CHRISTIANE GUEDES LAMBERT

**Efeito do interferon-gama em células dendríticas
de pacientes com defeitos no CD40L**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2017

CHRISTIANE GUEDES LAMBERT

**Efeito do interferon-gama em células dendríticas
de pacientes com defeitos no CD40L**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Versão Original.

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lambert, Christiane Guedes

Efeito do interferon-gama em células
dendríticas de pacientes com defeitos no CD40L /
Christiane Guedes Lambert; orientador Antonio
Condino Neto. - São Paulo, 2016.
61 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Síndrome de Hiper IgM. 2. Células dendríticas.
3. Interferon-gama. 4. CD40L. 5. C. albicans. I.
Condino Neto, Antonio, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Christiane Guedes Lambert

Título da Dissertação: Efeito do interferon-gama em células dendríticas de
pacientes com defeitos no CD40L

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em
sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovada** ☐ **Reprovada**

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 27 de setembro de 2014.

PARECER 1201/CEPSH

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: " *Efeito do Interferon-gamma in vitro sobre as células dendríticas de pacientes deficientes de CD40L*" do pesquisador **Antonio Condino Neto** e aluna **Christiane Guedes Lambert**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: icb.usp.br.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **27.09.2015**.

Atenciosamente,

Prof. Dra. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

A Deus, por não escolher os capacitados,
mas por capacitar os escolhidos.

Ao meu amado marido Emersom, que,
com seu incentivo constante, permitiu-me a
realização de um sonho: ser uma profissional
da saúde e poder contribuir para cuidar da
obra-prima de Deus: crianças, nas quais habita
o Espírito Santo.

AGRADECIMENTOS

De uma forma ímpar, agradeço ao querido Professor Antonio Condino Neto, meu orientador-amigo, que admiro sem precedentes, por me propiciar uma das mais desafiadoras oportunidades da minha vida.

Agradeço imensamente ao meu marido, Emersom, e minhas filhas, Sophia e Izabelly, que me acompanharam, colaboraram, torceram, vibraram e enxergam com seus próprios olhinhos que vale a pena dedicação e amor a tudo que se faz.

Agradeço, também:

Ao meu paizinho, Sr. Guedes, pelo eterno apoio e amor.

Ao apoio de toda minha família, Fabio, Ana Paula, D. Neide, Sr. Oswaldo, Bizo e Bibi, pelo incentivo, e carinho.

À minha amiga de infância, Mônica Império Simiscuka, sempre presente nas ocasiões de grande importância da minha vida.

Às amigas que ganhei para toda vida Christina Arslanian, Silvana Lucchini. pelo apoio constante e carinho.

À minha parceira na ciência, Tábata, de modo especial, por todos os momentos de companheirismo e dedicação à minha pessoa e em minha causa.

Aos queridos amigos do laboratório de Imunologia Humana (LIH), Renata, Leandro, Paola, Marina, José Antonio, Edgar, Lucila que nunca estiveram ausentes e fazem parte desta conquista.

Ao Prof^o Dr. José Alexandre Barbuto e aos colegas do Laboratório de Imunologia dos Transplantes, Rodrigo, Bruna, Cecília, Aline, Tiago e Mariana, por compartilharem seu tempo e conhecimento, de maneira tão solícita.

As médicas, Dra. Beatriz Costa Carvalho, Dra. Cristina Weber Worm, Dra. Janáira, bem como às suas respectivas equipes, pelo apoio a esta dissertação, e pela organização, coleta e envio de amostras de sangue dos pacientes deficientes de CD40 ligante para nosso laboratório. Sem esse apoio, este trabalho não teria sido realizado;

Aos pequenos pacientes e aos seus pais, pois sem eles esta pesquisa teria sido impossível.

A Áurea, pelos cafés cheios de carinho e a todas outras tantas pessoas, como Claudia, Grace e todo o pessoal da portaria que, no dia a dia, sempre tinham um sorriso e votos de bom dia a serem dedicados.

Ao Professor Niels Câmara Olsen, por sempre acreditar em mim.

Aos Professores do Departamento de Imunologia, em especial às Professoras Sônia Jancar, Bruna Alencar e Dra. Cristina Kokron, pelas valiosas críticas e sugestões, por ocasião do Exame de Qualificação.

Por fim, agradeço a todas as pessoas no Departamento de Imunologia com as quais convivi durante estes ricos anos de crescimento e conhecimento.

Agradecimento especial

Agradeço especialmente à CAPES pela Bolsa-Mestrado e Auxílio concedido, sem o qual não seria possível a realização deste estudo.

“O que prevemos raramente ocorre; o que
menos esperamos geralmente acontece”.

(Benjamin Disraeli)

RESUMO

LAMBERT, C. G. **Efeito do interferon-gama em células dendríticas de pacientes com defeitos no CD40L**. 2016. 61f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A Síndrome de Hiper-IgM é uma imunodeficiência primária ocasionada por mutações que levam a defeitos na troca de isótopo da cadeia pesada das imunoglobulinas e na hipermutação somática, resultando em níveis séricos normais ou elevados de IgM, associados com baixos níveis séricos de IgG, IgA e IgE. O primeiro tipo de hiper-IgM descrita foi a síndrome da X-HIGM ligada ao cromossomo X, que se deve a mutações no gene CD40LG. A proteína CD40L, codificada pelo CD40LG, é expressa na superfície de linfócitos T e interage com seu receptor CD40, expresso nas células apresentadoras de antígeno como linfócitos B e células dendríticas. A diminuída expressão de CD40L pelos linfócitos T afeta os monócitos e células dendríticas, diminuindo a secreção de IL-12. Esta reduzida secreção resulta na diminuição da produção de IFN- γ pelos linfócitos T, contribuindo para a suscetibilidade aumentada a infecções oportunistas observadas nestes pacientes. As células dendríticas são um elemento primordial do sistema imune pela conexão que estabelecem entre a imunidade inata e adaptativa e pela capacidade única de modulação da resposta adaptativa. Nesta conexão, a interação CD40L-CD40 exerce importante papel para resposta antigênica através de sua ação sobre as células dendríticas, como amplificar a apresentação de antígenos e a maior ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos T. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* do interferon-gama em células dendríticas de pacientes com mutações no CD40LG. Para tanto, as células dendríticas foram diferenciadas a partir de monócitos de sangue periférico, tratadas *in vitro* com interferon-gama, pulsadas com *C. albicans* e analisadas quanto a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80(B7-1) e CD86 (B7-2), a produção de espécies reativas de oxigênio, das citocinas IL-10, IL-12, IL-4 e IL-5, e por fim, a capacidade destas células em induzir linfoproliferação também foram avaliadas. O tratamento com IFN- γ sob as DCs imaturas induziu aumento na expressão da molécula CD86 em indivíduos saudáveis e nos pacientes X-HIGM. As células dendríticas dos controles saudáveis e dos pacientes sob as mesmas condições quando pré-tratadas com IFN- γ e desafiadas com *C. albicans* foram capazes de aumentar a resposta na produção de espécies reativas de oxigênio, citocina IL-12 e porcentagem de proliferação dos linfócitos TCD3. Com base nestes resultados, o IFN- γ demonstrou capacidade em potencializar a resposta das células dendríticas tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com X-HIGM. Os resultados obtidos podem fundamentar futuros ensaios clínicos que visem o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento de pacientes acometidos por infecções oportunistas.

Palavras-chave: Síndrome de Hiper IgM. Células dendríticas. Interferon-gama. CD40L. *C. albicans*.

ABSTRACT

LAMBERT, C. G. **Effect of interferon-gamma on dendritic cells of patients with CD40L defects.** 2017. 61p. Masters science (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Hyper-IgM Syndrome is a primary immunodeficiency caused by mutations leading to defects in immunoglobulin heavy chain isotope exchange and somatic hypermutation, resulting in normal or elevated serum IgM levels associated with low serum levels of IgG, IgA And IgE. The first type of hyper-IgM described was the X-HIGM syndrome linked to the X chromosome, which is due to mutations in the CD40LG gene. The CD40L protein, encoded by CD40LG, is expressed on the surface of T lymphocytes and interacts with its CD40 receptor, expressed on antigen presenting cells such as B lymphocytes and dendritic cells. Decreased CD40L expression by T lymphocytes affects monocytes and dendritic cells, decreasing IL-12 secretion. This reduced secretion results in decreased IFN- γ production by T lymphocytes, contributing to the increased susceptibility to opportunistic infections observed in these patients. Dendritic cells are a key element of the immune system by the connection that they establish between innate and adaptive immunity and the unique ability to modulate the adaptive response. In this connection, the CD40L-CD40 interaction plays an important role in antigenic response by acting on dendritic cells, such as amplifying the antigen presentation and the greater activation, proliferation and differentiation of T lymphocytes. The objective of this work was to evaluate the effect *in vitro* analysis of interferon-gamma in dendritic cells from patients with mutations in CD40LG. The dendritic cells were differentiated from peripheral blood monocytes treated *in vitro* with interferon gamma, pulsed with *C. albicans* and analyzed for the expression of co-stimulatory molecules CD80 (B7-1) and CD86 (B7- 2), production of reactive oxygen species, cytokines IL-10, IL-12, IL-4 and IL-5, and finally the ability of these cells to induce lymphoproliferation were also assessed. Treatment with IFN- γ under immature DCs induced increased expression of the CD86 molecule in healthy subjects and in X-HIGM patients. Dendritic cells from healthy controls and patients under the same conditions when pre-treated with IFN- γ and challenged with *C. albicans* were able to increase response in the production of reactive oxygen species, IL-12 cytokine and proliferation percentage of TCD3 lymphocytes. Based on these results, IFN- γ demonstrated ability to potentiate dendritic cell response in both healthy and X-HIGM patients. The results obtained may support possible future clinical trials aimed at the development of new therapeutic options in the treatment of patients with opportunistic infections.

Keywords: Hyper IgM Syndrome. Dendritic cells. Interferon-gamma. CD40L. *C. albicans*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
APC	células apresentadoras de antígeno (do inglês: <i>antigen-presenting cells</i>)
AR-HIGM	Síndrome de Hiper- IgM Autossômica Recessiva
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
BRAGID	Grupo Brasileiro de Imunodeficiência
BSA	albumina sérica bovina
CCR7	<i>chemokine receptor type 7</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40 ligante
CD40LG	gene CD40L
CD40s	CD40 ligante solúvel
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CFSE	<i>carboxifluoresceína succinimidyl éster</i>
CSR	<i>class-switch recombination</i>
CXCR4	<i>chemokine receptor type 4</i>
DCs	células dendríticas (do inglês: <i>dendritic cells</i>)
DGC	doença granulomatosa crônica
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
Doublets	(células que passam unidas através do laser e são reconhecidas como um único evento)
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético (do inglês: <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	<i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
FasL	fas ligante
FSC	tamanho (do inglês: <i>forward scatter</i>)
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GVHD	<i>graft versus host disease</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>

HSCT	<i>stem cell hematopoietic therapy</i>
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
iDC	células dendríticas imaturas (do inglês: <i>imature dendritic cells</i>)
IDPs	imunodeficiências primárias
IFN-γ	interferon-gama
Ig	imunoglobulina
IGIV	imunoglobulina intravenosa
IGSC	imunoglobulina subcutânea
IL	interleucina
kDa	<i>kilo</i> Dalton
LPS	lipopolissacarídeo
Ly	linfócitos
mDC	células dendríticas imaturas (do inglês: <i>mature dendritic cells</i>)
MFI	intensidade mediana de fluorescência (do inglês: <i>median fluorescence intensity</i>)
MHC	complexo de histocompatibilidade maior (do inglês: <i>major histocompatibility complex</i>)
MOI	<i>multiplíce of infection</i>
NBS1	Síndrome de Quebra de Nijmegen
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NK	célula natural <i>killer</i>
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos (do inglês: <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBMCs	células mononucleares do sangue periférico (do inglês: <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PHA	fitohemaglutinina
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PMS2	<i>postmeiotic segregation increased</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PTX3	pentraxina 3
RNA	ácido ribonucleico (do inglês: <i>ribonucleic acid</i>)
ROS	espécies reativas de oxigênio (do inglês: <i>reactive species of oxygen</i>)

RPM	rotações por minuto
RPMI	meio Roswell Park Memorial Institute
sCD40L	CD40L solúvel (do inglês: <i>soluble</i> CD40L)
SFB	soro fetal bovino
Single Cells	células únicas
SSC	granulosidade (do inglês: <i>sideward scatter</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th	<i>T helper</i>
TLRs	<i>toll-like receptors</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFB	<i>tumor necrosis factor homology</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
Treg	linfócito T regulador
UNG	uracil-DNA glicolisase
URL	unidade relativa de luz
X-HIGM	Hiper IgM ligada ao X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Síndrome da Hiper IgM.....	16
1.2 A interação CD40L/CD40 na resposta imune.....	17
1.3 Defeitos genéticos e moleculares da Síndrome de Hiper IgM.....	20
1.4 DCs: maturação, interação CD40L/CD40 e terapia com IFN-γ.....	22
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Casuística.....	27
3.2 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) por aderência e diferenciação em células dendríticas.....	29
3.3 Imunofenotipagem das iDCs (diferenciadas a partir de monócitos).....	30
3.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por ensaio de quimioluminescência.....	30
3.5 Quantificação de IL-10, IL-12p70.....	31
3.6 Avaliação da capacidade linfoestimuladora das células dendríticas.....	31
3.7 Quantificação das citocinas, IL-4 e IL-5 em co-cultura de DCs com linfócitos.....	32
3.8 Análises estatísticas.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Fenotipagem das DCs.....	33
4.2 Produção de espécies reativas de oxigênio.....	35
4.3 Produção de citocinas.....	37
4.4 Avaliação da capacidade de estímulo linfoproliferativa das DCs dos pacientes X-HIGM.....	38
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXOS.....	57
ANEXO A - FICHA CLÍNICA.....	57
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	60

1 INTRODUÇÃO

Pacientes com deficiência do CD40 ligante (CD40L), ou Hiper-IgM ligada ao X (X-HIGM), apresentam maior susceptibilidade a infecções graves, causadas por bactérias extracelulares. Tal disposição é, em parte, atribuída a uma ineficiente resposta mediada por anticorpos. Outra particularidade desses pacientes, que ainda necessita de esclarecimentos, é a maior incidência de infecções fúngicas.

Um claro entendimento dos diferentes mecanismos de defesa envolvidos na infecção por *C. albicans* é essencial para o desenvolvimento de estratégias, tanto para a prevenção e controle, como para o tratamento das infecções por esse fungo. A contenção da invasão do patógeno no hospedeiro exige uma resposta rápida, geralmente promovida pelo sistema imune inato, o qual se desenvolve prontamente, precedendo a expansão clonal de linfócitos antígenos específicos. O sistema imune inato consiste de células NK, complemento, proteínas plasmáticas e células fagocíticas e serve para dois propósitos principais: atuar como um efeito direto antifúngico pela destruição do patógeno através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e como uma função instrutiva nas células do sistema imune adaptativo, por meio da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, da indução de atividades co-estimulatórias e da apresentação de antígeno (1).

Dados provenientes da literatura colhidos em laboratórios de pesquisa (2) demonstram um mau funcionamento das células dendríticas (DCs) de pacientes com X-HIGM. Esses dados nos instigam a investigar fatores que possam melhorar essa disfunção.

A avaliação do efeito do tratamento com interferon-gama (IFN- γ), na função das DCs, pode contribuir para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos imunológicos, envolvidos nos quadros infecciosos dos pacientes com X-HIGM.

1.1 Síndrome da Hiper IgM

A Síndrome de Hiper IgM (HIGM) descrita, pela primeira vez, em 1961, por Rosen e Burtin (3, 4), tem incidência estimada em 1/500.000 nascimentos (5) e é mais comumente observada em indivíduos do sexo masculino, na forma de uma herança recessiva, ligada ao cromossomo X (6, 7).

A HIGM é uma imunodeficiência primária, caracterizada por defeito na troca de isótopo de cadeia pesada das imunoglobulinas, resultando em níveis séricos normais ou elevados de IgM, associados com baixos níveis séricos de IgG, IgA e IgE.

Os defeitos moleculares, descritos até o momento, relacionados a essa Síndrome, incluem mutações no CD40L, CD40, *activation-induced cytidine deaminase* (AID), uracil-DNA glicolisase (UNG) e *nuclear factor kappa B* (NF-Kb) - todas moléculas fundamentais na fisiologia da troca de isótipos de cadeia pesada das imunoglobulinas. Os patógenos mais frequentes são bactérias extracelulares, micobactérias e fungos, resultando num padrão fenotípico de imunodeficiência combinada.

Uma publicação recente, do Registro Latino-Americano de Imunodeficiências Primárias, demonstrou que pacientes latino-americanos apresentam infecções fúngicas relevantes, incluindo *Pneumocystis jiroveci*, *Candida albicans* e *Paracoccidioides brasiliensis*, dentre outras (8). Os pacientes com HIGM são suscetíveis a infecções sinopulmonares recorrentes, infecções oportunistas, neutropenia, doença autoimune e Câncer (9), particularmente do fígado, do pâncreas e da via biliar (10). No entanto, as manifestações clínicas de HIGM podem ser variáveis e, em parte, dependem do defeito molecular que afeta a via de sinalização do CD40L/CD40.

1.2 A interação CD40L/CD40 na resposta imune

O CD40L, membro da família TNF- α , família de glicoproteínas associadas à membrana, é expresso predominantemente nas células T CD4+ ativadas. Consiste numa proteína transmembranar tipo II, codificada no cromossoma X, que é expressa na superfície celular como um trímero. Muito do que hoje é sabido sobre o papel da interação CD40L/CD40 se deve aos achados clínicos, laboratoriais e imunopatológicos obtidos a partir de estudos com pacientes deficientes de CD40L, cujos primeiros relatos foram descritos em 1993 (11, 12). As infecções recorrentes causadas por um amplo espectro de agentes etiológicos, incluindo bactérias extracelulares e intracelulares, vírus, protozoários e mesmo por fungos (13), são as características clínicas predominantes, manifestadas por esses indivíduos.

É de essencial importância ressaltar que a suscetibilidade aos patógenos oportunistas é uma diferença marcante da deficiência de CD40L, quando comparada com deficiências, sobretudo, de anticorpos, tais como a agamaglobulinemia ligada ao X (14), ou com as outras formas de HIGM, incluindo as deficiências de AID e UNG (15, 16).

Além dos patógenos supracitados (*Pneumocystis jiroveci* e *Cryptosporidium parvum*), pacientes deficientes de CD40L são suscetíveis a infecções causadas por *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis* (8), *Cryptococcus neoformans* (17), *Histoplasma capsulatum* (18), *Aspergillus sp.*, *Microsporidium sp.*, *Isospora belli* e micobacterias (8), o que pode resultar em morbidade grave e mortalidade frequente.

A interação CD40L/CD40 exerce um papel substancial no desenvolvimento dos progenitores mielóides (19). O CD40L solúvel (CD40Ls) interage com o CD40 expresso na superfície de células do estroma da medula óssea, induzindo a produção do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (19). Na ausência de inflamação, essas duas citocinas atuam sobre os progenitores mielóides, induzindo o amadurecimento dos fagócitos. Já, durante a reação inflamatória aguda, as moléculas *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), fas ligante (FasL) e altas concentrações do próprio CD40Ls aumentam a expressão do CD40 na superfície dos progenitores mielóides. Sob essas condições, a interação CD40L/CD40 induz a morte celular por apoptose e por contrabalancear o efeito do G-CSF e do GM-CSF.

Figura 1 - Diagrama esquemático da interação CD40/CD40L na medula óssea

Em estado basal de não inflamação, a interação CD40L/CD40 regula o desenvolvimento de progenitores mielóides, por meio da indução da produção de G-CSF e GM-CSF. Durante a inflamação aguda, a interação CD40L/CD40 induz a morte celular por apoptose. (19).

A neutropenia apresentada pelos pacientes deficientes de CD40L, por si só, justificaria a suscetibilidade desses indivíduos às infecções fúngicas. Contudo, mesmo quando não neutropênicos e sob tratamento com reposição de imunoglobulinas e G-CSF, pacientes deficientes de CD40L continuam a manifestar infecções fúngicas graves (20). Esse fato sugere que, além de defeitos em linfócitos B, esses indivíduos também denotam mau funcionamento de outras células envolvidas com a resposta imune antifúngica.

As DCs de pacientes deficientes de CD40L também foram estudas pelo nosso grupo e foi observado falha na maturação celular. Em resposta aos fungos *C. albicans* destacou-se: expressão reduzida da molécula coestimulatória CD80 e do complexo principal de compatibilidade (MHC II), concentrações reduzidas de IL-12 e concentrações aumentadas de IL-10. As DCs em co-cultura com linfócitos T autólogos, apresentaram reduzida capacidade de induzir a geração de linfócitos T auxiliares (Th1) cuja citocina de assinatura é o IFN- γ , porém houve uma exacerbação da resposta por linfócitos Th2 que são produtoras de IL-4 e IL-5, caracterizando um padrão de resposta imune associado a suscetibilidade a infecções fúngicas. (21).

1.3 Defeitos genéticos e moleculares da Síndrome de Hiper IgM

A HIGM pode ser classificada em tipos geneticamente definidos, podendo estar relacionada a falhas de sinalização na via do CD40, devido à incapacidade de expressão de CD40 ou CD40L, ou deste em se ligar ao CD40, resultando em uma via de sinalização ineficiente, que acarreta efeitos adversos na troca do isótipo das imunoglobulinas (22).

Diversos defeitos genéticos foram descritos como formas autossômicas recessivas da HIGM (AR-HIGM), que se caracterizam por apresentar expressão normal de CD40L, mas com falhas na via de sinalização do CD40 em linfócitos B (23, 24). Os desarranjos moleculares detectados nas AR-HIGM incluem defeitos em enzimas envolvidas na produção ou reparo de quebras no filamento duplo do DNA, durante a troca de isótipo da imunoglobulina (25), tais como a desaminase induzida por ativação (AID) (16, 26, 27), uracil-N-glicosilase (UNG) (15), *postmeiotic segregation increased 2* (PMS2) (28), *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) (29) e o gene codificador do *Nibrin* (30), que é encontrado maculado na Síndrome de quebra de Nijmegen (NBS1).

Além disso, a AR-HIGM pode ser decorrente de mutações no gene da molécula CD40 (31), o receptor do CD40L, proteínas encontradas em linfócitos B, neutrófilos, monócitos, DCs, células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e algumas células cancerosas (32, 33).

A interação entre o CD40, presente em células apresentadoras de antígeno, e o CD40L, presente nos linfócitos T, desempenha um papel importante na imunidade; falhas nessa interação podem levar à X-HIGM, que é resultante de defeitos moleculares no gene CD40LG (11, 12, 34-36), o qual consiste em cinco *exons* (11, 12, 35-38), localizados no cromossomo X, na posição Xq26.3–Xq27.1 (39).

O produto do gene CD40LG, o CD40L, é uma glicoproteína, de membrana tipo II, de 39 kDa, com sequência homóloga ao fator de necrose tumoral (TNF- α), expressa na forma de um homotrímero, composto por 261 aminoácidos de modo transiente na superfície de linfócitos T CD4⁺ ativados (40). O CD40L também pode ser expresso em linfócitos T CD8⁺, linfócitos B, mastócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas (32).

A proteína CD40L possui uma cauda citoplasmática curta e uma grande porção extracelular, onde se encontra uma porção homóloga ao TNF, que interage como

receptor. Essa região é parcialmente codificada pelo *exon* 4 e por todo o *exon* 5, e corresponde à região que mais sofre mutações (65%) (41).

Além da forma de membrana, o CD40L pode ser solúvel, denominado *soluble* CD40L (sCD40L), sendo formado a partir da clivagem na porção transmembranosa, que é secretada por plaquetas estimuladas. Essa clivagem gera uma molécula solúvel de 18 kDa com os 148 últimos aminoácidos do CD40L que, por conservar o domínio TNFH intacto, mantém a capacidade de se ligar ao CD40 (42).

A ligação de sCD40L ao CD40, nos neutrófilos, promove sua ativação, a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais podem gerar estímulo adicional às plaquetas e aumentar a liberação de sCD40L. Essa interação pode ter diversos efeitos clínicos, como o aumento da inflamação mediada por plaquetas e aterosclerose (43).

As várias formas de defeitos moleculares relatadas para o CD40L - o subtipo mais frequente de HIGM (44), com frequência estimada em 1/1.000.000 de nascimentos (13), incluem substituições únicas de aminoácidos, deleções transcritas truncadas, dentro e fora do quadro de leitura. A maior porcentagem das mutações encontradas na molécula de CD40L é do tipo *missense* (39,5%), seguida de mutações *nonsense* (18,6%), deleção *frameshift* (12,8%) e inserções *frameshift* (10,5%) (45).

Recentemente, estudos realizados em pacientes brasileiros deficientes de CD40L (20), revelaram seis mutações, sendo elas, um defeito de *splicing*, levando à deleção dos *exons* 3 (r.345_402del do gene CD40L (CD40LG), uma nova substituição *missense* g.11856 G>C (c.476 G>C, pW140C), uma substituição *nonsense* g.11855 G>A (c.475 G>A, p. W140X), e três deleções g.3074_3077delTAGA, o que altera o processamento do RNA.

Alguns pacientes que não apresentam CD40L detectável na superfície dos linfócitos T, ativados sem qualquer mutação detectável no RNAm do CD40LG (11), ou sem nenhum RNAm detectável de CD40LG, sugerem um defeito de transcrição do CD40L, como, por exemplo, a expressão deficiente de CD40L devido a anormalidades na região do promotor (46).

As mutações e deleções no gene CD40LG em X-HIGM resultam em uma proteína CD40L defeituosa que, quando expressa na superfície de linfócitos, não possui a capacidade de se ligar ao CD40 e, portanto, não o ativa normalmente (13, 47). Como consequência, há a interrupção da interação entre os linfócitos T CD4+ e

linfócitos B, impedindo a troca de isótipo de imunoglobulina, a co-estimulação de linfócitos T e o desenvolvimento de linfócitos B de memória. Tendo em vista que o defeito genético não é letal para os linfócitos T, mães portadoras de mutação possuem inativação aleatória do cromossomo X, em linfócitos T (48), sem acarretar em efeito aparente na função imunitária, exceto em casos graves que podem estar associados com um fenótipo leve de HIGM (49).

Embora tenha sido descrita, inicialmente, como uma deficiência de anticorpos (50), a deficiência de CD40L está classificada entre as imunodeficiências combinadas, porque o CD40L é uma molécula de sinalização celular T, cuja ausência leva a ambos os defeitos, celulares e humorais.

1.4 DCs: maturação, interação CD40L/CD40 e terapia com IFN- γ

Desde a descoberta das DCs, em 1974 (51), que são células essenciais tanto para a indução da imunogenicidade quanto da tolerância (52), sua habilidade tem sido explorada no tratamento de infecções, Câncer e nas imunodeficiências primárias (IDPs) (11, 53-55). Essas células encontram-se presentes na maioria dos tecidos e reconhecem diferentes padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), (56) por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs).

As DCs, que residem nos epitélios e nos tecidos, apresentam um fenótipo imaturo, caracterizado por uma alta atividade fagocítica. Após reconhecimento e captura do antígeno, as DCs migram através dos vasos linfáticos aferentes para os nódulos linfáticos. Nesse local, elas amadurecem, perdem sua capacidade de fagocitose e expressam moléculas coestimuladoras CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2). A maturação das DCs também é caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC-II ou HLA-DR) bem como pela produção de diversas citocinas, o que contribui para sua capacidade de ativação dos linfócitos T (57, 58).

Nos linfonodos, as DCs interagem com as células T, ativando-as e desencadeando a resposta específica ao antígeno apresentado (54). As DCs imaturas também são encontradas nos nódulos linfáticos, onde podem fagocitar o antígeno que entra, via vasos linfáticos aferentes, e amadurecer.

A interação CD40L/CD40 influencia o fenótipo das DCs, aumentando sua capacidade de expressar elevados níveis de complexos antigênicos das moléculas

do antígeno leucocitário humano (HLA), que também são conhecidas como moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC).

Na X-HIGM, pacientes afetados, normalmente, apresentam infecções recorrentes já no primeiro ano de vida (59). A deficiência de CD40L os torna propensos a infecções piogênicas (60) e oportunistas por *Pneumocystis carinii*, *Cryptosporidium* e *Toxoplasma gondii*, indicando defeito na imunidade celular (60).

Em humanos, uma resposta imune efetiva contra fungos é dependente das respostas imunes inatas e adaptativas. A ativação apropriada de fagócitos e, particularmente, a produção de reativos do oxigênio são cruciais para o controle de infecções fúngicas (21). Os neutrófilos expressam o receptor CD40 em sua superfície, e a interação com seu ligante potencializa a função microbicida destes fagócitos (33). Em monócitos, essa ligação induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-10), necessárias para a resposta eficiente contra micróbios e tumores (33, 61). Estudos demonstraram que a interação com CD40L da superfície plaquetária contribui para o recrutamento e firme adesão dos neutrófilos em sítios de lesão vascular (43).

A interação CD40L/CD40 também é capaz de estimular as DCs e induzir a produção das citocinas IL-12, IL-10, IL-23, TNF- α e IFN- α (62-65), bem como a pentraxina 3 (PTX3). Esta última é um PRR solúvel, que reconhece fungos e é, parcialmente, regulada pela interação CD40L/CD40 (66, 67).

Outro importante passo na diferenciação das DCs, igualmente influenciado pela interação CD40L/CD40, é a mudança no padrão de expressão de receptores de quimiocinas. Essa interação aumenta a expressão de *chemokine receptor type 7* (CCR7) e *chemokine receptor type 4* (CXCR4) e amplia a capacidade migratória das DCs para os linfonodos, a fim de que possam “instruir” a resposta imune mediada pelos linfócitos T (68); e, durante a interação das DCs com o linfócito T, a IL-12 exerce papel central na resposta imune antifúngica.

A citocina acima mencionada é responsável pelo desenvolvimento da resposta das células *T helper* (Th), do tipo 1 (Th1), caracterizada pela produção de IFN- γ . A função da IL-12 pode ser antagonizada pela citocina IL-10 (69) que, por sua vez, é fundamental na diferenciação Th2, caracterizada pela produção de IL-4 e IL-5 (70). Estudos prévios demonstram que um desvio de uma resposta Th1 para Th2 tem associação com a suscetibilidade às infecções fúngicas, haja vista que a resposta

imune antifúngica, coordenada pelo IFN- γ , pode ser suprimida pelas citocinas Th2, tanto ao nível de produção, quanto de sua ação (71).

No organismo, o IFN- γ é produzido, principalmente, por linfócitos T CD4⁺ do subtipo Th1, linfócito T CD8⁺ e células NK. Os linfócitos secretam IFN- γ , em resposta à apresentação de antígenos e IL-12. As células T CD4⁺, que se diferenciam em células Th1, secretam mais IFN- γ , que atua nos macrófagos, aumentando a taxa de fagocitose e morte dos microrganismos nos fagolisossomos (72). Além disso, nos linfócitos B, o IFN- γ estimula a produção de anticorpos IgG, que opsonizam os microrganismos (70).

Estudos anteriores a este, demonstram que o desvio do padrão Th1 para Th2 é uma característica marcante do perfil imunopatológico dos pacientes deficientes de CD40L. Isso destaca a interação CD40L/CD40 como tendo papel relevante na ativação em DCs, conforme demonstrado por falhas na função dessas células, em pacientes deficientes de CD40L (8). Essa característica imunopatológica se reflete na susceptibilidade às infecções fúngicas e bactérias intracelulares.

Uma terapia utilizada para pacientes deficientes de CD40L, é a administração intravenosa (IGIV) ou subcutânea (IGSC) de imunoglobulinas (Ig), a qual reduz significativamente as infecções bacterianas e virais (73, 74). Ao serem tratados dessa forma, pacientes com IDPs, portando defeitos exclusivos de anticorpos, passam a ter uma qualidade de vida relativamente saudável (74). Por outro lado, os deficientes de CD40L ou CD40 continuam apresentando infecções oportunistas, causadas por fungos e bactérias intracelulares, com elevada morbidade e mortalidade (73, 75). Isso indica a necessidade de desenvolvimento de terapias que visem reestabelecer essa resposta microbicida deficiente.

Outros procedimentos também são considerados essenciais para o tratamento e prevenção de infecções em pacientes deficientes de CD40L. Dentre eles, destacam-se: antibioticoterapia profilática contra infecções pulmonares, causadas por *Pneumocystis jiroveci*; cuidados alimentares, tais como tomar apenas água fervida para prevenir infecções causadas pelo *Cryptosporidium parvum*; e administração de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), para tratar neutropenia.

A despeito da reposição de Ig, terapia com G-CSF e terapia profilática com antibiótico, pacientes deficientes de CD40L ainda possuem qualidade de vida muito comprometida, apresentando elevada taxa de mortalidade decorrente de infecções

causadas pelos patógenos supracitados. Além disso, o transplante de medula óssea, que é um tratamento definitivo para curar os deficientes de CD40L, ainda é pouco indicado, sobretudo em nosso país. Com base nos dados descritos acima, novas terapias adjuvantes, que previnam infecções oportunistas na deficiência de CD40L, necessitam ser estudadas e desenvolvidas.

O uso do IFN- γ no tratamento de IDPs, como a doença granulomatosa crônica (DGC), acarreta em melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes, pois a terapia induz uma resposta imune mais eficiente frente aos casos de infecções bacterianas e fúngicas (8, 76). As células progenitoras mielóides de indivíduos com DGC, quando tratadas com IFN- γ exógeno, dão origem a fagócitos maduros, capazes de induzir mais apropriadamente a explosão respiratória e a atividade microbicida, quando comparados com aqueles não tratados (77). A literatura também destaca o IFN- γ como uma molécula essencial para imunidade celular, por ativar macrófagos e promover o desenvolvimento de linfócitos CD4+ Th1 e linfócitos T CD8+ citotóxicos (78).

Em 1986, os primeiros ensaios clínicos sobre o uso do IFN- γ começaram a avaliar o seu potencial terapêutico. Focados sobre a tolerabilidade e farmacologia de IFN- γ , os estudos iniciais, sistematicamente, determinaram a sua atividade antitumoral e anti-infecciosa. Nos mais de 20 anos, desde então, o IFN- γ humano comercial tem estado presente em grande variedade de indicações clínicas: tratamento de terapias para inúmeras patologias, como o Câncer, Tuberculose, Pneumonia idiopática fibrocística, Fibrose cística, Hepatite, Osteoporose, entre outras (79).

A imunoterapia para infecções fúngicas vem representando uma atraente opção em relação às terapias antifúngicas atuais, uma vez que pacientes imunodeficientes apresentaram melhora, tanto na prevenção, quanto no tratamento (80).

Sendo assim, o estudo do tratamento *in vitro* com *do* IFN- γ , na função das DCs, de pacientes deficientes de CD40L, bem como sua capacidade em ativar a resposta imune celular, são cruciais para a obtenção de resultados que permitirão a sugestão do uso do IFN- γ como terapia adjuvante para esse grupo de pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito do IFN- γ sobre as DCs dos pacientes deficientes de CD40L.

2.2 Objetivos Específicos

Em DCs de pacientes com deficiência de CD40L tratadas com IFN- γ foram avaliados:

- a) Fenótipo das iDCs
- b) Produção de ROS
- c) Produção das citocinas IL-10 e IL-12p70
- d) Capacidade de indução da linfoproliferação

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Nossa casuística inclui pacientes do sexo masculino, com deficiência de CD40L, oriundos de famílias distintas. Aqueles potencialmente contemplados nesse estudo já estão caracterizados geneticamente: todos têm idade entre 1 e 23 anos, são pertencentes a famílias não consanguíneas, cujos heredogramas demonstram um padrão clássico de herança ligada cromossomo X (2). Na Tabela 1 temos listados os defeitos genéticos identificados nos pacientes utilizados neste estudo:

Tabela 1 - Lista das mutações identificadas na corte dos pacientes deficientes de CD40L

Paciente	Nacionalidade	Tipo de Mutação	cDNA mutação (CD40LG)	Efeito na Proteína
P1	Brasil	Splice site	c. 213-1G>T	exon 2 skipping
P2	Brasil	Insertion	c.633_634insAGCC	p.L193fsX201
P3	Brasil	FS del	c.213_216delATAG	p.I53fsX65
P4	Brasil	Missense	c. 433 T>G	p.V126G
P5	Brasil	Splice site	c. 213-1G>T	exon 2 skipping
P6	Brasil	FS del	c.213_216delATAG	p.I53fsX65
P7	Brasil	FS del	c.213_216delATAG	p.I53fsX65
P8	Brasil	Missense	c.817C>T	p.T254M

As amostras de sangue dos indivíduos que estavam em condições clínicas estáveis de saúde foram encaminhadas, por médicos pertencentes ao Grupo Brasileiro de Imunodeficiências (BRAGID), ao desenvolvimento do protocolo experimental do presente trabalho.

Tal protocolo e o termo de consentimento contemplam os aspectos éticos analisados pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, e não ultrapassaram os limites descritos de risco mínimo, de acordo com as normas para pesquisa, envolvendo seres humanos, estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde sob legislação do MINISTÉRIO DA SAÚDE em 2003.

Os pacientes menores de idade estiveram sempre acompanhados pelos pais ou responsável, no momento da coleta, sendo que a retirada do sangue somente

ocorreu após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

No fluxograma (Figura 2), temos representados os experimentos realizados com as amostras de controles saudáveis e pacientes deficientes de CD40L, em ordem, para melhor entendimento.

Figura 2 - Fluxograma dos experimentos

3.2 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) por aderência e diferenciação em células dendríticas

Neste estudo, foram utilizadas amostras de sangue periférico (10 mL), coletadas em tubo de polipropileno heparinizado, dos pacientes deficientes de CD40L e dos controles voluntários sadios.

A seguir, o sangue foi diluído, volume/volume, em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS) (NaCl 0,14 M; Na₂PO₄ 0,01 M; pH 7,2). Adicionou-se, então, vagarosamente, 20 mL desse sangue em tubo de 50 mL, de polipropileno estéril, contendo 12,5 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Tal solução foi centrifugada a 900 x g, por 20 minutos, a 25 °C, e a interface, contendo a camada de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), coletada e transferida a um novo tubo, de 50 mL, de polipropileno estéril, posteriormente completado com PBS, até atingir a marca de 50 mL (81).

Na sequência, a suspensão celular foi centrifugada a 1200 rpm, por 10 minutos, a 20 °C. Com o sobrenadante descartado, o volume foi completado, novamente, para 50 mL, com PBS. O processo se repetiu, numa segunda centrifugação, a 1100 rpm, por 10 minutos, com o sobrenadante desprezado e o volume mais uma vez completado com PBS. A terceira centrifugação aconteceu a 900 rpm, por 10 minutos.

As células mononucleares, presentes no *pellet* do tubo, foram ressuspensas em 1 mL, de meio RPMI 1640, não suplementado, e quantificadas numa câmara hemocitométrica. A fim de aproveitar, para este estudo, as amostras com viabilidade celular maior que 90%, houve seleção, feita a partir da utilização azul de trypan 0,4% (Sigma Chemical Co.)

Amostras de $2,5 \times 10^6$ das PBMCs foram distribuídas em placas de 96 poços e mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C durante 2 h, para aderência dos monócitos as placas. O sobrenadante das culturas contendo linfócitos não aderentes, foi separado e congelado em nitrogênio líquido, numa concentração de 1×10^7 células/mL e num volume final de 900 µl de SFB e 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, os linfócitos foram utilizados nos experimentos em que foi avaliada a capacidade linfoestimuladora das DCs.

Conforme previamente descrito (81), os monócitos aderentes foram cultivados por 5 dias em R-10, suplementado com de IL-4 (50 ng/mL) e GM-CSF (50 ng/mL). No quinto dia, as células dendríticas imaturas (iDCs) foram obtidas.

3.3 Imunofenotipagem das iDCs (diferenciadas a partir de monócitos)

Para facilitar o desprendimento das placas em que estiveram cultivadas por cinco dias, as iDCs foram dispostas sobre gelo, durante 5 minutos e, em seguida, por pipetagem, coletadas em tubos de polipropileno estéril, de 15 mL, com PBS adicionado, para uma primeira lavagem e posterior centrifugação (900 x g, 25 °C, 6 minutos).

Ressuspendidas, na sequência, em volume suficiente para as marcações desejadas no ensaio, essas iDCs foram transferidas em um volume de 100 µL para os respectivos tubos de poliestireno, de 5 mL, com fundo redondo (utilizados em citometria) e, em seguida, marcadas com anticorpos monoclonais comerciais (Becton Dickinson, Mountain View, CA), para as seguintes moléculas de membrana: anti-CD80 (B7-1, molécula coestimuladora), anti-CD86 (B7-2, molécula coestimuladora), anti-HLA-DR (MHC classe II), anti-CD14 (marcador de monócitos).

Depois da adição dos anticorpos, houve a incubação das iDCs, durante 30 minutos, a 4 °C. Após esse período, lavadas duas vezes com 500 µl de PBS (900 x g, 25 °C, 5 minutos) e ressuspendidas em 1 mL de PBS, contendo 0,5% de paraformaldeído, elas passaram em análise, por citometria de fluxo (Citometro Attune Nxt Flow Cytometer - Thermo-Fisher).

Houve análise das amostras no *software* FlowJo 7.2.5 (Tree Stars Inc.), levando-se em consideração o *side scatter* (SSC), ou seja, a granulosidade, tipo de estrutura e complexidade interna, e o *forward scatter* (FSC), isto é, o tamanho relativo, relacionado por sombra e tempo de passagem.

3.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por ensaio de quimioluminescência

Realizou-se a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio, por ensaio de quimioluminescência, conforme Hatanaka, Eliane et al (82). Após quantificação em câmara hemocitométrica 1×10^5 iDCs/poço, houve a sua

distribuição em placas de 96 poços, de fundo branco, sendo que um grupo foi tratado com IFN- γ , *in vitro*, (100 UI/mL), por 24 h.

No sexto dia de cultura, as iDCs, tratadas ou não com IFN- γ , foram pulsadas com *C. albicans* e estimuladas com PMA (50 nM). Após os tempos de tratamento (1 e 2 h), o substrato Luminol (100 μ M) foi acrescentado aos poços e as reações monitoradas, por 4 h, a 37 °C, usando um luminômetro de microplacas (EG & G Berthold LB96V, Bad Wildbad, Alemanha), que indicou os resultados em unidades relativas de luz (URL).

3.5 Quantificação de IL-10, IL-12p70.

Após 24 h de tratamento com IFN- γ 100 UI/mL (sexto dia de cultura) e posterior ativação, por mais 24 h, com *C. albicans* (sétimo dia de cultura), o sobrenadante das culturas de DCs foram coletados e analisados por meio do ensaio de imunoabsorbância, ligado à *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA). Utilizou-se o kit para dosagem das citocinas IL-12p70 e IL-10, conforme instrução do fabricante (Becton Dickinson), com os resultados expressos em pg/mL.

3.6 Avaliação da capacidade linfoestimuladora das células dendríticas

No quinto dia de cultura, foram obtidas iDCs quantificadas e distribuídas $1,0 \times 10^4$ /poço, em placa de 96 poços, sendo, em seguida, tratadas *in vitro* ou não, com IFN- γ (100 UI/mL), por 24 h. No sexto dia, mais uma vez, elas passaram por pulsação com *C. albicans*, por mais 24 h. Tal placa, empregada para o ensaio de linfoproliferação, foi centrifugada, no sétimo dia de cultura, e o sobrenadante coletado para dosagens de citocinas IL-12p70 e IL-10.

Para os experimentos de linfoproliferação alogênica, os linfócitos foram descongelados no sétimo dia de cultura. Marcados com CFSE 5 mM, de acordo com as instruções do fabricante (*Cell Proliferation Kit* - Invitrogen/molecular probes), e colocados em co-cultura com as células dendríticas imaturas ou com as células dendríticas maduras, estimuladas com *C. albicans*, na proporção de 1 DCs:10 linfócitos, em placas de 96 poços, completando um volume total de 250 μ l de RPMI 1640, contendo 10% de SFB. Utilizou-se um grupo de linfócitos sem a presença de DCs, como parâmetro de comparação.

Após cinco dias, houve a análise da proliferação dos linfócitos, por citometria de fluxo. Para tanto, as células receberam marcação com anticorpos monoclonais anti-CD3 (Becton Dickinson, Mountain View, CA), durante 30 minutos, a 4 °C, foram lavadas 2 vezes com 500 µL de PBS (900 x g por 5 minutos a 25 °C), e ressuspensas em PBS, contendo 0,5% de paraformaldeído. Para análise das amostras, utilizou-se o citômetro de fluxo Attune Nxt Flow Cytometer (Thermo-Fisher).

3.7 Quantificação das citocinas, IL-4 e IL-5 em co-cultura de DCs com linfócitos

A produção de citocinas IL-4 e IL-5 foi avaliada a partir do sobrenadante das co-culturas das iDCs (pré-ativadas com IFN- γ e pulsadas com *C. albicans*), com os linfócitos autólogos, por 5 dias. Para tanto, utilizou-se os kits de ELISA específicos para cada citocina, conforme instruções do fabricante (Becton Dickinson).

3.8 Análises estatísticas

Os pacientes foram comparados com os controles empregando-se o teste de Mann-Whitney. Para comparar o efeito dos estímulos dentro do grupo controle e do grupo de pacientes empregou-se Wilcoxon teste. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Foi utilizado o *software* GRAPHPAD PRISM 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Fenotipagem das DCs

A caracterização das iDCs foi realizada no quinto dia de cultura. A foto da figura 03 abaixo é representativa das iDCs diferenciadas a partir de monócitos. Após diferenciação, as células passam a apresentar morfologia característica de células dendríticas imaturas, que foram utilizadas neste estudo.

Figura 3 – Morfologia das células dendríticas imaturas (iDCs)

Morfologia das células dendríticas imaturas de controle saudável (Figura 3A) e paciente X-HIGM (Figura 3B), obtidas após diferenciação das células periféricas mononucleares por 5 dias em cultura GM-CSF (50 ng/mL) e IL-4 (50 ng/mL).

Após diferenciação, as células foram fenotipadas quanto à expressão das moléculas de superfície CD14, HLA-DR, CD80 e CD86. Células que apresentam o fenótipo CD14-HLA-DR⁺ são conceitualmente consideradas DCs (83). Após marcação com anticorpos, analisou-se as amostras por citometria de fluxo. A análise da expressão dos marcadores se deu a partir de *gate* selecionado em gráfico de pontos, expressando os parâmetros tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 4A). A partir da população selecionada, os parâmetros FSC-A/FSC-H foram aplicados, de maneira a eliminar os *doublets* (células que passam unidas através do laser e são reconhecidas como um único evento), e se obteve 86% de células únicas (*single cells*) (Figura 4B). A partir dessa população, a expressão das moléculas CD14 e HLA-DR foi analisada, na qual células expressando o fenótipo CD14-HLA-DR⁺, característico de iDCs diferenciadas a partir de monócitos, representadas no quadrante Q3, atingiram uma porcentagem de 75% de células diferenciadas (Figura 4C). Para confirmar a população de iDCs diferenciadas, foram utilizados os

marcadores HLA-DR (Figura 4D) e CD11c (integrina ligante do complemento), (Figura 4E).

Figura 4 – Representação da estratégia de *gates* utilizada na análise das células dendríticas

Os *Dot Plots* ilustram as células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos tratados por 5 dias com GM-CSF (50 ng/mL) e IL-4 (50 ng/mL). Com base nos parâmetros: tamanho (SSC), granulosidade (FSC) (Figura 4A) e exclusão de *doublets* (Figura 4B), é selecionada a população de monócitos diferenciados (CD14⁻ HLA-DR⁺) (Figura 4C). População HLA-DR⁺ (Figura 4D) e CD11c⁺ (Figura 4E) estão representadas nos histogramas em cinza, respectivamente, e comparados com a população não marcada.

A avaliação das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 visou verificar qual seu padrão de expressão mediante o pré-tratamento das DCs dos controles saudáveis e dos pacientes X-HIGM com IFN- γ , quando comparado ao grupo de DCs não tratadas. Ao avaliarmos a intensidade mediana de fluorescência da molécula CD80 os controles saudáveis demonstraram uma maior expressão mediante o tratamento com IFN- γ quando comparada ao mesmo grupo sem tratamento. Os pacientes demonstraram uma expressão similar desta molécula quando foram tratadas com IFN- γ em comparação com o mesmo grupo sem o tratamento. (Figura 5B). Na avaliação da expressão da molécula CD86 foi observado uma tendência a maior expressão quando tratada com IFN- γ no grupo dos controles saudáveis e nos pacientes com X-HIGM.

Figura 5 – Expressão de moléculas coestimulatórias CD80 e CD86

Histogramas representativos da expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, nos grupos controle saudável e pacientes X-HIGM pré-tratados, ou não, com IFN- γ (Figura 5A). As DCs tratadas com IFN- γ dos pacientes quando comparadas aos controles não demonstraram diferença na expressão da molécula co-estimulatórias CD80 ($p < 0.05$, $n = 7$, Mann-Whitney). A molécula CD86 nos controles saudáveis após tratamento com IFN- γ mostrou-se aumentada. ($*p < 0.05$, $n = 6$, Wilcoxon) Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) dos indivíduos de controle, saudáveis e dos pacientes X-HIGM com (+) ou sem tratamento (-) com IFN- γ (Figura 5B). NM: células dendríticas imaturas não marcadas; SEM IFN: células dendríticas imaturas marcadas como espontâneas, não tratadas com IFN- γ ; COM IFN: células dendríticas imaturas, tratadas com IFN- γ (100 UI/mL) por 24 h.

4.2 Produção de espécies reativas de oxigênio

A ativação apropriada dos fagócitos e, particularmente, a produção de reativos do oxigênio são de grande importância para o controle de infecções fúngicas. A análise da produção de espécies reativas de oxigênio foi realizada em ensaio de quimioluminescência. Após a leitura das microplacas em luminômetro, a produção de ROS foi expressa em unidades relativas de luz (URL) e estas, posteriormente, representadas por gráficos, expressando a área sob a curva. Na Figura 6, temos a

produção de ROS sob diversas situações e condições do experimento. Ao tratarmos os controles e os pacientes somente com IFN- γ , não foi observada alteração significativa. Quando comparados aos grupos não estimulados, mas de uma maneira geral o tratamento com IFN- γ surtiu um efeito discreto. Ao compararmos os grupos controle saudável e pacientes tratados com IFN- γ pode-se observar aumento na produção de ROS mediante o estímulo com PMA e *C. albicans*.

Figura 6 – Produção de ROS pelos controles saudáveis e os pacientes X-HIGM

Ensaio de quimioluminescência realizado no sexto dia de diferenciação das DCs, tratadas ou não com IFN- γ (100 UI/mL), por 24 h, e estimuladas, ou não, com PMA (50 nM) ou *C. albicans* (MOI 1:2). As Dcs pré tratadas com IFN- γ dos controles saudáveis e dos pacientes quando pulsadas com *C. albicans* aumentaram a produção de ROS. N/E: DCs não estimuladas; PMA: DCs estimuladas com PMA; CA: DCs estimuladas com *C. albicans*; IFN: DCs tratadas com interferon-gamma; IFN+PMA: DCs tratadas com interferon-gamma e, posteriormente, estimuladas com PMA; IFN+C. *albicans*: DCs tratadas com interferon-gamma e, posteriormente, pulsadas com *C. albicans*; Pct: paciente; (*p<0.05, n=5, Wilcoxon/ Mann-Whitney)

4.3 Produção de citocinas

Foram dosadas as citocinas IL-10 e IL-12p70, após tratamento com IFN- γ (100 UI/mL) e pulso com *C. albicans* (MOI 1:2), por 24h, respectivamente, e no sétimo dia da cultura, foram coletados os sobrenadantes e dosadas as citocinas.

Figura 7 – Produção das citocinas IL-10 e IL-12p70

Produção das citocinas IL-10 e IL-12p70 pelas DCs dos controles saudáveis e dos pacientes X-HIGM, dosadas no sétimo dia de cultura, após tratamento prévio com IFN- γ (100 UI/mL), por 24 h, ou pulsadas com *C. albicans* (MOI 1:2) por 24 h. Foi observado aumento na produção das citocinas após o tratamento com IFN- γ tanto nos controles saudáveis como pacientes. N/E: DCs não estimuladas; IFN: DCs tratadas com interferon-gama; *C. albicans*: DCs pulsadas com *C. albicans*; IFN+C. *albicans*: DCs tratadas com interferon-gama e, posteriormente, pulsadas com *C. albicans*; Pct: paciente (*p<0.05, n=5, Wilcoxon/ Mann-Whitney).

Ambas citocinas foram detectadas mediante ao estímulo com *C.albicans* e ao serem pré-tratadas com IFN- γ e estimuladas com *C. albicans* tanto nos grupos controles saudáveis quanto nos pacientes. A *C. albicans* foi capaz de induzir a produção das citocinas em ambos os grupos, diferentemente dos grupos somente tratados com IFN- γ , quando comparados com os grupos NE. A IL-10 tanto nos grupo controle como nos pacientes apresentou o mesmo perfil de produção em ambos os grupos estudados. Não foi vista alteração estatística em relação à produção de IL-10 e houve aumento de produção de IL-12 tratado apenas com CA, só IFN- γ não faz diferença, esse aumento é reforçado com a adição de IFN- γ à CA.

A dosagem da citocina IL-12p70 também foi feita nos pacientes com X-HIGM e nos controles saudáveis. Quando comparamos os dois grupos que foram pulsados com *C. albicans* com o grupo NE houve produção de IL12p70 maior nos pacientes e com significância estatística. Notou-se que, quando comparados os dois grupos: pulsados com *C. albicans*, e pré-tratados com IFN- γ e pulsados com *C. albicans*, houve um aumento na produção de IL-12p70 em ambos os grupos, mantendo-se o perfil de uma maior produção nos pacientes. O Tratamento com IFN- γ na presença do fungo induziu a produção de IL12p70 em maior quantidade tanto nos controles saudáveis como nos pacientes.

Foram realizadas as dosagens das citocinas IL-4 e IL-5 também pelo kit ELISA, conforme instruções do fabricante (Becton Dickinson), quando as DCs foram colocadas em co-cultura com os linfócitos autólogos dos pacientes X-HIGM e dos controles saudáveis, após o tratamento com IFN- γ (100 UI/mL) e pulso com *C. albicans* (MOI 1:2). A dosagem da produção das citocinas foi realizada após cinco dias de co-cultura das DCs, com os linfócitos autólogos, e os resultados encontrados estavam abaixo do nível de detecção do ensaio(dados não mostrados).

4.4 Avaliação da capacidade de estímulo linfoproliferativa das DCs dos pacientes X-HIGM

As iDCs, pré-tratadas ou não, com IFN- γ (100 UI/mL), foram ativadas com *C. albicans* na proporção de 2 fungos para cada célula, por 24 h. Após o tempo de estímulo, as DCs foram incubadas em cultura com linfócitos previamente marcados com CFSE. Analisou-se, então, nas co-culturas, a capacidade das DCs estimuladas com *C. albicans* em induzir a proliferação dos linfócitos T autólogos. A população de linfócitos TCD3+ foi selecionada por citometria de fluxo, a partir de *gates* com os

parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 8A). Em seguida, pelos parâmetros de FSC-A/FSC-H (Figura 8B), obtivemos as *singles cells*, que representam a população de linfócitos TCD3+.

Figura 8 – Estratégia de *gates* para análise da linfoproliferação dos linfócitos TCD3+

Os *Dot Plots* ilustram a população de linfócitos TCD3+, que foi selecionada a partir dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 8A). Em (Figura 8B), temos os parâmetros (FSC-A/FSC-H) selecionados para eliminar os *doublers* e a análise seguiu dentro do *gate* de *single cells* (92%). Um marcador específico de linfócitos foi utilizado para selecionar a população TCD3+ e obter posterior análise da linfoproliferação.

A análise da proliferação dos linfócitos TCD3 depende de uma eficiente marcação desse tipo celular com CFSE, que irá se ligar ao DNA e emitir uma fluorescência. Conforme a linfoproliferação acontece, essa marcação perde sua intensidade, pois, com o número de divisão celular, há o decaimento da emissão da fluorescência. Portanto, quanto menor a intensidade média de fluorescência das células marcadas com CFSE, maior será a porcentagem de proliferação celular. Na Figura 9, está demonstrada a eficiência de marcação com CFSE, que é essencial para a análise correta do ensaio de linfoproliferação.

Figura 9 – Eficiência da marcação dos linfócitos TCD3+ com CFSE

Histograma representativo da população dos linfócitos (Ly) TCD3+ marcados com CFSE, não estimulados (Ly marcado), ou estimulados com fitohemaglutinina (Ly marcado+PHA). Histograma pontilhado representativo dos linfócitos não marcados (Ly não marcado).

Após cinco dias, a linfoproliferação dos linfócitos TCD3 dos pacientes X-HIGM foi analisada e comparada com as células dos indivíduos-controle. Nos histogramas da figura 10 podemos observar o comportamento proliferativo dos linfócitos autólogos quando comparamos ao grupo utilizado como controle positivo que foi estimulado com PHA e marcado com CFSE. Nas figuras 10A(2,3,4) e 10B(2,3,4) estão representados os histogramas do comportamento proliferativo dos linfócitos sob as diferentes condições do experimento dos controles saudáveis e dos pacientes respectivamente. Na figura 11 estão representados as porcentagens de proliferação dos linfócitos durante a cocultura com as DCs. Os pacientes demonstram uma proliferação basal aumentada quando comparada com controles saudáveis sob as mesmas condições, característica esta que vai se manter durante todo o experimento. Ao desafiarmos tanto os controles como os pacientes com *C. albicans*, a proliferação também é observada, sendo que os pacientes respondem melhor ao fungo. Os controles saudáveis e os pacientes desafiados com *C. albicans* após tratamento com o IFN- γ demonstram maior capacidade de proliferar quando comparamos aos grupos somente desafiados com *C. albicans*. Foi observada proliferação similar em ambos os grupos mediante o tratamento com IFN- γ quando comparamos ao grupo sem tratamento.

Figura 10 – Capacidade de indução da linfoproliferação pelas DCs e influência do pré-tratamento com IFN- γ

Histogramas representativos dos linfócitos TCD3+ dos controles saudáveis e dos pacientes X-HIGM, após co-cultura com DCs. População dos linfócitos sem estímulo não marcados (picos em cinza) e marcados com CFSE (picos pontilhados) (Figuras 10A1 e 10B1). Os linfócitos proliferaram após o pré-tratamento com IFN- γ nos grupos controles e no paciente. Intensidade de fluorescência dos linfócitos, após co-cultura com DCs pré-tratadas com IFN- γ (100 UI/mL), por 24 h (Figuras 10A2 e 10B2), ou DCs pulsadas com *C. albicans* (MOI 1:2), por 24 h (Figuras 10A3 e 10B3). Comparação da proliferação dos linfócitos, após co-cultura com DCs, pré-tratadas ou não, e posteriormente pulsadas com *C. albicans* (Figuras 10A3 e 10B3). Sem estímulo: DCs não estimuladas; IFN: DCs tratadas com interferon-gamma; *C. albicans*: DCs pulsadas com *C. albicans*; IFN+ *C. albicans*: DCs tratadas com interferon-gamma e, posteriormente, pulsadas com *C. albicans*.

Figura 11 – Proliferação dos linfócitos T dos controles saudáveis e pacientes X-HIGM

Porcentagem de proliferação dos linfócitos TCD3+, dos controles saudáveis e dos pacientes X-HIGM, após co-cultura com DCs. Foi observado uma maior porcentagem de proliferação dos linfócitos após o pré-tratamento das DCs com IFN- γ e pulsadas com *C. albicans* nos grupos controles e no paciente. Linfócitos estimulados com fitohemaglutinina, utilizados como controle positivo do experimento. Representados no eixo X, as diferentes condições de tratamento aplicadas sobre as DCs, antes da co-cultura com os linfócitos. N/E: DCs não estimuladas; IFN: DCs tratadas com interferon-gamma; *C. albicans*: DCs pulsadas com *C. albicans*; IFN+ *C. albicans*: DCs tratadas com interferon-gamma e, posteriormente, pulsadas com *C. albicans*; PHA: linfócitos estimulados com Fitohemaglutinina. (* $p < 0.05$, $n = 5$, Wilcoxon/ Mann-Whitney).

5 DISCUSSÃO

Muito do que se sabe atualmente sobre o papel da interação CD40L-CD40 é devido aos achados clínicos, laboratoriais e imunopatológicos obtidos a partir de estudos com os pacientes deficientes de CD40L. Os pacientes ao serem submetidos a diversos tipos de tratamento, como a administração de imunoglobulina intravenosa ou subcutânea, associada ou não a antibióticos, nota-se a eficácia do tratamento pela redução drástica dos episódios de infecções bacterianas e virais. Contudo, os pacientes com síndrome de hiper-IgM ligado ao X causada por mutações no gene que codifica para CD40L (CD40LG), persistem apresentando um amplo espectro de infecções oportunistas causadas por bactérias intracelulares e fungos (20, 73, 84). Jain e colaboradores (85) deram os primeiros passos para explicar os mecanismos imunopatológicos responsáveis pela suscetibilidade às infecções fúngicas apresentadas pelos pacientes deficientes de CD40L. As DCs, por serem excelentes apresentadoras de antígenos, poderiam ser manipuladas na tentativa de modular a resposta celular adaptativa frente peptídeos antígeno-específicos. Muitos fatores influenciam a capacidade das DCs em polarizar a resposta de célula T para um padrão Th1 ou Th2. Dentre estes se destacam o subtipo de DC, a natureza do estímulo para sua maturação e o microambiente no qual a célula é estimulada (86).

As DCs foram obtidas através da diferenciação de monócitos dos pacientes com X-HIGM e de indivíduos saudáveis. Após um período de cinco dias, obteve-se uma população de DCs imaturas, confirmadas pela fenotipagem das moléculas HLA-DR+ e CD11c+, características de DCs mielóides. A expressão similar das moléculas em pacientes e indivíduos saudáveis indicam que a capacidade de diferenciação de monócitos em DCs não é afetada na deficiência do CD40L. Esta observação é importante, pois ao tratarmos as DCs com o IFN- γ , este deve comportar-se de modo que não ative as DCs imaturas pois mediante ao tratamento objetiva-se avaliar a produção das espécies reativas de oxigênio, citocinas e capacidade destas DCs de indução da proliferação dos linfócitos. Resultados semelhantes foram obtidos de células de pacientes com coccidioidomicose disseminada (87).

A maturação das DCs é representada pelo aumento da expressão de moléculas de MHC-II e de moléculas coestimulatórias como CD80 e CD86 em sua superfície, bem como pela produção de diversas citocinas, contribuindo dessa forma

para a ativação dos linfócitos T (58). A expressão de CD86 é fundamental para a maturação da DC e posteriormente apresentação de antígenos para linfócitos T no sítio da infecção (88). Ao analisarmos a expressão da molécula CD86, tanto dos grupos controles saudáveis como dos pacientes, observamos aumento na expressão mediante o tratamento com o IFN- γ , embora diferenças estatísticas tenham sido observadas somente no grupo dos controles. Como os pacientes X-HIGM apresentam deficiência na interação durante a apresentação antigênica, o aumento observado na expressão da molécula CD86 contribui para a melhor apresentação de peptídeos aos linfócitos. A expressão da molécula CD80 mostrou-se similar entre os indivíduos controle e pacientes, sendo que o tratamento com IFN- γ não alterou a expressão desta molécula.

Durante a apresentação antigênica a produção de ROS age como um segundo mensageiro na ativação do linfócito. As DCs dos pacientes foram capazes de reagir mais aos estímulos PMA do que a *C. albicans*, quando comparamos controles saudáveis e pacientes. Nossos dados demonstram também uma pequena ativação das DCs dos pacientes quando estimulados com *C. albicans* quando comparados com o grupo sem estímulo. Diferenças estatísticas foram observadas quando comparamos os grupos controles estimulados com *C. albicans* com grupo pré-tratados com IFN- γ e posteriormente pulsadas com *C. albicans*. Foi observado o mesmo perfil nos pacientes e nos indivíduos sadios sugerindo que o pré-tratamento com IFN- γ indica que este demonstra um papel potencializador da resposta celular pois uma eficiente produção de ROS nos remete a uma ação microbicida e consequentemente um processamento antigênico eficaz.

Na análise da capacidade efectora das DCs através da dosagem de citocinas em sobrenadantes da cultura, após tratamento com IFN- γ não foi detectado produção de IL-10 nos grupos controle saudável e nos pacientes X-HIGM. O estímulo antigênico pela *C. albicans* foi capaz de induzir produção desta citocina em ambos os grupos, bem como quando foram pré-tratados com IFN- γ , embora não foi observado nenhuma melhora significativa na produção. Aparentemente, o efeito modulatório caracterizado por apresentar-se antiinflamatório da IL-10, tem início durante a doença, controlando o número de células que sofrem apoptose (89), podendo persistir mesmo após a cura clínica, em função de um equilíbrio estabelecido entre esta citocina e as citocinas próinflamatórias.

Um dos principais mecanismos indutores da secreção de IL-12 pelas DCs é a interação entre DCs e linfócitos T via CD40-CD40L (90, 91). A IL-12 tem papel crucial na polarização para resposta Th1, favorável na resposta a infecções por *C. albicans*, sendo responsável pela indução da produção de IFN- γ por células T (92). Nossos resultados demonstram que, o tratamento com IFN- γ não foi capaz de induzir a secreção de IL12 em ambos os grupos quando comparamos com o grupo sem estímulo. A produção de IL-12p70 tanto nos controles como nos pacientes mostraram-se aumentadas quando foram tratadas com IFN- γ e obtivemos diferença estatística em ambos os grupos quando pulsados com *C. albicans* e após tratamento com IFN- γ tanto quando comparados com o grupo sem estímulo como também entre os pacientes e os controles saudáveis. Como a IL-12 esta comprometida com a polarização dos linfócitos T naive para o subtipo Th1 que é responsável pela resposta antifúngica, nossos dados sugerem que o IFN- γ pode aumentar a proteção dos pacientes X-HIGM frente estas infecções oportunistas.

Uma eficiente interação entre células dendríticas e linfócitos traduz-se por uma indução da proliferação dos linfócitos T naive, além do reconhecimento do antígeno (peptídeo) + MHC II, os linfócitos T necessitam que as DCs apresentem moléculas co-estimulatórias para iniciar sua ativação e produção das citocinas para polarização da resposta que será mais eficiente na eliminação do antígeno. As interações entre DCs e a *C. albicans* podem facilitar a indução da imunidade mediada por células (93).

Os ensaios de linfoproliferação foram realizados em co-cultura dos linfócitos autólogos com as DCs pré-tratadas, ou não, com IFN- γ dos pacientes X-HIGM e dos controles sadios. A eficácia na marcação dos linfócitos TCD3+ com CFSE permitiu a avaliação da capacidade dessas células proliferarem, após serem pulsadas com *C. albicans*. A proliferação basal dos linfócitos T CD3+ (sem a presença de DCs) dos pacientes e dos indivíduos-controle, demonstrou uma pré-estimulação dos pacientes em relação aos controles. Este comportamento das DCs dos pacientes demonstra uma resposta exacerbada em relação ao grupo controle. Apesar de não ser relatado infecção em curso por um agente fúngico, estes pacientes demonstram uma interessante capacidade de responder mais rapidamente ao estímulo por *C. albicans*. Diferenças estatísticas foram observadas quando os grupos controle e pacientes foram estimulados com *C. albicans* após tratamento com IFN- γ quando comparados com o mesmo grupo somente pulsados com *C. albicans*.

Dois grupos diferentes de células T CD4⁺ foram descritos (Th1 e Th2), sendo que eles têm funções antagonistas: as células Th1 ativam os fagócitos para um estado fungicida; enquanto as produzidas por células Th2 exacerbam a doença, por desativarem propriedades protetoras das células fagocíticas contra os fungos (21).

Estudos recentes sugerem que é necessário um balanço entre as citocinas produzidas pelas respostas Th1 e Th2 para desenvolver uma imunidade protetora contra fungos (93). Vários fatores contribuem para o balanço Th1-Th2, como: a dose do antígeno (altas ou baixas); a natureza e a quantidade das moléculas coestimulatórias (CD80/CD86); o tipo; o estado de maturação e a quantidade de células dendríticas, que atingem os gânglios linfáticos; a natureza da interação e a duração da ligação MHC-TCR, podendo ser de alta ou baixa afinidade; e, ainda, a produção de citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-10) (94-96).

Os níveis locais de citocinas são derivados de células T, assim, a resistência à candidíase requer a ação coordenada da defesa imune inata com a adaptativa (97). Conforme o exposto, mecanismos da resposta imune inata e adquirida formam um sistema integrado de defesa do hospedeiro, no qual numerosas células e moléculas funcionam coletivamente. A resposta imune inata é de suma importância na resolução da doença, além de influenciar o tipo de resposta específica, que se desenvolverá subsequentemente. Nos ensaios de linfoproliferação, observamos que a interação DC-linfócitos após o pré-tratamento com IFN- γ , os linfócitos proliferam apresentando uma tendência a polarizar para subclasse Th1, resultado conforme esperado pela influência da produção de IL-12 mostrada pelos nossos dados.

A falha de produzir IFN- γ foi relatada em pacientes com deficiência de CD40L além disso, esta citocina afeta o desenvolvimento de células progenitoras para gerar fagócitos maduros capazes de eliminar patógenos oportunistas (2, 77). Estudos recentes em macrófagos de pacientes deficientes de CD40L, demonstraram que o IFN- γ teve a capacidade de aumentar os níveis de expressão de receptores de reconhecimento de padrões, tais como os receptores Toll-like 1 e 2, dectina1, como também da molécula de adesão intercelular específica de células dendríticas (98). Em nossos resultados o IFN- γ demonstrou capacidade em potencializar a resposta das células dendríticas tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com X-HIGM. Este comportamento celular nos faz pensar que o IFN- γ demonstra ação positiva sobre as células da imunologia inata como os macrófagos e células dendríticas. Os resultados obtidos podem fundamentar possíveis ensaios clínicos

futuros que visem o desenvolvimento de novas opções terapêuticas no tratamento de pacientes acometidos por infecções oportunistas.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo nos permitiu concluir:

- O grupo de pacientes Deficientes de CD40L apresentaram as células dendríticas pré-estimuladas quando comparadas as DCs dos indivíduos saudáveis.
- O IFN- γ mostrou potencial em melhorar as respostas das DCs frente a *C. albicans* tanto nos indivíduos saudáveis como nos pacientes deficiente de CD40L, em relação a expressão da molécula coestimulatória CD86, no burst oxidativo, na produção de IL-12 e na indução da linfoproliferação,

REFERÊNCIAS*1

1. ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2004.
2. CABRAL-MARQUES, O., et al. Dendritic cells from X-linked hyper-IgM patients present impaired responses to *Candida albicans* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Allergy Clin Immunol**, v. 129, n. 3, p. 778-86, 2012.
3. ROSEN, F. S., et al. Recurrent bacterial infections and dysgamma-globulinemia: deficiency of 7S gamma-globulins in the presence of elevated 19S gamma-globulins. Report of two cases. **Pediatrics**, v. 28, n., p. 182-95, 1961.
4. BURTIN, P. [An example of atypical agammaglobulinemia (a case of severe hypogammaglobulinemia with increase of the beta-2 macroglobulin)]. **Rev Fr Etud Clin Biol**, v. 6, n., p. 286-9, 1961.
5. DURANDY, A., et al. Immunoglobulin replacement therapy in primary antibody deficiency diseases--maximizing success. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 136, n. 3, p. 217-29, 2005.
6. KRANTMAN, H. J., et al. Abnormal B cell differentiation and variable increased T cell suppression in immunodeficiency with hyper-IgM. **Clin Exp Immunol**, v. 40, n. 1, p. 147-56, 1980.
7. NOTARANGELO, L. D., et al. Analysis of X-chromosome inactivation in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1): evidence for involvement of different hematopoietic cell lineages. **Hum Genet**, v. 88, n. 2, p. 130-4, 1991.
8. CABRAL-MARQUES, O., et al. Expanding the clinical and genetic spectrum of human CD40L deficiency: the occurrence of paracoccidioidomycosis and other unusual infections in Brazilian patients. **J Clin Immunol**, v. 32, n. 2, p. 212-20, 2012.
9. NOTARANGELO, L. D., et al. Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). **Immunodefic Rev**, v. 3, n. 2, p. 101-21, 1992.
10. HAYWARD, A. R., et al. Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. **J Immunol**, v. 158, n. 2, p. 977-83, 1997.
11. ALLEN, R. C., et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. **Science**, v. 259, n. 5097, p. 990-3, 1993.
12. KORTHAUER, U., et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. **Nature**, v. 361, n. 6412, p. 539-41, 1993.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

13. WINKELSTEIN, J. A., et al. The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients. **Medicine**, v. 82, n. 6, p. 373-84, 2003.
14. CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Key aspects for successful immunoglobulin therapy of primary immunodeficiencies. **Clin Exp Immunol**, v. 164 Suppl 2, n., p. 16-9, 2011.
15. IMAI, K., et al. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. **Nat Immunol**, v. 4, n. 10, p. 1023-8, 2003.
16. REVY, P., et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). **Cell**, v. 102, n. 5, p. 565-75, 2000.
17. JO, E. K., et al. X-linked hyper-IgM syndrome associated with *Cryptosporidium parvum* and *Cryptococcus neoformans* infections: the first case with molecular diagnosis in Korea. **Journal of Korean medical science**, v. 17, n. 1, p. 116-20, 2002.
18. HOSTOFFER, R. W., et al. Disseminated *Histoplasma capsulatum* in a patient with hyper IgM immunodeficiency. **Pediatrics**, v. 94, n. 2 Pt 1, p. 234-6, 1994.
19. MAVROUDI, I., et al. The role of CD40/CD40 ligand interactions in bone marrow granulopoiesis. **ScientificWorldJournal**, v. 11, n., p. 2011-9, 2011.
20. CABRAL-MARQUES, O., et al. Expanding the clinical and genetic spectrum of human CD40L deficiency: the occurrence of paracoccidioidomycosis and other unusual infections in Brazilian patients. **J Clin Immunol**, v. 32, n. 2, p. 212-20, 2012.
21. ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 4, p. 275-88, 2011.
22. FULEIHAN, R. L. The X-linked hyperimmunoglobulin M syndrome. **Semin Hematol**, v. 35, n. 4, p. 321-31, 1998.
23. CONLEY, M. E., et al. Hyper IgM syndrome associated with defective CD40-mediated B cell activation. **J Clin Invest**, v. 94, n. 4, p. 1404-9, 1994.
24. DURANDY, A., et al. Abnormal CD40-mediated activation pathway in B lymphocytes from patients with hyper-IgM syndrome and normal CD40 ligand expression. **J Immunol**, v. 158, n. 6, p. 2576-84, 1997.
25. DAVIES, E. G., et al. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. **British journal of haematology**, v. 149, n. 2, p. 167-80, 2010.
26. MURAMATSU, T. Protein-bound carbohydrates on cell-surface as targets of recognition: an odyssey in understanding them. **Glycoconj J**, v. 17, n. 7-9, p. 577-95, 2000.

27. MINEGISHI, Y., et al. Mutations in activation-induced cytidine deaminase in patients with hyper IgM syndrome. **Clin Immunol**, v. 97, n. 3, p. 203-10, 2000.
28. PERON, S., et al. Human PMS2 deficiency is associated with impaired immunoglobulin class switch recombination. **J Exp Med**, v. 205, n. 11, p. 2465-72, 2008.
29. NOORDZIJ, J. G., et al. Ataxia-telangiectasia patients presenting with hyper-IgM syndrome. **Arch Dis Child**, v. 94, n. 6, p. 448-9, 2009.
30. PIATOSA, B., et al. The defect in humoral immunity in patients with Nijmegen breakage syndrome is explained by defects in peripheral B lymphocyte maturation. **Cytometry A**, v. 81, n. 10, p. 835-42, 2012.
31. FERRARI, S., et al. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 22, p. 12614-9, 2001.
32. VOGEL, L. A., et al. CD40 and its crucial role as a member of the TNFR family. **Semin Immunol**, v. 10, n. 6, p. 435-42, 1998.
33. SALMEN, S., et al. CD40/CD40L expression in leukocytes from chronic granulomatous disease patients. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 939-47, 2007.
34. ARUFFO, A., et al. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. **Cell**, v. 72, n. 2, p. 291-300, 1993.
35. DISANTO, J. P., et al. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. **Nature**, v. 361, n. 6412, p. 541-3, 1993.
36. FULEIHAN, R., et al. Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 6, p. 2170-3, 1993.
37. RAMESH, N., et al. Deletions in the ligand for CD40 in X-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM (HIGMX-1). **International immunology**, v. 5, n. 7, p. 769-73, 1993.
38. VILLA, A., et al. Organization of the human CD40L gene: implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 6, p. 2110-4, 1994.
39. GRAF, D., et al. Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 12, p. 3191-4, 1992.
40. FULEIHAN, R., et al. Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. **J Clin Invest**, v. 93, n. 3, p. 1315-20, 1994.

41. LUTTGES, P. D., et al. [Hyper-IgM syndrome in members of two unrelated Chilean families: molecular and mutation analysis]. **Rev Med Chil**, v. 132, n. 10, p. 1179-88, 2004.
42. GRAF, D., et al. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 6, p. 1749-54, 1995.
43. VANICHAKARN, P., et al. Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation. **Thromb Res**, v. 122, n. 3, p. 346-58, 2008.
44. TSAI, H. Y., et al. X-linked hyper-IgM syndrome with CD40LG mutation: two case reports and literature review in Taiwanese patients. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 48, n. 1, p. 113-8, 2015.
45. NOTARANGELO, L. D., et al. CD40lbase: a database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper-IgM syndrome. **Immunol Today**, v. 17, n. 11, p. 511-6, 1996.
46. VAN HOEYVELD, E., et al. Hyper-immunoglobulin M syndrome caused by a mutation in the promotor for CD40L. **Immunology**, v. 120, n. 4, p. 497-501, 2007.
47. LEE, W. I., et al. Molecular analysis of a large cohort of patients with the hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome. **Blood**, v. 105, n. 5, p. 1881-90, 2005.
48. CALLARD, R. E., et al. CD40 ligand (CD40L) expression and B cell function in agammaglobulinemia with normal or elevated levels of IgM (HIM). Comparison of X-linked, autosomal recessive, and non-X-linked forms of the disease, and obligate carriers. **J Immunol**, v. 153, n. 7, p. 3295-306, 1994.
49. DE SAINT BASILE, G., et al. CD40 ligand expression deficiency in a female carrier of the X-linked hyper-IgM syndrome as a result of X chromosome lyonization. **Eur J Immunol**, v. 29, n. 1, p. 367-73, 1999.
50. PICARD, C., et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. **J Clin Immunol**, v. 35, n. 8, p. 696-726, 2015.
51. STEINMAN, R. M., et al. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. **J Exp Med**, v. 139, n. 2, p. 380-97, 1974.
52. TAN, J. K., et al. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 2, p. 319-24, 2005.
53. BANCHEREAU, J., et al. Dendritic cells as vectors for therapy. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 271-4, 2001.
54. BANCHEREAU, J., et al. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-52, 1998.

55. BOZZA, S., et al. Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. **Vaccine**, v. 22, n. 7, p. 857-64, 2004.
56. VISINTIN, A., et al. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. **J Immunol**, v. 166, n. 1, p. 249-55, 2001.
57. ARINA, A., et al. Clinical implications of antigen transfer mechanisms from malignant to dendritic cells. exploiting cross-priming. **Experimental hematology**, v. 30, n. 12, p. 1355-64, 2002.
58. BANCHEREAU, J., et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 18, n., p. 767-811, 2000.
59. QAMAR, N., et al. The hyper IgM syndromes. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 46, n. 2, p. 120-30, 2014.
60. CUNNINGHAM-RUNDLES, C., et al. Molecular defects in T- and B-cell primary immunodeficiency diseases. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 11, p. 880-92, 2005.
61. KIENER, P. A., et al. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. **J Immunol**, v. 155, n. 10, p. 4917-25, 1995.
62. CELLA, M., et al. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 747-52, 1996.
63. KERKMANN, M., et al. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. **J Immunol**, v. 170, n. 9, p. 4465-74, 2003.
64. SENDER, L. Y., et al. CD40 ligand-triggered human dendritic cells mount interleukin-23 responses that are further enhanced by danger signals. **Mol Immunol**, v. 47, n. 6, p. 1255-61, 2010.
65. YANAGAWA, Y., et al. Distinct regulation of CD40-mediated interleukin-6 and interleukin-12 productions via mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB-inducing kinase in mature dendritic cells. **Immunology**, v. 117, n. 4, p. 526-35, 2006.
66. DONI, A., et al. Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 4, p. 797-802, 2006.
67. GARLANDA, C., et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 182-6, 2002.
68. XIA, Y., et al. Distinct effect of CD40 and TNF-signaling on the chemokine/chemokine receptor expression and function of the human monocyte-derived dendritic cells. **Cell Mol Immunol**, v. 5, n. 2, p. 121-31, 2008.

69. TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. **Immunol Today**, v. 14, n. 7, p. 335-8, 1993.
70. RISSOAN, M. C., et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. **Science**, v. 283, n. 5405, p. 1183-6, 1999.
71. ROMANI, L. The T cell response against fungal infections. **Curr Opin Immunol**, v. 9, n. 4, p. 484-90, 1997.
72. MELLMAN, I., et al. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 255-8, 2001.
73. LEVY, J., et al. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. **J Pediatr**, v. 131, n. 1 Pt 1, p. 47-54, 1997.
74. CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Key aspects for an adequate immunoglobulin therapy of primary immunodeficiencies. **Clin Exp Immunol**, v. 164 Suppl 2, n., p. 1, 2011.
75. CABRAL-MARQUES, O., et al. First report of the Hyper-IgM syndrome Registry of the Latin American Society for Immunodeficiencies: novel mutations, unique infections, and outcomes. **J Clin Immunol**, v. 34, n. 2, p. 146-56, 2014.
76. LEIVA, L. E., et al. Primary immunodeficiency diseases in Latin America: the second report of the LAGID registry. **J Clin Immunol**, v. 27, n. 1, p. 101-8, 2007.
77. EZEKOWITZ, R. A., et al. Restoration of phagocyte function by interferon-gamma in X-linked chronic granulomatous disease occurs at the level of a progenitor cell. **Blood**, v. 76, n. 12, p. 2443-8, 1990.
78. SCHRODER, K., et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 2, p. 163-89, 2004.
79. MILLER, C. H., et al. Clinical Use of Interferon-gamma. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1182, n., p. 69-79, 2009.
80. ARMSTRONG-JAMES, D., et al. Renal allograft recipients fail to increase interferon-gamma during invasive fungal diseases. **Am J Transplant**, v. 12, n. 12, p. 3437-40, 2012.
81. BARBUTO, J. A., et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunol Immunother**, v. 53, n. 12, p. 1111-8, 2004.
82. HATANAKA, E., et al. Systematic study on ROS production induced by oleic, linoleic, and gamma-linolenic acids in human and rat neutrophils. **Free radical biology & medicine**, v. 41, n. 7, p. 1124-32, 2006.
83. SEGURA, E., et al. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. **Trends in immunology**, v. 34, n. 9, p. 440-5, 2013.

84. CABRAL-MARQUES, O., et al. First Report of the Hyper-IgM Syndrome Registry of the Latin American Society for Immunodeficiencies: Novel Mutations, Unique Infections, and Outcomes
Journal of Clinical Immunology v. 34, n. 2, p. 146-56, 2014.
85. JAIN, A., et al. Defects of T-cell effector function and post-thymic maturation in X-linked hyper-IgM syndrome. **J Clin Invest**, v. 103, n. 8, p. 1151-8, 1999.
86. SHORTMAN, K., et al. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 3, p. 151-61, 2002.
87. RICHARDS, J. O., et al. Reversal of coccidioidal anergy in vitro by dendritic cells from patients with disseminated coccidioidomycosis. **J Immunol**, v. 169, n. 4, p. 2020-5, 2002.
88. JANEWAY, C. A., JR., et al. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, n., p. 197-216, 2002.
89. CACERE, C. R., et al. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. **Clin Immunol**, v. 105, n. 2, p. 215-22, 2002.
90. ABDI, K. IL-12: the role of p40 versus p75. **Scandinavian journal of immunology**, v. 56, n. 1, p. 1-11, 2002.
91. MACAGNO, A., et al. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. **Trends in immunology**, v. 28, n. 5, p. 227-33, 2007.
92. FUGIER-VIVIER, I., et al. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. **J Exp Med**, v. 186, n. 6, p. 813-23, 1997.
93. NEWMAN, S. L., et al. Candida albicans is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. **Infection and immunity**, v. 69, n. 11, p. 6813-22, 2001.
94. VIEIRA, P. L., et al. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. **J Immunol**, v. 164, n. 9, p. 4507-12, 2000.
95. RESCIGNO, M. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 9, p. 425-61, 2002.
96. BOONSTRA, A., et al. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. **J Exp Med**, v. 197, n. 1, p. 101-9, 2003.

97. GIL, M. L., et al. TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae. **Microbes Infect**, v. 8, n. 8, p. 2299-304, 2006.
98. CABRAL-MARQUES, O., et al. Human CD40 ligand deficiency dysregulates the macrophage transcriptome causing functional defects that are improved by exogenous IFN-gamma. **J Allergy Clin Immunol**, v., n., p., 2016.

ANEXOS

ANEXO A - FICHA CLÍNICA

Estudo de Pacientes com Suspeita de Imunodeficiência Primária
Laboratório de Imunologia Humana

Paciente encaminhado por:					
Nome		Data de Nascimento: ____/____/____	Sexo M () F ()	Idade - Diagnóstico Anos: ____ Meses : ____	
H.C.	Tel:				
Idade de início dos primeiros sintomas: ____					
Consanguinidade Sim () Não () Tipo _____		Nº. Gesta: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 NE*	Nº. filhos: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 NE*	Sadios: Sim () Não () Infec. repet. Sim () Não ()	
Antecedentes Familiares					Heredograma
Falecimentos precoces: Sim () Não () Parentesco _____ Idade de óbito _____			Dx IDP: Sim () Não () DGC: Sim () Não () Outra _____		
Vacinas	BCG Sim () Não () Não especificado ()	Idade de aplicação ____ meses	Reação adversa Sim () Não ()	Adenomegalias BCG disseminada Outra _____	
Hep B S () N () () NE*	DPT/dT S () N () () NE*	Tríplice S () N () () NE*	Hib S () N () () NE*	Varicela S () N () () NE*	VTV S () N () () NE*
Sabin S () N () () NE*	Salk S () N () () NE*	Sarampo S () N () () NE*	Meningite S () N () () NE*	Pneumonia S () N () () NE*	Poliomielite S () N () () NE*
Reação adversa? () sim () não		Especificar Vacina: _____		Manifestações: _____	
DNPM	BDNPM S () N () NE* ()		RDNPM S () N () NE* () Detalhar: _____		
DPE	>p90% S () N ()		<p10% S () N ()		>p10% e <p90% S () N ()
1ª Manifestação			Motivo de Estudo		
Idade ____ ano ____ meses		Local		Infecção Repetição: Sim () Não () Manifestação Grave: Sim () Não () História Familiar : Sim () Não () Outro: Sim () Não () Especificar: _____	

Manifestações	Nº. de episódios	Micro-organismo isolado Sim () Não () Nome: _____	Especificar: idade e data em cada manifestação e datas dos episódios da mesma infecção	Localização		
1. Otite						
2. Pneumonia						
3. Pneumonia/DP						
4. Amigdalite						
5. Linfonodo (HIPERPLASIA)						
6. ITU						
7. Meningite						
8. Artrite						
9. Osteomielite						
10. Diarreia						
11. Infecções de Pele. Especificar: _____						
12. Artrite						
13. Sepses						
14. Colangite esclerosante						
15. Neutropenia						
16. Hiperplasia						
17. Autoimunidade						
18. Outras						
Granulomas Sim () Não ()	Nº. de episódios	Localização 1 TGI 2 Cardíaco 3 Urinário 4 Outra: _____	Micro-organismo Isolado	Nº de Hospitalizações		
Exames Laboratoriais (Início da Investigação)						
HMG	Hb	Leuco	NT	LT	PLQ	
Linfócitos/mm³ (colocar em valores absolutos)		CD3	CD4	CD8	CD19	CD16/56
Data da dosagem: Na data da dosagem o paciente estava com alguma infecção? Qual?						
Dosagem de Imunoglobulinas (colocar os valores antes da primeira reposição de Gama)			IgG	IgM	IgA	IgE
Data da dosagem:						
Complemento	C3	C4	CH50			
Quimiotaxia			Mono		PMN	
Mono	Mig. Espontânea					
PMN	Mig estim. soro nl					
	Mig. estim. soro pcte.					

Superóxido	Mono	PMN	NBT	
Espontâneo			Repouso	Estimulado
Estimulado				
Tratamento 1 IFN γ 2 ITRA 3 FLUCO 4 SMX +TMP 5 Prednisona 6 TMO 7. Gama (data de início)	Administração Sim () Não (0) Data de início _____	Tratamento atual Sim () Não (0)	Óbito Sim () Não (0) Idade: _____	Causa 1 Conhecida 2 Desconhecida
			Autópsia Sim () Não ()	Laudo
Outras Manifestações – Livre Relato de Ocorrências				

* = não especificado

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (menores de 18 anos)

ESTUDO: “Efeito do IFN- γ *in vitro* sobre as Células Dendríticas de Pacientes Deficientes de CD40L”

Seu filho está sendo convidado a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos (ou estaremos) fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao(a) seu (sua) filho(a).

Eu, RG:....., abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a) nascido em/...../....., seja voluntário do estudo “Efeito do IFN- γ *in vitro* sobre as Células Dendríticas de Pacientes Deficientes de CD40L”. Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente de que:

- I) Investigaremos, por meio desse estudo, se o medicamento interferon gamma irá contribuir para diminuição do número de infecções de repetição por conta dos resultados do trabalho “Efeito do IFN- γ *in vitro* sobre as Células Dendríticas de Pacientes Deficientes de CD40L”;
- II) Serão feitas, no total, 3 coletas de sangue venoso (10 mL em tubo com anticoagulante) do (a) meu (minha) filho (a); com intervalo de 6 meses entre uma e outra coleta.
- III) A participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração para este estudo, no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho (a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médico a que ele (ela) estiver sendo submetido;
- VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho sejam mencionados;
- VII) Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;
- VIII) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP - pelo Fone: 3091.7733 (e-mail: cep@icb.usp.br) ou Christiane Guedes Lambert, Departamento de Imunologia, no Fone: (11) 3091-7435 (e-mail: ane.lambert@uol.com.br), para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- IX) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo a mim ou ao meu (minha) filho (a).
() Sim ou () Não
- X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XI) O pesquisador responsável deverá, da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XII) Resolução 196/96: Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

OBS: Assinalar abaixo com (x):

- () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Paulo, de de 20..

() Paciente / () Responsável

Testemunha 1:

Nome: _____

RG: _____ Telefone: _____

Testemunha 2:

Nome: _____

RG: _____ Telefone: _____

CHRISTIANE GUEDES LAMBERT
Mestranda
Responsável pelo Projeto

PROF. DR. ANTONIO CONDINO NETO
Orientador
Responsável pelo Projeto