferentes populações.....   | 110 |
| Tabela 10 | Comparação entre as freqüências dos genótipos combinados para Fc $\gamma$ R $\text{IIIb}$ /SH entre diferentes populações.....                         | 110 |
| Tabela 11 | Comparação entre as freqüências dos genótipos combinados para Fc $\gamma$ R $\text{IIa}$ /Fc $\gamma$ R $\text{IIIb}$ entre diferentes populações..... | 111 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                       |   |
|-----------------------|---|
| A:                    | Adenina   |
| ADCC:                 | <i>Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity</i>    |
| Ala:                  | Alanina   |
| Asp:                  | Asparagina  |
| Ag:                   | Antígeno  |
| BD:                   | <i>Becton &amp; Dickinson</i>                           |
| BSA:                  | Albumina de Soro Bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> ) |
| Domínio C:            | Domínio Citoplasmático                                  |
| C:                    | Citosina  |
| °C:                   | Graus Celsius   |
| C3:                   | Componente do Complemento 3                             |
| C3b:                  | Componente 3b do complemento                            |
| C3bi:                 | Fragmento inativado do componente C3b do complemento    |
| CD:                   | <i>Cluster of Differentiation</i>                       |
| cm:                   | Centímetros   |
| CR:                   | Receptor para Complemento                               |
| CR1:                  | Receptor para Complemento tipo 1                        |
| CR3:                  | Receptor para Complemento tipo 3                        |
| DNA:                  | Ácido desoxiribonucléico                                |
| dNTP:                 | Dinucleotídeo Trifosfato                                |
| DO:                   | Densidade Ótica   |
| EC:                   | Extracelular  |
| EC1:                  | Domínio Extracelular 1                                  |
| EC2:                  | Domínio Extracelular 2                                  |
| EDTA.K <sub>2</sub> : | Sal Dipotássico do Ácido Etilenodiaminotetracético      |
| EDTA.Na <sub>2</sub>  | Sal Dissódico do Ácido Etilenodiaminotetracético        |
| ERO:                  | Espécies Reativas de Oxigênio                           |
| F:                    | Fenilalanina  |
| FACS:                 | <i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>                |
| Fc:                   | Fragmento cristalizável                                 |
| FcγR:                 | <i>Fc gamma receptors</i>                               |
| FcRn:                 | Receptor Fc Neonatal para IgG                           |

|                     |   |
|---------------------|---|
| FITC:               | Isotiocianato de Fluoresceína                         |
| G:                  | Guanina   |
| <i>g</i> :          | Força de aceleração da gravidade                      |
| G-CSF:              | Fator Estimulador de Colônia Granulocítica            |
| GM-CSF:             | Fator Estimulador de Colônia Granulocítica Monocítica |
| GN:                 | Glomerulonefrite                                      |
| GPI:                | <i>Glycosylphosphatidylinositol</i>                   |
| H:                  | Histidina   |
| HGH:                | Hormônio do Crescimento Humano                        |
| IC:                 | Imunocomplexo   |
| IFN:                | Interferon  |
| Ig:                 | Imunoglobulina  |
| IgG:                | Imunoglobulina da classe G                            |
| IL:                 | Interleucina  |
| ITAM:               | <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i> |
| ITIM:               | <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif</i> |
| KCl:                | Cloreto de Potássio                                   |
| KDa:                | Kilodáltons   |
| LES:                | Lúpus Eritematoso Sistêmico                           |
| LFA-1:              | <i>Leukocyte Function-associated Antigen-1</i>        |
| M:                  | Molar   |
| µg:                 | Microgramas   |
| µl:                 | Microlitros   |
| mg:                 | Miligramas  |
| MgCl <sub>2</sub> : | Cloreto de Magnésio                                   |
| min.:               | Minutos   |
| mL:                 | Mililitros  |
| mm:                 | Milímetros  |
| mM:                 | Milimolar   |
| MPO:                | Mieloperoxidase                                       |
| mV:                 | Milivolts   |
| NA:                 | <i>Neutrophil Antigen</i>                             |
| NA1:                | <i>Neutrophil Antigen 1</i>                           |

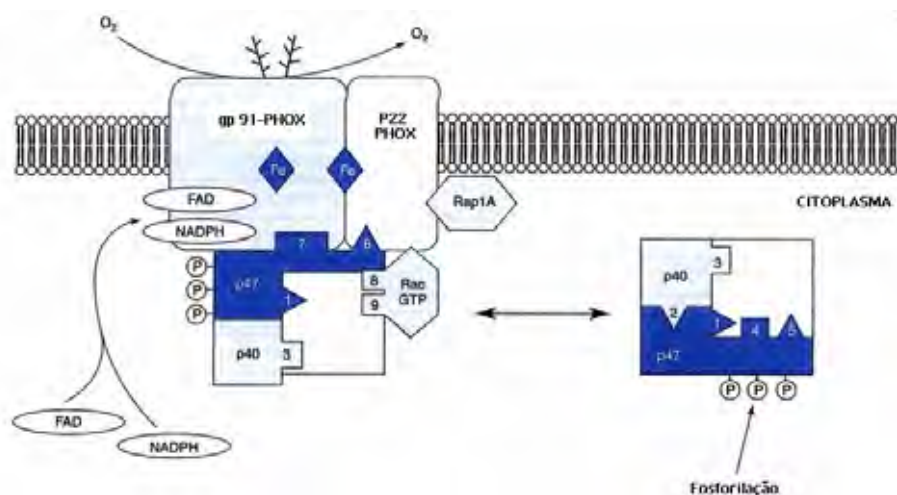
|                     |   |
|---------------------|---|
| NA2:                | <i>Neutrophil Antigen 2</i>                 |
| NAC:                | Núcleo de Atendimento a Comunidade          |
| NaCl:               | Cloreto de Sódio                            |
| NADPH:              | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido |
| NH <sub>4</sub> Cl: | Cloreto de Amônio                           |
| ng:                 | Nanogramas                                  |
| NK:                 | <i>Natural Killer</i>                       |
| nm:                 | Nanômetros                                  |
| NNA:                | Neutropenia Neonatal Aloimune               |
| pb:                 | Pares de Bases                              |
| PBS:                | Salina Tamponada com Fosfato                |
| PCR:                | Reação em Cadeia da Polimerase              |
| PE:                 | Ficoeritrina                                |
| pH:                 | Potencial Hidrogeniônico                    |
| PMN:                | Polimorfonucleares                          |
| QL:                 | Quimioluminescência                         |
| R:                  | Arginina                                    |
| RNA:                | Ácido Ribonucléico                          |
| rpm:                | Rotações por minuto                         |
| SBF:                | Soro Bovino Fetal                           |
| SDS:                | Dodecil Sulfato de Sódio                    |
| SHN:                | Soro Humano Normal                          |
| SHNI:               | Soro Humano Normal Inativado                |
| SNP:                | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>       |
| T:                  | Timina                                      |
| TBE:                | Tris-Borato-EDTA                            |
| TEA:                | Trietanolamina                              |
| TM:                 | Transmembrana                               |
| TNF:                | Fator de Necrose Tumoral                    |
| U:                  | Unidade                                     |
| UV:                 | Ultra-Violeta                               |
| V:                  | Volts                                       |
| V:                  | Valina                                      |

## **1. INTRODUÇÃO**

## **Neutrófilos**

Os neutrófilos são células fagocíticas extremamente importantes na defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores e partículas estranhas. Nos mamíferos, a fagocitose de partículas estranhas é favorecida pela ligação das imunoglobulinas aos receptores para a porção Fc (FcR) nos fagócitos profissionais, tais como os neutrófilos e macrófagos, e a partícula opsonizada é, então, rapidamente internalizada. Esta internalização é caracterizada por uma extensão da membrana plasmática, dependente da actina, ao redor da partícula, e é seguida pela produção de espécies reativas de oxigênio, bem como pela liberação de enzimas lisossomais e de citocinas inflamatórias dos fagócitos (MAY; MACHESKY, 2001).

Após estimulação o neutrófilo é capaz de produzir um metabolismo oxidativo, não mitocondrial, referido na literatura como *burst* (surto ou explosão) oxidativo ou respiratório. O *burst* oxidativo é caracterizado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são geradas por mecanismos dependentes da mieloperoxidase (MPO) liberada dos grânulos e por mecanismos independentes da MPO. Este metabolismo oxidativo dos neutrófilos é mediado por um complexo enzimático, associado às membranas citoplasmática e dos grânulos específicos, chamado nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADPH) oxidase (Figura 1). O complexo NADPH oxidase está dormente na célula não estimulada, e é formado por sete subunidades, sendo que no estado não ativado, duas permanecem associadas à membrana da célula e cinco no citoplasma. Quando os fagócitos são expostos a estímulos adequados, as sete subunidades se unem e o complexo rapidamente se ativa (BABIOR, 1988; EL-BENNA et al., 2005).



**Figura 1-** Esquema representativo do complexo NADPH oxidase na membrana da célula e suas subunidades (LICHTMAN, et al.,2006).

Quando os neutrófilos são ativados, as ERO geradas podem, via oxidação, converter moléculas como o luminol a derivados intermediários instáveis e excitados, que quando retornam ao seu estado fundamental emitem luz na forma de fótons. Esta produção de luz, durante a reação química, é conhecida por quimioluminescência (QL) e é uma das características do *burst* oxidativo, podendo ser um indicador da ativação do metabolismo oxidativo. Desta forma, o luminol tem sido utilizado, como sonda quimioluminescente no estudo do metabolismo oxidativo dos neutrófilos. O luminol é exclusivamente oxidado pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e espécies derivadas dele sendo a enzima mieloperoxidase, presente nos neutrófilos, um importante catalisador da reação. (ALLEN, 1982). Assim, o luminol pode ser utilizado para avaliar a produção de ERO durante a estimulação dos neutrófilos (GASBARRINI et al., 1998).

Os estímulos que desencadeiam o *burst* oxidativo, envolvem uma variedade de agentes solúveis e particulados, capazes de ativar os fagócitos, podendo estar ou não revestidos por proteínas do hospedeiro (opsoninas), tais como imunoglobulinas, formando complexos antígeno-anticorpo (imunocomplexos = IC) e/ou complemento, que podem aumentar o reconhecimento da partícula pelos fagócitos. Esta ligação é mediada por receptores para a porção Fc (fragmento cristalizável) da IgG ( $Fc\gamma R = Fc\ gamma\ receptors$ )

e/ou receptores para complemento (CR) (MANTOVANI, 1975; MELAMED et al., 1982; OKHURO et al., 1995).

Desta forma, a possibilidade de se estudar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos por QL tem sido amplamente explorada e também utilizada para diferenciar doenças agudas e crônicas, o que implica na importância das alterações deste metabolismo para o significado clínico (ANTON et al., 1988; FONSECA et al., 1993; FONSECA et al., 1998). E como os neutrófilos podem ser ativados via Fc $\gamma$ R e/ou CR, as diferenças nestes podem influenciar a dinâmica de ativação destas células.

### ***Receptores para IgG (Fc $\gamma$ R)***

As imunoglobulinas da classe G (IgG) exercem inúmeras e importantes funções biológicas pelo fato de interagirem com vários tipos celulares. A base desta interação é a ligação dos domínios Fc da IgG aos Fc $\gamma$ R presentes nas membranas das células do sistema imune. Desta forma, os Fc $\gamma$ R são importantes mediadores da ligação entre as respostas imunes celular e humoral, fazendo assim a ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, com a finalidade de direcionar os imunocomplexos (IC) para as células efetoras (DAËRON, 1997b; BIEZVELD et al., 2006).

A IgG constitui 70-75% do total de imunoglobulinas (Ig) do soro humano, é a classe mais abundante nas respostas imunes secundárias e está distribuída igualmente entre os espaços intra e extravasculares. Existem quatro subclasses de IgG humana (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e elas possuem cadeias pesadas denominadas  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3 e  $\gamma$ 4, respectivamente, que diferem ligeiramente entre si na seqüência de aminoácidos. Estas quatro subclasses de IgG (IgG1-IgG4) ocorrem, aproximadamente em proporções de 66%, 23%, 7% e 4%, respectivamente (MORELL et al., 1972; SCHUR, 1987).

Inicialmente, os Fc $\gamma$ R foram descritos há mais de 30 anos como glicoproteínas de membrana e, posteriormente, formas solúveis destas moléculas foram identificadas em alguns fluídos biológicos (DAËRON, 1997b; GALON et al., 1995). Os Fc $\gamma$ R atuam como

reguladores das respostas imunes (NIMMERJAHN; RAVETCH, 2008) e a ligação da IgG aos Fc $\gamma$ R estimula uma variedade de respostas biológicas, as quais dependem de fatores como: tipo celular, tipo de receptor Fc $\gamma$  e natureza do complexo de IgG como está apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1-** Distribuição e propriedades dos Fc $\gamma$ R humanos

| Fc $\gamma$ R                    | Expressão  |   |  | Função  | Especificidade   |
|----------------------------------|--|---|--|---|--|
|                                  | Constitutiva   | Induzida  | Modulada   |   |  |
| <b>Fc<math>\gamma</math>RI</b>   | Monócitos, Macrófagos, precursores mielóides CD34 <sup>+</sup>   | Neutrófilos (IFN- $\gamma$ , G-CSF);                                    | ↑: G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10                          | Fagocitose, ADCC, Endocitose, Internalização, Apresentação de antígeno, Produção de superóxido, Liberação de: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 | Monômeros e agregados de IgG1 e IgG3 humanas   |
|                                  |  | Eosinófilos (IFN- $\gamma$ )  | ↓: IL-4, IL-3  |   |  |
| <b>Fc<math>\gamma</math>RII</b>  | <b>Ila</b> Monócitos, Macrófagos, Neutrófilos, Eosinófilos, Basófilos, Células de Langerhans, Plaquetas, Células endoteliais da placenta, Linhagem de células megacariocíticas |   | ↑: IL-4<br>↓: IFN- $\gamma$ , IL-3 (eosinófilos somente) | Ila:Fagocitose, ADCC, Endocitose, Internalização, <i>Burst</i> respiratório, Liberação de: TNF- $\alpha$ , IL-6                                   | Ila-H131: IC de IgG3>IgG1=IgG2>>IgG4<br><br>Ila-R131: IC de IgG3>IgG1>>IgG2,4<br><br>IC de IgG1 e IgG3 |
|                                  |  | <b>Ilb</b> Monócitos, Macrófagos, Células B, Subpopulações de Células T |  |   |  |
| <b>Fc<math>\gamma</math>RIII</b> | <b>Illa</b> Macrófagos, Linfócitos grandes/granulares/células NK, Células T $\gamma\delta$ , Subpopulações de monócitos  | Monócitos: TGF- $\beta$   | ↓: IL-4<br>↑: TGF- $\beta$                               | Fagocitose, ADCC, Endocitose, Internalização, Produção de superóxido, Liberação de: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Indução de apoptose           | Afinidade intermediária para IgG monomérica e IC de IgG1 e IgG3  |
|                                  |  | <b>Illb</b> Neutrófilos   | Eosinófilos: IFN- $\gamma$                               |   |  |

Fonte: MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 2005

Estas respostas incluem processos diretamente relacionados com a eliminação de antígenos tais como: fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC: *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*), geração de espécies reativas de oxigênio (indução do *burst* oxidativo), liberação de enzimas lisossomais, *clearance* de IC e regulação

da produção de anticorpos. Além do fato de que os Fc $\gamma$ R também participam da imunoregulação na patogênese de reações alérgicas (MALBEC; DAËRON, 2007), auto-imunes e inflamatórias (BIEZEVELD et al., 2006; SCHMIDT; GESSNER, 2005; TAN SARDJONO et al., 2003; DAËRON, 1997b). Esta diversidade funcional dos Fc $\gamma$ R também é atribuída ao polimorfismo genético, que introduz variações entre os indivíduos (RASCU et al., 1997), bem como à geração de formas solúveis de Fc $\gamma$ R (GALON et al., 1995) e ao sinergismo com outros receptores (ZHOU; BROWN, 1994).

Nos seres humanos, todos os Fc $\gamma$ R pertencem à superfamília das imunoglobulinas e são expressos em muitas células, principalmente nas de origem hematopoética, mas não são marcadores específicos de um clone, e uma mesma célula pode expressar mais do que um tipo deste receptor (DAËRON, 1997a). Sabe-se que os Fc $\gamma$ R não reconhecem diretamente o antígeno, mas quando a imunoglobulina se liga ao Fc $\gamma$ 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 antígeno (DAËRON, 1997a; BIEZEVELD et al., 2006),

Os Fc $\gamma$ R diferem em vários fatores, como: expressão e distribuição das diferentes classes destes receptores na superfície das células hematopoiéticas, peso molecular, afinidade (força e capacidade) de ligação às diferentes sub-classes de IgG e tipo de sinal intracelular. Sendo que a heterogeneidade destas classes de moléculas é ainda aumentada pelos polimorfismos genéticos e funcionais de algumas sub-classes ou isoformas destes receptores (Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIIA e Fc $\gamma$ RIIIB), cujos polimorfismos estão localizados nos domínios extracelulares, que são sítios de ligação de Ig e desta forma afetam a afinidade de ligação às diferentes sub-classes de IgG (DAËRON, 1997a; GESSNER et al., 1998; KIMBERLY; SALMON; EDBERG, 1995; TORKILDSEN et al., 2005).

Assim, as três principais classes de Fc $\gamma$ R reconhecidas nas superfícies celulares são: um receptor de alta afinidade Fc $\gamma$ RI (CD64) e, os de baixa afinidade, Fc $\gamma$ RII (CD32) e Fc $\gamma$ RIII (CD16), além do receptor Fc neonatal para IgG (FcRn), cada um contendo múltiplos genes

distintos e variantes nos *splicings* alternativos. Além disso, os receptores Fc $\gamma$ R exibem algumas isoformas: Fc $\gamma$ RI (CD64) - Fc $\gamma$ RIa e Fc $\gamma$ RIb; Fc $\gamma$ RII (CD32) - Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb e Fc $\gamma$ RIIc; e Fc $\gamma$ RIII (CD16) - Fc $\gamma$ RIIIa e Fc $\gamma$ RIIIb. Sendo que alguns destes genes, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIIA e Fc $\gamma$ RIIIB, demonstram determinados polimorfismos genéticos (DAËRON, 1997a; GESSNER et al., 1998; KIMBERLY; SALMON; EDBERG, 1995; TORKILDSEN et al., 2005; DE HAAS et al., 1996).

As classes de Fc $\gamma$ R são codificadas por oito genes distintos que estão localizados no braço longo do cromossomo 1 (1q21-23), nas bandas 1p13 e 1q21 (Fc $\gamma$ RI), na banda 1q22 (Fc $\gamma$ RII e Fc $\gamma$ RIII) e no cromossomo 19 nas bandas 19q13 para o FcRn. Alguns destes genes têm múltiplos *exons* e a seleção entre estes, na junção do RNA mensageiro (RNA-m) (*splicing* alternativo), pode gerar proteínas diferentes. A análise da seqüência dos RNAs-m indica a possibilidade da ocorrência de várias isoformas das três principais classes de Fc $\gamma$ R, no entanto, muitas delas ainda não foram demonstradas *in vivo* (DAËRON, 1997b; GESSNER et al., 1998; BAZÍLIO et al., 2004).

Além disso, o polimorfismo genético é responsável por variações entre os indivíduos. Por exemplo, o Fc $\gamma$ RIIa, presente em neutrófilos, possui duas variantes alotípicas, o Fc $\gamma$ RIIa-R131 e o Fc $\gamma$ RIIa-H131, sendo que o Fc $\gamma$ RIIa-R131 não liga a IgG2, ou o faz muito fracamente. Enquanto que o Fc $\gamma$ RIIIb apresenta 3 alótipos, os antígenos de neutrófilo ou antígenos de neutrófilos humanos (NA - *Neutrophil Antigen* ou HNA - *Human Neutrophil Antigens*) 1 (NA1 ou HNA-1a) e 2 (NA2 ou HNA-1b) e o SH ou HNA-1c (BUX et al., 1997; SALMON; EDBERG; KIMBERLY, 1990; STEFFENSEN; VARMING; VERSILD, 2000).

Em relação à sua estrutura molecular, os Fc $\gamma$ R podem apresentar dois ou três domínios extracelulares (EC) semelhantes aos das imunoglobulinas (*Ig-like*), que são altamente conservados entre as diferentes classes destes receptores. Além dos domínios EC, os Fc $\gamma$ R possuem domínios transmembrana (TM) e domínios citoplasmáticos (C). Sendo que o sítio de ligação para a IgG encontra-se no domínio EC de uma cadeia de aminoácidos, denominada cadeia  $\alpha$ , presente nos Fc $\gamma$ R. Alguns dos Fc $\gamma$ R são moléculas

formadas por complexos de uma ou mais cadeias ( $\gamma$ ,  $\beta$  ou  $\zeta$ ) associadas à cadeia  $\alpha$ , sendo assim conhecidos como receptores de cadeias múltiplas, enquanto outros são apenas formados pela cadeia  $\alpha$ , e por isso são conhecidos como receptores de cadeia única (GESSNER et al., 1998).

Os receptores de IgG formados por cadeias múltiplas, podem ser divididos em dois tipos principais. O primeiro tipo é representado pelos Fc $\gamma$ RI e Fc $\gamma$ RIIIa, que são compostos de uma cadeia ou subunidade  $\alpha$  ligante de IgG, semelhante àquela presente nos receptores de cadeia única. Nestes receptores, embora esta subunidade  $\alpha$  apresente domínios EC e TM, o domínio citoplasmático não possui a seqüência de aminoácidos transdutora de sinal intracelular. No entanto, as subunidades  $\alpha$  do Fc $\gamma$ RI e do Fc $\gamma$ RIIIa estão associadas a uma ou duas cadeias acessórias, que contêm tais seqüências de sinalização. Estas cadeias acessórias encontram-se na membrana celular e podem variar de acordo com o tipo celular onde estão expressas. Sendo assim, constituem as subunidades de transdução de sinal intracelular, quando há a ligação da IgG ao seu receptor (DAËRON, 1997b; GESSNER et al., 1998; FLESH; NEPPERT, 2000).

O segundo tipo de receptor de IgG, formado por mais de uma cadeia, é o FcRn, e é o que possui alta afinidade para a IgG (ORLOFF et al., 1990).

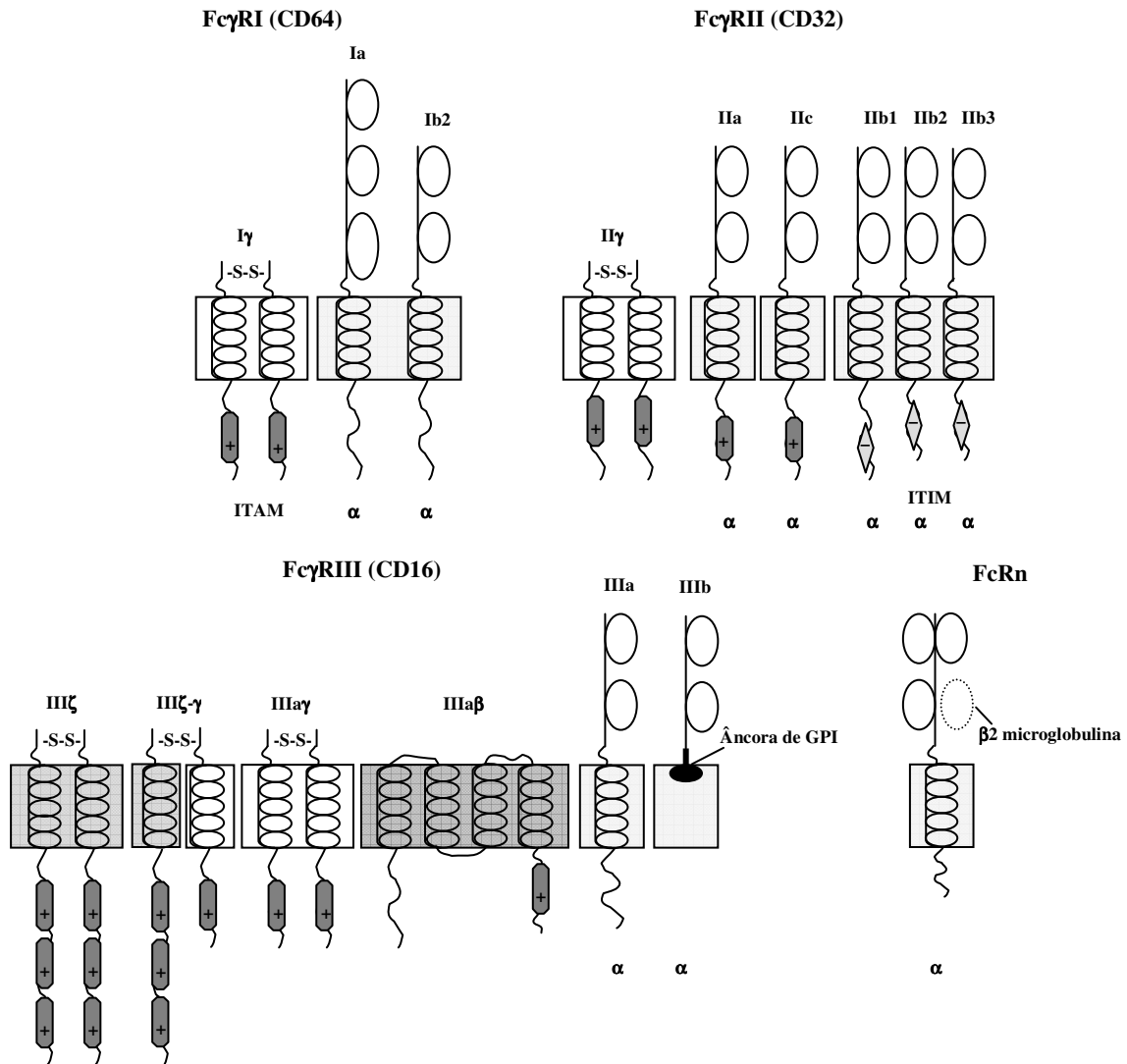
Já os Fc $\gamma$ R de cadeia única que são receptores de baixa afinidade e compreendem as isoformas: Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIIa/c e Fc $\gamma$ RIIIb. Os Fc $\gamma$ RII apresentam uma cadeia  $\alpha$  com um domínio EC, um domínio TM e um domínio C (com uma seqüência de aminoácidos responsável pela transdução de sinal intracelular). Entretanto, a cadeia  $\alpha$  do Fc $\gamma$ RIIIb não apresenta os domínios TM e C, portanto, a expressão deste receptor na membrana dos neutrófilos é mediada por uma molécula âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI: *Glycosylphosphatidylinositol*) (DAËRON, 1997b; SELVARAJ et al., 1988; ZHOU; BROWN, 1994).

De acordo com as propriedades biológicas dos Fc $\gamma$ R de membrana, podemos dividi-los em dois grupos principais sob o aspecto funcional: os Fc $\gamma$ R que induzem a ativação

celular e os Fc $\gamma$ R que não o fazem. 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 $\gamma$ RIIIa) e os de cadeias múltiplas (Fc $\gamma$ RI e Fc $\gamma$ RIIIa). O segundo grupo, o dos receptores sem ITAM, inclui os Fc $\gamma$ R que não estimulam a ativação celular e podem ser divididos em: a) receptores de cadeia única (Fc $\gamma$ RIIb), apresentando ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) no seu domínio C, que inibe a ativação celular mediada pelos receptores com ITAM, b) o Fc $\gamma$ RIIIb, que não possui domínio C e por si só não é capaz de ativar a célula, mas contribui para a sinalização graças à co-expressão com outros receptores, o Fc $\gamma$ RIIIa e o receptor para complemento tipo 3 (CR3), e c) o FcRn, 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 a fagocitose (VIDARSSON et al., 2006; DAËRON, 1997a; DAËRON, 1997b).

A interação entre Fc $\gamma$ R e IgG estimula a rápida fosforilação dos resíduos de tirosina específicos nos motivos ITAMs dos domínios citoplasmáticos do receptor ou das moléculas acessórias (DAËRON, 1997a; DAËRON, 1997b).

A Figura 2 ilustra as características estruturais da família de Fc $\gamma$ R.



**Figura 2-** Representação esquemática da família de receptores humanos para Fc de Imunoglobulina G (Fc $\gamma$ R). S-S: pontes de dissulfeto; ITAM: seqüência de ativação de imuno-receptor baseada em tirosina (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*); ITIM: seqüência 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 $\gamma$ RIIIb, todos os Fc $\gamma$ R são moléculas transmembrana. Os produtos dos genes para cada classe de Fc $\gamma$ R e suas subunidades individuais estão indicados como: *a*, *b*, e *c*; e  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\zeta$ , respectivamente. Fonte: MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 2005.

O Fc $\gamma$ RI é primariamente expresso em monócitos e macrófagos, e como já dito anteriormente, é capaz de ligar IgG monomérica com alta afinidade (GESSNER et al., 1998).

O Fc $\gamma$ RII é a classe de receptores mais amplamente distribuída e é expresso em muitos tipos de células sanguíneas (leucócitos e plaquetas) (BIEZEVELD et al., 2006). Esta classe de receptor liga IgG na forma de IC e é predominantemente expresso em células mielóides. Um total de três genes, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB e Fc $\gamma$ RIIC, codificam respectivamente três isoformas: Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb e Fc $\gamma$ RIIc. E este polimorfismo genético parece ser responsável por variações entre os indivíduos, além do fato de que estas isoformas apresentam funções divergentes, estimulatórias ou inibitórias, dependendo da presença do ITAM ou ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation/Inhibition Motifs*) no seu domínio intracitoplasmático (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 2005). Assim, a co-ligação tanto ao Fc $\gamma$ R inibitório quanto ao Fc $\gamma$ R estimulatório, pode determinar a magnitude da resposta celular efetora (VAN DEN BERG et al., 2001).

O Fc $\gamma$ RIIa está presente nos fagócitos mononucleares, neutrófilos e plaquetas, e é encontrado tanto na forma transmembrana (Fc $\gamma$ RIIa1) quanto na forma solúvel (Fc $\gamma$ RIIa2). Este tipo de receptor possui um importante e funcional polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP: *single nucleotide polymorphism*), localizado no *exon* 4 (A/G) que leva à substituição de um aminoácido, uma arginina (R) ou uma histidina (H) na posição 131, no domínio extracelular 2 (EC2) da molécula (BIEZEVELD et al., 2006; WARMERDAN et al., 1990; KUWANO et al., 2000). Assim, dois alelos são expressos co-dominantemente, o Fc $\gamma$ RIIa-R131 e o Fc $\gamma$ RIIa-H131. Estas variantes polimórficas, interagem diferentemente com as subclasses de IgG, pois esta substituição do aminoácido influencia fortemente a sua capacidade para ligar principalmente a IgG2 humana. Assim, o Fc $\gamma$ RIIa-H131 é o receptor de IgG que eficientemente liga IgG2 em humanos, enquanto o Fc $\gamma$ RIIa-R131 não o faz ou o faz muito fracamente (BIEZEVELD et al., 2006; BAZÍLIO et al., 2004; TORKILDSEN et al., 2005). Assim, o genótipo H/H induz os fagócitos à uma capacidade de fagocitose maior do que o H/R e o R/R (TORKILDSEN et al., 2005; SALMON et al., 1992). Além disso, como a IgG2 não é um potente ativador da via clássica do complemento, o Fc $\gamma$ RIIa-H131 é essencial para uma ligação eficiente de IC de IgG2 (BAZÍLIO et al., 2004) já que esta sub-

classe de IgG é a principal responsável pela resposta contra bactérias encapsuladas. Variações alélicas do Fc $\gamma$ RIIA são comuns dentro da população e podem influenciar, em certos contextos ambientais e genéticos, na suscetibilidade a doenças mediadas por IC (BAZÍLIO et al., 2004).

Quanto aos Fc $\gamma$ RIII (CD16) humanos, estes são proteínas altamente glicosiladas que possuem pesos moleculares entre 50 a 80kDa. Estes receptores são capazes de ligar IgG na forma de IC, com especificidade para IgG1 e IgG3 ( $K_a \leq 10^7 M^{-1}$ ) e pequena ligação para IgG4 e IgG2 (KIMBERLY; SALMON; EDBERG, 1995; GESSNER et al., 1998).

A diversidade molecular do Fc $\gamma$ RIII é decorrente da existência de dois genes, Fc $\gamma$ RIIIA e Fc $\gamma$ RIIIB, altamente homólogos. O produto do gene Fc $\gamma$ RIIIA é o Fc $\gamma$ RIIIa, que é um receptor transmembrana expresso em macrófagos e em células *natural killer* (NK), onde medeiam as funções citotóxicas e fagocíticas, sendo que nestas células dois alelos são expressos co-dominantemente, V158 (V: valina) e F158 (F: fenilalanina) (KOENE et al., 1997; WU et al., 1997).

Enquanto que o gene Fc $\gamma$ RIIIB codifica o Fc $\gamma$ RIIIb, exclusivamente expresso nos neutrófilos, ligado à sua membrana por GPI (também promove a estimulação do *burst* oxidativo), sendo o único Fc $\gamma$ R sem domínio TM (SELVARAJ et al., 1988; ZHOU; BROWN, 1994; TORKILDSEN et al., 2005). Mas dados experimentais, revelaram uma associação de proteínas ligadas à GPI dos Fc $\gamma$ RIIIb, com domínios particulares de membrana, ricos em tirosina quinases (BROWN; ROSE, 1992; ZHOU; BROWN, 1994).

O Fc $\gamma$ RIIIb, preferencialmente, remove pequenos complexos imunes (ou imunocomplexos) da circulação. Além disso, o Fc $\gamma$ RIIIb é liberado da membrana dos neutrófilos durante a apoptose, e na sua forma solúvel pode inibir a proliferação e a produção de imunoglobulinas por linfócitos B estimulados (BUX et al., 1997).

O gene Fc $\gamma$ RIIIB também apresenta um polimorfismo, que determina a ocorrência dos alótipos de antígenos específicos dos neutrófilos (NA - *Neutrophil Antigen*), 1 (NA1) e 2 (NA2), sorologicamente definidos (SALMON; EDBERG; KIMBERLY, 1990; BUX et al., 1997;

OMI et al., 2002).

A seqüência de nucleotídeos dos genes de NA1 e NA2 codificam 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* três, sendo que um deles (posição 147) é uma mutação silenciosa. 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 no domínio EC1, com mutações nas posições 65 e 82, dando origem a dois sítios extras de glicosilação (seis ao invés de quatro) no Fc $\gamma$ RIIIb-NA2 (SALMON; EDBERG; KIMBERLY, 1990; BREDIUS et al., 1994; ORY et al., 1989; KUWANO et al., 2000).

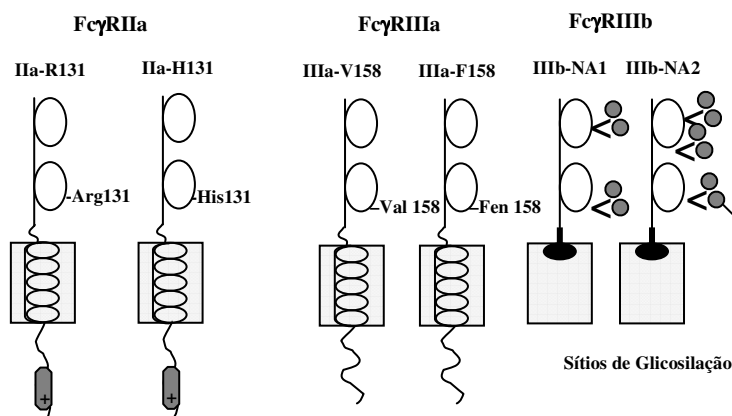
Os alótipos NA diferem em seu peso molecular relativo: de 50 a 65 kDa para Fc $\gamma$ RIIIb-NA1 e de 65 a 80 kDa para Fc $\gamma$ RIIIb-NA2. Sendo que os diferentes pesos moleculares são atribuídos aos diferentes padrões de glicosilação, dois sítios de glicosilação a mais na isoforma NA2 do que na NA1. Além disso, os alótipos também se diferenciam pela capacidade de ligação aos diferentes tipos de subclasses de IgG humanas, o que influencia fortemente a capacidade fagocítica dos neutrófilos, demonstrando que este polimorfismo pode ter conseqüências significantes para as funções fisiológicas (BUX et al., 1997; SALMON; EDBERG; KIMBERLY, 1990; KUWANO et al., 2000).

Os neutrófilos de indivíduos com o alótipo NA2 são menos eficientes para fagocitar IC com IgG1 e IgG3, quando comparados com os neutrófilos de indivíduos do alótipo NA1. No entanto, estes alótipos não apresentam diferenças quanto à fagocitose mediada por IgG2 (SALMON; EDBERG; KIMBERLY, 1990; BREDIUS et al., 1994). Desta forma, o Fc $\gamma$ RIIA e o Fc $\gamma$ RIIIB podem ser simultaneamente ligados, levando à uma colaboração na inicialização das funções integradas da célula. O polimorfismo Fc $\gamma$ RIIIB-NA1/NA2, apresenta influência sob a função do Fc $\gamma$ RIIA de forma alelo-específica. Já o Fc $\gamma$ RIIIB-NA2/NA2, apresenta uma menor ativação da fagocitose mediada por Fc $\gamma$ RIIA, quando comparada com o Fc $\gamma$ RIIIB-NA1/NA1 (OMI et al, 2002).

Vários estudos étnicos mostram variações na distribuição dos vários genótipos de FcγR (TORKILDSEN et al., 2005). Aproximadamente 0,1% da população Européia, não expressa o receptor FcγRIIIb em seus neutrófilos e conseqüentemente não apresentam os antígenos NA1 e NA2. Este fenótipo é chamado de NA-nulo é causado por uma deficiência no gene FcγRIIIB (BUX et al., 1997).

Um outro alo-antígeno ou alótipo do gene FcγRIIIB, chamado SH, foi localizado no FcγRIIIb e é resultante de uma mutação em um único nucleotídeo no gene FcγRIIIB-NA2, **C** (no indivíduo NA2) para **A** (no indivíduo SH+) na posição 266, que resulta na substituição de uma alanina por um ácido aspártico na posição 78 (BUX et al., 1997; KUWANO et al., 2000).

Um estudo de famílias confirmou que esta substituição de nucleotídeos é herdada, e corresponde ao fenótipo SH. Existe ainda uma outra hipótese de que os indivíduos SH positivos, possuam uma cópia adicional do gene FcγRIIIB, o qual pode ocorrer *in tandem* com NA2-FcγRIIIB (KOENE et al., 1998). Assim, três genes são identificados: FcγRIIIB-NA1, FcγRIIIB-NA2 e FcγRIIIB-SH (BUX et al., 1997; KOENE et al., 1998). A Figura 3 apresenta as variantes polimórficas dos FcγRIIa e FcγRIIIb.



**Figura 3-** Representação esquemática das variantes polimórficas dos receptores humanos para Fc de imunoglobulina G (FcγR): R/Arg (Arginina)-131; H/His (Histidina)-131; V/Val (Valina)-158; F/Fen (Fenilalanina)-158; NA: antígeno de neutrófilo (*neutrophil antigen*; NA1 e NA2). ITAM: seqüência de ativação de imuno-receptor baseada em tirosina (*Immunoreceptor Tyrosyne-based Activation Motif*); GPI: glicosil fosfatidil inositol (*glycosylphosphatidylinositol*). Fonte: MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 2005.

As diferenças alélicas no FcγRIIA-131 e FcγRIIIA-176 podem predispor o indivíduo às doenças auto-imunes com base numa incapacidade de realizar o *clearance* dos IC ou mudanças no sinal de transdução sob estímulos apropriados, e alguns autores relatam a ocorrência de lúpus eritematoso sistêmico (LES) em pacientes com deficiência de FcγRIIIB. Além disso, alguns estudos prévios em várias populações indicam uma possível participação ou influência dos polimorfismos de FcγRIIA, FcγRIIIA e FcγRIIIB na suscetibilidade ao LES, nefrite lúpica e artrite reumatóide. Fatos que demonstram a importância da caracterização genética dos indivíduos quanto a estes polimorfismos, para contribuir para a identificação dos fatores primários que possam estar associados com as doenças auto-imunes (GONZÁLEZ-ESCRIBAN et al., 2002).

As formas alotípicas do FcγRIIIb (NA1 *versus* NA2) também apresentam diferenças quanto à ligação e à fagocitose e podem ter relevância clínica para a suscetibilidade à doenças infecciosas. Já que este polimorfismo e a deficiência deste receptor têm sido associados à neutropenia neonatal, quando mães são alo-imunizadas em gestações anteriores, e passam anticorpos IgG anti-FcγRIIIb para o feto FcγRIIIb (+) (VANCE et al., 1993; HUIZINGA et al., 1990).

Desta forma, os polimorfismos do FcγR podem influenciar a intensidade da resposta inflamatória, além de contribuir para as diferenças na suscetibilidade às doenças infecciosas e auto-imunes. Existem ainda, variações étnicas na frequência de distribuição dos diferentes alótipos. Já que a prevalência das doenças auto-imunes e infecciosas também varia entre os diferentes grupos étnicos, pode ser que o polimorfismo destes receptores exerça importância clínica frente a estas doenças (VAN DEN BERG et al., 2001).

### ***Receptores para complemento***

Como o FcγRIIIb é incapaz de estimular a ativação celular por si só, por não possuir uma seqüência de sinalização citoplasmática, a sua interação com outros receptores na superfície celular é importante para uma resposta efetora completa, pois a cooperação do

Fc $\gamma$ RIIIb com o Fc $\gamma$ RIIIa e o CR3 é necessária para a fagocitose, ADCC e desgranulação eficientes. Além disso, a co-agregação dos Fc $\gamma$ RIIIb nos neutrófilos leva à ativação celular (ZHOU; BROWN, 1994; HUNDT; SCHMIDT, 1992).

Portanto, a ativação simultânea do Fc $\gamma$ RIIIb e CR3 leva ao *burst* oxidativo em neutrófilos, devido à fosforilação do domínio C do Fc $\gamma$ RIIIa e ao *cross-linking* do CR3, que induz a associação do Fc $\gamma$ RIIIa com o citoesqueleto (ZHOU; BROWN, 1994). Uma vez que a expressão do Fc $\gamma$ RIIIb é predominante nos neutrófilos, com  $1-3 \times 10^6$  moléculas/célula, e a expressão de Fc $\gamma$ RIIIa é de  $1-2 \times 10^4$  moléculas/célula (UNKLESS et al., 1995), há de 10 a 20 vezes mais moléculas de Fc $\gamma$ RIIIb expressas na superfície dos polimorfonucleares (PMN) do que Fc $\gamma$ RIIIa (HUIZINGA et al., 1990; ZHOU; BROWN, 1994).

Assim, alguns estudos sugerem que, em neutrófilos, o Fc $\gamma$ RIIIb, embora não possua domínios TM ou C, seria importante para o acúmulo de IC na membrana para ativar o Fc $\gamma$ RIIIa e para estimular o aumento do influxo de cálcio ( $Ca^{+2}$ ), enquanto que o Fc $\gamma$ RIIIa seria o responsável pelo potencial de membrana e geração de superóxido (BRUNKHORST et al., 1992; ZHOU et al., 1993).

Os neutrófilos expressam os receptores para complemento CR1 e CR3 em sua superfície e ambos estão implicados com a fagocitose. O CR1 (CD35) é uma proteína transmembrana e medeia a aderência de partículas, já o CR3 é uma integrina heterodimérica (CD11b/CD18 ou Mac-1), capaz de ligar vários ligantes através de diferentes sítios de reconhecimento, e a ligação de C3bi (fragmento inativado do componente 3b do complemento) leva à fagocitose da partícula. O CR1 e o CR3 ligam o componente 3b do complemento (C3b) e o C3bi com diferentes afinidades (MAY; MACHESKY, 2001).

A cooperação entre Fc $\gamma$ R e receptor para complemento (CR) nos neutrófilos para promover a fagocitose está bem estabelecida na literatura (MANTOVANI, 1975; BROWN; BOHNSACK; GRESHAM, 1988; ZHOU et al., 1993). Pelo fato da IgG e do componente do complemento 3 (C3) serem as duas principais opsoninas do soro humano, a colaboração entre os receptores para anticorpo e complemento possui um importante papel na defesa do

hospedeiro, e o sinergismo entre anticorpo e complemento ativa as funções efetoras dos fagócitos (MANTOVANI, 1975; ZHOU; BROWN, 1994).

Desde o trabalho de Ehlenberger e de Nussenzweig (1977) foi proposto que o papel da opsonização das partículas com complemento e sua interação com os CR era apenas aumentar a eficiência da apresentação de IgG para receptores Fc em fagócitos. Outros dados da literatura também apontavam para a falta de um papel para os CR na sinalização das funções destas células (ADEREM et al., 1985). Porém, outros estudos sugerem que os CR possam ter um papel direto na transdução de sinal, em funções mediadas por Fc $\gamma$ R em fagócitos. Estudos bio-físicos mostraram que o CR3, um membro da família das  $\beta_2$  integrinas, coopera com Fc $\gamma$ RIII em PMN, hipotetizando-se uma interação física direta entre Fc $\gamma$ RIII e CR3 (ZHOU; BROWN, 1994).

Um mecanismo potencial para a associação física destas duas moléculas na superfície dos neutrófilos é a interação lectina-sacarídeo (*lectin-saccharide*). Esta hipótese parece atrativa, porque Ross et al. (1985) mostraram que os CR3 possuem atividade lectina-semelhante e o Fc $\gamma$ RIIIb apresentam sítios de ligação para a lectina. Portanto, para que haja a interação entre Fc $\gamma$ RIIIb e outros receptores é necessário que este possua sítios para lectina (ZHOU et al., 1993). Além disso, os neutrófilos possuem uma outra integrina, a LFA-1 (leukocyte function-associated antigen-1; CD11a/CD18), que é estrutural e funcionalmente homóloga ao CR3. Esta molécula participa na interação entre CR3 e Fc $\gamma$ RIIIb na membrana dos neutrófilos. Assim, além de ligar carboidratos na superfície de partículas estranhas, o CR3 também pode se ligar a carboidratos expressos na superfície dos neutrófilos (ZHOU et al., 1993).

Em particular, o Fc $\gamma$ RIIIb é conhecido por possuir cadeias de oligossacarídeos, desta forma, a interação do CR3 com o Fc $\gamma$ RIIIb via o sítio de ligação lectina-sacarídeo-*like*, poderia explicar a associação destes receptores, a qual é importante para a fagocitose com Fc $\gamma$ R descrita anteriormente (MANTOVANI, 1975; KIMBERLY et al, 1990; ZHOU et al., 1993; ROSS; CAIN; LACHMANN, 1985).

### ***Fc $\gamma$ R e doenças***

Existem circunstâncias nas quais a interação dos IC com os neutrófilos, via Fc $\gamma$ R e/ou CR, pode estar envolvida na fisiopatologia de doenças inflamatórias crônicas, especialmente aquelas de caráter auto-imune, tais como as doenças por imunocomplexos (DAVIES, 1996). Nestas doenças ocorre deposição de IC nos tecidos e conseqüentemente acúmulo de neutrófilos, estabelecendo-se um processo inflamatório no local. Os neutrófilos aderem aos IC depositados na tentativa de fagocitá-los. No entanto, o IC não é internalizado e em conseqüência desta fagocitose “frustrada”, há uma liberação maciça das ERO e enzimas lisossomais dos neutrófilos sobre as células do hospedeiro, causando lesão tecidual. Em circunstâncias normais, as proteinases que extravasam para o meio extracelular, durante a fagocitose, são rapidamente inativadas por antiproteinases, presentes nos fluidos intersticiais e no plasma, limitando os efeitos deletérios das proteinases sobre os tecidos. No entanto, estudos demonstraram que as antiproteinases eram sensíveis à oxidação por reagentes químicos ou produtos dos neutrófilos estimulados. A oxidação das antiproteinases diminui cerca de duas mil vezes a velocidade de associação entre estes inibidores e a elastase do neutrófilo. Assim, o ataque dos tecidos pela elastase não pode ser inibido. Ainda que o recrutamento dos neutrófilos para o foco inflamatório, inicialmente, tenha a função de defesa, em algumas circunstâncias, como nas doenças por IC, estas células tornam-se responsáveis pela destruição dos tecidos do hospedeiro (WEISS, 1989).

Os IC formados por IgG estão envolvidos na patogênese de várias nefropatias incluindo a glomerulonefrite (GN) causada pelo LES. O *clearance* anormal de IC de IgG é considerado um importante fator na patogênese da GN, particularmente na nefrite causada pelo LES. Este *clearance* depende essencialmente da expressão de receptores para IgG (Fc $\gamma$ R) nas células (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 1997).

Existe ainda, uma alta relevância com relação aos polimorfismos das isoformas dos Fc $\gamma$ R para a suscetibilidade e para o prognóstico das doenças auto-imunes (SALMON;

PRICOP, 2001; KARASSA; TRIKALINOS; IOANNIDIS, 2004), das doenças infecciosas (YUAN et al., 2003; REKAND et al., 2002), das respostas biológicas aos agentes terapêuticos (LOUIS et al., 2004, GRUEL et al., 2004) e do risco de rejeição a aloenxertos (YUAN et al., 2004).

Os antígenos NA são clinicamente importantes, pois o polimorfismo estrutural do FcγRIIIb resulta na formação de alo-anticorpos, os quais podem ser responsáveis pela ocorrência da neutropenia neonatal alo-imune (NNA) e reações transfusionais (KOENE et al., 1998). Por causa da alo-imunização, o SH também tem sido reportado como causa da NNA, pois alo-anticorpos para o antígeno SH já foram identificados no soro materno de casos de NNA, indicando que a alo-imunização não é um evento raro. Embora esta patologia não seja muito freqüente, a NNA pode levar à graves infecções, como meningite ou pneumonia, principalmente quando não reconhecida adequadamente logo após o nascimento (BUX et al., 1997).

Assim, pelo fato dos FcγR medirem 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 FcγR, nas funções biológicas mediadas por eles, pode contribuir (i) para o entendimento da fisiopatologia de doenças infecciosas, bem como aquelas de caráter auto-imune; e (ii) para identificar indivíduos, cujo fenótipo determinado pelo polimorfismo dos FcγR possa conferir suscetibilidade ou proteção para determinadas doenças.

Uma vez que a isoforma NA2 do FcγRIIIb difere da NA1 nos sítios de glicosilação, e que a interação do CR3 com o FcγRIIIb ocorre via o sítio de ligação lectina-sacarídeo, seria interessante determinar se este polimorfismo poderia afetar a cooperação entre CR3 e FcγRIIIb em mediar o *burst* oxidativo dos neutrófilos. Além disso, os estudos de determinação da freqüência dos alelos NA1/NA2 têm sido relacionados à avaliação da alo-

imunização pelos antígenos NA1 e NA2 durante a gravidez. Ainda não está bem estabelecida a frequência desta imunização com a ocorrência da neutropenia neonatal (BUX; MUELLER-ECKHARDT, 1992; ZUPANSKA et al., 2001).

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. Gerais**

**2.1.1.** Avaliar a influência do polimorfismo FcγRIIIb (NA1/NA2) na cooperação com os CR para mediar o *burst* oxidativo dos neutrófilos humanos.

**2.1.2.** Analisar a freqüência dos genes NA1 e NA2 nos doadores de sangue do Hemonúcleo Regional de Araraquara do Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC), unidade auxiliar associada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”.

## **2.2. Específicos**

**2.2.1.** Avaliar a influência do polimorfismo FcγRIIIb (NA1/NA2) na cooperação com os CR, em mediar o *burst* oxidativo dos neutrófilos utilizando como estímulos:

- (a) IC contendo IgG para avaliar a resposta dos neutrófilos mediada somente por FcγR;
- (b) IC contendo IgG e complemento do soro humano normal (SHN): IC/IgG-SHN, para avaliar a resposta dos neutrófilos mediada pela cooperação FcγR/CR;

**2.2.2.** Determinar os alótipos do FcγRIIIb, NA1 e NA2, por PCR alelo-específico, para estabelecer os grupos de indivíduos homozigotos NA1, homozigotos NA2 e heterozigotos NA1/NA2.

**2.2.3.** Determinar a densidade de expressão dos FcγR (FcγRIIa e FcγRIIIb) e dos CR (CR1 e CR3), por citometria de fluxo, para avaliar se existe relação do polimorfismo com a expressão dos receptores e com o resultado do teste funcional do *burst* oxidativo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1 Amostras de sangue

O protocolo de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) e recebeu parecer favorável para a sua realização (Anexo 1).

As amostras de sangue foram obtidas de voluntários adultos saudáveis doadores de sangue do Hemonúcleo Regional de Araraquara do Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC), unidade auxiliar associada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”.

O doador voluntário foi esclarecido sobre a pesquisa, e após decidir participar desta, recebeu e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

O sangue foi colhido por punção venosa, utilizando-se sistema de coleta a vácuo, Vacutainer®, em tubos estéreis e descartáveis contendo o sal dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-K<sub>2</sub>) como anticoagulante.

Cento e setenta e cinco (175) amostras de sangue foram coletadas e os respectivos ácidos desoxirribonucléicos (DNA) foram extraídos e armazenados. Deste total, 169 amostras foram genotipadas para o polimorfismo FcγRIIIb-NA1/NA2, 174 para o SH e 143 amostras para o polimorfismo FcγRIIIa-H/R-131. Oitenta e três (83) amostras foram analisadas quanto à expressão dos FcγR [FcγRIIIa (CD32) e FcγRIIIb (CD16)] e 55 amostras quanto à expressão dos CR (CR1 e CR3) na membrana dos neutrófilos. E 23 amostras foram submetidas à avaliação funcional dos neutrófilos medida por ensaios de quimioluminescência dependente de luminol.

### 3.2 Extração e caracterização do DNA genômico

#### 3.2.1 Extração por método de “*salting out*”

A extração de DNA foi realizada pelo método de *salting out* descrito por Abdel-Rahman, (1994) e Dynal, (1996) com algumas modificações. O protocolo para preparação das soluções consta no anexo 5.

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir da camada leucocitária separada após a centrifugação do sangue total, colhido com anticoagulante EDTA-K<sub>2</sub>, a 1000g por 10 minutos. Quinhentos microlitros de sangue total ou da camada leucocitária foram colocados em tubo tipo *ependorf* e acrescidos de 1mL de tampão de lise para eritrócitos, que estava 5 vezes concentrado. A mistura foi cuidadosamente homogeneizada por inversão por 30 segundos e submetida à centrifugação a 15000g por 1 minuto. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com 1mL de água destilada pura estéril e centrifugadas a 15000g por 1 minuto, desprezando-se o sobrenadante.

As células foram ressuspendidas em uma mistura contendo 80μL de solução tampão proteinase K (5 vezes concentrado), 30μL de uma solução estoque de proteinase K (10mg/mL), 40μL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 10% e 216μL de água destilada pura estéril. Esta suspensão foi mantida em banho a 56°C por 30 minutos. Em seguida, a preparação foi resfriada à temperatura ambiente e, então, acrescida de 132μL de NaCl 5M, homogeneizada em vórtex por 15 segundos e submetida à centrifugação a 15000g por 6 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo limpo e estéril e submetido à centrifugação a 15000g por 3 minutos. Novamente o sobrenadante foi transferido para outro tubo limpo e estéril e 1mL de etanol absoluto (Merck) foi acrescentado. A mistura foi homogeneizada, deixada em repouso à temperatura ambiente por 2 minutos e submetida à centrifugação a 15000g por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com uma solução de etanol a 70% e centrifugado a 15000g por 2 minutos. A seguir, a remoção do sobrenadante foi realizada cuidadosamente e o tubo foi mantido invertido sobre um papel de filtro absorvente durante 5 minutos ou mais até a secagem completa.

O DNA presente no precipitado seco foi dissolvido em 100μL de água destilada pura estéril, homogeneizado em vórtex por 30 segundos e, então, armazenado à temperatura de 4 a 8°C, em tubo tipo *ependorf* fechado, até o momento do uso.

### 3.2.2 Quantificação de DNA na amostra e avaliação qualitativa da pureza

As amostras de DNA foram avaliadas quanto à concentração e pureza do material obtido baseando-se em métodos descritos em Maniatis et al., (1989).

Para a quantificação, as amostras foram diluídas 100 vezes (1:100) em água destilada pura e a leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280nm foi determinada em espectrofotômetro modelo Hitachi U-3000. A quantidade de DNA existente na amostra foi determinada pela leitura da absorbância no comprimento de onda de 260nm, onde 1 unidade de densidade ótica (DO) corresponde a 50µg de DNA/mL. A concentração de DNA foi calculada pela seguinte fórmula:

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

A pureza do ácido nucléico na amostra foi estimada pela razão entre os valores das leituras de DO em 260nm e 280nm (DO<sub>260nm</sub>/DO<sub>280nm</sub>), como mostra a fórmula abaixo, sendo que esta relação deve estar entre 1,8 e 2,0.

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

### 3.2.3 Verificação da qualidade e integridade do DNA

As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, para verificação da pureza da amostra e da integridade do DNA, baseando-se em métodos descritos em Maniatis et al., (1989).

Cada gel foi preparado com 100 mL de agarose 0,8% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,3, nas dimensões de 11 x 14cm. Os poços para a aplicação das amostras foram confeccionados colocando-se um pente de 1mm de espessura, o qual foi retirado após a solidificação da agarose. Cinco microlitros de cada amostra de DNA diluídas 50 vezes foram acrescentados a 10µL de uma solução corante, contendo: azul de bromofenol 0,1%, SDS 1%, glicerol 50% e EDTA-Na<sub>2</sub> 0,1 M (tampão da amostra). As amostras com a solução

corante, foram homogeneizadas em vórtex e, então, aplicadas nos poços do gel.

Para a corrida eletroforética foram utilizadas cubas contendo eletrodo de platina e conectadas a uma fonte de corrente contínua. Antes de iniciar a corrida, deixou-se passar o tampão TBE pH 8,3 pelo gel durante 1 hora. A corrida foi acompanhada pela migração do azul de bromofenol, contido na solução corante da amostra, durante cerca de 40 minutos a 100 volts (V).

Após a migração, o gel foi corado em um recipiente contendo 200mL de água destilada pura e 10 $\mu$ L de uma solução estoque de brometo de etídeo 10mg/mL, durante 10 a 15 minutos, para a visualização do DNA em transluminador de luz ultra-violeta (UV). Como o brometo de etídeo é capaz de absorver luz a 300nm e emitir luz vermelha e alaranjada a 590nm, a quantidade de brometo de etídeo intercalado no DNA, visto através do brilho refringente, é proporcional à concentração de DNA na amostra.

### 3.3. Análise dos genótipos

A fim de esclarecer a nomenclatura apresentada, as formas “F $\gamma$ RIIA” e “F $\gamma$ RIIIB”, designam os genes para os receptores, enquanto que as formas “F $\gamma$ RIIa” e “F $\gamma$ RIIb”, os produtos dos respectivos genes.

Para estabelecer os grupos de indivíduos, os genótipos dos F $\gamma$ R foram determinados tanto para o polimorfismo do F $\gamma$ RIIIB (NA1/NA2 e SH), quanto para o F $\gamma$ RIIA (H131/R131). Assim, obtivemos os seguintes grupos: a) NA1/H131/SH<sup>-</sup>; b) NA1/R131/SH<sup>-</sup>; c) NA2/H131/SH<sup>+</sup>; d) NA2/H131/SH<sup>-</sup>; e) NA2/R131/SH<sup>+</sup>; f) NA2/R131/SH<sup>-</sup>; g) NA1/NA2/H131/SH<sup>+</sup>; h) NA1/NA2/H131/SH<sup>-</sup>; i) NA1/NA2/R131/SH<sup>+</sup>; j) NA1/NA2/R131/SH<sup>-</sup>; k) NA1/H131/R131/SH<sup>-</sup>; l) NA2/H131/R131/SH<sup>+</sup>; m) NA2/H131/R131/SH<sup>-</sup>; n) NA1/NA2/H131/R131/SH<sup>+</sup> e o) NA1/NA2/H131/R131/SH<sup>-</sup>.

A análise do polimorfismo alélico dos F $\gamma$ R foi realizada pela técnica de amplificação do DNA genômico auxiliada pela polimerase (PCR: Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando-se oligonucleotídeos (*primers*) alelo-específicos.

Um controle positivo interno para o produto da PCR foi obtido pela adição, em todos os tubos, de oligonucleotídeos controles, 0,5mM do *sense* (5' gcc ttc cca acc att ccc tta 3') e 0,5mM do "*anti-sense*" (5' ctc acg gat ttc tgt gtt tc 3'), para o gene HGH (Hormônio do Crescimento Humano), conforme descrito por Kuwano et al., (2000) e Tong et al., (2003), que foram adicionados a todos os tubos na concentração de 0,5mM, e visualizado no gel de agarose com peso molecular de 428pb. E ainda, como controle de contaminação dos reagentes com DNA, dois controles contendo todo o *mix* de reação, mas sem DNA, cada um contendo um dos *primers* alelo-específicos, também foram incluídos e submetidos às mesmas condições de reações dos outros tubos que continham amostras de DNA. E como controles da genotipagem, foram utilizadas amostras previamente genotipadas e seqüenciadas, adicionadas a todas as reações.

### 3.3.1 Análise do genótipo FcγRIIA

As formas alélicas FcγRIIA-H-131 e FcγRIIA-R-131 resultam nas variantes: H-131 e R-131. Assim, para a análise do polimorfismo alélico do FcγRIIA duas PCRs foram realizadas para cada amostra de DNA. As reações utilizaram oligonucleotídeos *sense* específicos para cada um dos alelos (H-131 e R-131) e *anti-sense* comum aos dois, a saber: para H-131, *sense* 5' atc cca gaa att ctc cca 3', para R-131, *sense* 5' atc cca gaa att ctc ccg 3' e o *anti-sense* em comum 5' caa ttt tgc tgc tat ggg c 3'. As seqüências dos oligonucleotídeos para H-131 e R-131 foram reproduzidas de acordo com aquelas descritas por Osborne et al., (1994) e Kuwano et al., (2000) e aneladas à seqüência de DNA disponível no *genbank* para a verificação da seqüência dos oligonucleotídeos (Anexo 3).

O volume total de reação em cada tubo foi de 25μL, sendo 100 a 200ng de DNA genômico (2,0μL) e o restante de um *mix* de reação. Foram realizados dois tubos de *mix*, um correspondente ao H-131 e outro ao R-131. O tubo de *mix* do H-131 era constituído pelas seguintes quantidades de reagentes correspondentes a uma amostra, sendo estas quantidades multiplicadas de acordo com o número de amostras, assim: 2,5μL de tampão

para PCR contendo KCl (10 vezes concentrado) (Fermentas); 2,0µL ou 2mM de solução de MgCl<sub>2</sub> (25Mm) (Fermentas); 0,5µL ou 200µM de dinucleotídeo trifosfato (dNTP) (Promega); 0,1µL ou 0,5 unidade (U) de Taq DNA polimerase recombinante (Fermentas); 1mM ou 1,0µL de oligonucleotídeo H-131 *sense* (Bioneer); 1mM ou 1,0µL de oligonucleotídeo H/R-131 *anti-sense* (Bioneer) ; 0,5µL de cada oligonucleotídeo *sense e anti-sense* HGH (Bioneer) e água destilada pura estéril em quantidade suficiente para completar 25µL. O tubo de *mix* do R-131 era constituído pelas mesmas quantidades e reagentes do tubo para H-131, sendo que mudava-se apenas o oligonucleotídeo alelo-específico *sense* correspondente ao R-131 pois o oligonucleotídeo *anti-sense* (Bioneer) era comum aos dois tubos de reação.

O tamanho dos fragmentos obtidos após a amplificação era: 253pb.

As reações foram realizadas em um ciclador automático de temperatura Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) nas condições descritas por Osborne et al., (1994) e Kuwano et al., (2000), com algumas modificações: 4 minutos a 95°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de amplificação de 1 minuto a 95°C para desnaturação, 2 minutos a 57°C para anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão, seguidos de um acréscimo de 5 minutos a 72°C para completar a extensão final. Ao final da reação as amostras foram mantidas no ciclador a 4°C e posteriormente foram armazenadas a -20°C até o uso.

### 3.3.2 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 duas PCRs foram realizadas para cada amostra de DNA. As reações utilizaram oligonucleotídeos *sense* específicos para cada um dos alelos (NA1 e NA2) e *anti-sense* comum aos dois, a saber: para NA1, *sense* 5' cag tgg ttt cac aat gtg aa 3', para NA2, "sense" 5' ctc aat ggt aca gcg tgc tt 3' e o *anti-sense* em comum 5' atg gac ttc tag ctg cac 3'. As seqüências dos oligonucleotídeos para NA1 e NA2 foram reproduzidas de acordo com aquelas descritas por Torkildsen et al., (2005) e

aneladas à seqüência de DNA disponível no *genbank* para a verificação da seqüência dos oligonucleotídeos (Anexo 4).

O volume total de reação em cada tubo foi de 25µL sendo 100 a 200ng de DNA genômico (2,0µL) e o restante de um *mix* de reação. Foram realizados dois tubos de *mix*, um correspondente ao NA1 e outro ao NA2. O tubo de *mix* do NA1 era constituído pelas seguintes quantidades de reagentes correspondentes a uma amostra, sendo estas quantidades multiplicadas de acordo com o número de amostras, assim: 2,5µL de tampão para PCR contendo KCl (10 vezes concentrado) (Fermentas); 2,0µL ou 2mM de solução de MgCl<sub>2</sub> (25Mm) (Fermentas); 0,5µL ou 200µM de dinucleotídeo trifosfato (dNTP) (Promega); 0,1µL ou 0,5 unidade (U) de Taq DNA polimerase recombinante (Fermentas); 1mM ou 1,0µL de oligonucleotídeo *sense* NA1 (Bioneer); 1mM ou 1,0µL de oligonucleotídeo *anti-sense* (Bioneer); 0,5µL de cada oligonucleotídeo *sense e anti-sense* HGH (Bioneer) e água destilada pura estéril em quantidade suficiente para completar 25µL. O tubo de *mix* do NA2 era constituído pelas mesmas quantidades e reagentes do tubo para NA1, sendo que mudava-se apenas o oligonucleotídeo alelo-específico *sense* correspondente ao NA2.

Os tamanhos dos fragmentos obtidos após a amplificação eram: 141 pb para o NA1 e 221 pb para o NA2.

As reações foram realizadas em um ciclador automático de temperatura Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) nas condições descritas por Torkildsen et al., (2005) com algumas modificações: 3 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de amplificação de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 2 minutos a 57°C para anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão, seguidos de um acréscimo de 10 minutos a 72°C para completar a extensão final. Ao final da reação as amostras foram mantidas no ciclador a 4°C e posteriormente foram armazenadas a -20°C até o uso.

### 3.3.3 Análise do genótipo SH

O alelo SH resultante de uma mutação do gene FcγRIIIB-NA2 dá origem ao alo-antígeno SH.

Para a análise do alelo SH uma PCR foi realizada para cada amostra de DNA. As reações utilizaram os seguintes oligonucleotídeos: *sense* 5' aag atc tcc caa aag gct gtg 3', e o *anti-sense* 5' act gtc gtt gac tgt gtc at 3'. As seqüências dos oligonucleotídeos para SH foram reproduzidas de acordo com aquelas descritas por Kuwano et al., (2000) e aneladas à seqüência de DNA disponível no *genbank* para a verificação da seqüência dos oligonucleotídeos (Anexo 4).

O volume total de reação em cada tubo foi de 22,5μL sendo 100 a 200ng de DNA genômico (2,5μL) e 20μL do *mix* de reação. O *mix* de reação era constituído pelas seguintes quantidades de reagentes correspondentes a uma amostra, sendo estas quantidades multiplicadas de acordo com o número de amostras, assim: 2,25μL de tampão para PCR contendo KCl (10 vezes concentrado) (Fermentas); 1,125μL ou 2mM de solução de MgCl<sub>2</sub> (50Mm) (Fermentas); 0,45μL ou 200μM de dinucleotídeo trifosfato (dNTP) (Promega); 0,16μL ou 0,5 unidade (U) de Taq DNA polimerase recombinante (Fermentas); 1mM ou 0,45μL de oligonucleotídeo *sense* (Bioneer); 1mM ou 0,45μL de oligonucleotídeo *anti-sense* (Bioneer); 0,12μL de cada oligonucleotídeo *sense e anti-sense* HGH (Bioneer) e água destilada pura estéril em quantidade suficiente para completar 22,5μL.

O tamanho do fragmento obtido após a amplificação era de 191pb.

As reações foram realizadas em um ciclador automático de temperatura Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) nas condições descritas por KUWANO et al. (2000) com algumas modificações: 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de amplificação de 30 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 60°C para anelamento e 30 segundos a 71°C para extensão, seguidos de um acréscimo de 5 minutos a 71°C para completar a extensão final. Ao final da reação as amostras foram mantidas no ciclador a 4°C e posteriormente foram armazenadas a -20°C até o uso.

A Tabela 2 resume todos os oligonucleotídeos e condições para a análise dos genótipos FcγRIIIa, FcγRIIIb e SH.

**Tabela 2-** Seqüências dos oligonucleotídeos e das condições de PCR para a alotipagem dos FcγR.

| Gene<br>e/ou<br>alelo | Seqüências dos oligonucleotídeos*                  | Condições de PCR   | Referências<br>Bibliográficas |
|-----------------------|--|--|-------------------------------|
| <b>FcγRIIA</b>        |  | <i>Hot start:</i> 4 min. a 95°C                                |                               |
| <b>H-131</b>          | <i>sense</i> 5' atc cca gaa att ctc cca 3'         | 30 ciclos: { 1 min. a 95°C<br>2 min. a 57°C<br>1 min. a 72°C   | OSBORNE et al.,<br>1994       |
| <b>R-131</b>          | <i>sense</i> 5' atc cca gaa att ctc ccg 3'         |  |                               |
| <b>H e R-131</b>      | <i>anti-sense</i> 5' caa ttt tgc tgc tat ggg c 3'  | Extensão: 5 min. a 72°C  | KUWANO et al.,<br>2000        |
|                       |  | Final: ∞ a 4°C   |                               |
| <b>FcγRIIIB</b>       |  | <i>Hot start:</i> 3 min. a 94°C                                |                               |
| <b>NA1</b>            | <i>sense</i> 5' cag tgg ttt cac aat gtg aa 3'      | 30 ciclos: { 1 min. a 94°C<br>2 min. a 57°C<br>1 min. a 72°C   | TORKILDSEN et<br>al., 2005    |
| <b>NA2</b>            | <i>sense</i> 5' ctc aat ggt aca gcg tgc tt 3'      |  |                               |
| <b>NA1 e NA2</b>      | <i>anti-sense</i> 5' atg gac ttc tag ctg cac 3'    | Extensão: 10 min. a 72°C                                       |                               |
|                       |  | Final: ∞ a 4°C   |                               |
| <b>SH</b>             | <i>sense</i> 5' aag atc tcc caa aag gct gtg 3'     | <i>Hot start:</i> 5 min. a 94°C                                | KUWANO et al.,<br>2000        |
|                       | <i>anti-sense</i> 5' act gtc gtt gac tgt gtc at 3' | 30 ciclos: { 30 seg. a 95°C<br>1 min. a 60°C<br>30 seg. a 71°C |                               |
|                       |  | Extensão: 5 min. a 71°C  |                               |
|                       |  | Final: ∞ a 4°C   |                               |
| <b>HGH</b>            | <i>sense</i> 5' gcc ttc cca acc att ccc tta 3'     |  | KUWANO et al.,<br>2000;       |
|                       | <i>anti-sense</i> 5' ctc acg gat ttc tgt gtt tc 3' |  |                               |

### 3.4 Eletroforese dos produtos da PCR

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR, para as variantes polimórficas do Fc $\gamma$ R, foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3. Uma amostra de 10 $\mu$ L do produto de cada PCR foi misturada a 2 $\mu$ L do tampão da amostra para eletroforese de DNA, contendo azul de bromofenol. Estas misturas foram homogeneizadas em vórtex e, então, aplicadas nos poços do gel. Amostras padrões de marcadores de número de pares de base, DNA *ladder* 50pb, também foram aplicadas nos géis (0,5 $\mu$ g/poço).

O preparo dos géis e as condições da corrida eletroforética foram realizados como descrito anteriormente para as amostras de DNA genômico (item 3.2.3). A corrida foi acompanhada pela migração do azul de bromofenol, contido na mistura da amostra, durante 60 a 90min a 100V.

Após a migração, o gel foi corado em uma solução formada por 200mL de água destilada pura e 10 $\mu$ L de uma solução estoque de brometo de etídeo 10mg/mL, durante 10 a 15 minutos. As imagens dos fragmentos de DNA corados nos géis de eletroforese foram capturadas em um sistema ImageMaster® VDS, Pharmacia Biotech.

### 3.5 Determinação da expressão dos receptores para IgG (Fc $\gamma$ RIIIa/CD32 e Fc $\gamma$ RIIIb/CD16) e para complemento (CR1 e CR3) nos neutrófilos

Amostras de sangue total (100 $\mu$ L) de cada doador saudável foram utilizadas. Cada amostra foi incubada, à temperatura ambiente, por 20 minutos, ao abrigo da luz, com 5 $\mu$ L do anticorpo específico anti-receptor marcado com fluorocromo ou com o anticorpo isotipo controle como descrito por Marzocchi-Machado et al., (2002). As amostras que receberam o isotipo controle foram utilizadas para descontar a fluorescência causada pela ligação inespecífica do respectivo isotipo anti-receptor à célula. Após este período de incubação, todas as amostras receberam 2000 $\mu$ L de tampão de lise da marca Becton & Dickinson (BD),

para lisar os eritrócitos e foram mantidas à temperatura ambiente, por 10 minutos, ao abrigo da luz, e, em seguida, centrifugadas a 550g, a 4°C, por 10 minutos. As misturas foram lavadas em 2000µL de PBS/SBF (Soro Bovino Fetal) 2%/azida  $\leq 0,1$  % pH7,2 gelado, a 550g, a 4°C, por 10 minutos, e ressuspendidas em 500µL de PBS/formol 1%, para leitura no citômetro de fluxo dentro de 24 horas.

Os anticorpos marcados com FITC (isotiocianato de fluoresceína) ou PE (ficoeritrina) usados foram: **a)** IgG1-PE de camundongo anti-Fc $\gamma$ RIII (CD16) humano (BD PharMingen™-30625X; clone 3G8; IgG1, $\kappa$ ); **b)** IgG1-PE de camundongo, isotipo controle para anti-CD16 (BD PharMingen™-33815X; clone MOPC-21; IgG1, $\kappa$ ); **c)** IgG2b-FITC de camundongo anti-Fc $\gamma$ RII (CD32) humano (BD PharMingen™-30934X; clone FLI8.26; IgG2b, $\kappa$ ); **d)** IgG2b-FITC de camundongo, isotipo controle para CD32 (BD PharMingen™-33804X; clone 27-35; IgG2b, $\kappa$  anti-Dansyl); **e)** IgG1-PE de camundongo anti-CD11b (CR3; Mac-1) humano (BD PharMingen™-30455X; clone ICRF44; IgG1, $\kappa$ ); **f)** IgG1-FITC de camundongo anti-CD35 (CR1) humano (BD PharMingen™-30964X; clone E11; IgG1, $\kappa$ ); **g)** IgG1-PE de camundongo, isotipo controle para anti-CD11b (CR3; Mac-1) (BD PharMingen™-33815X; clone MOPC-21; IgG1, $\kappa$ ) e **h)** IgG1-FITC de camundongo, isotipo controle para anti-CD35 (CR1) (BD PharMingen™-33814X; clone MOPC-21; IgG1, $\kappa$ ).

As análises foram feitas em um citômetro de fluxo modelo Becton & Dickinson (BD) FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorter*) Calibur *software* Cell Quest Pro, no Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

O citograma bidirecional permitiu distinguir e selecionar a população de neutrófilos analisada. Os resultados foram expressos como mediana da fluorescência/célula determinada em um histograma em escala logaritmo e como porcentagem de células fluorescentes na população total.

### 3.6 Medida do *burst* oxidativo dos neutrófilos

#### 3.6.1 Obtenção dos neutrófilos

Os neutrófilos foram obtidos a partir da mistura de sangue total com uma solução de gelatina, segundo metodologia descrita por Lucisano; Mantovani, (1984). O sangue total foi colhido por punção venosa dos indivíduos doadores, em sistema a vácuo, utilizando-se tubos (2 ou 3) sem anticoagulante (tubo seco) e rapidamente o sangue foi transferido para um tubo contendo como anticoagulante solução de Alséver (citrato de sódio) na proporção de volume a volume. Em seguida, o material foi centrifugado a 1000g por 10 minutos. O plasma e a camada leucocitária foram desprezados e acrescentou-se solução de gelatina 2,5% em cloreto de sódio (NaCl) 0,15M na quantidade equivalente à duas vezes o volume de células restantes. Esta mistura foi homogeneizada e deixada em banho a 37°C por 30 minutos. Após este tempo o sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo. Ao sobrenadante foi acrescentado NaCl 0,15M na proporção de duas vezes o volume de sobrenadante. Após homogeneização e centrifugação a 650g por 10 minutos sem refrigeração, o sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi adicionado cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) 0,83%, pH 7,2 (37°C), na proporção de duas vezes o volume do precipitado. O material foi deixado em repouso a 37°C por 5 minutos e submetido a centrifugação a 650g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com NaCl 0,15M e então centrifugado a 650g por 10 minutos. O precipitado foi então ressuspendido com 1mL de solução balanceada de Hanks, pH 7,2, contendo gelatina 0,1% e mantido no gelo até o momento do uso. A suspensão de células foi diluída na proporção de 1:100 em Líquido de Lázarus e contadas em Câmara de Neubauer e depois avaliadas quanto à sua viabilidade pela exclusão do corante Azul de Tripán 0,04%, na proporção de volume a volume. Comprovando que esta metodologia, descrita por Lucisano; Mantovani, (1984), assegura uma preparação contendo 80-90% de neutrófilos e viabilidade maior que 95%, quando analisada com o corante azul de Tripán.

Uma alíquota (30µl) de cada preparação de células, acrescida de 2 gotas de solução

de albumina de soro bovino (1mg/ml) foi submetida à citocentrifugação e posterior coloração panótica por Leishman.

### 3.6.2 Fonte de complemento

O soro humano normal (SHN) foi obtido a partir de amostras sangue venoso, colhidas sem anticoagulante, de voluntários saudáveis e que não faziam uso de qualquer tipo de medicação. Após a completa retração do coágulo, o soro foi separado por centrifugação a 1000g por 10 minutos a 4°C e imediatamente colocado no gelo. Várias amostras foram reunidas para constituir um *pool* de SHN e um *pool* de soro humano normal inativado (SHNI). A inativação do SHN (inativação das proteínas do sistema complemento) foi feita pelo tratamento da amostra a 56°C por 30 minutos. Os *pools* de SHN e SHNI foram mantidos em alíquotas a -80°C até o uso (MARZOCCHI-MACHADO et al., 2002).

### 3.6.3 Imunocomplexos

Os neutrófilos humanos foram estimulados com IC formados por albumina de soro bovino (BSA, Sigma A 7638) e IgG policlonal de coelho anti-BSA, gentilmente doada pela Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Os IC precipitados foram preparados na zona de equivalência, ponto de precipitação máxima dos complexos, a partir de uma mistura, volume a volume, de uma solução de BSA 1mg/mL (antígeno) diluída 1:4 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH7.4 e uma diluição 1:8 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) da preparação do anticorpo IgG de coelho anti-BSA, que estava a 20 mg/mL. Esta mistura foi mantida a 37°C por 1 hora e *overnight* a 4°C. Então, foi submetida a 12100g a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante lavado duas vezes em PBS pH 7.4, sendo ressuspensão neste mesmo tampão. Uma alíquota desta suspensão foi retirada para se estimar a concentração de proteína em 280nm.

Parte das amostras de IC foram opsonizadas com complemento segundo MARZOCCHI-MACHADO et al., (2002). Cerca de 300 a 500 $\mu$ g IC foram incubados com uma mistura de *pool* de SHN ou SHNI (controle negativo de opsonização) diluída na proporção de 1:2 em tampão de fixação para complemento trietanolamina (TEA) pH 7.4, contendo  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  e gelatina 0,1%, e mantida a 37°C, em banho-maria, por 30 minutos. Esta mistura foi então submetida a 12100g por 10 minutos a 4°C e o precipitado lavado 2 vezes em PBS pH 7.4 a 12100g por 10 minutos a 4°C. Então, o precipitado, contendo IC/SHN ou IC/SHNI foi ressuspensionado em PBS pH 7.4. Desta forma, tínhamos como estímulos a) IC contendo IgG e b) IC contendo IgG e complemento. Os IC foram utilizados nos ensaios como suspensão.

#### **3.6.4 Medida do *burst* oxidativo por quimioluminescência dependente de luminol**

Os ensaios de quimioluminescência (QL) foram realizados segundo Cheung et al., (1983) e Alves et al., (2003). Um ensaio preliminar foi realizado para determinar a concentração de imunocomplexos a ser utilizada. Uma vez padronizada a condição, o método consistiu em uma suspensão de  $2 \times 10^6$  neutrófilos/2mL, em solução de Hanks/gelatina 0,1%, pH 7,2, incubada com 60 $\mu$ g dos diferentes IC (IC-IgG, IC-IgG/SHN ou IC-IgG/SHNI), na presença de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona)  $10^{-4}$ M. A produção de QL foi acompanhada em um luminômetro, modelo 1251 Bio-Orbit, a 37°C por 15 minutos e registrada em milivolts (mV).

Os controles de QL espontânea consistiram em incubar as células e luminol, na ausência de IC, em solução de Hanks/gelatina 0,1%, pH 7,2.

Os resultados foram expressos como o valor da área sob a curva do perfil de QL registrado.

### **3.7 Forma de análise dos resultados**

#### **3.7.1 Análises Estatísticas**

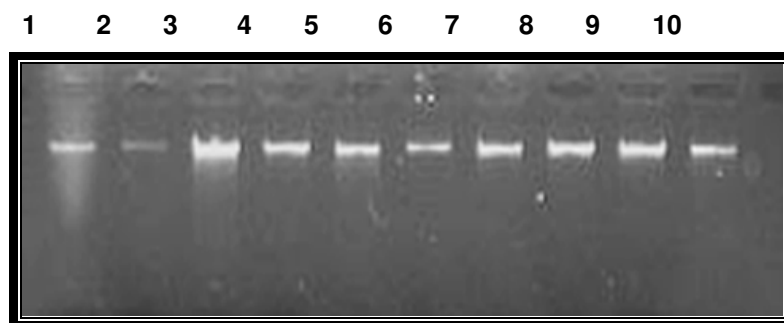
As variáveis numéricas para a avaliação funcional dos neutrófilos foram comparadas usando testes para dados não paramétricos com níveis de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ): a) Mann-Whitney, para comparação entre 2 grupos não pareados; b) Kruskal-Wallis e Dunn, para comparações múltiplas de 3 ou mais grupos não pareados e, c) Wilcoxon, para pareamento dos dados de um mesmo indivíduo antes e depois da opsonização com complemento.

A análise da expressão dos receptores foi feita por teste para dados paramétricos: a) análise de variância (ANOVA), seguido por teste de Tukey para comparações de 3 ou mais grupos, e b) análises de correlação pelo teste de Pearson; considerando-se o valor de  $p \leq 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 Extração e caracterização do DNA genômico

A verificação da qualidade das amostras de DNA extraídas foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE pH 8,3, e está apresentada na Figura 4. Para a eletroforese, as amostras foram diluídas 50 vezes.



**Figura 4-** Avaliação qualitativa das amostras de DNA extraídas pelo método de *salting out*. Representação do perfil eletroforético das amostras de DNA (números 1 ao 10) em gel de agarose 0,8% em TBE pH 8,3.

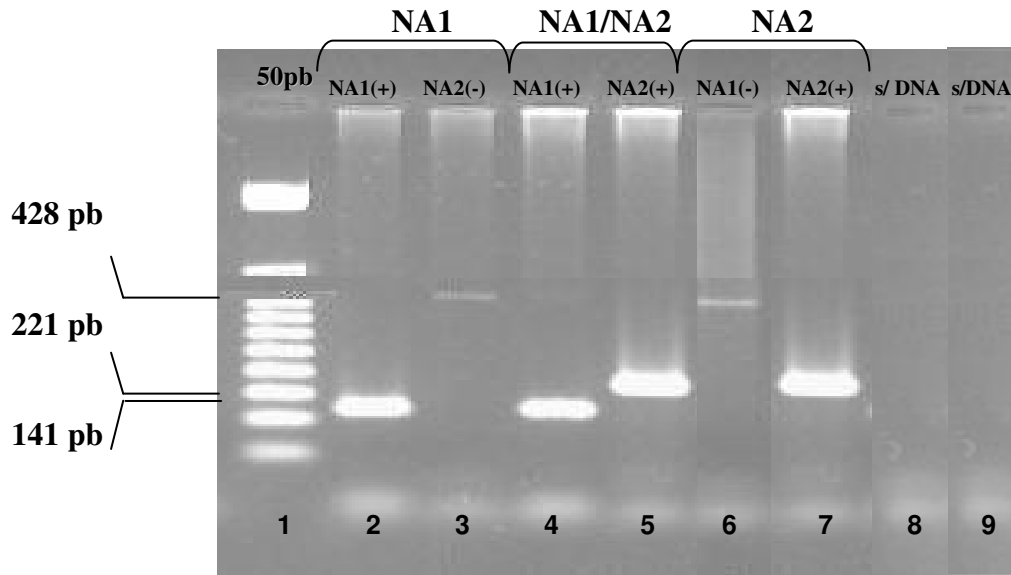
Após a análise das bandas no gel de agarose, concluímos que as amostras estavam adequadas para serem utilizadas nas próximas etapas, pois todas as bandas indicaram uma boa qualidade e integridade deste DNA. A banda que se encontrava no segundo poço apareceu mais fraca do que as demais pois esta amostra possuía DNA em menor concentração.

#### 4.2 Alotipagem dos *FcγR*

A padronização da técnica de amplificação do DNA por PCR, para a identificação do genótipo para o *FcγRIIIb* (NA1, NA2 e SH) e para *FcγRIIIa* (H-131 e R-131), foi realizada com os oligonucleotídeos alelo-específicos, cujas seqüências e codições já foram citadas anteriormente na tabela 2.

A Figura 5 apresenta a análise dos produtos da PCR para os alelos NA1 e NA2. Os fragmentos amplificados para os alelos NA1 e NA2 foram de 141 e 221 pb, respectivamente, e o controle interno, produto do gene do hormônio do crescimento humano (HGH) com 428

pb, foi amplificado. Nenhuma amplificação pôde ser vista no poço do controle de contaminação dos reagentes (poço sem DNA).

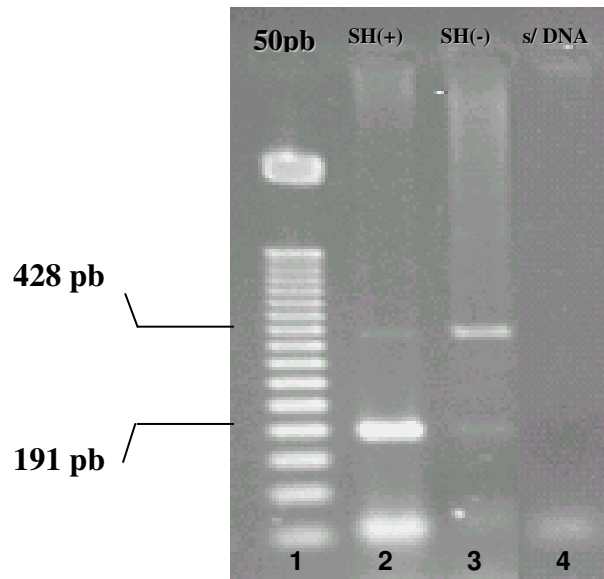


**Figura 5-** Perfil eletroforético dos produtos da PCR para amplificação do DNA com os oligonucleotídeos *sense* e *anti-sense* alelos-específicos para NA1 (141pb) e NA2 (221pb) em gel de agarose 2% em TBE pH 8,3. Marcador de número de pares de bases (pb), DNA ladder 50pb (primeiro poço do gel). Controle da reação, HGH (428pb), visto somente nos poços 3 e 6. Poços 8 e 9 sem DNA, controle de reagentes. O segundo e o terceiro poço contêm a mesma amostra de DNA (indivíduo homocigoto NA1), o quarto e o quinto poço contêm o DNA do mesmo indivíduo (sendo este heterocigoto: NA1/2) e o sexto e sétimo poços contêm o DNA de um mesmo indivíduo (sendo este homocigoto para NA2).

A análise da Figura 5 permite-nos observar o perfil eletroforético dos produtos de PCR representativo de 169 amostras, sendo que a cada dois poços temos uma amostra. A amostra contida nos poços 2 e 3 é representativa dos indivíduos homocigotos NA1, pois observamos apenas a amplificação da banda do polimorfismo no tubo que continha oligonucleotídeos para a amplificação do gene *FcγRIIIB-NA1* (poço 2), e nenhuma amplificação no poço 3, assim estes indivíduos não apresentam o gene *FcγRIIIB-NA2*. A amostra contida nos poços 4 e 5 é representativa dos indivíduos heterocigotos NA1/NA2, pois observamos a amplificação da banda do polimorfismo tanto no tubo que continha

oligonucleotídeos para a amplificação do gene Fc $\gamma$ RIIIB-NA1 (poço 4) quanto no que continha oligonucleotídeos para o gene Fc $\gamma$ RIIIB-NA2 (poço 5). A amostra contida nos poços 6 e 7 é representativa dos indivíduos homozigotos NA2, pois observamos apenas a amplificação da banda do polimorfismo no tubo que continha oligonucleotídeos para a amplificação do gene Fc $\gamma$ RIIIB-NA2 (poço 7), e nenhuma amplificação no poço 6, assim estes indivíduos não apresentam o gene Fc $\gamma$ RIIIB-NA1. Os últimos dois poços, 8 e 9, não apresentam sinal de qualquer amplificação, nem na mistura de reagentes que continha os oligonucleotídeos para amplificação do gene Fc $\gamma$ RIIIB-NA1 (poço 8) e nem na do gene Fc $\gamma$ RIIIB-NA2 (poço 9), por isso podemos concluir que nenhum reagente estava contaminado com DNA.

A Figura 6 apresenta a análise dos produtos da PCR para o alelo SH. O fragmento amplificado para o alelo SH apresenta 191 pb. O controle interno, produto do gene do hormônio do crescimento humano (HGH) com 428 pb, foi amplificado, e nenhuma amplificação pôde ser vista no poço do controle de contaminação dos reagentes (poço sem DNA).



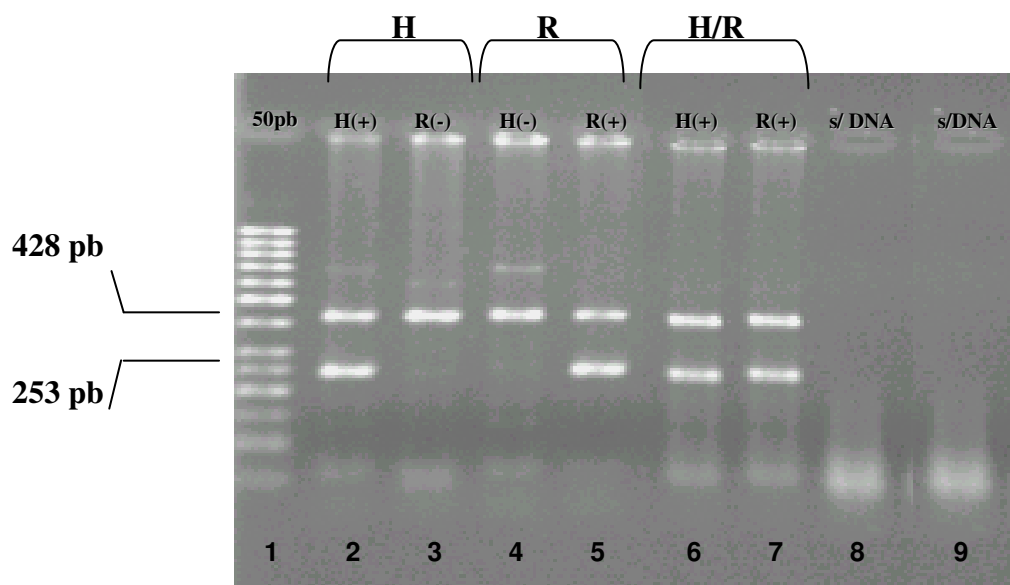
**Figura 6-** Perfil eletroforético dos produtos da PCR para amplificação do DNA com os oligonucleotídeos *sense* e *anti-sense* alelos-específicos para SH (191pb), em gel de agarose 2% em TBE pH 8,3. Marcador de número de pares de bases (pb), DNA *ladder* 50pb (primeiro poço do gel). O controle da reação, HGH – 428pb, pode ser observado com maior intensidade no poço 3. O controle dos reagentes encontra-se no poço 4, sem DNA. O segundo poço contém DNA de um indivíduo SH(+) e o terceiro poço de um indivíduo SH(-).

Após analisarmos a Figura 6, observamos o perfil eletroforético dos produtos de PCR representativo de 174 amostras, para a amplificação ou não do gene *FcγRIIIb-NA2/SH*. A amostra contida no poço 2 é representativa dos indivíduos que apresentam o gene para o SH, pois observamos a amplificação da banda do polimorfismo, já no poço 3 observamos uma amostra representativa do perfil eletroforético dos indivíduos que não apresentam este polimorfismo, onde nenhuma amplificação é observada neste poço. O último poço, 4, não apresenta qualquer sinal de amplificação, por isso podemos concluir que nenhum reagente estava contaminado com DNA. No poço 4 observamos a amplificação da banda do HGH (428pb) provando que havia DNA naquele tubo de reação mas que a banda do polimorfismo não foi amplificada pois este indivíduo não apresentava o gene para tal polimorfismo.

A amplificação do gene do HGH, pode ser observada apenas nos poços 3 e 6, pelo fato da temperatura (temperatura de *melting*) para a amplificação dos alelos NA1 e NA2 não ter favorecido a amplificação do HGH. Mas também este fato pode ser devido a priorização

da utilização do DNA para a amplificação da banda do polimorfismo, já que havia maior quantidade de oligonucleotídeos para esta finalidade.

A Figura 7 apresenta a análise dos produtos da PCR para os alelos H-131 e R-131. Os fragmentos amplificados para os alelos H-131 e R-131 foram de 253pb. O controle interno, produto do gene do hormônio do crescimento humano (HGH), com 428 pb, também foi amplificado e nenhuma amplificação pôde ser vista no poço do controle de contaminação dos reagentes (poço sem DNA).



**Figura 7-** Perfil eletroforético dos produtos da PCR para amplificação do DNA com os oligonucleotídeos “sense” e “anti-sense” alelos-específicos para H-131 e R-131 (253pb) em gel de agarose 2% em TBE pH 8,3. Marcador de número de pares de bases (pb), DNA ladder 50pb (primeiro poço do gel). Controle da reação, amplificação do HGH – 428pb. Controle de reagentes, poço sem DNA. O segundo e o terceiro poço contêm a mesma amostra de DNA (indivíduo homocigoto para H-131), o quarto e o quinto poço contêm o DNA do mesmo indivíduo (sendo este homocigoto para R-131) e o sexto e sétimo poços contêm o DNA de um mesmo indivíduo (sendo este heterocigoto: H/R-131).

Analisando a Figura 7, podemos observar o perfil eletroforético dos produtos de PCR representativo de 143 amostras, sendo que a cada dois poços temos uma amostra. A amostra contida nos poços 2 e 3 é representativa dos indivíduos homocigotos H-131, pois observamos apenas a amplificação da banda do polimorfismo no tubo que continha

oligonucleotídeos para a amplificação do gene deste alelo (poço 2), e nenhuma amplificação no poço 3, assim este indivíduo não apresentava o alelo R. A amostra contida nos poços 4 e 5 é representativa dos indivíduos homozigotos R-131, pois observamos apenas a amplificação da banda do polimorfismo no tubo que continha oligonucleotídeos para a amplificação deste alelo (poço 5), e nenhuma amplificação no poço 4, assim este indivíduo não apresentava o alelo H. A amostra contida nos poços 6 e 7 é representativa dos indivíduos heterozigotos H/R-131, pois observamos a amplificação da banda do polimorfismo tanto no tubo que continha oligonucleotídeos para a amplificação do alelo H (poço 6) quanto no que continha oligonucleotídeos para o alelo R (poço 7). Os últimos dois poços, 8 e 9, não apresentam sinal de qualquer amplificação, nem no *mix* que continha os oligonucleotídeos para amplificação do alelo H (poço 8) e nem no do alelo R (poço 9), por isso podemos concluir que nenhum reagente estava contaminado com DNA. Além disso, a amplificação do gene do HGH (428pb) pôde ser observada nos poços de 2 a 7.

#### **4.3 Análise da frequência dos alótipos NA1, NA2 e SH**

A determinação dos genótipos de 169 amostras para o Fc $\gamma$ RIIIb – NA1 e NA2, e 174 amostras para o Fc $\gamma$ RIIIb – SH, através de PCR alelo específica, e posterior análise do perfil eletroforético dos produtos destas PCRs, resultou em: 34 amostras NA1/NA1, 47 amostras NA2/NA2, 88 amostras NA1/NA2, 11 amostras positivas para SH e 163 amostras negativas para SH.

A Tabela 3 apresenta a distribuição dos genótipos Fc $\gamma$ RIIIB e SH e a frequência de alelos NA1 e NA2.

**Tabela 3-** Distribuição dos genótipos FcγRIIIB e SH e freqüência dos alelos NA1/2

|            | FcγRIIIB<br>(n = 169) |         |         | SH<br>(n=174) | Freqüência dos alelos<br>n = 338 |      |
|------------|-----------------------|---------|---------|---------------|----------------------------------|------|
|            | NA1/NA1               | NA2/NA2 | NA1/NA2 | SH+           | NA1                              | NA2  |
| N          | 34                    | 47      | 88      | 11            | 156                              | 182  |
| % do total | 20,1                  | 27,8    | 52,1    | 6,3           | 46,2                             | 53,8 |

Na Tabela 3, podemos observar que no grupo estudado a maior porcentagem de indivíduos apresenta como genótipo NA1/NA2. Desta forma, o alelo NA2 é o mais freqüente na população estudada. Já dos 174 indivíduos tipados para o polimorfismo SH, aproximadamente 6% deles mostram-se positivos para este polimorfismo. A freqüência das combinações dos genótipos NA1/2 e SH nos doadores voluntários saudáveis incluídos neste estudo está apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4-** Freqüência das combinações dos genótipos NA1/2 e SH

| Genótipo  | Nº de doadores com genótipo |
|---|-----------------------------|
|   | FcγRIIIB (%)<br>n=169       |
| <b>NA1</b>  |                             |
| NA1 <sup>+</sup> /NA2 <sup>-</sup> /SH <sup>+</sup> | 0                           |
| NA1 <sup>+</sup> /NA2 <sup>-</sup> /SH <sup>-</sup> | 34 (20,1)                   |
| <b>NA1/NA2</b>                                      |                             |
| NA1 <sup>+</sup> /NA2 <sup>+</sup> /SH <sup>+</sup> | 5 (3)                       |
| NA1 <sup>+</sup> /NA2 <sup>+</sup> /SH <sup>-</sup> | 83 (49,1)                   |
| <b>NA2</b>  |                             |
| NA1 <sup>-</sup> /NA2 <sup>+</sup> /SH <sup>+</sup> | 6 (3,6)                     |
| NA1 <sup>-</sup> /NA2 <sup>+</sup> /SH <sup>-</sup> | 41 (24,3)                   |

Na tabela 4, observamos que quando combinamos os genótipos NA e SH na população estudada, a maior freqüência é de indivíduos com genótipo NA1<sup>-</sup>/NA2<sup>+</sup>/SH<sup>+</sup> (3,6%) seguido pelos indivíduos NA1<sup>+</sup>/NA2<sup>+</sup>/SH<sup>+</sup> (3%).

#### 4.4 Análise da frequência dos genes H-131 e R-131

A determinação dos genótipos de 143 amostras para o FcγRIIIa, através de PCR alelo específica, e posterior análise do perfil eletroforético dos produtos destas PCRs, resultou em: 29 amostras H/H-131, 59 amostras R/R-131 e 55 amostras H/R-131.

A Tabela 5 apresenta a distribuição e a frequência dos genes H-131 e R-131 nos doadores voluntários saudáveis incluídos neste estudo.

**Tabela 5-** Distribuição dos genótipos e frequência dos alelos FcγRIIIA.

|                   | Nº de doadores com genótipo FcγRIIIA |         |         | Frequência dos alelos |       |
|-------------------|--------------------------------------|---------|---------|-----------------------|-------|
|                   | n = 143                              |         |         | n = 286               |       |
|                   | H/H-131                              | R/R-131 | H/R-131 | H-131                 | R-131 |
| <b>n</b>          | 29                                   | 59      | 55      | 113                   | 173   |
| <b>% do total</b> | 20,3                                 | 41,2    | 38,5    | 39,5                  | 60,5  |

Ao analisarmos a tabela 5, podemos inferir que na população estudada, a maior porcentagem de indivíduos apresenta como genótipo R/R-131 (41,2%), sendo que a frequência do alelo R-131 também é a maior (60,5%) se compararmos com a frequência de H-131.

#### 4.5 Análise das combinações dos genótipos

Após tipar geneticamente cada indivíduo, os seus genótipos foram agrupados e as combinações foram analisadas, como mostra a Tabela 6.

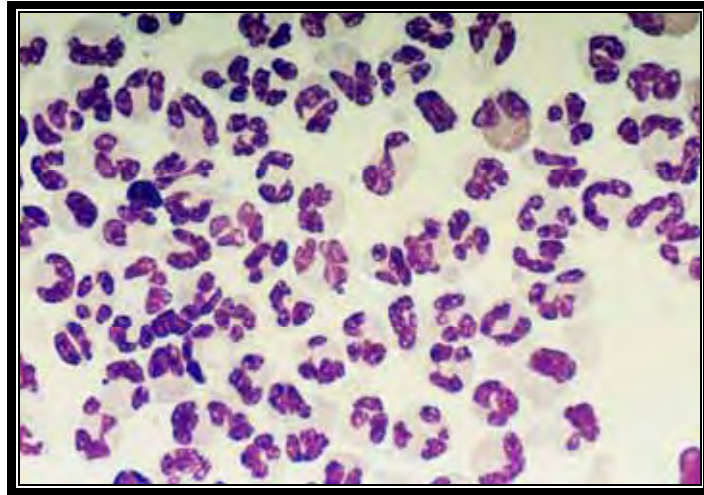
**Tabela 6-** Frequência das combinações observadas para os genótipos FcγR

| Genótipo        | Nº de indivíduos | %        |
|-----------------|------------------|----------|
|                 | n = 143          | do total |
| HH-131/NA1/1    | 4                | 2,8      |
| HH-131/NA1/1/SH | 0                | 0        |
| HH-131/NA2/2    | 8                | 5,6      |
| HH-131/NA2/2/SH | 0                | 0        |
| HH-131/NA1/2    | 16               | 11,2     |
| HH-131/NA1/2/SH | 1                | 0,7      |
| RR-131/NA1/1    | 12               | 8,4      |
| RR-131/NA1/1/SH | 0                | 0        |
| RR-131/NA2/2    | 11               | 7,7      |
| RR-131/NA2/2/SH | 3                | 2,1      |
| RR-131/NA1/2    | 30               | 20,9     |
| RR-131/NA1/2/SH | 3                | 2,1      |
| HR-131/NA1/1    | 11               | 7,7      |
| HR-131/NA1/1/SH | 0                | 0        |
| HR-131/NA2/2    | 13               | 9,1      |
| HR-131/NA2/2/SH | 2                | 1,4      |
| HR-131/NA1/2    | 28               | 19,6     |
| HR-131/NA1/2/SH | 1                | 0,7      |

A análise da tabela 6, mostra a combinação dos genótipos H/R e NA na população estudada, sendo que a maior frequência de indivíduos apresenta como genótipo RR-131/NA1/2 (20,9%), seguida pelos indivíduos que possuem genótipo HR-131/NA1/2 (19,6%). Nesta tabela estão incluídos apenas 10 indivíduos dos 11 que possuem o alelo SH, pois em um deles que possui genótipo NA2 não foi possível confirmar o seu genótipo para H/R.

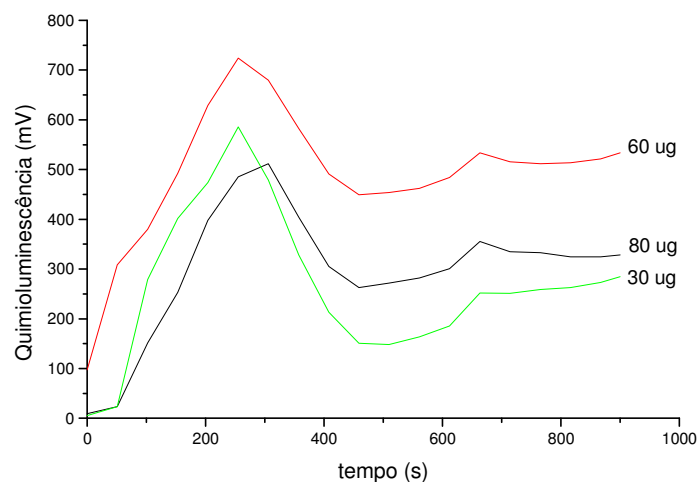
#### **4.6 Medida do burst oxidativo dos neutrófilos**

A Figura 8 apresenta a análise qualitativa da preparação de neutrófilos obtida a partir do método de separação em gelatina. Esta análise mostra que o método leva ao rendimento de uma população celular constituída por um número maior que 90% de neutrófilos.



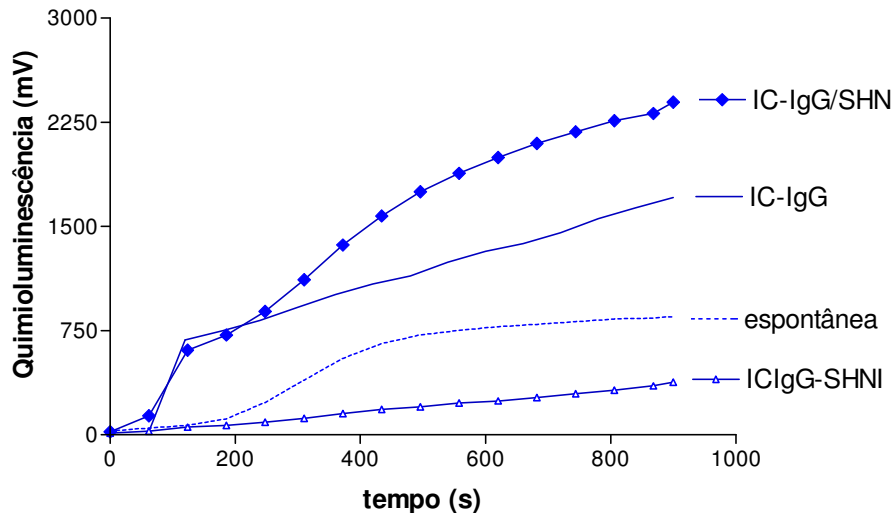
**Figura 8-** População de neutrófilos obtida a partir do método de gelatina. Lâmina preparada por citocentrifugação. Coloração de Leishman (microscopia de luz com aumento de 100x).

O *burst* oxidativo dos neutrófilos foi avaliado por ensaio de quimioluminescência (QL) dependente de luminol. Primeiramente, realizou-se um ensaio de padronização para definir a concentração de imunocomplexos (IC) a ser utilizada como estímulo para a célula (Figura 9). Nesta figura, é possível observar que a resposta dos neutrófilos *versus* a concentração de estímulo, refletiu um padrão dependente de receptores (efeito dose-resposta). Assim, um máximo de quimioluminescência foi observado quando as células foram estimuladas com 60 $\mu$ g do IC. Portanto, esta foi a concentração definida para os ensaios.



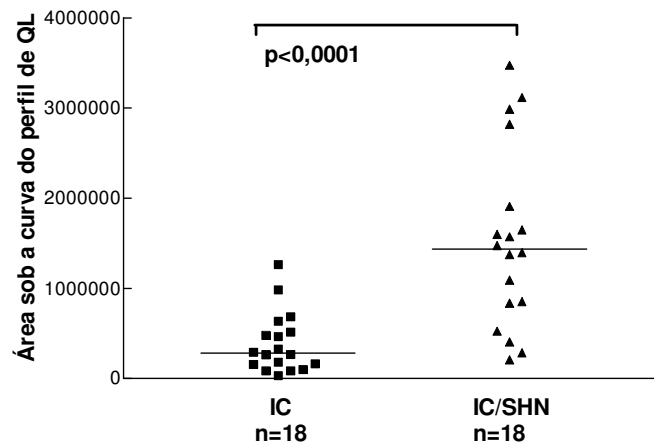
**Figura 9-** Padronização da concentração de imunocomplexos. Medida do *burst* oxidativo de neutrófilos ( $2 \times 10^6$ ) estimulados com diferentes concentrações de IC-IgG. Ensaio representativo de 3 experimentos individuais.

Os neutrófilos foram estimulados com 60 $\mu$ g de IC-IgG, IC-IgG opsonizados por complemento (IC-IgG/SHN) e, como controle, foi utilizado apenas neutrófilos e luminol (QL espontânea). Em alguns ensaios foi também utilizado IC-IgG-SHNI como controle negativo para a atividade do complemento. A Figura 10 representa o perfil de QL registrado para a medida do *burst* oxidativo com cada um destes estímulos.



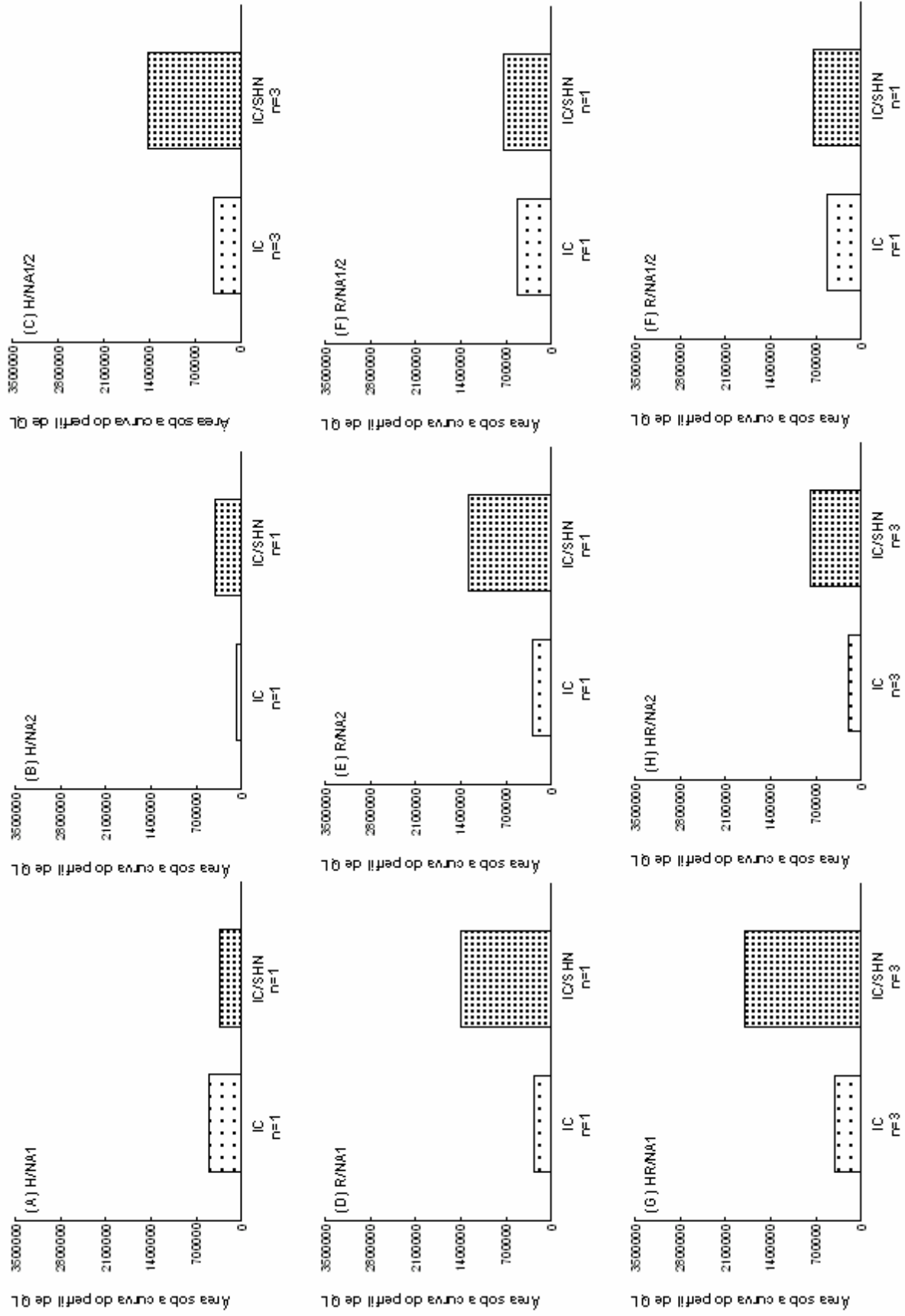
**Figura 10-** Representação do perfil de QL registrado (mV) para os diferentes estímulos. Neutrófilos ( $2 \times 10^6$ ) de um indivíduo homocigoto para o genótipo Fc $\gamma$ RIIB-NA1 para 60 $\mu$ g de diferentes estímulos.

Na Figura 11 pode-se observar que o efeito da opsonização pelo complemento, que contribui para aumentar o *burst* oxidativo dos neutrófilos, e pode ser medido por QL dependente de luminol (IC x IC/SHN,  $p < 0,0001$ ). Neste resultado as amostras foram consideradas independentemente das combinações dos genótipos HR e NA.



**Figura 11-** Medida da QL-dependente de luminol. Os neutrófilos ( $2 \times 10^6$ ) foram estimulados com  $60 \mu\text{g}$  de IC-IgG (via  $\text{Fc}\gamma\text{R}$ ) e com  $60 \mu\text{g}$  de IC/SHN (via  $\text{Fc}\gamma\text{R}/\text{CR}$ ) na presença de luminol. O resultado está apresentado como a área sob a curva do perfil de QL registrado para cada amostra. As barras representam os valores de mediana para cada grupo. Teste de Mann-Whitney: IC x IC/SHN,  $p < 0,0001$ .

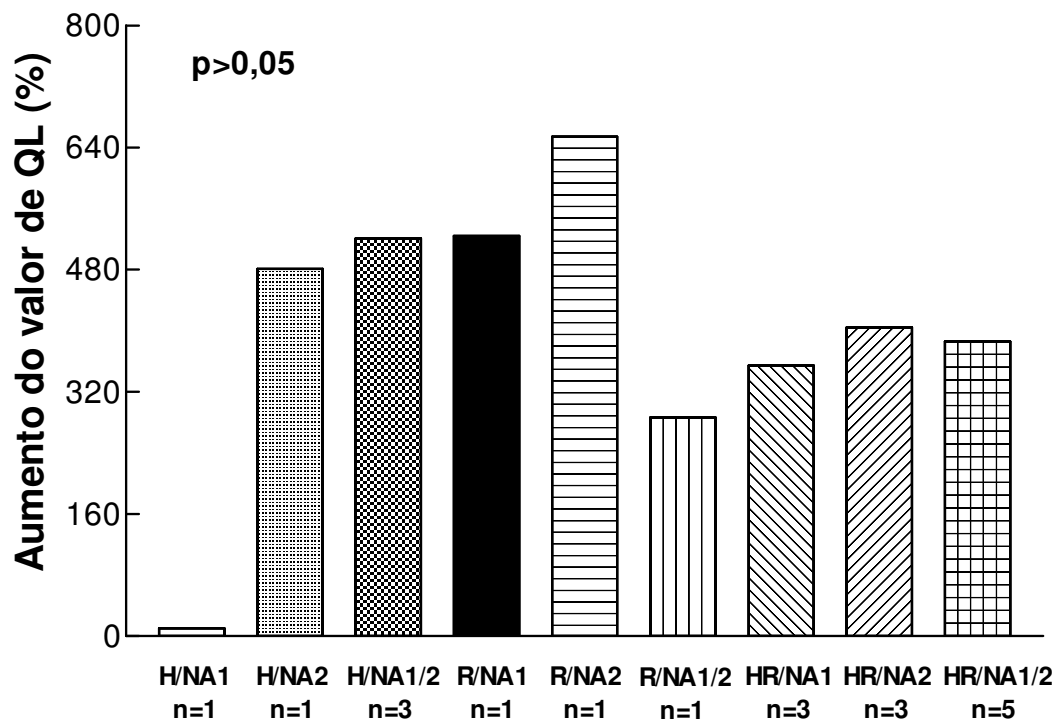
Para analisarmos se o perfil encontrado na figura anterior se mantinha ao separarmos os indivíduos pelos genótipos, apresentamos os resultados dos ensaios de QL por grupo, estes estão representados na Figura 12A-I. Os neutrófilos foram agrupados de acordo com o genótipo de cada indivíduo doador voluntário, comparando o efeito da opsonização sobre o perfil de QL em cada um dos grupos. Os dados aparecem como os valores das áreas sob as curvas dos perfis de QL registrados para cada estímulo. Os valores de QL espontânea (células e luminol) foram subtraídos.



**Figura 12 A-I-** QL dos neutrófilos agrupados segundo as diferentes combinações dos genótipos do FcγRIIb e do FcγRIIIb. As barras correspondem aos valores da mediana para cada grupo.

Após a análise da Figura 12, podemos inferir que mesmo que os grupos possuam um número de amostras pequeno, na maioria deles o perfil de QL se mantém, mostrando que a opsonização exerce um efeito para o aumento do *burst* oxidativo, pois há cooperação entre os receptores para IgG e para complemento, e que o polimorfismo não exerce influência sobre o perfil de QL pois o perfil é mantido como na Figura 11.

A cooperação dos CR para aumentar o *burst* oxidativo dos neutrófilos mediada por Fc $\gamma$ R foi avaliada a partir do cálculo, em porcentagem, do aumento do valor de QL obtida com o IC-IgG/SHN em relação aquele obtido com IC-IgG. A Figura 13 apresenta as diferenças do aumento do valor de QL, em porcentagem, dentro de cada grupo de genótipos para Fc $\gamma$ R.

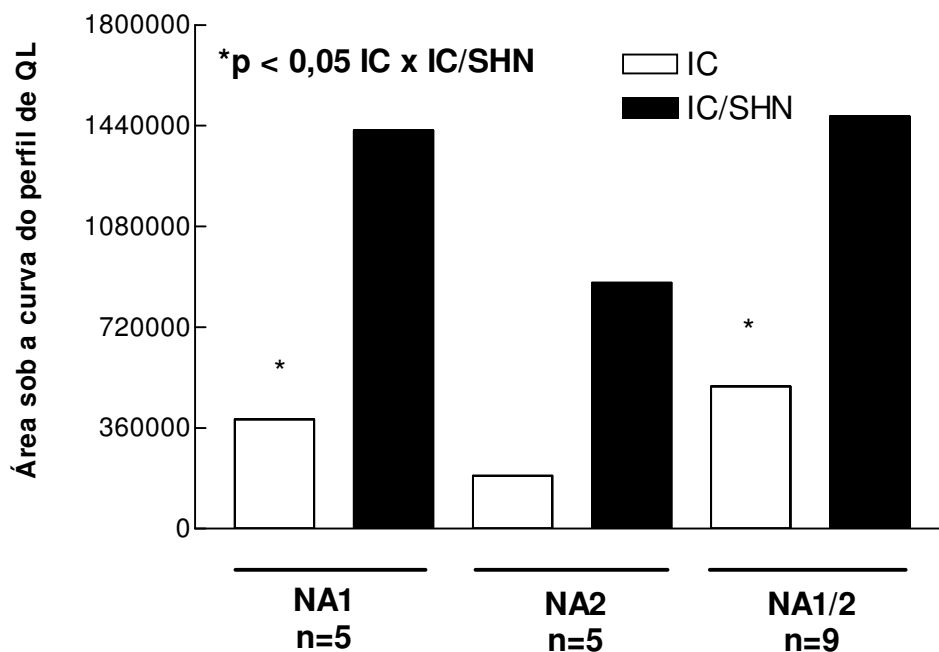


**Figura 13-** Cooperação dos CR para aumentar o *burst* oxidativo dos neutrófilos. Aumento do valor de QL (em porcentagem) em cada grupo de combinação dos genótipos HR/NA. Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn para comparações múltiplas:  $p > 0,05$ .

Analisando a Figura 13, podemos observar que no grupo R/NA2 o aumento do perfil de QL foi maior do que nos outros grupos, e que o grupo H/NA1 foi o que apresentou quase

nenhum aumento do perfil de QL, apesar de não possuímos nenhuma análise estatística significativa pelo fato de que os grupos são constituídos por um número muito pequeno de indivíduos.

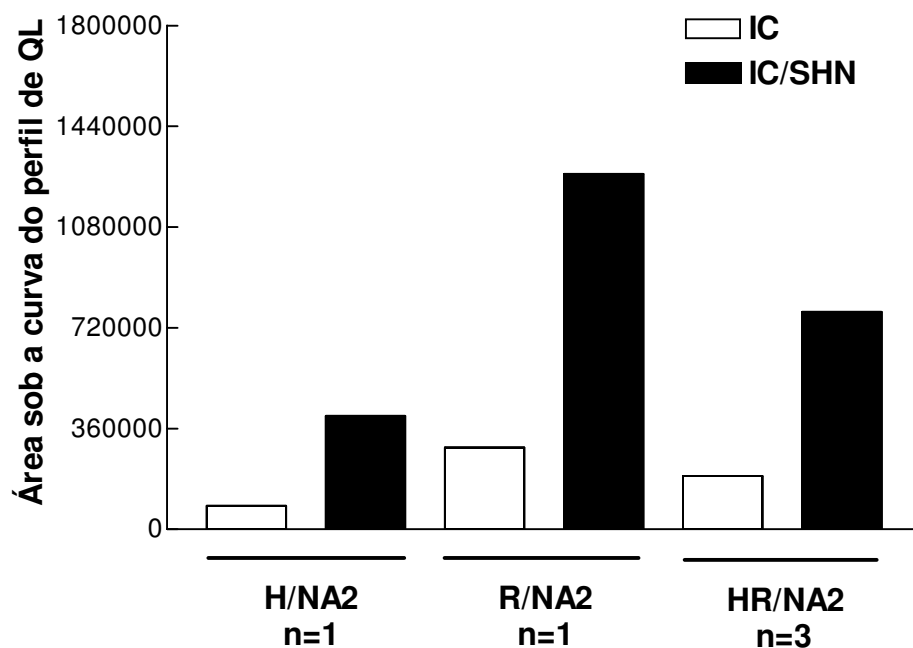
Desta forma, como para os ensaios de QL a distribuição das diferentes combinações dos genótipos HR/NA resultou em um número muito pequeno de amostras por grupo. Assim, neste momento, optou-se por agrupar os indivíduos apenas quanto aos genótipos para o Fc $\gamma$ RIIIb (NA) (Figura 14).



**Figura 14-** Análise da cooperação dos CR com os Fc $\gamma$ R em mediar o *burst* oxidativo de neutrófilos, de indivíduos com genótipos NA1, NA2 e NA1/2, mediado por Fc $\gamma$ R (IC-IgG) e/ou Fc $\gamma$ R/CR (IC-IgG/SHN). Teste de Kruskal-Wallis e de Dunn para comparações múltiplas: IC x IC/SHN, \* $p < 0,05$ .

Ao analisarmos a cooperação entre os receptores Fc $\gamma$ R e CR, na Figura 14, observamos uma diferença estatisticamente significativa no perfil de QL, quando utilizamos como estímulos apenas IC e IC/SHN, nos grupos NA1 e NA1/NA2, mostrando a cooperação entre os receptores.

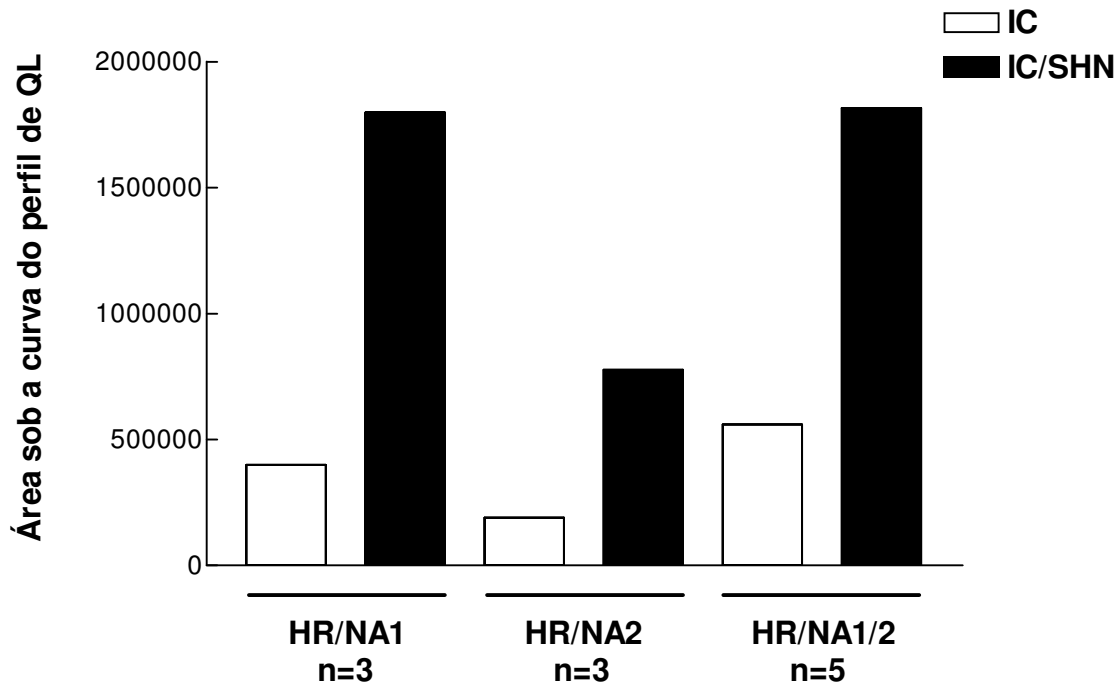
De acordo com a Figura 14, o genótipo NA2 não apresentou diferença significativa na QL estimulada por IC/SHN em relação àquela apenas com IC, sugerindo a falta de cooperação dos CR em mediar o *burst* oxidativo dos neutrófilos. Então, a seguir analisou-se a influência dos genótipos para FcγRIIa (HR) em combinação com o genótipo NA2. A Figura 15 apresenta o perfil de QL dentro do genótipo NA2, separado de acordo com os genótipos para FcγRIIa (H, R e H/R).



**Figura 15-** Perfil de QL dentro do grupo NA2, separado de acordo com as combinações dos genótipos HR para FcγRIIa.

Desta forma, após analisarmos a Figura 15, observamos que o grupo R/NA2 foi o que apresentou uma melhor cooperação entre os receptores, apesar de não apresentar uma diferença estatisticamente significativa devido ao pequeno número de indivíduos neste grupo.

Para eliminarmos a influência dos diferentes genótipos HR, analisamos o perfil de QL dentro do grupo HR separando-os de acordo com o genótipo para NA, como está apresentado na Figura 16:

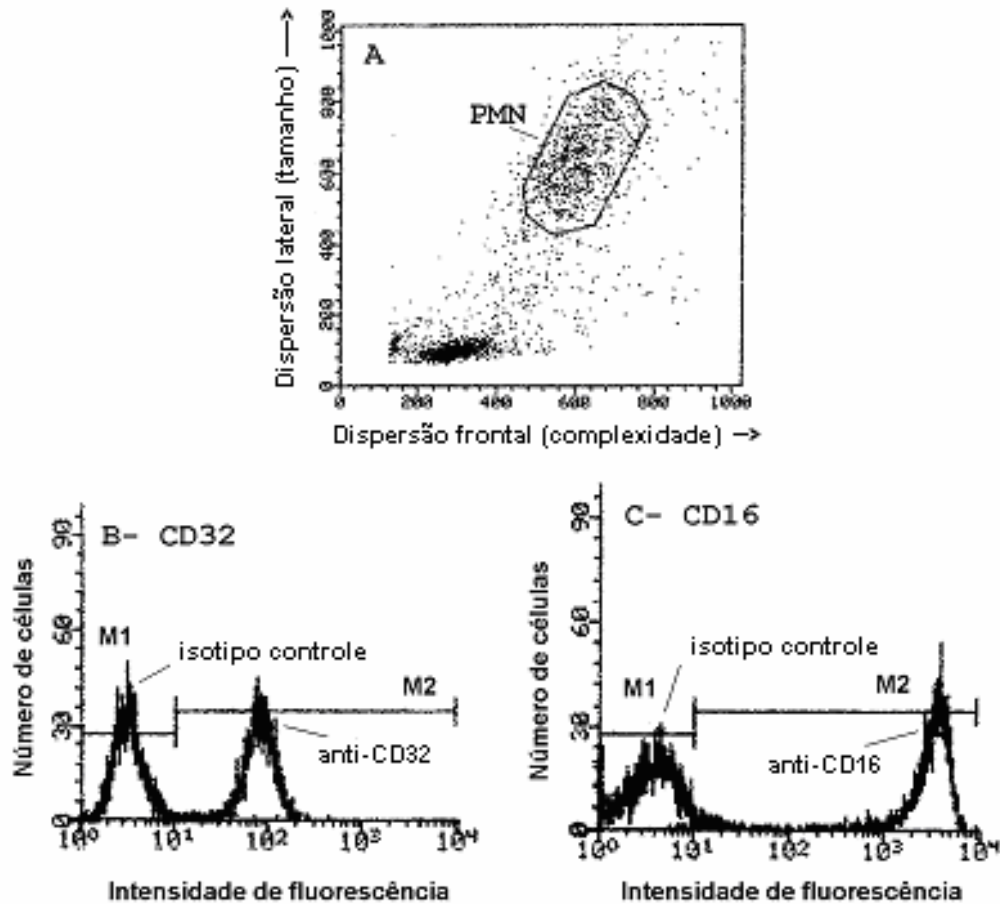


**Figura 16-** Perfil de QL dentro do grupo HR, separado de acordo com as combinações de genótipos para NA.

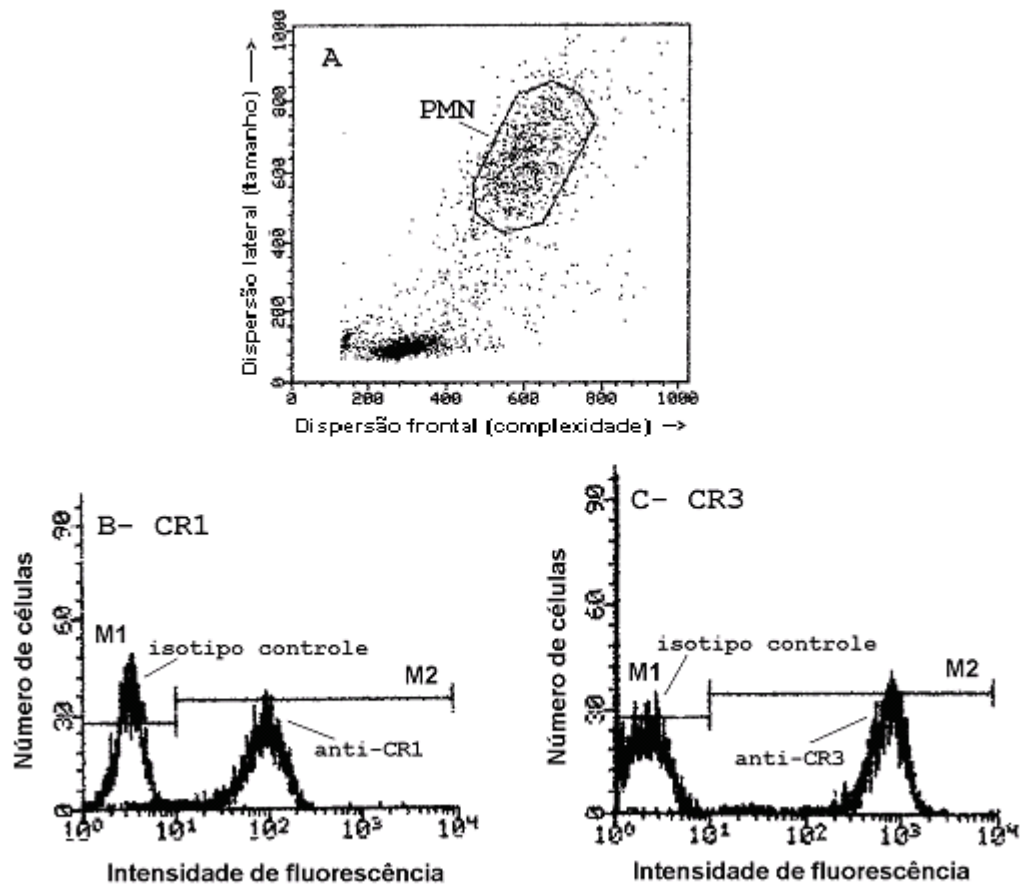
Assim, após analisarmos a Figura 16, observamos que o grupo HR/NA2 foi o que apresentou uma menor cooperação entre os receptores, apesar de não apresentar uma diferença estatisticamente significativa devido ao pequeno número de indivíduos nestes grupos.

#### **4.7 Quantificação dos $Fc\gamma R$ ( $Fc\gamma RIIa/CD32$ e $Fc\gamma RIIIb/CD16$ ) e dos receptores para complemento ( $CR1$ e $CR3$ ) nos neutrófilos por citometria de fluxo**

As Figuras 17 e 18 apresentam os histogramas representativos dos ensaios de citometria de fluxo para determinação da expressão dos  $Fc\gamma R$ ,  $Fc\gamma RIIa$  (CD32) e  $Fc\gamma RIIIb$  (CD16), nos neutrófilos [polimorfonucleares (PMN)] humanos.



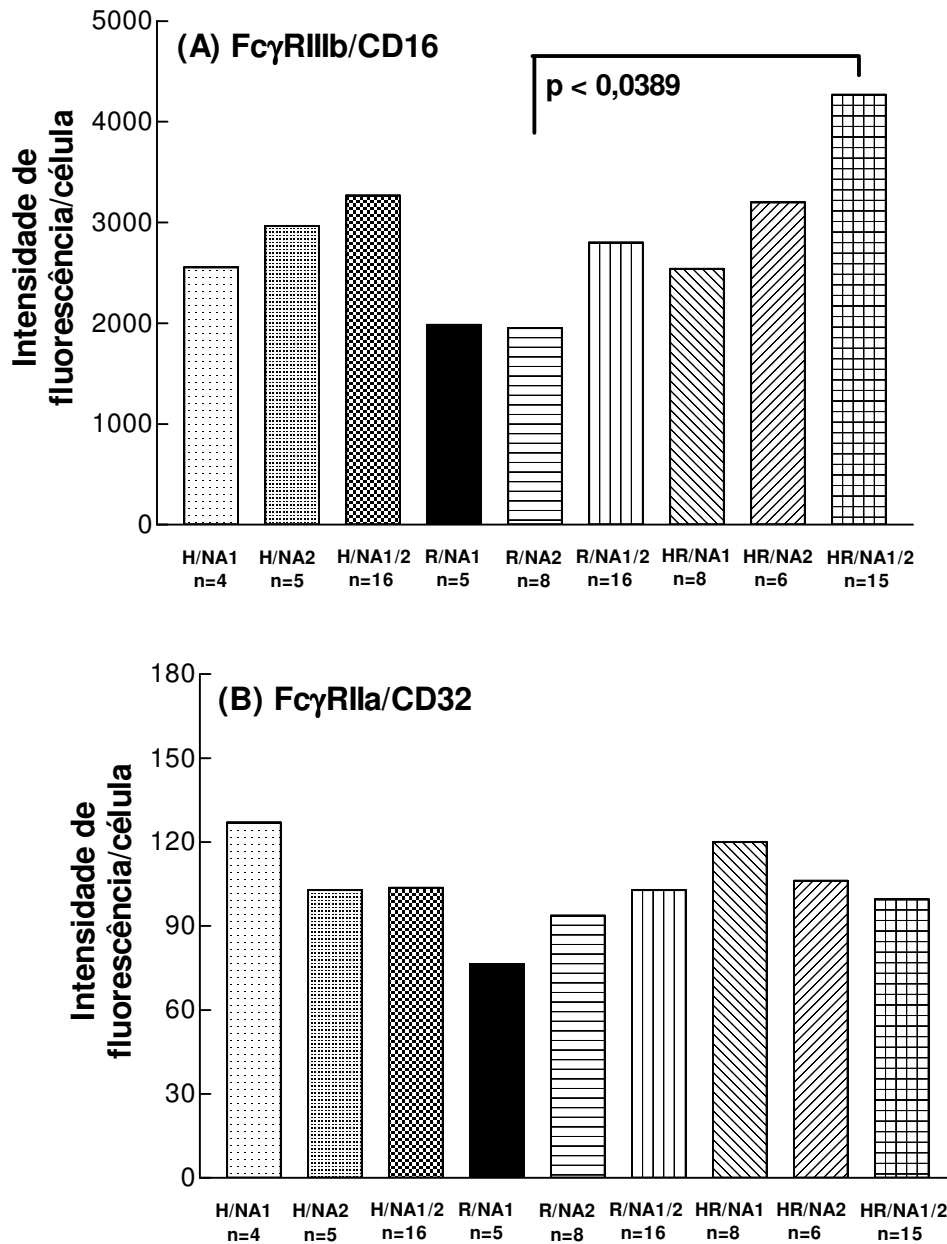
**Figura 17-** Histogramas representativos dos ensaios de citometria de fluxo para determinação da expressão dos Fc $\gamma$ R, Fc $\gamma$ RIIa (CD32) e Fc $\gamma$ RIIIb (CD16), nos neutrófilos (PMN) humanos de 83 amostras. Em A, observamos as células do sangue total inseridas no aparelho, sendo que a janela demarca a população de PMN analisada. Em B e C, observamos os picos de fluorescência representando as células marcadas com os respectivos anticorpos isotipos controle e as células marcadas com o anticorpo fluorescente anti-CD32 (B) ou anti-CD16 (C). M1 – fluorescência inespecífica (isotipo controle); M2 – fluorescência específica para as células coradas com os respectivos anticorpos. Estas análises foram feitas em um citômetro de fluxo modelo Becton & Dickinson (BD) FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorter*) Calibur com *software* Cell Quest Pro.



**Figura 18-** Histogramas representativos dos ensaios de citometria de fluxo para determinação da expressão dos receptores para complemento, CR1 (CD35) e CR3, nos neutrófilos (PMN) humanos de 55 amostras. Em A, observamos as células do sangue total inseridas no aparelho, sendo que a janela demarca a população de PMN analisada. Em B e C, observamos os picos de fluorescência representando as células marcadas com os respectivos anticorpos isotipos controle e as células marcadas com o anticorpo fluorescente anti-CR1 (B) ou anti-CR3 (C). M1 – fluorescência inespecífica (isotipo controle); M2 – fluorescência específica para as células coradas com os respectivos anticorpos. Estas análises foram feitas em um citômetro de fluxo modelo Becton & Dickinson (BD) FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorter*) Calibur com *software* Cell Quest Pro.

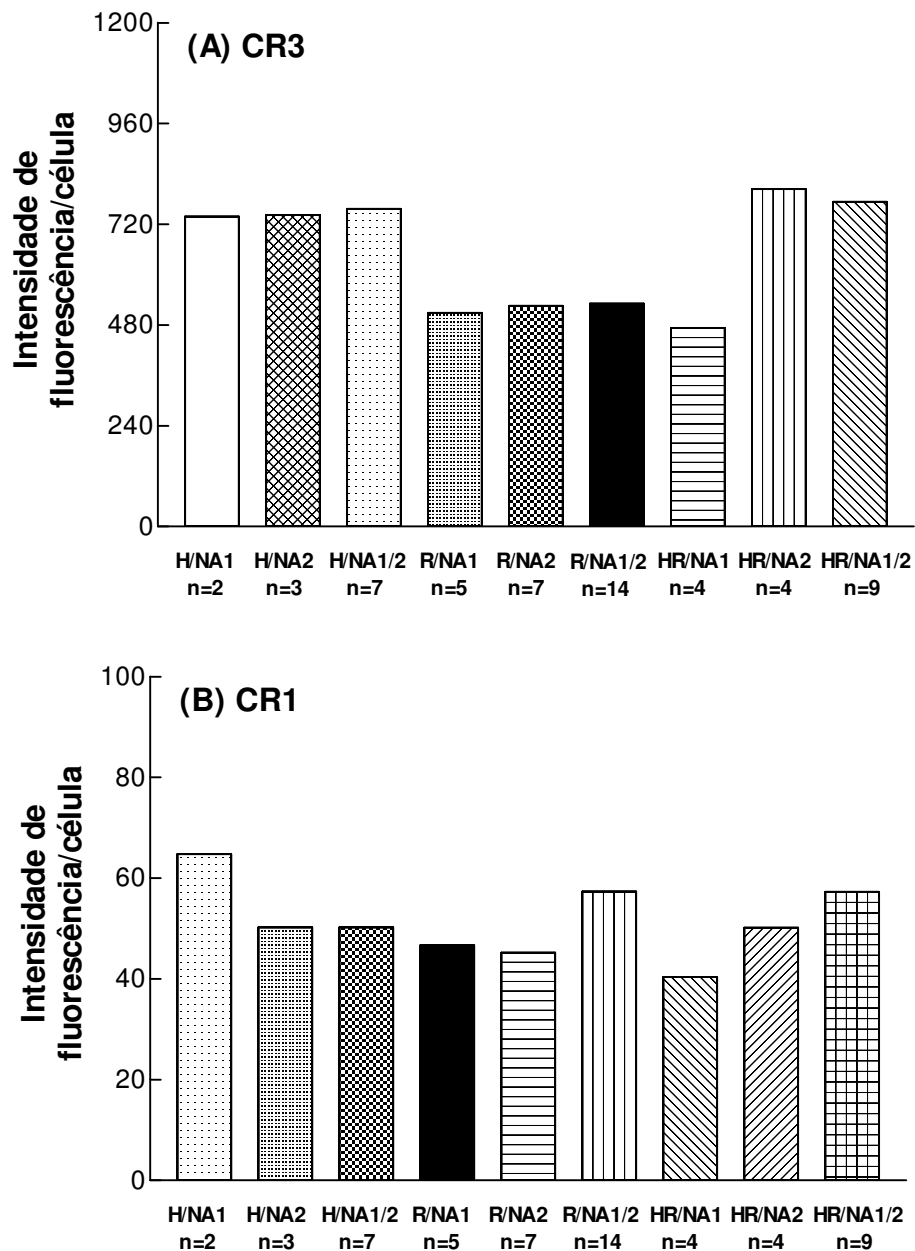
Os resultados da expressão dos receptores Fc $\gamma$ R (CD16 e CD32) nos diferentes genótipos, determinada por citometria de fluxo, estão apresentados na Figura 19A-B. Somente para CD16 encontrou-se diferença significativa entre as combinações R/NA2 x

HR/NA1/2.



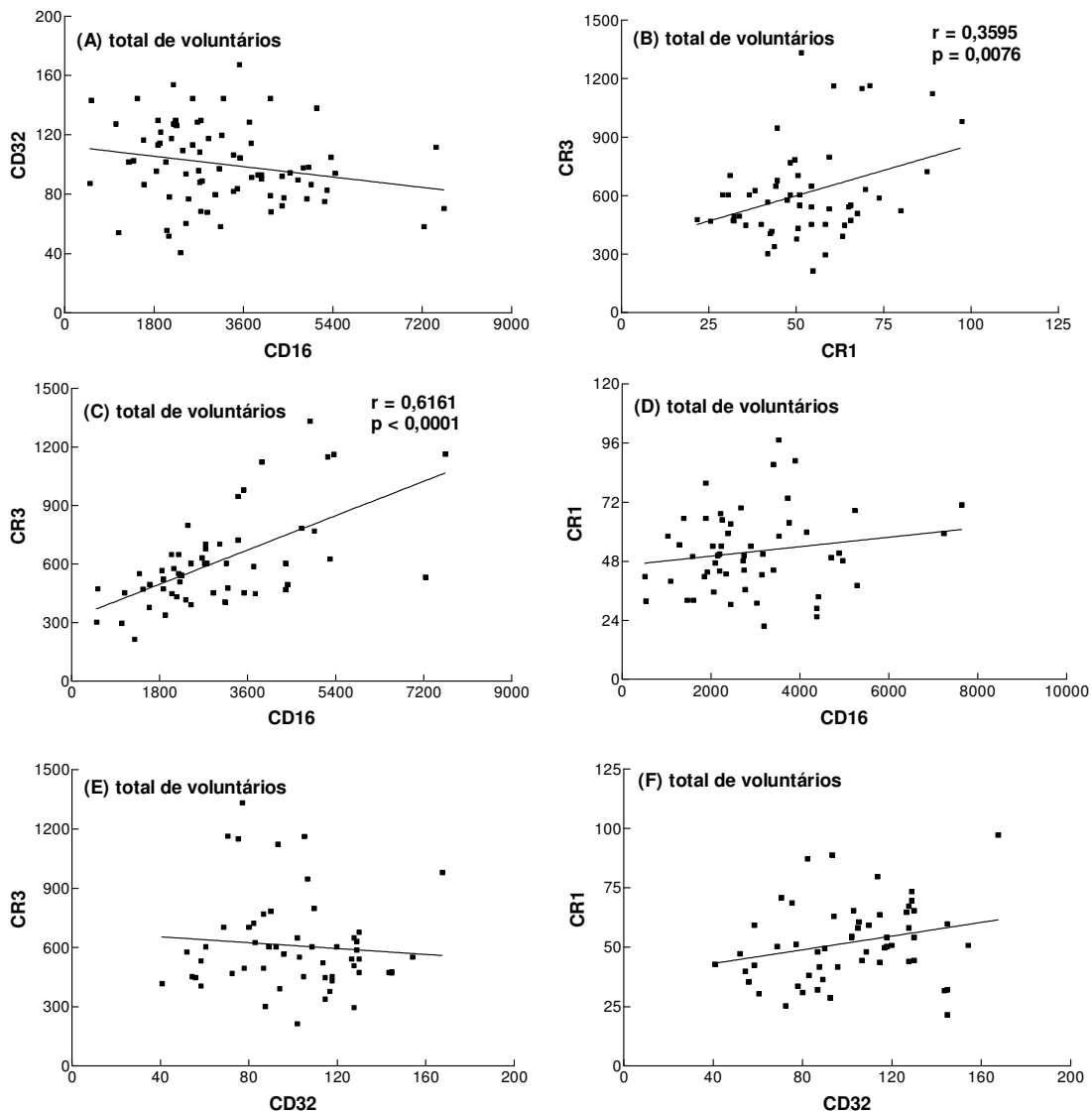
**Figura 19A-B-** Análise da expressão de CD16 e CD32 por citometria de fluxo, nos neutrófilos de indivíduos com diferentes combinações dos genótipos para HR/NA. As barras representam a média dos valores das medianas da intensidade de fluorescência/célula de cada grupo. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas.

Os resultados da expressão dos receptores para complemento (CR1 e CR3) nos diferentes genótipos, determinada por citometria de fluxo, estão apresentados na Figura 20A-B. Não foi observada qualquer diferença estatística significativa entre os grupos analisados.



**Figura 20A-B-** Análise da expressão de CR3 e CR1, por citometria de fluxo, nos neutrófilos de indivíduos com diferentes combinações dos genótipos para HR/NA. As barras representam a média dos valores das medianas da intensidade de fluorescência/célula de cada grupo. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas.

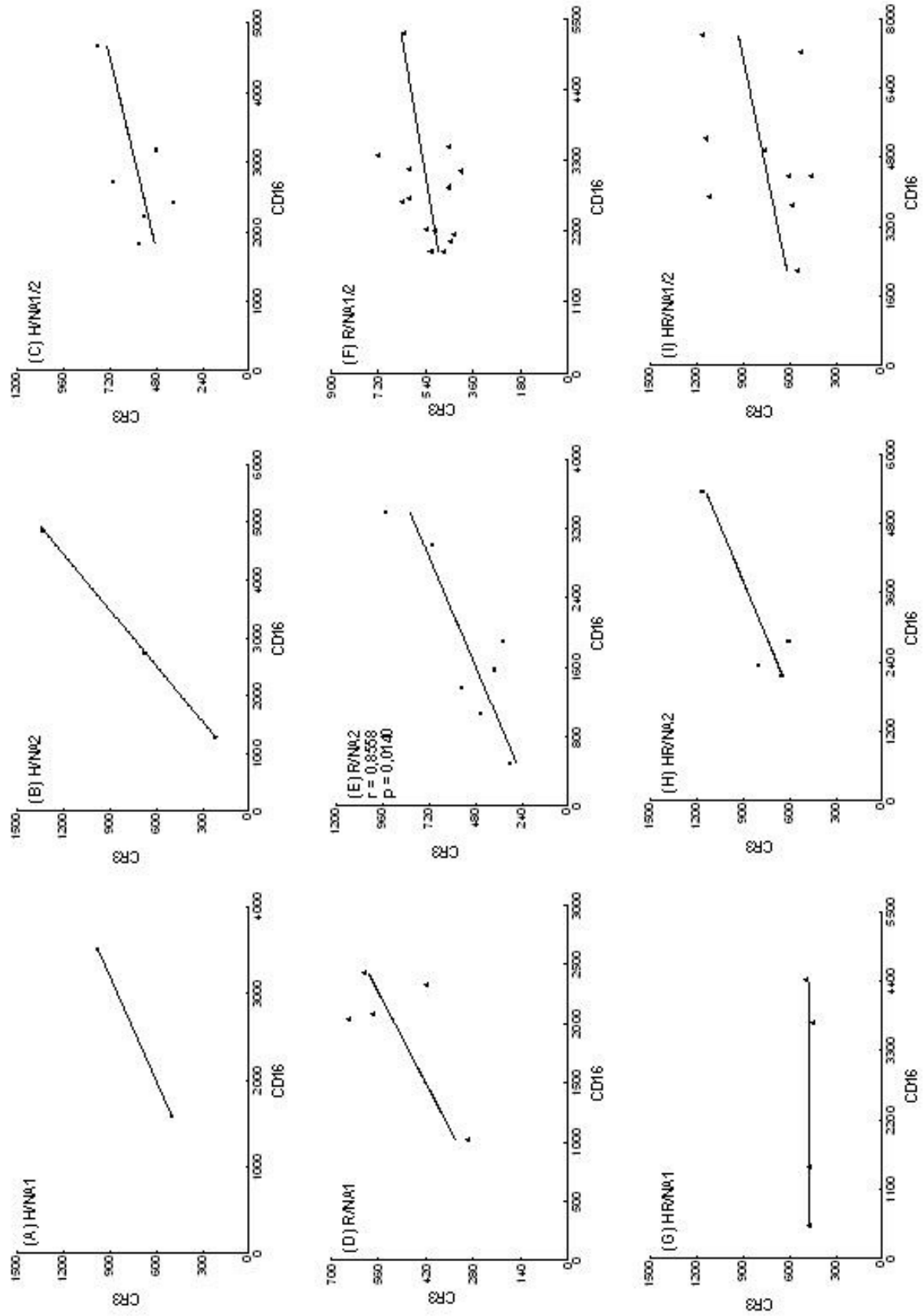
A Figura 21A-F mostra a correlação entre os diferentes receptores no total de voluntários sem discriminar as combinações de genótipos HR/NA. Observou-se uma correlação positiva significativa entre a expressão de CR3 e CR1 (Figura 21B) e entre CR3 e CD16 (Figura 21C).



**Figura 21A-F-** Análise da correlação da expressão dos receptores CD16, CD32, CR3 e CR1. Teste de Pearson.

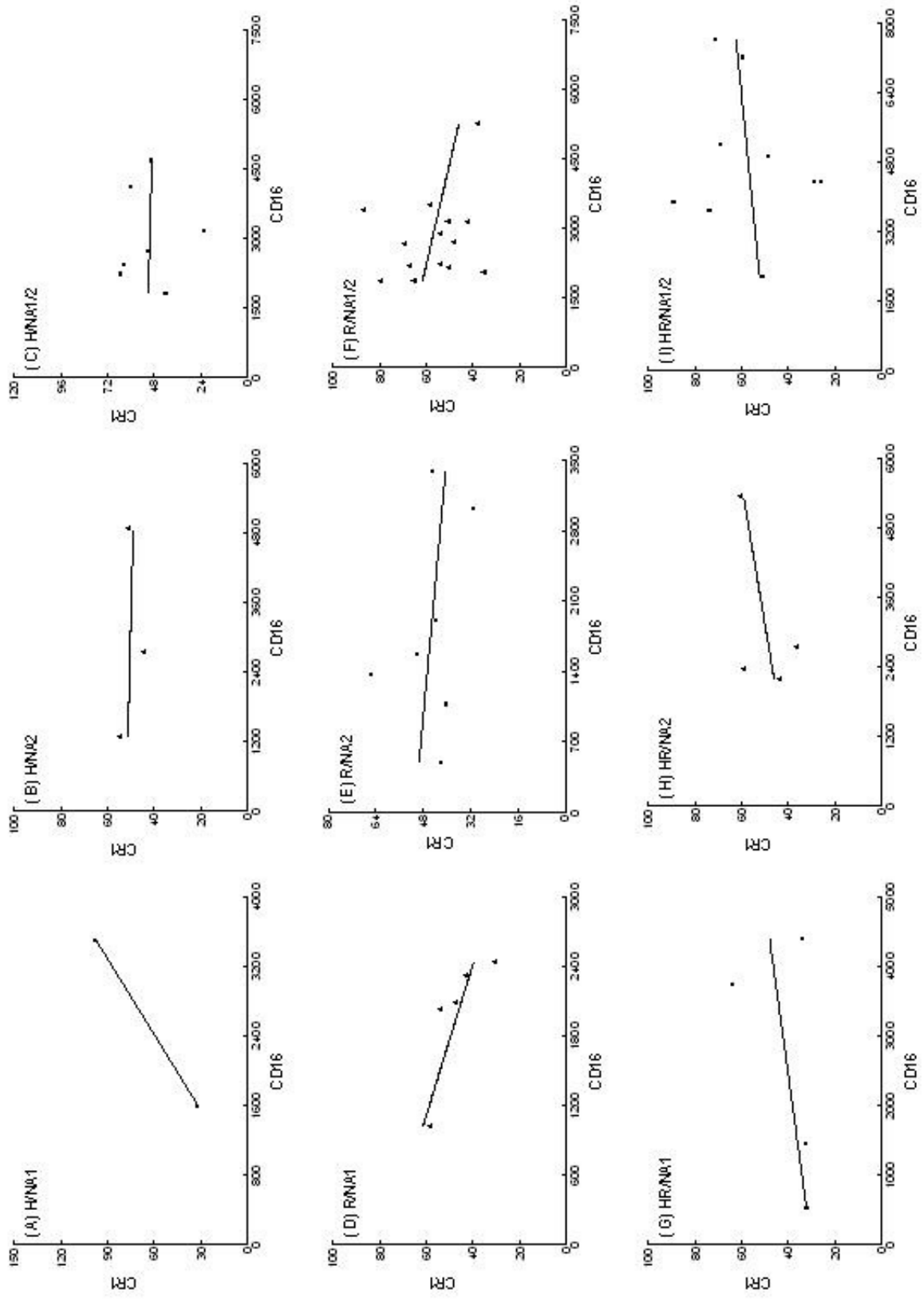
Dando ênfase ao CD16, as correlações com os demais receptores nos neutrófilos dos indivíduos com diferentes combinações dos genótipos HR/NA foram analisadas. Os resultados das correlações entre os receptores CR3 e CD16, nas diferentes combinações de genótipos, estão apresentados na Figura 22A-I. A correlação positiva observada para CR3 x CD16 no grupo de voluntários totais (Figura 21C) manteve-se significativa somente na combinação R/NA2 dos genótipos (Figura 22E), sendo que o perfil correspondente a uma correlação positiva, como no total de voluntários analisado, se manteve apesar de não ser

estatisticamente significativa. E a correlação praticamente desapareceu dentro do grupo HR/NA1.



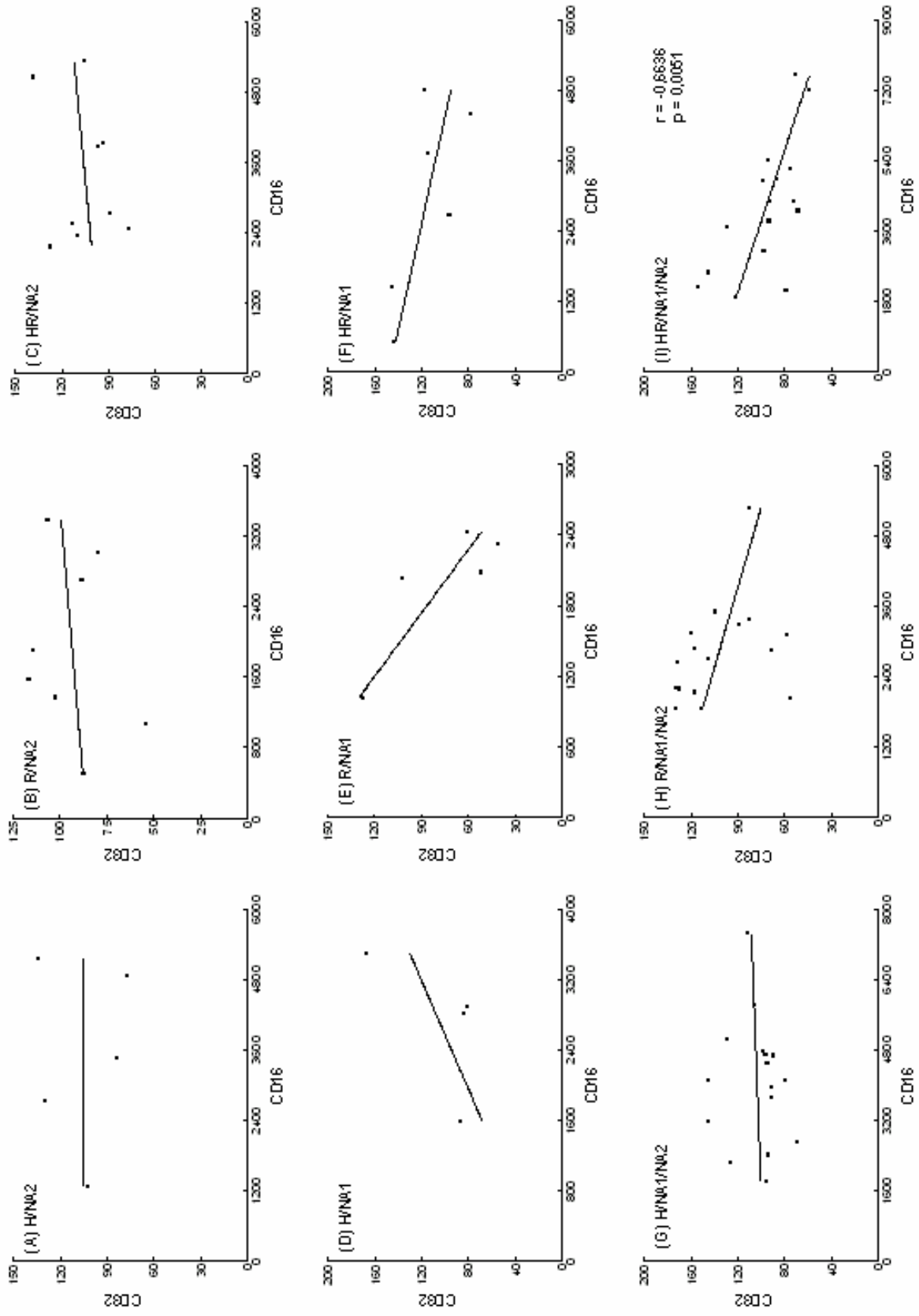
**Figura 22 A-I-** Análise da correlação entre CD16 e CR3 nas diferentes combinações de genótipos HR/NA. Teste de

A Figura 23A-I mostra as correlações de CR1 e CD16 em relação às diferentes combinações de genótipos HR/NA, desta forma podemos observar que em nenhum grupo há correlação estatisticamente significativa entre CR1 e CD16, e que nem o perfil do total de voluntários (Figura 21D) é mantido.



**Figura 23A-I-** Correlações entre CR1 e CD16 nas diferentes combinações de genótipos HR/NA. Teste de Pearson.

As correlações entre os receptores CD16 e CD32 em cada combinação de genótipos estão apresentadas na Figura 24A-I. Observou-se uma correlação positiva significativa para CD32 x CD16 na combinação HR/NA1/2 dos genótipos (Figura 24I). Ao compararmos a figura 24A-I com o gráfico do total de voluntários (Figura 21A) que possui uma correlação não significativa mas que tende a ser negativa, observamos que alguns grupos, R/NA1 (Figura 24E), HR/NA1 (Figura 24F) e R/NA1/NA2 (Figura 24H), apesar de não apresentarem uma correlação estatisticamente significativa, demonstram uma tendência a uma correlação negativa, mantendo o perfil observado na população total (Figura 21A), mostrando que a expressão dos receptores para CD32 e CD16 tende a ser inversamente proporcional.



**Figura 24A-I-** Correlações entre CD32 e CD16 nas diferentes combinações de genótipos HR/NA. Teste de Pearson.

Portanto, a análise da expressão destes receptores foi importante para avaliar se o polimorfismo genético do FcγRIIIb (CD16) e do FcγRIIa (CD32) poderia influenciar a densidade de receptores na membrana do neutrófilo. A expressão do CR1 e do CR3 nos neutrófilos também foi determinada, uma vez que a cooperação destes receptores foi avaliada no ensaio de medida do *burst* oxidativo.

## **5. CONCLUSÕES**

- Quanto a genotipagem, a população estudada apresentou uma maior frequência de indivíduos NA1/NA2 (52,1%), apenas 6,3% dos indivíduos genotipados para SH apresentaram este gene, e quando os genótipos para NA e SH foram combinados nenhum indivíduo homocigoto NA1 apresentou SH. Dos 143 indivíduos genotipados para FcγRIIIa, a maioria deles (41,2%) apresentaram R/R-131 como genótipo. E quando combinamos os genótipos para HR e NA, observamos uma maior frequência de indivíduos RR-131/NA1/2 (20,9%) e HR-131/NA1/2 (19,6%).
- De um modo geral, a opsonização com complemento aumenta o *burst* oxidativo confirmando os dados da literatura;
- A cooperação dos CR com os FcγRIIIb em indivíduos NA2/NA2 não foi tão eficiente quanto nos outros genótipos para NA;
- O genótipo R/NA2 apresentou uma melhor cooperação entre os receptores para gerar o *burst* oxidativo dos neutrófilos;
- Quanto à expressão de CD16, observou-se uma diferença significativa na expressão de CD16 entre os grupos R/NA2 e HR/NA1/2, quando comparados com os demais grupos;
- Observou-se uma correlação positiva e significativa entre CR3 e CD16;
- A correlação entre os receptores estudados, em alguns casos, pode ser influenciada pelas diferentes combinações de genótipos.

## **6. DISCUSSÃO**

Os receptores para a porção Fc das IgG (Fc $\gamma$ R) estão amplamente expressos nas células do sistema imune e fazem uma importante ligação entre as respostas imunes humoral e celular, por estimularem uma variedade de respostas efetoras (DAËRON, 1997b; BIEZEVELD et al., 2006). O polimorfismo genético dos Fc $\gamma$ R leva ao aparecimento de variantes com polimorfismo funcional, o que pode resultar em comprometimento das respostas biológicas mediadas por esses receptores (ZHOU; BROWN, 1994).

A isoforma Fc $\gamma$ RIIIb é expressa somente nos neutrófilos (SELVARAJ et al., 1988; ZHOU; BROWN, 1994) e tem sido descrito que os alótipos NA1 e NA2, os quais apresentam diferenças no número de resíduos de açúcares, podem diferir em algumas respostas desta célula (SALMON; EDBERG; KIMBERLY, 1990; BREDIUS et al., 1994; ORY et al., 1989; KUWANO et al., 2000). Uma vez que a cooperação entre os Fc $\gamma$ RIIIa/IIIb com o CR3 promove a estimulação máxima das respostas do neutrófilo, dentre elas o *burst* oxidativo, e que a interação Fc $\gamma$ RIIIb/CR3 ocorre via sítio de ligação lectina-sacarídeo, é importante avaliar se os alótipos NA1/NA2 podem influenciar a cooperação Fc $\gamma$ R/CR.

No presente estudo, primeiramente nós procedemos a genotipagem dos diferentes alótipos do Fc $\gamma$ RIIIb e do Fc $\gamma$ RIIIa, através da técnica de PCR utilizando-se oligonucleotídeos alelo-específicos, para determinarmos a frequência e as combinações dos genótipos, dos doadores de sangue do Hemonúcleo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, já que existe uma alta relevância com relação aos polimorfismos das isoformas dos Fc $\gamma$ R para a suscetibilidade e para o prognóstico das doenças auto-imunes, infecciosas e risco de rejeição a aloenxertos (SALMON; PRICOP, 2001; KARASSA; TRIKALINOS; IOANNIDIS, 2004; YUAN et al., 2003; REKAND et al., 2002; YUAN et al., 2004).

Quanto ao polimorfismo para o Fc $\gamma$ RIIIb, observamos que na população estudada (169 indivíduos), a maioria (52,1%) apresentava como genótipo NA1/NA2, seguidos por 27,8% de indivíduos NA2/NA2 e por último 20,1% de indivíduos NA1/NA1. E a frequência dos alelos distribui-se da seguinte forma: NA1 (46,2%) e NA2 (53,8%). No estudo realizado por Kuwano et al., (2000) após a genotipagem de alguns grupos étnicos Brasileiros como os

índios de Amazônia e doadores de sangue, observou-se as seguintes freqüências com relação ao FcγRIIIb para os doadores de sangue: 83,5% de indivíduos NA1/NA2 e 16,5% de NA1/NA1, sendo que nenhum indivíduo NA2/NA2 foi encontrado neste estudo. Com relação a genotipagem dos índios da Amazônia, uma população mais homogênea, as seguintes freqüências foram encontradas: 52,2% de NA1/NA1, 30,4% de NA1/NA2 e 5,5% de NA2/NA2. Além disso, ao compararmos a freqüência dos nossos genótipos com o de outras populações como Alemães e Americanos brancos observamos que a nossa distribuição assemelha-se mais com a destas populações onde há um predomínio de indivíduos NA1/NA2 (46% na população Alemã e 51% nos Americanos brancos), seguidos pelos genótipos NA2/NA2 (42% na população Alemã e 38% nos Americanos brancos) e finalmente pelos indivíduos NA1/NA1 (12% na população Alemã e 11% nos Americanos brancos) (BUX et al., 1995; HESSNER et al., 1996). Na população Norueguesa, também se observou um predomínio de indivíduos NA1/NA2 (45,2%), como na população estudada por nós, seguido por 42,3% de NA2/NA2 e 12,5% de NA1/NA1 (TORKILDSEN et al., 2005). Em contrapartida, a população de Afro-Americanos possui um predomínio do genótipo NA2/NA2 (54%), seguidos por 30% de NA1/NA2 e 16% de NA1/NA1 (HESSNER et al., 1996). A população de Índios-Asiáticos apresenta uma distribuição de 55% de NA2/NA2, 28% de NA1/NA2 e 16% de NA1/NA1 (HESSNER et al., 1996). A população Hispânica possui uma distribuição destes genótipos da seguinte forma: 72% de NA1/NA2, 17% de NA1/NA1 e 11% de NA2/NA2 (HESSNER et al., 1996). Os Americanos Nativos apresentam predomínio do genótipo NA1/NA2 (71%), com 20% da população apresentando genótipo NA1/NA1 (HESSNER et al., 1996). Já na população Japonesa, 52% dos indivíduos são NA1/NA2, 36% NA1/NA1 e 12% NA2/NA2 (FUJIWARA et al., 1999) que se assemelha a população Chinesa: 57,4% NA1/NA2, 31,8% NA1/NA1 e 10,9% NA2/NA2 (CHU et al., 2003). Na população Holandesa, este genótipo se distribui da seguinte forma: 47% NA1/NA2, 40% NA2/NA2 e 13% NA1/NA1 (VAN DER POL et al., 2003). Desta forma, ao levarmos em conta o predomínio de indivíduos genotipados para NA1/NA2, observamos que as populações que também apresentam predomínio deste genótipo são: doadores de sangue do Brasil

(KUWANO et al., 2000), Alemães, Americanos branco, Noruegueses, Hispânicos, Americanos nativos, Japoneses, Chineses e Holandeses, comprovando a forte miscigenação da população brasileira, pois o padrão de predomínio se manteve. Os dados comparativos entre a nossa população e as anteriormente citadas estão apresentados na Tabela 7.

Na população estudada o alelo SH estava presente em apenas 6,3% dos indivíduos genotipados (n=174), o que está de acordo com a frequência de indivíduos SH-positivos (5%) reportada na população caucasiana (BUX et al., 1997; KOENE et al., 1998). Nesta época ainda era desconhecida a prevalência deste alo-antígeno em outros grupos raciais, foi então que em 1999, HESSNER e colaboradores genotiparam seis grupos raciais: Afro-Americanos (SH+: 22,5%), Índios-Asiáticos (SH+: 15,9%), Hispânicos (SH+: 7,8%), Coreanos (SH+: 0%) e Americanos nativos (SH+: 1,1%). Sendo que a maior frequência do gene SH (22,5%) foi observada na população Afro-Americana, enquanto que o alelo SH não foi observado na população Coreana. Os dados comparativos entre a nossa população e as demais apresentadas estão apresentados na Tabela 8.

A genotipagem destes polimorfismos na população apresenta uma grande relevância clínica já que os antígenos NA são clinicamente importantes, pois o polimorfismo estrutural do FcγRIIIb resulta na formação de alo-anticorpos, os quais podem ser responsáveis pela ocorrência da neutropenia neonatal alo-imune (NNA) e reações transfusionais (KOENE et al., 1998). Em 1996, Bux e colaboradores identificaram um novo aloantígeno específico dos neutrófilos chamado de SH, sendo posteriormente denominado HNA-1c, que ocorre como uma mutação do NA2. Por causa da alo-imunização, o SH também tem sido reportado como causa da NNA, pois alo-anticorpos para o antígeno SH já foram identificados no soro materno de casos de NNA, indicando que a alo-imunização não é um evento raro. Embora esta patologia não seja muito frequente, a NNA pode levar à graves infecções, como meningite ou pneumonia, principalmente quando não reconhecida adequadamente logo após o nascimento (BUX et al., 1997).

Desta forma, hoje em dia reconhece-se, que muitos indivíduos saudáveis

apresentam três genes  $Fc\gamma RIIIB$  para o receptor  $Fc\gamma RIIIb$ , e este polimorfismo é capaz de predispor o indivíduo a determinadas patologias.

Já o genótipo  $Fc\gamma RIIa$  se distribui da seguinte forma na população estudada: 41,2% indivíduos R/R-131, seguidos por 38,5% de indivíduos H/R-131 e por 20,3% de indivíduos H/H-131. Quanto à frequência dos alelos, encontramos: 60,5% para R-131 e 39,5% para H-131. Bazilio et al., (2004) relatou que, na população brasileira saudável, a frequência destes genótipos apresenta-se da seguinte forma: 27% H/H-131 e 21% R/R-131, e na população Caucasiana Francesa: 31% H/H-131 e 18% R/R-131, e na população Chinesa 26% H/H-131 e 16% R/R-131 (BAZILIO et al., 2004). A população Norueguesa apresenta este genótipo distribuído da seguinte maneira: 47% H/R-131, 32,5% R/R-131 e 20,5% H/H-131 (TORKILDSEN et al., 2005) e na população Etíope: 44,1% H/R-131, 31,2% R/R-131 e 24,7% H/H-131 (VAN DEN BERG et al., 2001). Analisando ainda, dados sobre a população Japonesa, encontramos que os genótipos se distribuem da seguinte maneira: 64,1% de H/H-131, 32,7% de H/R-131 e 2,9% de R/R-131 (HATTA et al., 1999) e na população Holandesa: 50% H/R-131, 26% H/H-131 e 24% R/R-131 (VAN DER POL et al., 2003). Num estudo realizado por Kuwano et al., (2000), após a genotipagem de alguns grupos étnicos Brasileiros como os índios de Amazônia e doadores de sangue, observaram as seguintes frequências com relação ao  $Fc\gamma RIIa$  para os doadores de sangue: 44,7% H/R-131, 32,9% R/R-131 e 22,4% H/H-131, e para os índios da Amazônia: 83,7% R/R-131, 15,2% H/R-131 e 1,1% H/H-131. Ao analisarmos a frequência dos genótipos da população estudada por nós com as populações de diferentes etnias, observamos que apenas na nossa população estudada e no estudo com índios da Amazônia houve um predomínio de indivíduos com genótipo R/R-131, mostrando uma semelhança entre os dados destas duas populações. Os dados comparativos entre a nossa população e as anteriormente descritas estão apresentados na Tabela 9.

Desta forma podemos observar que existe uma discrepância na frequência destes genótipos, associada com a variação étnica.

O polimorfismo apresentado pelo Fc $\gamma$ RIIA, H e R-131, promove diferenças quanto a ligação das diferentes classes de IgG, pelo fato do H-131 ligar eficientemente IgG2 e o R-131 possuir baixa afinidade por este ligante, este polimorfismo determina diferenças quanto a fagocitose. Desta forma indivíduos homozigotos para R-131 apresentam um maior risco a infecções graves causadas por microorganismos encapsulados (que predominantemente são eliminados via resposta de IgG2) (SALMON et al., 1992; BREDIUS et al., 1993; BREDIUS et al., 1994; SANDERS, et al., 1994; PLATONOV et al., 1998; DOMINGO et al., 2002) e em consequência da deficiência na remoção dos imunocomplexos associa-se ao envolvimento renal no LES (DUITS et al., 1995; SALMON et al., 1996; YUN et al., 2001). Controversamente, a homozigose para o alelo R-131, pode fornecer uma proteção moderada contra as infecções pelo vírus da dengue clinicamente graves no Sudeste da Ásia (LOKE et al., 2002).

Após a genotipagem dos indivíduos, seus genótipos foram combinados para se estabelecer a frequência destas combinações na população estudada. Desta forma, os genótipos combinados mais frequentes foram RR-131/NA1/2 (20,9%) e HR-131/NA1/2 (19,6%), ambos negativos para SH. Já as combinações de genótipos não encontradas na população estudada foram: HH-131/NA1/1/SH, HH-131/NA2/2/SH, RR-131/NA1/1/SH, HR-131/NA1/1/SH. E as menos frequentes (0,7%) foram: HH-131/NA1/2/SH e HR-131/NA1/2/SH. Quando consideramos as combinações apenas de Fc $\gamma$ RIIIb e Fc $\gamma$ RIIIa, sem incluir SH, podemos analisar a frequência encontrada em outras populações, como a de Caucasianos e a de Afro-Americanos estudada por Van Schie; Wilson, (2000), onde as maiores frequências encontradas para Caucasianos foram HR-131/NA1/2 (19,6%), RR-131/NA1/2 (18,4%), HR-131/NA2/2 (15,9%) e RR-131/NA2/2 (12,5%), sendo que todas as outras combinações ficaram abaixo de 10%, o que assemelha-se muito aos nossos achados, principalmente nos genótipos RR-131/NA1/2 (20,9%) e HR-131/NA1/2 (19,6%). Quando analisamos a população de Afro-Americanos, observamos que as maiores frequências encontram-se distribuídas entre as seguintes combinações de genótipos: RR-131/NA2/2 (17,8%), HR-131/NA2/2 (16,1%), HR-131/NA1/2 (16,1%), RR-131/NA1/2 (15,3%)

e HR-131/NA1/1 (12,7%), as outras combinações de genótipos ficaram abaixo de 10%. Ao analisarmos as freqüências de NA e SH combinados, na nossa população estudada encontramos que 3,6% dos indivíduos apresentavam genótipo NA2/2/SH e 3% NA1/2/SH, e nenhum indivíduo NA1/NA1 foi genotipado para o genótipo SH. Quando comparamos nossos achados com os apresentados por Flesch et al., (2002), onde na população Alemã tais genótipos combinados se distribuem entre NA1/2/SH (3,46%) e NA1/1/SH (1,54%) e na população de Uganda entre NA2/2/SH (20,93%), NA1/1/SH (6,98%) e NA1/2/SH (4,65%), observamos que em nosso estudo não encontramos nenhum indivíduo NA1/NA1 que apresentasse o alelo SH, mas Flesch et al., (2002) mostra que isto pode ocorrer e sugere que pode ser explicado pela coexistência de duas formas diferentes de herança de SH. Os dados comparativos das combinações de genótipos entre a nossa população e as outras estão apresentados na Tabelas 10 e 11.

Após determinar os genótipos, a cooperação FcγR/CR foi avaliada em um modelo de estimulação de neutrófilos por imunocomplexos contendo IgG e/ou IgG/complemento, e o *burst* oxidativo foi medido por técnica de quimioluminescência dependente de luminol. Os resultados mostraram que, de um modo geral, a opsonização com complemento aumenta o *burst* oxidativo, confirmando os achados de Zhou; Brown, (1994) e de vários outros pesquisadores, pois a existência desta cooperação já está muito bem estabelecida na literatura. Sendo esta colaboração entre os receptores, para IgG e complemento, de extrema importância para a defesa do hospedeiro, pois é através deste sinergismo que as funções efetoras dos neutrófilos são ativadas (MANTOVANI, 1975; ZHOU; BROWN, 1994).

Analisando a resposta de QL, dos ensaios com estímulos opsonizados com complemento, dentro de cada grupo genotipado, observamos que a cooperação dos CR com os FcγRIIIb em indivíduos NA2/NA2 não foi tão eficiente quanto nos outros genótipos para NA. Em vista do genótipo NA2/NA2 não ter apresentado diferença significativa na QL estimulada por IC opsonizado com complemento em relação àquela estimulada por IC não-opsonizado, analisamos a influência do genótipo FcγRIIIa em combinação com o FcγRIIIb-

NA2/NA2, então pudemos observar que o genótipo R/NA2 apresentou uma melhor cooperação entre os receptores para gerar o *burst* oxidativo. E quando analisamos a porcentagem do aumento do valor de QL dentre todos os genótipos (NA e HR) combinados, pudemos constatar que o genótipo homozigoto R/NA2 (RR/NA2/2) foi o que apresentou a maior porcentagem de aumento de QL, e, portanto uma melhor resposta deste genótipo ao estímulo utilizado, e que o genótipo homozigoto H/NA1 (HH/NA1/1) apresentava a menor porcentagem de aumento de QL, mas como o número de amostras em cada grupo era pequeno, achamos melhor considerar os dados obtidos apenas com o genótipo para NA, sem combiná-lo com o HR.

É interessante citar que a combinação dos genótipos R/NA2 foi associada com maior suscetibilidade à doença meningocócica em indivíduos com deficiência de complemento (FIJEN et al., 1993).

Desta forma, o polimorfismo entre estes receptores pode influenciar a eficácia das funções efetoras para a geração da resposta dos neutrófilos aos diferentes antígenos. E tais achados podem contribuir para se observar as diferenças na resistência e suscetibilidade de distintos grupos populacionais, nos quais os polimorfismos possam apresentar um importante papel na patogênese de determinadas doenças.

Como controle, analisamos a expressão dos receptores estudados (CD16, CD32, CR1 e CR3) na superfície dos neutrófilos, através de citometria de fluxo, com a finalidade de avaliar se a ocorrência dos diferentes alótipos poderia influenciar a expressão dos receptores.

Quanto à expressão de CD16, observou-se uma diferença significativa na sua expressão entre os grupos R/NA2 e HR/NA1/2, quando comparados com os demais grupos. Sendo que quanto a expressão de CD32, CR1 e CR3 não se observou diferenças significativas dentre os grupos de genótipos. Quando analisamos se havia correlação entre os receptores CD16 e CD32 não pudemos observar tal correlação significativa, mas havia uma correlação estatisticamente significativa e positiva entre CR1 e CR3 ( $p=0,0076$ ). Entre CR3 e CD16 observou-se uma correlação positiva e altamente significativa ( $p<0,0001$ ), o

que reforça a importante cooperação entre estes receptores para a geração de um *burst* oxidativo mais eficiente (MANTOVANI, 1975; BROWN; BOHNSACK; GRESHAM, 1988; ZHOU et al., 1993). Sendo que correlações entre CR1 x CD16, CR3 x CD32 e CR1 x CD32 não puderam ser estabelecidas, apesar das retas apresentarem certa tendência à positividade ou negatividade estatisticamente não pudemos observar correlação.

Após analisarmos a correlação ou a ausência dela, entre estes receptores na população total estudada, obtivemos um perfil geral, então decidimos analisar se este perfil de correlação ou não poderia ser influenciado pelos diferentes genótipos. Já que pudemos observar uma correlação positiva significativa entre CD16 e CR3 no total de voluntários estudados, analisamos também se esta correlação se mantinha quando este grupo era separado de acordo com as combinações genotípicas para HR e NA. Assim, pode-se observar que a correlação positiva se mantinha na maioria dos grupos, mas como em alguns deles o *n* era pequeno, não se obteve significância. Apenas no grupo R/NA2 observou-se uma correlação positiva significativa. Porém, no grupo HR/NA1 a correlação desapareceu.

Apesar de não termos observado correlação entre CR1 e CD16, analisamos se ao separarmos pelos grupos de genótipos observaríamos alguma modificação no perfil, então pudemos constatar que as diferentes combinações de genótipos, ou seja, o polimorfismo não influencia a ausência de correlação entre CR1 e CD16.

Mesmo não conseguindo estabelecer um estudo comparativo destes achados com dados de outros estudos, por não existirem relatos com modelos similares na literatura que relacionem os diferentes alótipos x expressão, nossos resultados sugerem que a correlação entre os receptores analisados, em alguns casos, pode ser influenciada pelas diferentes combinações de genótipos.

A importância de estudos sobre a influência das combinações dos diferentes genótipos H/R e NA1/NA2 nas funções efetoras mediadas pelas imunoglobulinas é contribuir para o entendimento de mecanismos fisiopatológicos e a possibilidade de se estabelecer marcadores genéticos para as doenças.

**Tabela 7-** Comparação entre as frequências dos genótipos para FcγRIIIb entre diferentes populações

| Pop. (%)  | Presente<br>Estudo | Doadores<br>de Sangue<br>Brasileiros <sup>1</sup> | Índios da<br>Amazônia <sup>1</sup> | Alemães <sup>2</sup> | Americanos<br>brancos <sup>3</sup> | Hondugueses <sup>4</sup> | Afro-<br>Americanos <sup>5</sup> | Índios-<br>Asiáticos <sup>6</sup> | Hispânicos <sup>3</sup> | Americanos<br>Nativos <sup>3</sup> | Japoneses <sup>3</sup> | Chineses <sup>3</sup> | Holandeses <sup>7</sup> |
|-----------|--------------------|---|------------------------------------|----------------------|------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| IIA1/IIA1 | 20,1               | 16,5  | 52,2                               | 12                   | 11                                 | 12,5                     | 16                               | 16                                | 17                      | 20                                 | 36                     | 31,8                  | 13                      |
| IIA1/IIA2 | 52,1               | 83,5  | 30,4                               | 46                   | 51                                 | 45,2                     | 30                               | 28                                | 72                      | 71                                 | 52                     | 57,4                  | 47                      |
| IIA2/IIA2 | 27,8               | 0   | 5,5                                | 42                   | 38                                 | 42,3                     | 54                               | 55                                | 11                      | 9                                  | 12                     | 10,9                  | 40                      |

<sup>1</sup>KUWANO et al., 2000<sup>2</sup>BUX et al., 1995<sup>3</sup>HESSNER et al., 1996<sup>4</sup>TORKILDSEN et al., 2005<sup>5</sup>FUJIWARA et al., 1999<sup>6</sup>CHU et al., 2004<sup>7</sup>VAN DER POL et al., 2003**Tabela 8-** Comparação entre as frequências dos genótipos para SH entre diferentes populações

| Gen.            | Pop. (%) | Presente<br>Estudo | Caucasianos <sup>1,2</sup> | Afro-<br>Americanos <sup>3</sup> | Índios-<br>Asiáticos <sup>3</sup> | Hispânicos <sup>3</sup> | Coreanos <sup>3</sup> | Americanos<br>Nativos <sup>3</sup> |
|-----------------|----------|--------------------|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| SH <sup>+</sup> |          | 6,3                | 5                          | 22,5                             | 15,9                              | 7,8                     | 0                     | 1,1                                |

<sup>1</sup>BUX et al., 1997<sup>2</sup>KOENE et al., 1998<sup>3</sup>HESSNER et al., 1999

**Tabela 9-** Comparação entre as frequências dos genótipos para FcγRIIIa entre diferentes populações

| Gen.   | Pop. (%) |                                  | Presente   |                        | População |      | Caucasianos |    | Chineses <sup>1</sup> |      | Noruegueses <sup>2</sup> |    | Etiopes <sup>3</sup> |     | Japoneses <sup>4</sup> |      | Holandeses <sup>5</sup> |    | Doadores de Sangue Brasileiros <sup>5</sup> |      | Indios da Amazônia <sup>5</sup> |    |      |
|--------|----------|----------------------------------|------------|------------------------|-----------|------|-------------|----|-----------------------|------|--------------------------|----|----------------------|-----|------------------------|------|-------------------------|----|---|------|---------------------------------|----|------|
|        | Estudo   | Brasileira Saudável <sup>1</sup> | Brasileira | Franceses <sup>1</sup> | 27        | 31   | 26          | 26 | 20,5                  | 24,7 | 64,1                     | 26 | 22,4                 | 1,1 | 38,5                   | 52   | 51                      | 58 | 47  | 44,1 | 32,7                            | 50 | 44,7 |
| HH-131 | 20,3     | 27                               | 31         | 26                     | 20,5      | 24,7 | 64,1        | 26 | 22,4                  | 1,1  | 38,5                     | 52 | 51                   | 58  | 47                     | 44,1 | 32,7                    | 50 | 44,7  | 15,2 |                                 |    |      |
| HR-131 | 41,2     | 21                               | 18         | 16                     | 32,5      | 31,2 | 2,9         | 24 | 32,9                  | 83,7 |                          |    |                      |     |                        |      |                         |    |   |      |                                 |    |      |

<sup>1</sup> BAZILIO et al., 2004

<sup>2</sup> TORKILDSEN et al., 2005

<sup>3</sup> VAN DEN BERG et al., 2001

<sup>4</sup> HATTA et al., 1999

<sup>5</sup> KUWANO et al., 2000

**Tabela 10-** Comparação entre as frequências dos genótipos combinados para FcγRIIIb/SH entre diferentes populações

| Genótipo  | População (%) |          | Presente |          | Alemães <sup>1</sup> |          | Ugandeses <sup>1</sup> |  |
|---|---------------|----------|----------|----------|----------------------|----------|------------------------|--|
|   | Estudo        | Presente | Estudo   | Presente | Estudo               | Presente |                        |  |
| NA1 <sup>+</sup> /NA2 <sup>-</sup> /SH <sup>+</sup> | 0             | 1,54     | 6,98     |          |                      |          |                        |  |
| NA1 <sup>+</sup> /NA2 <sup>+</sup> /SH <sup>+</sup> | 3             | 3,46     | 4,65     |          |                      |          |                        |  |
| NA1 <sup>-</sup> /NA2 <sup>+</sup> /SH <sup>+</sup> | 3,6           | 0        | 20,93    |          |                      |          |                        |  |

<sup>1</sup> FLESCHE et al., 2002

**Tabela 11-** Comparação entre as frequências dos genótipos combinados para FcγRIIIa/FcγRIIIb entre diferentes populações

| Genótipo        | População (%) Presente   |        | Afro-<br>Americanos <sup>1</sup> |
|-----------------|--------------------------|--------|----------------------------------|
|                 | Caucasianos <sup>1</sup> | Estudo |                                  |
| HH-131/NA1/1    | 2,8                      | 4,1    | 2,5                              |
| HH-131/NA1/1/SH | 0                        | -      | -                                |
| HH-131/NA2/2    | 5,6                      | 10,0   | 6,8                              |
| HH-131/NA2/2/SH | 0                        | -      | -                                |
| HH-131/NA1/2    | 11,2                     | 9,6    | 9,3                              |
| HH-131/NA1/2/SH | 0,7                      | -      | -                                |
| RR-131/NA1/1    | 8,4                      | 3,0    | 3,4                              |
| RR-131/NA1/1/SH | 0                        | -      | -                                |
| RR-131/NA2/2    | 7,7                      | 12,5   | 17,8                             |
| RR-131/NA2/2/SH | 2,1                      | -      | -                                |
| RR-131/NA1/2    | <b>20,9</b>              | 18,4   | 15,3                             |
| RR-131/NA1/2/SH | 2,1                      | -      | -                                |
| HR-131/NA1/1    | 7,7                      | 7,0    | 12,7                             |
| HR-131/NA1/1/SH | 0                        | -      | -                                |
| HR-131/NA2/2    | 9,1                      | 15,9   | 16,1                             |
| HR-131/NA2/2/SH | 1,4                      | -      | -                                |
| HR-131/NA1/2    | <b>19,6</b>              | 19,6   | 16,1                             |
| HR-131/NA1/2/SH | 0,7                      | -      | -                                |

<sup>1</sup> VAN SCHIE; WILSON, 2000

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDEL-RAHMAN, S.Z. Isolation of DNA using saltin-out procedure. **J. Biochem. Toxicol.**, v.9, p.191-198, 1994.

ADEREM, A.A.; WRIGHT, S. D.; SILVERSTEIN, S. C.; COHN, Z. A. Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. **J. Exp. Med.**, v.161, p.617-622, 1985.

ALLEN, R.C.; ADAM, W.; CILENTO, G. (Eds.), Chemical and biological generation of excited states, New York: **Academic Press**, p.309, 1982.

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 $\gamma$  and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. **Talanta**, v.60, p.601-608, 2003.

ANTON, P.A.; TARGAN, S.R.; VIGNA, S.R.; DURHAM, M.; SCHWABE, A.D.; SHANAHAN, F. Enhanced neutrophil chemiluminescence in familial mediterranean fever. **J. Clin. Immunol.**, v.8, p.148-156, 1988.

BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidase. **Basic Life Sci.**, v.49, p.815-821, 1988.

BAZÍLIO, A. P.; VIANA, V. S. T.; TOLEDO, R.; WORONIK, V.; BONFÁ, E.; MONTEIRO, R. C. Fc $\gamma$ R1a polymorphism: a susceptibility factor for immune complex-mediated lupus nephritis in Brazilian patients. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v.19, p.1427-1431, 2004.

BIEZEVELD, M.; GEISLER, J.; MERKUS, M.; KUIPERS, I.M.; OTTENKAMP, J.; KUIJPERS, T. The involvement of Fc gamma receptor gene polymorphisms in Kawasaki disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v.147, p.106-111, 2006.

BREDIUS, R.G.; DE VRIES, C.E.; TROELSTRA, A.; VAN ALPHEN, L.; WEENING, R.S.; VAN DE WINKEL, J.G.; OUT, T.A. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* type B opsonized with polyclonal human IgG1 and IgG2 antibodies. Functional hFc gamma RIIa polymorphism to IgG2. **J. Immunol.**, v.151, p.1463, 1993.

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. **Immunol.**, v.83, p.624-630, 1994.

BROWN, E. J.; BOHNSACK, J.F.; GRESHAM, H.D. Mechanism of inhibition of immunoglobulin G-mediated phagocytosis by monoclonal antibodies that recognize the Mac-1 antigen. **J. Clin. Invest.**, v.81, p.365-375, 1988.

BROWN, D.A.; ROSE, J.K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. **Cell**, v.68, p.533-544, 1992.

BRUNKHORST, B.A.; STROHMEIER, G.; LAZZARI, K.; WEIL, G.; MELNICK, D.; FLEIT, H.B.; SIMONS, E.R. Differential roles of Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIII in immune complex stimulation of human neutrophils. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.20659-20666, 1992.

BUX, J; MUELLER-ECKHARDT, C. Autoimmune neutropenia. **Semin. Hematol.**, v. 29, p.45-53, 1992.

BUX, J.; STEIN, E-L; BIERLING, P.; FROMONT, P.; CLAY, M.; STRONCER, D.; SANTOSO, S. Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fc $\gamma$  receptor III b. **Blood**, v.89, p.1027-1034, 1997.

BUX, J.; STEIN, E.L.; SANTOSO, S.; MULLER-ECKHARDT, C. NA gene frequencies in the German determined by polymerase chain reaction with sequences-specific primers. **Transfusion**, v.35, p.54-57, 1995.

CHEUNG, K.; ARCHIBALD, A.C.; ROBINSON, M.F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **J. Immunol.**, v.130, p.2324-2329, 1983.

CHU, Z.T.; TSUCHIYA, N.; KYOGOKU, C.; OHASHI, J.; QIAN, Y.P.; XU, S.B.; MAO, C.Z.; CHU, J.Y.; TOKUNAGA, K. Association of Fc $\gamma$  receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. **Tissue Antigens**, v.63, p.21-27, 2004.

DAËRON, M. Fc receptor biology. **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.203-234, 1997a.

DAËRON, M. Structural bases of Fc $\gamma$ R functions. **Int. Rev. Immunol.**, v.16, p.1-27, 1997b.

DAVIES, K.A. Michael Mason Prize Essay 1995. Complement, immune complexes and systemic lupus erythematosus. **Br. J. Rheum.**, v.35, p.5-23, 1996.

DAVIES, K.A.; PETERS, A.M.; BEYNON, H.L.; WALPORT, M.J. Immune complex processing in patients with systemic lupus erythematosus. In vivo imaging and clearance studies. **J. Clin. Invest.**, v.90, p.2075-2083, 1992.

DE HAAS, M.; KOENE, H.R.; KLEIJER, M.; DE VRIES, E.; SIMSEK, S.; VAN TOL, M.J.D.; VON ROOS, D.; DEM BORNE, A.E.G.K. A triallelic Fc receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc $\gamma$ RIIIa. **J. Immunol.**, v.156, p.2948, 1996.

DIJSTELBLOEM, H.M.; BIJL, M.; FIJNHEER, R.; SCHEEPERS, R.H.; OOST, W.W.; JANSEN, M.D.; SLUITER, W.J.; LIMBURG, P.C.; DERKSEN, R.H.; VAN DE WINKEL, J.G.; KALLENBERG, C.G. Fc $\gamma$  receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. **Arthritis Rheum.**, v.43, p.2793-2800, 2000.

DOMINGO, P.; MUNIZ-DIAZ, E.; BARALDES, M.A.; ARILLA, M.; BARQUET, N.; PERICAS, R.; JUAREZ, C.; MADDOZ, P.; VAZQUEZ, G. Associations between Fc gamma receptor IIA polymorphisms and the risk and prognosis of meningococcal disease. **Am. J. Med.**, v.112, p.19, 2002.

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. Skewed distribution of IgG Fc receptor Ila (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus erythematosus patients. **Arthritis Rheum.**, v.38, p.1832, 1995.

DYNAL. **Tissue typing DYNAL – SSP**. Oslo. p.165, 1996. (Technical Handbook).

EHLENBERGER, A.G.; NUSSENZWEIG, V. The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. **J. Exp. Med.**, v.145, p.357-371, 1977.

EL-BENNA, J.; DANG, P.M.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)**, v.53, p.199-206, 2005.

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

FLESCH, B.K.; DOOSE, S.; SIEBERT, R.; NTAMBI, E.; NEPERT, J. FCGR3 variants and expression of human neutrophil antigen-1a, -1b, and -1c in the populations of northern Germany and Uganda. **Transfusion.**, v.42, p.469-475, 2002.

FLESCH, B.K.; NEPERT, J. Functions of the Fc receptors for immunoglobulin G. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.14, p.141-156, 2000.

FONSECA, L.M.; BRUNETTI, I.L.; REGO, E.M.; GARCIA, A.B.; CILENTO, G.; FALCAO, R.P. Characterization of myeloid or lymphoid acute leukemia by a chemiluminescence assay. Comparison with immunocytochemistry using an antimyeloperoxidase antibody. **Acta Haematol.**, v.90, p.19-24, 1993.

FONSECA, L.M.; YAVO, B.; CATALANI, L.H.; FALCAO, R.P.; BRUNETTI, I.L.; CAMPA, A. Chemiluminescent determination of esterases in monocytes. **J. Biolumin. Chemilumin.**, v.13, p.195-200, 1998.

FUJIWARA, K.; WATANABE, Y.; MITSUNAGA, S.; OKA, T.; YAMANE, A.; AKAZA, T.; TADOKORO, K.; TOKUNAGA, K.; SHIBATA, Y.; JUJI, T. Determination of granulocyte-specific antigens on neutrophil Fc $\gamma$  receptor IIIb by PCR-preferential homoduplex formation assay, and gene frequencies in the Japanese population. **Vox Sang**, v.77, p.218-122, 1999.

GALON, J.; BOUCHARD, C.; FRIDMAN, W.H.; SAUTÈS, C. Ligands and biological activities of soluble Fc $\gamma$  receptors. **Immunol. Letters**, v.44, p.175-181, 1995.

GASBARRINI, A.; PASINI, P.; NARDO, B.; De NOTARIIS, S.; SIMONCINI, M.; CALLARI, 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.**, v.15, p.211-216.1998.

GESSNER, J.E.; HEIKEN, H.; TAMM, A.; SCHIMIDT, R.E. The IgG Fc receptor family. **Ann. Hematol.**, v.76, p.231-248, 1998.

GONZÁLEZ-ESCRIBANO, M.F.; AGUILAR, F.; SÁNCHEZ-ROMÁN, J.; NÚÑEZ-ROLDÁN, A. Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIIA and Fc $\gamma$ RIIIB polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. **Eur. J. Immunogenet.**, v.29, p.301-306, 2002.

GRESHAM, H.D.; MCGARR, J.A.; SHACKELFORD, P.G.; BROWN, E.J. Studies on the molecular mechanisms of human Fc receptor-mediated phagocytosis. Amplification of ingestion is dependent on the generation of reactive oxygen metabolites and is deficient in polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic granulomatous disease. **J. Clin. Invest.**, v.82, p.1192-1201, 1988.

GRUEL, Y.; POUPLARD, C.; LASNE, D.; MAGDELAINE-BEUZELIN, C.; CHARROING, C.; WATIER, H. The homozygous FccRIIIa-158V genotype is a risk factor for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antibodies to heparin/platelet factor 4 complexes. **Blood**, v.104, p.2791–2793, 2004.

HATTA, Y.; TSUCHIYA, N.; OHASHI, J.; MATSUSHITA, M.; FUJIWARA, K.; HAGIWARA, K.; JUJI, T.; TOKUNAGA, K. Association of Fc gamma receptor IIIB, but not of Fc gamma receptor IIA and IIIA polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese. **Genes Immun.**, v.1, p.53-60, 1999.

HESSNER, M.J.; CURTIS, B.R.; ENDEAN, D.J.; ASTER, R.H. Determination of neutrophil antigen and gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence specific primers. **Transfusion**, v.36, p.896-899, 1996.

HESSNER, M.J.; SHIVARAM, S.M.; DINAUER, D.M.; CURTIS, B.R.; ENDEAN, D.J.; ASTER, R.H. Neutrophil antigen (FcγRIIIB) SH gene frequencies in six racial groups. **Blood.**, v. 93, p.1115-1116, 1999.

HUIZINGA, T.W.; KUIJPERS, R.W.; KLEIJER, M.; SCHULPEN, T.W.; CUYPERS, H.T.; ROOS, D.; VON DEM BORNE, A.E. Maternal genomic neutrophil FcγRIII deficiency leading to neonatal isoimmune neutropenia. **Blood**, v.76, p.1927-1932, 1990.

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.**, v.22, p.811-816, 1992.

KARASSA, F.B.; TRIKALINOS, T.A.; IOANNIDIS, J.P.A. The role of FcγRIIA and IIIA polymorphism in autoimmune disease. **Biomed Pharmacother**, v.58, p.286–29, 2004.

KIMBERLY, R.P.; AHLSTROM, J.W.; CLICK, M.E.; EDBERG, J.C. The glycosyl phosphatidylinositol linked FcγRIIIPMN mediates transmembrane signaling events distinct from FcγRII. **J. Exp. Med.**, v.171, p.1239-1255, 1990.

KIMBERLY, R.P.; SALMON, J.E.; EDBERG, J.C. Receptors for immunoglobulin G. Molecular diversity and implications for disease. **Arthritis Rheum.**, v.38, p.306-314, 1995.

KOENE, H.R.; KLEIJER, M.; ALGRA, J.; ROOS, D.; VON DEM BORNE, A.E.; DE HAAS, M. FcγRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell FcγRIIIa, independently of the FcγRIIIa-48L/R/H phenotype. **Blood**, v.90, p.1109-1114, 1997.

KOENE, H.R.; KLEIJER, M.; ROOS, D.; DE HAAS, M.; VON DEM BORNE, A.E. Fc $\gamma$ RIIIB gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct Fc $\gamma$ RIIIB genes in NA (1<sup>+</sup>, 2<sup>+</sup>) SH (+) individuals. **Blood**, v.91, p.673-679, 1998.

KRICKA, L.J. Clinical applications of chemiluminescence. **Anal. Chim. Acta**, v.500, p.279-286, 2003.

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 $\gamma$  receptor IIa and Fc $\gamma$  receptor IIIb among distinct groups in Brazil. **Transfusion**, v.40, p.1388-1392, 2000.

LICHTMAN, M.A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J.T. **Williams hematology**. 7th. ed. United States: McGraw-Hill Companies, 2006. p.942.

LOKE, H.; BETHELL, D.; PHUONG, C.X.; DAY, N.; WHITE, N.; FARRAR, J.; HILL, A. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and Fc gamma receptor IIa genes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.67, p.102, 2002.

LOUIS, E.; EL GHOUL, Z.; VERMEIRE, S.; DALL'OZZO, S.; RUTGEERTS, P.; PAINAUD, G.; BELAICHE, J.; DE VOS, M.; VAN GOSSUM, A.; COLOMBEL, J.F.; WATIER, H. Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.19, p.511-519, 2004.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **J. Immunol.**, v.132, n.4, p.2015-2020, 1984.

MALBEC, O.; DAËRON, M. The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation. **Immunol. Rev.**, v.217, p.206-221, 2007.

MANIATIS, T.; FRITSCHI, E.F.; SASMBROOCK, J. Molecular cloning, a laboratory manual. New York: Spring Harbor, p. ES, 1989.

MANTOVANI, B. Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.**, v.115, p.15-17, 1975.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ALVES, C.M.; AZZOLINI, A.E.; POLIZELLO, A.C.; CARVALHO, I.F.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Fc $\gamma$  and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v.11, p.240-248, 2002.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Receptores para Imunoglobulina G (Fc $\gamma$ R). **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.38, p.82-95, 2005.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M. ; LUCISANO-VALIM, Y.M. Clearance de Imunocomplexos: Papel do sistema complemento e dos polimorfonucleares neutrófilos. **Medicina**, v. 30, p.234-242, 1997.

MAY, R. C.; MACHESKY, L. M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. **J. Cell Sci.**, v.114, p.1061-1077, 2001.

MELAMED, J.; ARNAOUT, M.A.; COLTEN, H.R. Complement C3b.interaction with the human granulocyte receptor: correlation of binding of fluid-phase radiolabeled ligand with histaminase release. **J. Immunol.**, v.128, p.2313–2318, 1982.

MORELL, A.; SKVARIL, F.; HITZIG, W.H.; BARANDUN, S. IgG subclasses: development of the serum concentrations in "normal" infants and children. **J. Pediatr.**, v.80, p.960-964, 1972

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J.V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. **Nat. Rev. Immunol.**, v.8, p.34-47, 2008.

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 FcγR and CR3. **FEBS Lett.**, v.373, p.189–192, 1995.

OMI, K.; OHASHI, J.; PATARAPOTIKUL, J.; HANANANTACHAI, H.; NAKA, I.; LOOAREESUWAN, S.; TOKUNAGA, K. Fcγ receptor IIA and IIIB polymorphisms are associated with susceptibility to cerebral malaria. **Parasitol. Int.**, v.51, p.361-366, 2002.

ORLOFF, D.G.; RA, C.S.; FRANK, S.J.; KLAUSNER, R.D.; KINET, J.P. Family of disulphide-linked dimmers containing the zeta and eta chains of the T-cell receptor and the gamma chain of Fc receptors. **Nature**, v.347, p.189-191, 1990.

ORY, P.A.; CLARK, M.R.; KWOH, E.E.; CLARKSON, S.B.; GOLDSTEIN, I.M. Sequences of complementary DNAs that encode the NA1 and NA2 forms of Fc receptors III on human neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v.84, p.1688, 1989.

OSBORNE, J.M.; CHACKO, G.W.; BRANDT, J.T.; ANDERSON, C.L. Ethnic variation in frequency of an allelic polymorphism of human Fc gamma RIIA determined with allele specific oligonucleotide probes. **J. Immunol. Methods.**, v.173, p.207-217,1994.

PLATONOV, A.E.; KUIJPER, E.J.; VERSHININA, I.V.; SHIPULIN, G.A.; WESTERDAAL, N.; FIJEN, C.A.; VAN DE WINKEL, J.G. Meningococcal disease and polymorphism of Fc gamma RIIa (CD32) in late complement component-deficient individuals. **Clin. Exp. Immunol.**, v.111, p.97, 1998.

RASCU, A.; REPP, R.; WESTERDAAL, N.A.C.; KALDEN, J.R.; VAN DE WINKEL, J.G.J. Clinical relevance of Fc gamma receptor polymorphisms. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 815, p. 282-295, 1997.

REKAND, T.; LANGELAND, N.; AARLI, J.A.; VEDELER, C.A. Fc gamma receptor IIIA polymorphism as a risk factor for acute poliomyelitis. **J. Infect. Dis.**, v.186, p.1840-1843, 2002.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6.ed. São Paulo: Manole, 2003. p.75-78.

ROSS, G.D.; CAIN, J.A.; LACHMANN, P.J. Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin and functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for CR3. **J. Immunol.**, v.134, p.3307, 1985.

SALMON, J.E.; EDBERG, J.C.; BROGLE, N.L.; KIMBERLY, R.P. Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. **J. Clin. Invest.**, v.89, p.1274-1281, 1992.

SALMON, J.E.; EDBERG, J.C.; KIMBERLY, R.P. FcγRIII on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. **J. Clin. Invest.**, v.85, p.1287-1295, 1990.

SALMON, J.E.; MILLARD, S.; SCHACHTER, L.A.; ARNETT, F.C.; GINZLER, E.M.; GOURLEY, M.F.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; PETERSON, M.G.; KIMBERLY, R.P. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. **J. Clin. Invest.**, v.97, p.1348, 1996.

SALMON, J.E.; PRICOP, L. Human receptors for immunoglobulin G: key elements in the pathogenesis of rheumatic disease. **Arthritis Rheum.**, v.44, p.739-750, 2001.

SANDERS, L.A.; VAN DE WINKEL, J.G.; RIJKERS, G.T.; VOORHORST-OGINK, M.M.; DE HAAS, M.; CAPEL, P.J.; ZEGERS, B.J. Fc gamma receptor IIa (CD32) heterogeneity in patients with recurrent bacterial respiratory tract infections. **J. Infect. Dis.**, v.170, p.854, 1994.

SCHMIDT, R.E.; GESSNER, J.E. Fc receptors and their interaction with complement in autoimmunity. **Immunol. Lett.**, v.15; p.56-67, 2005.

SCHUR, P.H. IgG subclasses-a review. **Ann. Allergy.**, v.58, p.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**, v.333, p.565-567, 1988.

STEFFENSEN, R.; VARMING, K.; JERSILD, C. Nomenclature of granulocyte alloantigens **Transfusion**, v. 40, p.491-493, 2000.

TAN SARDJONO, C.; MOTTRAM, P.L.; HOGARTH, P.M.  
The role of Fc $\gamma$ RIIIa as an inflammatory mediator in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.

**Immunol. Cell. Biol.**, v.81, p.374-81, 2003.

TONG, Y.; JIN, J.; YAN, L.; NEPPERT, J.; MARGET, M.; FLESCHE, B.K. FCGR3B gene frequencies and FCGR3 variants in a Chinese population from Zhejiang Province. **Ann. Hematol.**, v.82, p.574-578, 2003.

**Hematol.**, v.82, p.574-578, 2003.

TORKILDSEN, O.; UTSI, E.; MELLGREN, S.I.; HARBO, H.F.; VEDELER, C.A.; MYHR, K.M.  
Ethnic variation of Fc $\gamma$  receptor polymorphism in Sami and Norwegian populations.

**Immunology**, v.115, p.416-421, 2005.

UNKLESS, J.C.; SHEN, Z.; LIN, C.W.; DEBEUS, E. Function of human Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIIB. **Semi. Immunol.**, v.7, p.37-44, 1995.

VAN DEN BERG, L.; MYHR, K.M.; KLUGE, B.; VEDELER, C.A. Fc $\gamma$  receptor polymorphisms in populations in Ethiopia and Norway. **Immunology**, v.104, p.87-91, 2001.

VAN DER POL, W.L.; JANSEN, M.D.; SLUITER, W.J.; VAN DE SLUIS, B.; LEPPERS-VAN DE STRAAT, F.G.; KOBAYASHI, T.; WESTENDORP, R.G.; HUIZINGA, T.W.; VAN DE WINKEL, J.G. Evidence for non-random distribution of Fc $\gamma$  receptor genotype combinations. **Immunogenetics**, v.55, p.240-246, 2003.

VAN SCHIE, R.C.; WILSON, M.E. Evaluation of human Fc $\gamma$ RIIA (CD32) and Fc $\gamma$ RIIIB (CD16) polymorphisms in Caucasians and African-Americans using salivary DNA. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.7, p.676-681, 2000.

VANCE, B.A.; HUIZINGA, T.W.; WARDWELL, K.; GUYRE, P.M. Binding of monomeric human IgG defines an expression polymorphism of Fc $\gamma$ RIII on large granular lymphocyte/natural killer cells. **J. Immunol.**, v.151, p.6429-6439, 1993.

VIDARSSON, G.; STEMERDING, A.M.; STAPLETON, N.M.; SPLIETHOFF, S.E.; JANSSEN, H.; REBERS, F.E.; DE HAAS, M.; VAN DE WINKEL J.G. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. **Blood.**, v.108, p.3573-3579, 2006.

WARMERDAN, P.A.M.; VAN DE 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.**, v.172, p.19-25, 1990.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **N. Engl. J. Med.**, v.320, p.365-376, 1989.

WU, J.; EDBERG, J.C.; REDECHA, P.B.; BANSAL, V.; GUYRE, P.M.; COLEMAN, K.; SALMON, J.E.; KIMBERLY, R.P. A novel polymorphism of Fc $\gamma$ RIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes of autoimmune disease. **J. Clin. Invest.**, v.100, p.1059, 1997.

YUAN, F.F.; WATSON, N.; SULLIVAN, J.S.; BIFFIN, S.; MOSES, J.; GECZY, A.F.; CHAPMAN, J.R. Association of Fc gamma receptor IIa polymorphisms with acute renal-allograft rejection. **Transplantation**, v.78, p.766–769, 2004.

YUAN, F.F.; WONG, M.; PERERVA, N.; KEATING, J.; DAVIS, A.R.; BRYANT, J.A.; SULLIVAN, J.S. Fc $\gamma$ RIIIa polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. **Immunol. Cell. Biol.**, v.81, p.192–195, 2003.

YUN, H.R.; KOH, H.K.; KIM, S.S.; CHUNG, W.T.; KIM, D.W.; HONG, K.P.; SONG, G.G.; CHANG, H.K.; CHOE, J.Y.; BAE, S.C.; SALMON, J.E.; YOO, D.H.; KIM, T.Y.; KIM, S.Y. FcγRIIIa/IIIa polymorphism and its association with clinical manifestations in Korean lupus patients. **Lupus**, v.10, p.466, 2001.

ZHOU, M.J.; BROWN, E.J. CR3 (Mac-1,  $\alpha_M\beta_2$ , CD11b/CD18) and FcγRIII Cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for FcγRII and tyrosine phosphorylation. **J. Cell Biol.**, v.125, p.1407-1416, 1994.

ZHOU, M.J.; TODD, R.F.; WINKEL, J. G. J. V.; PETTY, H. R. Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fcγ receptor III on human neutrophils. **J. Immunol.**, v.150, p.3030-3041, 1993.

ZUPANSKA, B.; UHRYNOWSKA, M.; GUZ, K.; MASLANKA, K.; BROJER, E.; CZESTYNSKA, M.; RADOMSKA, I. The risk of antibody formation against HNA1a and HNA1b granulocyte antigens during pregnancy and its relation to neonatal neutropenia. **Transfusion Med.**, v.11, p.377-382, 2001.





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



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 7/2006

Interessado: ANA CAROLINA URBACZEK

Orientador: Prof. Dr. LUIZ MARCOS DA FONSECA

Projeto: Funções e *burst* oxidativo dos neutrófilos humanos: estudo da influência do polimorfismo do receptor para IgG FcyRIIIb na cooperação com os receptores para complemento

#### Parecer nº 28/2006 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto "Funções e *burst* oxidativo dos neutrófilos humanos: estudo da influência do polimorfismo do receptor para IgG FcyRIIIb na cooperação com os receptores para complemento", 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 considera o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório parcial do projeto de pesquisa deverá ser entregue em outubro 2007 e o final em outubro de 2008, no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 7 de agosto de 2006.

Profª. Drª. MARIA VIRGÍNIA COSTA SCARPA  
Coordenadora do CEP





## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, Estado Civil \_\_\_\_\_,  
Idade \_\_\_\_\_ anos, Residente na \_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_, Bairro  
\_\_\_\_\_, Cidade \_\_\_\_\_, Telefone \_\_\_\_\_,

### Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade *estudar proteínas nas células do sangue dos seres humanos, nas quais os anticorpos se ligam. Estas proteínas são chamadas de receptores para anticorpos e são muito importantes para ajudar o organismo a combater alguns tipos de doenças infecciosas. Por causa da herança genética, algumas pessoas possuem pequenas modificações nestas proteínas, que poderão influenciar a maneira como o seu organismo irá se defender das doenças. Assim, neste trabalho, nós iremos identificar estas proteínas nas células dos doadores de sangue, e estudar como as suas células se comportam, quando são estimuladas para defender o seu organismo;*
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para *um estudo que irá identificar pessoas que têm receptores para anticorpos com pequenas modificações e também estudar como as suas células podem melhorar os mecanismos de defesa contra os microrganismos;*
3. Terei que doar para a realização dessa pesquisa, o(s) seguinte(s) material (ais) biológico (s) *8 mL de sangue;*
4. A minha participação como voluntário deverá ter a duração de *18 meses;*
5. Que não corro nenhum risco ao participar dessa pesquisa e que a coleta de material não será desconfortável;
6. Os materiais empregados na coleta serão totalmente descartáveis;
7. Deverei voltar ao laboratório todas as vezes em que houver solicitação do médico ou dos pesquisadores desse projeto;
8. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos 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 de Araraquara/UNESP);
9. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
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 interrupção do meu tratamento;
11. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica pelos telefones: *UNESP (16) 3301-6545 (Laboratório de Hematologia - Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca); (16) 3301-6549 (Laboratório de Imunologia – Ana Carolina Urbaczek);*
12. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, 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, pelo telefone (16) 3301-6897.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária(o), do estudo “Funções e *burst* oxidativo dos neutrófilos humanos: estudo da influência do polimorfismo do receptor para IgG Fc $\gamma$ RIIIb na cooperação com os receptores para complemento”.

Araraquara, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Voluntário

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca  
Pesquisador responsável




**1: [NM\\_021642](#)**

LOCUS NM\_021642 2411 bp mRNA linear PRI 17-FEB-2008

DEFINITION Homo sapiens Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)

(FCGR2A), mRNA.

ACCESSION NM\_021642 XM\_938849

receptor for

(CD32) "

/codon\_start=1

/product="Fc fragment of IgG, low affinity IIa,

receptor

**ORIGIN**

```

1  gtctcttaaa acccactgga cgttggcaca gtgctgggat gactatggag acccaaatgt
61  ctcagaatgt atgtcccaga aacctgtggc tgcttcaacc attgacagtt ttgctgctgc
121  tggcttctgc agacagtcaa gctgctcccc caaaggctgt gctgaaactt gagccccctg
181  ggatcaacgt gctccaggag gactctgtga ctctgacatg ccagggggct cgcagccctg
241  agagcgactc cattcagtggt ttccacaatg ggaatctcat tcccaccac acgcagccca
301  gctacaggtt caaggccaac aacaatgaca gcggggagta cacgtgccag actggccaga
361  ccagcctcag cgaccctgtg catctgactg tgctttccga atggctgggt ctccagacc
421  ctcacctgga gttccaggag ggagaaacca tcatgctgag gtgccacagc tggagaggaca
481  agcctctggt caaggtcaca ttcttccaga atggaaaatc ccagaaattc tcccatttgg
541  atcccacett ctccatccca caagcaaacc acagtcacag tgggtgattac cactgcacag
601  gaaacatagg ctacacgctg ttctcatcca agcctgtgac catcactgtc caagtgccca
661  geatggggcag ctcttcacca atggggatca ttgtggctgt ggtcattgctg actgctgtag
721  cagccattgt tgctgctgta gtggccttga tctactgcag gaaaaagcgg atttcagcca
781  attccactga tctgtggaag gctgcccact ttgagccacc tggacgtcaa atgattgcca
841  tcagaaagag acaacttgaa gaaaccaaca atgactatga aacagctgac ggcggctaca
901  tgactctgaa ccccagggca cctactgacg atgataaaaa catctacctg actcttctct
961  ccaacgacca tgtcaacagt aataactaaa gagtaacggt atgccatgtg gtcatactct
1021  cagcttgctg agtggatgac aaaaagaggg gaattgttaa aggaaaattt aaatggagac
1081  tggaaaaatc ctgagcaaac aaaaccacct ggcctttaga aatagcttta actttgctta
1141  aactacaaac acaagcaaaa cttcacgggg tcatactaca tacaagcata agcaaaactt
1201  aacttgatc atttctggta aatgcttatg ttagaataa gacaacccca gccaatcaca
1261  agcagcctac taacatataa ttaggtgact agggacttct taagaagata octaccccca
1321  aaaaacaatt atgtaattga aaaccaaccg attgccttta ttttgettcc acatthtccc
1381  aataaatact tgcctgtgac atthtggcac tggaaacta aacttcatga atthgcctc
1441  agatthtccc tthaacatct thtthttht tgacagagtc tcaatctggt acccaggctg
1501  gagtgcagtg gtgctatctt ggctcactgc aaaccgcct cccaggttta agcgattctc
1561  atgcctcagc ctcccagtag ctgggattag aggcattgtc catcataccc agctaatttt
1621  tgtatthttht atthtthttht thtagtagag acagggttct gcaatgttgg ccaggccgat
1681  ctogaacttc tggcctctag cgatctgccc gcctcggcct cccaaagtgc tgggatgacc
1741  agcatcagcc ccaatgtcca gctctthta catcttcttht cctatgcct ctctgtggat
1801  cctactgct ggtthtctgct thtctcatgc tgagaacaaa atcacctatt cactgcttat
1861  gcagtggaa gctccagaag acaaaagagc ccaattacca gaaccacatt aagtctccat
1921  tgtthtgcct tgggatttga gaagagaatt agagaggtga ggatctggta thtctggac
1981  taaattcccc ttggggaaga cgaagggatg ctgcagttcc aaaagagaag gactcttcca
2041  gagtcatcta cctgagtcct aaagctccct gtcctgaaag ccacagacaa tatggtccca
2101  aatgactgac tgcaccttct gtgcctcagc cgthtctgac atcaagaatc thtctgtcca
2161  catccacaca gccaatataa ttagtcaaac cactgttatt aacagatgta gcaacatgag
2221  aaacgcttat gttacaggtt acatgagagc aatcatgtaa gtctatatga cttcagaaat
2281  gttaaaatag actaacctct aacaacaaat taaaagtgat tgtthtcaagg tgatgcaatt
2341  attgatgacc tathtthttht thctataatg atcatatatt acctthttaa taaaacatta
2401  taacaaaac a

```

//

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)

[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

**Gene CD32**

Acesso AL590385

a = H-131 (g = R-131)

66001 tttttttt ttttaacca gcaacagcat gtggaaaa aa ggggggaaga aggctctact  
 66061 tctttgctaa tacagtcaa ggctgccac cctcactt cc caaagctgt acaaaattta  
 66121 ccattaaatt agtaatcccc agaccacaaa aactgacg gc ttcaggcct gtcgagtagc  
 66181 ctctacagtt actgaaatgc gctcatttct ctactcaa ac gtagtatttt aaattcctca  
 66241 gaattgtttt aaatatctgc tctgcatctt tgaaacct ct gaaaacttct gcttttagaa  
 66301 gtcccacaga tataatacca tataatgcct ataagaga at gctcacatct gtcatgaagc  
 66361 atcttcattt ctgtctgcca gacatcatgt caagttctgt gagtaacgta cctctgagac  
 66421 tgaaaaaacc ttggaatcta tccttacaac tttttctt at catatttgg tctttcagaa  
 66481 tggctggg gc tccagacccc tcacctggag ttccaggagg gagaaacat catgctgagg  
 66541 tgccacagct ggaagga caagcctctggcaaggtc ac at tcttcagaa tggaaaatcc  
 66601 cagaaattct ccc a/g ttgga tccaccttc tccatcccacaagcaaaccacagtcacagt  
 66661 ggtgattaccactgcacaggaacataggctacacgctgtt ctcatccaagcctgtgacc  
 66721 atcactgtccaaggatggggagtctgccaagatgtaggga ggggagaagaggggatgga  
 66781 caagggtgaggtcacatgggcctacatggaggctgagaa agcccatagcagcaaaatt  
 66841 gggcactggagcaaagaggagtgggtggaagcctggctaa gtattgaccaacaagtagg  
 66901 ggccagagcctggagcccctacgctcccaggtaataggtagtcaggctgtt gtttcacttt  
 66961 gaaatgtaggccccagactaaagatggcagtgaaagcagagctccctcatt gatgcagagg  
 67021 ttcccctagctcctgggcattcctaagagctgagggttgccctgcttctctcatggctc  
 67081 atgtatagccattcactccagaaagcctggcacgtcatggactgttcaaggctgtgctc  
 67141 catagagtaa tgatgcctcc agctatgca ggctttgggc ccacctccg tactgtcccc  
 67201 aggggctaag ggaatcctt ccctctgctc ctgcatgctc accagtgtgc tttcattcat  
 67261 ttggtggaga aacctgggta gggaggaggc acaagtccag ccacagaaac cctgtgccag  
 67321 tgaggctgg gatgtgtga atcttgatt ggtgagtagc tcagacacag aagagctca  
 67381 ggtgacaagc actgggacat agcattggag gtgggagggt ggacaggag aatacaaagc  
 67441 ttgtcattaa aatagtaacc ccccatcctg ccctaattgc tgtcttccct agtgcccagc  
 67501 atgggcagct ctcc accaat ggggatc attgtggctgtggtcattg cgac tgctgtagca  
 67561 gccattgtg ctgctgtagt ggcttgatc tactgcagga aaaagcggat ttcaggttg  
 67621 tagctcctcc cagtcctttt tttatcagt ttccatttgg cccaggcct aaccccagac  
 67681 attgccagaa tccgctctt agggctagat atgcattccg atctaggccc acctttatt  
 67741 tattagtca ttattagtt catcctcaac aagagcacta ataggagtca cctcacaggg  
 67801 ttgcatggg gatgaaagag gctgatgctc ttacaccagt gcctggtagg cagtaacagc  
 67861 acacaaacag ggctgtgccc attctggagg aggtggtatg tgagggcagc gcttagctag  
 67921 ggaaggagga ctctccaggc actgggcaa ggcaggga ct gaggtgggt ggggcttata  
 67981 tgagggggga gtagatagg tactgcaagc ctctgaga aa gagaataat cccactaaca  
 68041 cctcaciaag cactttgcaa ttggtcata gccaacacct cagttactga tgataagtaa

Oligonucleotídeos para H/R-131 usados na PCR alelo-específico:

**Sense H-131** - 5' atc cca gaa att ctc cca 3' (seqüência destacada em amarelo-verde)

**Sense R-131** - 5' atc cca gaa att ctc ccg 3' (seqüência destacada em amarelo-pink)

**Anti-sense NA1/NA2** - 5' caa ttt tgc tgc tat ggg c 3' (seqüência destacada em verde)



**CD16** - Representação da localização das seqüências de oligonucleotídeos complementares ao fragmento do gene FcγRIIIB no cromossomo 1 humano.

**FcγRIIIB** – código de acesso no GenBank Z46223, DNA para FcγRIIIB humano  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>

#### ORIGEM

```

1 aagcttccca tctctgttga gtcocctact ctctctctgt gctctctctct cttcttctca
61 tctagcccac ccttttggta gctaagaatt cctccctcca ttggagagtc acagacccaaa
121 gaggagtcac ataagaaaat aagacctcaa agaaggaaaa caaagtgaag gccttgcatac
181 agaagtcacg tggcagaaaag ccacctggat atctgaaaag aagaaagaat tgagggatat
241 ccgctttttg cctcagagac catccttagc cctgaaggct ttgtttctgc ttttaggtttc
301 ccagatgagc atctgaagtg ctacagcaag gaacttcaag tttccagata ctgtgtctgga
361 ttttgcaagg cgtagatgag tcacttgaga aggagaactg gaatggcggc ctgggttcat
421 ttccgttgtg caatccaagg gcctgtggag aaggggctgc tgcaagactc tgtgtgtggc
481 agggggaggg gtgggtacgt ggatggcaat gggaggatca attaactcca cccaggagcc
541 aaatgaaaaca cacaaataaa aaacaaaacc tgagtgtgg tttttaggtc attctggagt
601 agaaagagca ttcatttata gcaaaggttg gcgggcaact gtgtcagccc ctgcccac
661 tccaccctca acaagtatca ggtgccaca cgggctgct gctgcctcc tgggcttttc
721 taagccaagt gagacctgtc ccagatgtcc acgaatccac tgggggagtg gcactatcaa
781 gcagagtcac ctgattttct gcctgggacc tggaccattg tgagagtaac caacatgggg
841 ttacggggga gaactctggag agaagagaag aggttaacaa cctcccactc tctggcccac
901 cccctccac cttttctggt aaggagccct ggagccctgg agccctggct cctaggtgga
961 cagaccagcc cagatccagt ggcccggagg gcctgagctc aatccgcagc gacctgggta
1021 acacgaggaa ggtaaagagt tctgtctctc acccctcccc acccccactc tttctgtgat
1081 ctttccagcc tttcactggt gacttgttct tccagggcc ctttctctac cctacctggg
1141 tttcttctaa cctggaatc taatgatcaa atcacactaa aaagtcagct cctgtggatt
1201 acatatccca ggagcatata gattttgaat ttgaaattt gaaagaaatt ctgctgggag
1261 ataatttga ggcagagaca ctgctagtgg tcaaagattt gaaaggacaa ctttctgtgt
1321 gacggcaggc cctcggctgg agatagatgg gtctggacga ggcaggagag tgagaagttc
1381 tgaggtgaaa tgcaggaagc cctcagagaa tgctcctccc acctggaatc tcatccccag
1441 ggtcttctgt tcccattctt ggtgctgggt ggatcctaat ccaggagatg ggggcaagca
1501 tctgggaaag ctgagggcac actctggcag attctgtgtg tgcctcaga tgctcagccc
1561 cagacctttg gggagtaaa gggggcacac ccaccacctc tgctccagc ctcttctct
1621 cctattctctg ttctatggtg gggctccatt gcgagacttc agattgagaa atcagatgaa
1681 gtttcaagaa aaggaaactg gcaggtgaca gagatgggtg gagggactgg ggaaaggctg
1741 tttactccct cctgtctagt cggcttggtc cctttagggc tccggatatac tttggtgact
1801 tgtccactcc agtgtggcat catgtggcag ctgctcctcc caactgctct gctactcta
1861 ggtaagtcag gatattccctg gttgagggag aagtttgaga tgccttgggt tcatcagaga
1921 ccccttttca ggctacgaat gagactccca caaagggatg ggaccctca ccacatctat
1981 agctgtggat tgagctacca ggacaagcca agatggggct agaaatgagg agaatgctgg
2041 ttccaattgg gtcatagtca tgagtgggc cagtcacttc acccctctgg gtcccagaat
2101 cactatgtgg aactgaagag cttcgactag atggtcccta gggctctgtc ctttcagttt
2161 gacattccag ggttctcctc tatggttttt aatttctacc ctttctgtg gggataggg
2221 ttgaggtctg ttctgtggct tggtttaggg aaattcaacc tgtaccctta atttgtgagt
2281 ttgcacaggg agcaaggggt aagggacag tgttgaaaat agggatttgt gttgacagtg
2341 gcgcaagagg catgaacagt agagaccaga gagcaggtag caaggtttcc accagaaaca
2401 tcctgattct tgggaaaatt gggctcctgg gcagaggag gcaggggag ttttaaactc
2461 actctatggt ctaatcactc tgatctctgc cccactcaa tatttgattt actctttttt
2521 cttgcagttt cagctggcat gcggactggt gactcagctt catggcttg gattgacca
2581 gtggggcaca tatggggaca atggccataa gatattggga aatgcttgtt gaatgggaaa
2641 atgctgatgt ggggttagca gggatagttc ctccaacaca gcagaacttg gccctgtgct
2701 tctctggcca gctttcctta agatactgaa caggccaaa atggggccaa gatgctctaa
2761 gactgagcca ccaagcatgg gtttgcaatg agctcattct ggctttgagg ctccctggga
2821 atggcagtg agagcctgct cctctccctg tctcaccctc acattatctt ggctcctcag
2881 aagatctccc aaaggctgtg gtgtcctggagcctcaatg gtacagc/ggtg ctt/cgagaagg
2941 acagtgtgactctgaagtgcaggagcctactccctgaggacaattccacacagtggt
3001 ttcacaatgagagcctcatctcaagccaggcctcag

```

As regiões em negrito correspondem à identidade das seqüências do código de acesso GenBank Z46223 (DNA para FcγRIIIB humano) com aquela do código NT\_004487 para o cromossomo 1 humano descrita a seguir.

Fc $\gamma$ RIIB – código de acesso no GenBank: NT\_004487, cromossomo 1 humano

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>

ORIGEM

```

1  cactccagtg tggcatcatg tggcagctgc tctcccaac tgctctgcta cttctaghta
61  agtcaggatc tccctggttg agggagaagt ttgagatgcc ttgggttcat cagacacccc
121 ttttcaggct acgaatgaga ctcccacaaa gggatgggac ccctcaccac atctatagct
181 gtggattgag ctaccaggac aagccaagat ggggctagaa atgaggagaa tgctggttcc
241 aattgggtca tagtcatgag tgaggccagt cacttcaccc ctctgggtcc cagaatcact
301 atgtggaacc aaagagcttc gactagatgg tccctagggt ctgtctcttt cagtttgaca
361 ttccagggtt ctctctatg gtttttaatt tctacccttt cttgtgggga tatgggttga
421 ggctctttct gtagcttggg tcaaggaaat tcaacctgta cccttaattt gtgagtttgc
481 acagggagca aggggtaagg gagcagtggt gaaaataggg atttgtgtg acagtggcgc
541 aagaggcatg aacagtggag accagagagc aggtagcaag gtttccacca gaaacatcct
601 gattcttggg aaaattgggc tcttggggca gaggagggca ggggagtttt aaactcactc
661 tatgttctaa tcactctgat ctctgccctt actcaatatt tgatttactc tttttcttg
721 cagtttcagc tggcatgcgg actggtgagt cagcttcatg gtcttgatt gacccagtgg
781 ggcacatag gggacaatgg ccataagata ttgggaaatg cttgttgaat gggaaaatgc
841 tgatgtgggg ttagcagga tagttcctcc aacacagcag aacttggccc tgtgcttctc
901 tggccagctt tcttaagat actgaacagg ccaaaaatgg ggccaagatg ctctaagact
961 gagccaccaa gcatgggtt gcaatgagct cattctggct ttgaggctcc ctgggaatgg
1021 cagtgtagag cctgctctc tccctgctc caccacat tatcttggct cctcag aaga
1081 tctcccaaaggctgtggtgttctctggagctcaatggtacagc/ggtgctt/c gagaaggacag
1141 tgtgactctg aagtgccag ggcctactc ccctgaggac aattccacac agtggtttca
1201 caatgagaac ctcatctcaa gccaggctc gagctacttc attgacgctg ccacagtcaa
1261 cgacagtggg agtacaggt gccagacaaa cctctccacc ctcagtgacc cgtgagct
1321 agaagtcoat atcggtgagt tgatgaagg gaagaggaaa atcaccaata aagggtgaaa
1381 caaagggtcc tgaataactt ggtaagagcc agagatgata ttcttagaga taaaagctaa
1441 gatgagatga tgtgtggtcc cactgaatgg tatcagagtt gtagtctag ctctaagtag
1501 gtcttggca aaatgtcaaa gectgtcaga cagtagatat aggtgctgc attgcacaa
1561 tccaagaatc ccataatgga gtgcatacaa tgtgaatgtg tcatgtgaag gttaggccat
1621 ggcataatg ctcaataata gttatttatt tattttttt cattttttt aatttttatt
1681 tttgagacag agtatcactc tctcaccag gctggagtgc aatgcgga tctgagctca
1741 ctgcaacttc tgcccccttg ggtttagtg attctccagc ctgagcctcc cgagtagctg
1801 agattacag caccgccac cagccccag taatttttgt attttttaga gagacagggt
1861 ttcaccatgt tggtcagtct ggtctcaac tctgacctc aggtgattoa ccggtcttg
1921 ctttccaaag tgctgggact acaggcgtga gccaccacac ctggccaata atttttattg
1981 aataaattaa tgaatttggg gttaggacct caatctcctt ctgctctca gacatgtaat
2041 gccctaagcc acctccaaa gcaatcctag tggcctagaa tcatatctt ctgtctctc
2101 atcaatgcta tactcaaacc tataattaag cataaattg gtaatgtgat agctcttcca

```

Oligonucleotídeos para NA1 e NA2 usados na PCR alelo-específico:

**Sense NA1 - 5' cag tgg ttt cac aat gtg aa 3'** (seqüência destacada em amarelo)

**Sense NA2 - 5' ctc aat ggt aca gcg tgc tt 3'** (seqüência destacada em pink)

**Anti-sense NA1/NA2 - 5' atg gac ttc tag ctg cac 3'** (seqüência destacada em vermelho)

**Sense SH - 5' aag atc tcc caa aag gct gtg 3'** (seqüência destacada em verde)

**Anti-sense SH - 5' act gtc gtt gac tgt gtc at 3'** (seqüência destacada em cinza)





## SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DE DNA

- 1) **MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1M**: preparar 50mL e autoclavar (PM = 203,30);
- 2) **Tris HCl 1M**; pH 8,0: preparar 50mL e autoclavar (PM = 121,14);
- 3) **NaCl 5M**: preparar 50mL e autoclavar (PM = 58,44); **não guardar na geladeira**;
- 4) **EDTA.Na<sub>2</sub> 0,5M**; pH 8,0: preparar 50mL e autoclavar;  
PM (EDTA.Na<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O) = 372,24
- 5) **SDS 10%**: preparar 50mL e **não autoclavar** (preparar em água autoclavada);  
**não guardar na geladeira**;

### 6) Tampão de lise de eritrócitos 5x concentrado

|  |               |
|--|---------------|
| Sacarose .....                                 | 27,4g (1,6M)  |
| Triton-X .....                                 | 2,5mL (5%)    |
| *MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 1M ..... | 1,25mL (25mM) |
| *Tris HCl 1M pH 8,0 .....                      | 3,0mL (60mM)  |
| *Água deionizada estéril qsp .....             | 50,0mL        |

\* Já estarão autoclavados.



### 7) Tampão Proteinase K (5x concentrado)

- \* NaCl 5M ..... 750 $\mu$ L
- \* EDTA. Na<sub>2</sub> 0,5M, pH 8,0 ..... 2,4mL
- \* Água deionizada estéril qsp ..... 10,0mL
- \* Já estarão autoclavados.

### 8) Gel de Agarose 0,8%

0,8g de agarose para 100mL de tampão TBE (1x).

Para cada corrida usar cerca de 70 a 80mL de agarose a 0,8%.

### **TAMPÃO TRIS-BORATO-EDTA (TBE) (10x concentrado)**

- Tris base ..... 121,1g (1M)
- Ácido Bórico Anidro ..... 55,6g (0,9M)
- EDTA.Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ..... 3,7g (10mM)
- Água deionizada estéril qsp ..... 1000mL

Ajustar o pH final para 8,3 a 25°C com HCl



### **SOLUÇÃO DE AZUL DE BROMOFENOL**

|   |                |
|---|----------------|
| Glicerol .....                                | 0,5mL (50%)    |
| EDTA.Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O ..... | 0,037g (0,1 M) |
| SDS .....                                     | 0,01g (1%)     |
| Azul de bromofenol .....                      | 0,001g (0,1%)  |
| Água deionizada estéril qsp .....             | 1mL            |

### **SOLUÇÃO DE BROMETO DE ETÍDEO (10 mg/ML)**

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| Brometo de etídeo .....           | 0,01g (1%) |
| Água deionizada estéril qsp ..... | 1mL        |



### **SOLUÇÃO BALANCEADA DE HANKS**

|   |   |
|---|---|
| NaCl .....                                      | 8g  |
| KCl .....                                       | 0,4g  |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....      | 0,185g [se o sal for anidro (sem água), pesar 0,14 g] |
| MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O .....      | 0,1g [se o sal for anidro, pesar 0,047g]              |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....      | 0,1g [se o sal for anidro, pesar 0,049 g]             |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....          | 0,048g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....           | 0,06g   |
| Glicose .....                                   | 1,0g  |
| NaHCO <sub>3</sub> (Bicarbonato de sódio) ..... | 0,35g   |
| Água deionizada estéril qsp ...                 | 1000mL  |

Ajustar o pH final para 7,2 a 25°C

### **SOLUÇÃO DE GELATINA 2,5% NaCl 0,15M**

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Gelatina .....           | 2,5g  |
| Sol. de NaCl 0,15M ..... | 100mL |



### **ÁCIDO CÍTRICO 10%**

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Ácido cítrico.....                | 10g   |
| Água deionizada estéril qsp ..... | 100ml |

### **SOLUÇÃO DE ALSÉVER**

|  |        |
|--|--------|
| Citrato trissódico.2H <sub>2</sub> O ..... | 8g     |
| Cloreto de sódio (NaCl).....               | 4,2g   |
| Glicose .....                              | 20,5g  |
| Água deionizada estéril qsp .....          | 1000mL |

Acertar o pH final para 6,1 com solução de ácido cítrico 10%

### **CLORETO DE AMÔNIO 0,83%**

|   |       |
|---|-------|
| Cloreto de amônio (NH <sub>4</sub> Cl) [PM=53,49 e M=0,16M] ..... | 4,28g |
| Água deionizada estéril qsp .....                                 | 500mL |

Ajustar o pH final para 7,2 a 25°C



**NaCl 0,15M**

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| NaCl [PM=58,44] .....             | 4,38g |
| Água deionizada estéril qsp ..... | 500mL |

**TAMPÃO TEA-Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> (10X Concentrado)**

|  |        |
|--|--------|
| Trietanolamina.....                        | 28,0mL |
| NaCl .....                                 | 75,0g  |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O ..... | 1,23g  |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O ..... | 0,22g  |
| Azida sódica .....                         | 0,50g  |
| Água deionizada estéril qsp .....          | 1000mL |

Ajustar o pH final para 7,4 a 25°C com HCl



### **TAMPÃO TRIS-EDTA (TE)**

|                                   |                |
|-----------------------------------|----------------|
| Tris base .....                   | 0,06g (10 mM)  |
| EDTA.Na <sub>2</sub> .....        | 0,0168g (1 mM) |
| Água deionizada estéril qsp ..... | 50mL           |

Ajustar o pH final para 8,0 a 25°C com HCl

### **TAMPÃO TRIS-HCl 0,5 M pH 6,8**

|                                   |                |
|-----------------------------------|----------------|
| Tris base .....                   | 60,57g (0,5 M) |
| Água deionizada estéril qsp ..... | 1000mL         |

Ajustar o pH final para 6,8 a 25°C com HCl

### **TAMPÃO TRIS-HCl 1 M pH 8,0**

|                                   |               |
|-----------------------------------|---------------|
| Tris base .....                   | 121,14g (1 M) |
| Água deionizada estéril qsp ..... | 1000mL        |

Ajustar o pH final para 8,0 a 25°C com HCl



### **TAMPÃO TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8**

Tris base ..... 181,71g (1,5 M)

Água deionizada estéril qsp ..... 1000mL

Ajustar o pH final para 8,8 a 25°C com HCl

### **PBS (SALINA TAMPONADA COM FOSFATO) pH 7,4 (10 X concentrado)**

NaCl ..... 80,0g

KCl ..... 2,0g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 11,5g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 2,0g

Água deionizada estéril qsp ..... 1000mL

Ajustar o pH final para 7,4 a 25°C com HCl