LÍLIAN CRISTINA BUZZETTO

**ESTUDO MOLECULAR DA VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE
EM INDIVÍDUOS COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências

**SÃO PAULO
2012**

LÍLIAN CRISTINA BUZZETTO

**ESTUDO MOLECULAR DA VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE
EM INDIVÍDUOS COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação 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. Luiz Vicente Rizzo

Versão Original

**SÃO PAULO
2012**

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

© reprodução total

Buzzetto, Lilian Cristina.

Estudo molecular da via extrínseca da apoptose em indivíduos com
Imunodeficiência Comum Variável. / Lilian Cristina Buzzetto. -- São
Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de
concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunodeficiências
primárias

Versão do título para o inglês: Molecular study of extrinsic apoptosis
pathway in patients with Common Variable Immunodeficiency.

1. Apoptose 2. Imunologia Clínica 3. Imunologia Celular 4.
Linfócitos T 5. Linfócitos B 6. Imunofenotipagem I. Rizzo, Prof. Dr.
Luiz Vicente II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB053/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lilian Cristina Buzzetto.

Título da Dissertação: Estudo molecular da via extrínseca da apoptose em indivíduos com Imunodeficiência Comum Variável.

Orientador(a): Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: 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) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 27 de outubro de 2009.

PARECER 921 /CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 23.10.2009 **APROVOU** o projeto intitulado: "*Estudo molecular na via extrínseca de indução da apoptose em indivíduos com imunodeficiência comum e variável*", com atenção que há necessidade da aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP, sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO e a aluna LILIAN CRISTINA BUZZETTO.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em
23.10.2010

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO MARINHO ANDRADE ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

*Aos meus pais, por estarem ao meu lado
em cada passo, seja este um degrau
alçado ou um tropeço.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo, pela oportunidade, apoio e por ter possibilitado o desenvolvimento deste projeto de forma tão leve e prazerosa. Obrigada, chefe, por tornar esta jornada uma experiência agradável e por ter me dado a chance de me apaixonar pelo trabalho.

Ao Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante-Mendes, por todo apoio desde o início e por ter contribuído com tantas idéias desde a concepção até a finalização deste trabalho.

À Julieta Genre, por ter me acolhido tão bem no grupo e por ter segurado minha mão nos primeiros passos. E por, mesmo de longe, ter continuado a me ajudar sempre que precisei.

A Dra. Cristina Kokron pela seleção dos pacientes, pelas amostras e especialmente por ter sido sempre tão solícita, interessada e atenciosa.

Ao Serafim e a toda a equipe do Hospital das Clínicas.

Em especial, à Dra. Eliana Blini Marengo, por todas às conversas, conselhos, correções e cafés. Por ter sido um pouco colega de trabalho, um pouco mãe e muito amiga. Sem você tenho certeza que a jornada teria sido muito mais difícil.

Ao Dr. Luiz Roberto Sardinha, por muito mais do que o apoio acadêmico e técnico, não tenho palavras para agradecer o tempo dedicado ao meu projeto e por tantos conselhos e citações que guardo minha mente num cantinho reservado para “as sábias palavras de Luiz”.

À Dra. Anna Coló, não apenas por toda a ajuda nos experimentos, mas acima de tudo por ter sido uma das melhores pessoas com a qual já tive o prazer de trabalhar. Por sua competência, dedicação, bom humor; por cada conversa científica; por ter se tornado, mais do que uma colega, uma amiga.

Ao Pedro Papotto, por cada conversa, conselho, sugestão, bronca, inspiração compartilhada, idéia discutida. Pela amizade e pelo companherismo.

A todas as demais pessoas de nosso grupo de pesquisa: Jean, Wesley, Fábio, Andressa, Heliene, Gabriela, Carina, Ivo: tem sido um prazer fazer parte da mesma equipe.

À todos os colegas e amigos do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, em especial, à Marta, Soely, Dra. Luciana Marti, Fernanda, Janaína, Daniela Bucci, Marília, Dra. Anna Carla Goldberg. Obrigada por fazerem do IIEP um ambiente para o qual eu tive prazer em vir todos os dias.

Ao professores e funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas pelos ensinamentos e pela oportunidade. Em especial, a Maria Eni, por ter sempre olhado por mim e me socorrido em tantos momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), agradeço o auxílio financeiro.

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, agradeço pela disponibilidade da estrutura física para a realização.

Aos meus amigos de sempre, como sempre, pelo de sempre.

À minha família, por tudo.

E a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste mestrado.

*"O homem razoável se adapta ao mundo;
o irascível tenta adaptar o mundo a si
próprio. Assim, o progresso depende do
homem irascível."*

George Bernard Shaw

Resumo

BUZZETTO LC. Estudo molecular da via extrínseca da apoptose em indivíduos com imunodeficiência comum variável. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A Imunodeficiência de Variável Comum (ICV) é a imunodeficiência primária mais freqüentemente diagnosticada em humanos. A síndrome é caracterizada por baixos níveis de imunoglobulinas com conseqüente susceptibilidade a infecções respiratórias e gastrointestinais. Disfunções em linfócitos T afetam até metade dos pacientes com ICV, muitos dos quais apresentam linfopenia. Para abordar o estado do compartimento de linfócitos T em nosso grupo de pacientes, analisamos a distribuição de linfócitos e a frequência apoptose espontânea no sangue venoso, bem como a expressão gênica de diversas moléculas envolvidas na apoptose, incluindo receptores de morte, ligantes, adaptadores, moléculas reguladoras, inibidoras e anti-apotóticas em células CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos com ICV. Células mononucleares do sangue venoso foram isoladas por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque. A análise quantitativa das células T CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD45RA⁺, CD45RO⁺ e Anexina-V⁺ foi realizada por citometria de fluxo. A apoptose espontânea *in vitro* foi avaliada após 2 horas de cultura. A expressão dos genes de interesse foi avaliada por PCR quantitativo. Dezenove pacientes ICV e 19 indivíduos saudáveis foram incluídos. Nossos resultados mostram que pacientes com ICV apresentam diminuição na frequência de linfócitos TCD4⁺ e CD4⁺CD45RA⁺ e menor relação CD4/CD8 quando comparados aos controles. Notavelmente, 36,8% dos pacientes (n = 7/19) podem ser discriminados por maior frequência de apoptose espontânea em linfócitos quando comparados aos indivíduos saudáveis e pacientes com apoptose espontânea normal. Os indivíduos com ICV também apresentaram níveis elevados de células CD4⁺Anexina-V⁺ quando comparados com indivíduos controles. A expressão gênica para os receptores de morte, ligantes, moléculas inibidoras e adaptadoras da apoptose estava alterada em pacientes ICV, sendo que células CD4⁺ apresentaram menor expressão gênica de TRAIL-R, BCL-2, FLIPL e FADD, enquanto as células CD8⁺ apresentaram diminuição da expressão gênica de TRAIL, FADD, BCL-2, BCL-xL e um aumento proeminente de FLIPs, o que sugere um desequilíbrio nos mecanismos que controlam a morte celular de linfócitos nestes pacientes. O grupo de indivíduos com ICV apresentou redução da frequência de linfócitos T CD4⁺, apoptose espontânea de linfócitos aumentada e alterações em diversos genes relacionados ao controle deste mecanismo de morte celular, o que pode explicar parcialmente as alterações observadas no compartimento de células T destes indivíduos. Estes dados reforçam a hipótese de que a doença pode estar, em alguns casos, parcialmente ligada à incapacidade das células T de fornecer sinais adequados para linfócitos B, prejudicando, em última instância, a produção de anticorpos. Um dos grandes desafios do ICV é encontrar padrões para agrupar os pacientes em grupos mais homogêneos e a compreensão da contribuição das células T para a patogênese da doença pode ser crucial para uma classificação adequada.

Palavras-chaves: Imunodeficiência Comum Variável, apoptose, linfócitos T, linfopenia.

Abstract

BUZZETTO LC. Molecular study of extrinsic apoptosis pathway in patients with common variable immunodeficiency. [Masters thesis (Immunology)] - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Common Variable Immunodeficiency (CVID) is the most frequently diagnosed primary immunodeficiency in humans. The syndrome is characterized by low immunoglobulins levels with consequent susceptibility to respiratory and gastrointestinal infections. T cell dysfunction affect up to half of CVID patients, many of who present lymphopenia. To address the state of the lymphocyte compartment in our cohort, we have analyzed T cell distribution and spontaneous apoptosis in peripheral blood of CVID, as well as gene expression of several molecules involved in apoptosis, including death receptors, ligands, adapters, regulatory and anti-apoptotic molecules in CD4⁺ and CD8⁺ cells. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient. Quantitative analysis of CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD45RA⁺, CD45RO⁺ and Annexin-V⁺ cells were performed by flow cytometry. Spontaneous apoptosis in vitro was evaluated after 2 hours culture. Gene expression was analyzed by quantitative PCR. Nineteen CVID patients and 19 healthy subjects were enrolled. Our data show patients with CVID present decreased frequency of TCD4⁺ and CD4⁺CD45RA⁺ cells and lower CD4/CD8 ratio when compared to controls. Notably, 36.8% of patients (n = 7/19) can be discriminated by enhanced spontaneous apoptosis when compared to healthy subjects and CVID patients with normal levels of apoptosis. Interestingly, CVID patients also presented higher levels of CD4⁺ Annexin-V⁺ cells when compared to health subjects. Gene expression for death receptors, ligands, inhibitors and adapters was altered in CVID patients: CD4⁺ presented lower expression of TRAIL-R, BCL-2, FLIPL and FADD, while CD8⁺ cells presented lower expression of TRAIL, FADD, BCL-2, BCL-xL and a prominent augment of FLIPs expression, which suggests an imbalance in mechanisms controlling cell death of those patients' lymphocytes. CVID patients presented reduced CD4⁺ frequency, enhanced spontaneous apoptosis and alterations in several genes related to cell death control, which might partially explain the changes in T cell compartment. This data reinforces the hypothesis that the disease is, in some cases, partially due to inability of T cells to provide adequate signals to B lymphocytes, ultimately impairing antibody production. One of the major challenges of CVID is finding patterns which can cluster affected individuals into more homogeneous groups and understanding T cell contribution to the pathogenesis of the disease might be crucial to adequately classify the patients.

Keywords: Common Variable Immunodeficiency, apoptosis, T lymphocytes, lymphopenia.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Imunodeficiência Comum Variável	20
1.1.1	<i>Bases moleculares e imunopatologia</i>	21
1.1.2	<i>Classificações propostas</i>	23
1.2	Apoptose	24
1.2.1	<i>Fas-FasL</i>	26
1.2.2	<i>TRAIL-TRAILR</i>	29
1.2.3	<i>TNF-α-TNFR</i>	31
1.2.4	<i>FLIP</i>	32
1.3	Apoptose em indivíduos com Imunodeficiência Comum Variável	33
2	OBJETIVOS.....	36
3	PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Casuística	38
3.2	Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Venoso	40
3.3	Cultura de células para avaliação da apoptose espontânea	40
3.4	Marcação de células monucleares com anticorpos monoclonais	40
3.5	Análise de apoptose por externalização de resíduos de fosfatidilserina e incorporação de iodeto de propídio (PI)	41
3.6	Separação das subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	42
3.7	Extração de RNA	44
3.8	Preparo do controle positivo das reações de PCR	45
3.9	PCR quantitativa	46
3.10	Análise estatística	51
4	RESULTADOS	52
4.1	Separação das células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺	52
4.2	Análise da frequência de células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺	53
4.3	Avaliação da frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em pacientes com ICV	54
4.4	Análise da relação entre as populações linfocitárias	56

4.5	Análise da frequência células CD3 ⁺ CD8 ⁺	58
4.6	Análise da frequência de células CD45RA ⁺ e CD45RO ⁺	58
4.6.1	Expressão atípica das isoformas de CD45 no Paciente # 2	62
4.7	Curva de Apoptose versus Tempo	64
4.8	Análise da frequência de células apoptóticas	65
4.9	Correlação entre apoptose espontânea e frequência de linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺	68
4.10	Correlação entre apoptose espontânea frequência CD4/CD8	69
4.11	Análise da frequência de linfócitos CD3 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ em apoptose espontânea.....	70
4.12	Avaliação da possível identificação de fenótipo(s) comum(uns) a partir de agrupamento entre os pacientes com ICV	72
4.13	Avaliação das manifestações clínicas	74
4.14	Análise da expressão gênica dos receptores de morte, ligantes e moléculas adaptadoras da via extrínseca da apoptose	76
4.15	Análise da expressão gênica de moléculas anti-apotóticas da via intrínseca em pacientes com ICV	82
5	DISCUSSÃO	83
6	REFERÊNCIAS	96

Lista de Figuras

Figura 1 –	Estratégia de separação de células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺ a partir de células mononucleares de sangue venoso de controles e pacientes com ICV	43
Figura 2 –	Estratégia de separação e pureza de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ a partir de células mononucleares de sangue venoso de controles e pacientes com ICV	44
Figura 3 –	Curvas para análise da amplificação das reações de PCR quantitativa	48
Figura 4 –	Curva de eficiência padrão para as reações de PCR	49
Figura 5 –	Análise de pureza das populações CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺ obtidas	52
Figura 6 –	Análise de linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺	53
Figura 7 –	Frequência de linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺ em controles e pacientes com ICV	54
Figura 8 –	Frequência de linfócitos TCD3 ⁺ CD4 ⁺ , TCD3 ⁺ CD8 ⁺ e CD19 ⁺ em controles e pacientes com ICV	56
Figura 9 –	Razão entre linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺ em controles e pacientes com ICV	57
Figura 10 –	Análise da expressão de CD45RA e CD45RO em linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD8 ^{low}	59
Figura 11 –	Frequência de linfócitos que expressam diferentes isoformas de CD45 em controles e pacientes com ICV	59
Figura 12 –	Frequência de linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ que expressam diferentes isoformas de CD45 em controles e pacientes com ICV	60
Figura 13 –	Frequência de linfócitos CD8 ^{Low} que expressam diferentes isoformas de CD45 em controles e pacientes com ICV.....	61
Figura 14 –	Expressão atípica de CD45RA e CD45RO no paciente # 2	62
Figura 15 –	Frequência de células apoptóticas em diferentes tempos de cultura	64
Figura 16 –	Análise da frequência de linfócitos em apoptose espontânea	66
Figura 17 –	Frequência de linfócitos em apoptose espontânea em controles e pacientes com ICV	67
Figura 18 –	Correlação entre frequência de apoptose espontânea e frequência de linfócitos CD4 ⁺ em controles e pacientes com ICV	68
Figura 19 –	Correlação entre frequência de apoptose espontânea e razão CD4/CD8 em controles e pacientes com ICV	69
Figura 20 –	Frequência de linfócitos CD3 ⁺ em apoptose espontânea em controles e pacientes com ICV	71

Figura 21 –	Reagrupamento dos pacientes com ICV a partir das análises de frequência de apoptose espontânea e de frequências de linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺	73
Figura 22 –	Expressão gênica de receptores de morte e respectivos ligantes em controles e pacientes com ICV	78
Figura 23 –	Expressão gênica das moléculas adaptadoras e inibidoras da via extrínseca da apoptose controles e pacientes com ICV	79
Figura 24 –	Expressão gênica de receptores de morte e moléculas relacionadas em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ dos indivíduos com ICV	80
Figura 25 –	Expressão gênica de moléculas anti-apoptóticas da via intrínseca da apoptose em controles e pacientes com ICV	82

Lista de Tabelas

Tabela 1 –	Resumo dos estudos que avaliaram apoptose em pacientes com ICV	35
Tabela 2 –	Informações clínicas e demográficas os pacientes com ICV estudados	39
Tabela 3 –	Painéis de anticorpos monoclonais e Anexina-V para marcação de células mononucleares de sangue venoso de controles e pacientes com ICV.....	41
Tabela 4 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados em reações de PCR quantitativa dos genes normalizadores e genes de interesse	47
Tabela 5 –	Condições utilizadas nas reações de PCR quantitativa dos genes normalizadores e genes de interesse	50
Tabela 6 –	Comparação entre o Paciente 02 e Grupo Controle	63
Tabela 7 –	Estratégia de clusterização dos pacientes com ICV pelos parâmetros frequência de apoptose espontânea e frequência de linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺	74
Tabela 8 –	Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com ICV aqui avaliados ...	75
Tabela 9 –	Expressão gênica dos receptores de morte, seus ligantes e moléculas adaptadoras e inibidoras da apoptose em controles e pacientes com ICV	77

Lista de Abreviaturas

ACTB	β -actina
ALPS	Síndrome Linfoproliferativa Autoimune
AICD	Morte celular induzida por ativação
AP1	Proteína ativadora-1
APC	Alofococianina
ASK1	Proteína quinase reguladora de sinais apoptóticos
Bcl-2	Do inglês, <i>B-cell lymphoma - 2</i>
Bcl-xL	Do inglês, <i>B-cell lymphoma - extra large</i>
BAFF	Fator de ativação de células B
BAFF-R	Receptor do fator de ativação de células B
CD	Cluster diferenciação
DAÍ	Doença autoimune
DAXX	Proteína Associada à morte
DcR	Receptor <i>Decoy</i>
DD	Domínio de morte
DED	Domínio efetor de morte
DlgA	Deficiência seletiva de IgA
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DMEN	Meio de Earle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DR	Receptor de Morte
ESID	Sociedade Europeia de Imunodeficiências
FADD	Proteína adaptadora com domínio de morte associada a FAS
FITC	Isotilcianato de fluoresceína
FLIP	Proteína inibidora semelhante à FLICE
FOXP3	Forkhead box P3
GAPDH	Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
ICOS	Co-estimulador induzível
ICV	Imunodeficiência comum variável
IFN	Intérferon
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E

IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IVIg	Imunoglobulina Intravenosa
kDa	<i>Quilodaltons</i>
LT	Linfotoxina
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NFκB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NK	Natural Killer
OPG	Osteoprotegerina
PAGID	Grupo Pan Americano de Imunodeficiências
PBS	Tampão Salina Fosfato
PE	Ficoeritrina
PE-Cy7	Ficoeritrina-cianina-7
PerCP	Proteína clorofila peridina
PerCP- Cy5.5	Proteína clorofila peridina-cianina 5.5
PI	Iodeto de Propídio
PHA	Fito hemaglutinina
PKC	<i>Proteína Quinase C</i>
PLAD	Domínios montados pré-ligantes
RAIDD	Proteína associada a RIP com domínio de morte
RIP	Proteína de interação com receptor
RNA	Ácido ribonucleico
TAC1	Ativador transmembrana e modulador do cálcio interativo do ligante da ciclofilina
TCR	Receptor de células T
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-R	Receptor do fator de necrose tumoral
TRADD	Domínio de morte associado ao receptor de TNF
TRAF	Fator associado ao receptor de TNF
TRAIL	Ligante indutor de apoptose ligado ao TNF
XBP-1	Proteína ligada ao domínio X-box-1

LISTA DE SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
μ	Micro
G	Unidade de centrifugação
L	Litros
mm ³	Milímetros cúbicos
° C	Graus Célsius
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa

1 INTRODUÇÃO

Organismos multicelulares estão constantemente em contato com patógenos que podem representar risco para a vida. O sistema imunológico oferece proteção contra os agentes infecciosos e a sobrevivência do indivíduo depende da integridade deste sistema e de sua capacidade para reconhecer e responder às adversidades. Devido ao vasto número de moléculas que constituem o sistema de defesa e a grande complexidade de suas interações, alterações nos genes e mecanismo do sistema imune podem levar a diversas desordens, incluindo as imunodeficiências, condições graves, potencialmente fatais, que são classificadas em dois grupos: (i) imunodeficiências primárias, ou congênitas, que são causadas por defeitos em genes relacionados ao sistema imunológico e (ii) imunodeficiências secundárias, ou adquiridas, resultantes de alterações orgânicas que ocorrem ao longo da vida, como desnutrição, infecções, cânceres e tratamentos com drogas imunossupressoras ⁽¹⁾.

São conhecidas cerca de 150 imunodeficiências primárias e mais de 120 genes foram identificados e relacionados com essas condições ^(2, 3), que podem ocorrer como consequência de defeitos na imunidade inata, como as deficiências de fagocitose e complemento, ou na imunidade adquirida. Esse último grupo é subdividido em (i) deficiências de anticorpo (com comprometimento predominante das defesas humorais e da secreção de imunoglobulinas); (ii) celulares (destacam alterações que envolvem os mecanismos efetores dependentes de células); e (iii) combinadas (onde ambos os compartimentos da imunidade específica estão prejudicados) ^(4, 5).

Em humanos, as deficiências de anticorpo são as mais frequentes, independente da região geográfica ou grupo etário, e representam 50 a 70% das imunodeficiências primárias diagnosticadas ⁽⁶⁾. Essas desordens constituem um grupo heterogêneo que varia desde a deficiência seletiva de uma única classe de imunoglobulinas até a ausência total de anticorpos e linfócitos B ⁽⁷⁾. Sem tratamento adequado, algumas dessas deficiências humorais podem levar à morte e, embora a terapia de substituição intravenosa de imunoglobulinas aumente a expectativa de vida e diminua a frequência das infecções e complicações, o diagnóstico deve ser feito precocemente, antes que ocorram danos severos e irreversíveis aos tecidos ⁽⁸⁾.

1.1 Imunodeficiência Comum Variável

A Imunodeficiência Comum Variável (ICV), descrita pela primeira vez por Janeway e colaboradores em 1953*, é a deficiência de anticorpo sintomática mais comumente identificada em humanos. De acordo com a Sociedade Européia de Imunodeficiências (ESID), o diagnóstico de ICV corresponde a 21% de todas as imunodeficiências registradas em um banco de dados que inclui 13 mil pacientes de 41 países ⁽⁹⁾.

A incidência exata da ICV é desconhecida, mas estudos apontam variações entre 1 em 10.000 a 1 em 200.000 indivíduos, sendo bastante rara entre os asiáticos e africanos. A ICV afeta em igual proporção indivíduos de ambos os sexos e os sintomas costumam aparecer na primeira e terceira décadas de vida, embora as primeiras manifestações possam ocorrer em qualquer faixa etária ⁽¹⁰⁻¹³⁾. Frequentemente, há um intervalo significativo, de 4 a 9 anos, entre o início das manifestações clínicas e o diagnóstico, fato que pode contribuir para a piora do prognóstico e aumento da morbidade ⁽¹⁴⁾. A maioria dos casos ocorre de forma esporádica, mas a ICV pode apresentar um padrão complexo de herança familiar, uma vez que 10 a 20% dos pacientes apresentam pelo menos um parente próximo afetado pela ICV ou pela deficiência seletiva de IgA (DIgA) ⁽¹⁵⁾. Nota-se que o quadro de alguns indivíduos com DIgA pode progredir para ICV ⁽¹⁶⁾.

Embora diversos mecanismos imunológicos estejam comprometidos nos portadores de ICV, a doença é caracterizada primordialmente por falha na diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, o que resulta na presença de níveis séricos reduzidos de duas ou mais classes de imunoglobulinas ^(13, 17-19). Os critérios diagnósticos para ICV são: nível de IgG no soro abaixo de 300 mg/dl (ou uma diminuição de pelo menos 2,5 desvios-padrões abaixo da média para a idade e região geográfica), baixos níveis de IgA (< 50 mg/dl) e/ou IgM (< 75 mg/dl) e o cumprimento de todos os critérios seguintes: 1) início da imunodeficiência após 2 anos de idade; 2) ausência de isohemaglutininas e/ou resposta deficiente a protocolos de imunização; 3) exclusão de outras causas conhecidas de hipogamaglobulinemia ⁽¹⁸⁾, que podem mimetizar a ICV ⁽¹⁵⁾.

Janeway et al, 1953⁽²⁰⁾ *apud* (12)

O quadro clínico apresentado por indivíduos com ICV depende do distúrbio imunológico primordial, ou seja, se predominantemente humoral, com conseqüente predisposição às infecções por bactérias encapsuladas ^(4, 12, 13, 21). Caso exista déficit da resposta celular, as infecções por fungos, bactérias intracelulares e protozoários podem compor o quadro de manifestações clínicas ⁽²¹⁾. Uma porcentagem considerável dos pacientes com ICV desenvolvem asma e rinite com sintomatologia semelhante à observada em indivíduos atópicos, porém, sem a presença de IgE ⁽²²⁾. Além disso, por razões desconhecidas, os indivíduos afetados também manifestam uma variedade de desordens autoimunes, incluindo anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia autoimune, artrite reumatóide e anemia perniciosa ^(12, 13). Ainda, os portadores dessa desordem são mais propensos a desenvolver granulomas, principalmente nos pulmões, fígado e baço, e alguns tipos de câncer, como carcinoma gástrico e linfoma ⁽²³⁾. Pela diversidade de manifestações clínicas, severidade e alterações imunológicas apresentadas pelos pacientes, acredita-se que a ICV seja um grupo heterogêneo de imunodeficiências primárias que levam a um resultado comum: a baixa concentração dos anticorpos séricos ^(13, 14, 24-26).

É importante salientar que mesmo com acompanhamento adequado e terapia de substituição intravenosa de imunoglobulinas, os pacientes com ICV ainda apresentam uma taxa de mortalidade que supera a da população normal ⁽²¹⁾, o que contrasta com a idéia de uma doença exclusivamente determinada pela produção deteriorada de anticorpos e sugere que outras populações celulares, além dos linfócitos B, possam apresentar anormalidades que ajudam a compor a patogênese da doença ⁽²⁷⁾.

1.1.1 Bases moleculares e imunopatologia da ICV

A etiologia da ICV é, em grande parte dos indivíduos, desconhecida ⁽⁵⁾ e nenhuma hipótese unificadora a respeito das bases moleculares desta doença foi proposta até o presente momento. Na última década, foram descritos os primeiros defeitos genéticos relacionados à doença, entretanto, todas as mutações identificadas até agora respondem apenas por um pequeno número de pacientes com ICV, destacando o perfil heterogêneo da doença ^(27, 28).

Há descrição de falhas na maturação das células B e na diferenciação destas células em plasmócitos, além de diminuição do número de linfócitos B de memória

(CD27⁺) circulantes ⁽²⁹⁾. Defeitos em moléculas que regulam a ativação e a diferenciação terminal de linfócitos B, tais como TACI (*Transmembrane Activator and Calcium-modulator and cytophilin ligand Interactor*) ⁽³⁰⁾, ICOS (*Inducible Costimulator*), CD19⁽³¹⁾ e BAFF-R (*B-cell Activating Factor*)⁽³²⁾ foram descritos em indivíduos com ICV, provendo avanços significativos na compreensão da patogênese desta doença. ⁽³³⁾.

Recentemente, foi encontrada, em um paciente com ICV, uma associação entre a diminuição do *splicing* da proteína XBP-1 (*X-box Binding Protein 1*) com o acúmulo de IgM no retículo endoplasmático, fornecendo um mecanismo que explica a hipogamaglobulinemia observada neste indivíduo ⁽³⁴⁾.

Em alguns casos, a doença está vinculada a disfunções da imunidade inata. Foram relatados casos de ICV associados a importantes alterações na distribuição dos diferentes subtipos de células dendríticas no sangue periférico ^(35, 36), além de perturbações na diferenciação, maturação e função destas células apresentadoras, com expressão de níveis reduzidos de moléculas co-estimulatórias críticas para ativação de células T. Alguns indivíduos afetados produzem níveis significativamente mais baixos de IL-12 após a sinalização por CD40 ⁽³⁷⁾. Foi relatado também que pacientes com ICV apresentam um número reduzido de células NK CD56⁺ na circulação ⁽³⁸⁾. Ainda, estudos indicam que indivíduos com ICV apresentam alterações do sistema complemento, como a diminuição da ativação da via clássica, dependente de complexos antígeno-anticorpo, e o aumento da função protetora a partir da ativação da via das lectinas⁽³⁹⁾.

Casos de disfunção dos linfócitos T podem acometer até a metade dos pacientes com ICV ^(10, 40). Os indivíduos afetados podem apresentar timopoiese defeituosa, expressão diminuída de moléculas de membrana, como CD40L e L-Selectina, alteração na produção de citocinas, incluindo IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ , além de baixa resposta proliferativa a mitógenos e antígenos e geração reduzida de células T de memória antígeno-específicas ⁽²⁹⁾. Estudos recentes demonstraram que as células T reguladoras CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺, circulantes no sangue periférico desses pacientes, apresentam frequência reduzida em relação aos indivíduos controle. ^(41, 42) O prejuízo funcional do compartimento de células T está associado com diminuição do tempo de sobrevida do paciente ⁽²⁷⁾.

Alguns indivíduos com ICV apresentam alterações no número absoluto de linfócitos. A linfopenia presente em alguns pacientes é resultado, em grande parte, da redução dos números de células B CD19⁺ e células T *helper*, sendo as células T

naïve, com fenótipo CD4⁺ CD45RA⁺, as maiores responsáveis por esse quadro ⁽⁴³⁾. Ainda, estudos mostraram que até um terço dos afetados pela ICV apresenta alterações no repertório de células T, com, além da diminuição da população de linfócitos T CD4⁺, aumento do número de células T CD8⁺ ⁽⁴⁴⁾. Em um estudo feito com 17 pacientes portadores da doença, Bloch-Michel e colaboradores mostraram que a maioria dos pacientes estudados apresentava linfopenia T CD4⁺, destacando que parte destes apresentava número absoluto de linfócitos T CD4⁺ abaixo de 400 células/mm³ ⁽⁴⁵⁾. Outro estudo mostrou contagens significativamente reduzidas de células T CD4⁺, sem alterações significativas no compartimento CD8⁺ ⁽⁴⁶⁾. Dentre os mecanismos propostos para a linfopenia, ressalta-se o aumento da susceptibilidade dessas células à apoptose que será discutida adiante. ^(43, 47, 48)

1.1.2 Classificações propostas

Classificar os pacientes adequadamente e identificar subgrupos mais homogêneos dentro do espectro da doença ainda constitui um dos grandes desafios ligados à ICV. Na última década, foram propostas classificações, baseadas no perfil fenotípico de subpopulações de linfócitos B, capazes de auxiliar no agrupamento de pacientes com ICV.

A classificação de Freiburg, aplicável a indivíduos com ICV que apresentavam células B correndo ao menos 1% dos linfócitos periféricos, propôs o estabelecimento de dois grupos de pacientes: (i) Pacientes com menos 0,4% de linfócitos B de memória com switch de classe (CD27⁺ IgM⁻ IgD⁻); (ii) Pacientes com mais de 0,4% desta população de células. O grupo I ainda foi subdividido de acordo com a expressão do marcador CD21, onde pacientes com mais de 20% de células B CD21⁻ correspondem ao Grupo Ia e os restantes ao grupo Ib. ⁽⁴⁹⁾

Outra proposta, conhecida como classificação de Paris, subgrupa os pacientes em 3 grupos: (i) pacientes com número normal de células B de memória (IgD⁺ CD27⁺); (ii) pacientes com redução das células B de memória; e (iii) pacientes com células B de memória com defeito no switch de classe (IgD⁻ CD27⁺) ⁽⁵⁰⁾.

A classificação EUROclass, provê um consenso entre as classificações anteriores e subdivide os pacientes em 7 grupos de acordo com as características fenotípicas dos linfócitos B de memória. Esta classificação encontrou associações entre a frequência das subpopulações de linfócitos B e algumas manifestações

clínicas apresentadas pelos pacientes com ICV. A diminuição no número de células B de memória tornaria os indivíduos mais propensos a apresentar esplenomegalia, granulomatose e autoimunidade, enquanto que uma proporção aumentada de células B transicionais estaria associada à linfadenopatia. ⁽⁵¹⁾.

Chapel e colaboradores (2008) propuseram uma classificação independente de parâmetros imunológicos, agrupando os pacientes com base em observações clínicas com diferentes prognósticos ⁽⁵²⁾.

Ainda, em um estudo abrangente do compartimento de células T dos pacientes com ICV, Giovannetti discriminaram os pacientes com ICV de acordo a frequência de linfócitos T *helper* *naïves* em três grupos: (i) indivíduos com menos de 15%, (ii) indivíduos com entre 16-29% e (iii) indivíduos com mais de > 30% de células CD4⁺ CD45RA⁺ CD62L⁺. Os autores demonstraram uma forte relação entre a frequência de linfócitos T CD4⁺ *naïves* e a severidade da doença e reforçaram a necessidade da inclusão de parâmetros ligados às células T para uma classificação mais adequada da ICV. ⁽²⁷⁾

1.2 Apoptose

A apoptose é uma forma de morte na qual a célula inicia um suicídio programado caracterizado por alterações morfológicas específicas, que incluem encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, *blebbing* de membrana e formação de corpos apoptóticos ⁽⁵³⁾, que são rapidamente eliminados do tecido através da fagocitose ⁽⁵⁴⁾.

Programas de morte celular evoluíram para suprir diversas necessidades: durante a embriogênese, a morte de células supérfluas ajuda a moldar tecidos e o desenvolvimento neuronal; em adultos, a apoptose contrabalanceia mecanismos de proliferação celular ajudando a manter a homeostasia, além de dirigir a involução de glândulas mamárias e do timo. A apoptose também é importante para a eliminação de células potencialmente perigosas, como as que passaram por transformações neoplásicas ou linfócitos auto-reativos, e pode funcionar como um mecanismo de remoção de células infectadas por patógenos ⁽⁵⁴⁾.

Este mecanismo de morte difere da necrose por não causar o rompimento da membrana citoplasmática, evitando a liberação do conteúdo intracelular para o meio

extracelular, minimizando a liberação de sinais inflamatórios e reduzindo o risco de desenvolvimento de autoimunidade ⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾.

A morte por apoptose é altamente regulada e depende da participação de um grupo de proteínas da família de cisteína-proteases chamadas caspases. As caspases são sintetizadas como precursores chamados pró-caspases que, quando clivados, assumem sua forma ativa. A clivagem destes precursores pode ocorrer como resposta a uma série de estímulos, como, por exemplo, dano ao DNA e ativação dos receptores de morte. As caspases iniciadoras são responsáveis por detectar e transduzir sinais dos sinais apoptóticos, clivando e ativando as caspases efetoras. As caspases efetoras por sua vez clivam alvos e proteínas que incluem enzimas de reparo de DNA, proteínas do citoesqueleto e moléculas envolvidas na progressão do ciclo celular, o que, por fim, culmina em mudanças morfológicas associadas a apoptose e a perda de viabilidade ⁽⁵³⁾.

A perda de função de moléculas envolvidas na apoptose pode levar a hiperproliferação de células, enquanto que a amplificação destas cascatas pode causar danos a vários tipos de tecido ⁽⁵⁷⁾. Em seres humanos, defeitos neste mecanismo de morte celular, resultando em apoptose excessiva ou insuficiente, podem provocar câncer, autoimunidade e desordens neurodegenerativas ^(55, 56).

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias principais: (i) a via extrínseca, iniciada por receptores localizados na membrana externa das células e (ii) a via intrínseca, associada à mitocôndria. A via extrínseca de apoptose é ativada por membros da superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNF: *Tumor Necrosis Factor*), que inclui citocinas solúveis e ligadas à membrana. Essas moléculas apresentam domínios de homologia estrutural através dos quais formam homotrímeros, que se ligam aos receptores com estrutura similar presentes na superfície da célula alvo.

Os receptores das proteínas da família TNF pertencem à chamada superfamília de receptores de TNF. Alguns membros desse grupo são conhecidos como receptores de morte (DR: *Death Receptor*). Os DRs apresentam em comum um domínio extracelular conservado contendo de dois a quatro pseudorepetições ricas em cisteína necessário para a interação com seus respectivos ligantes e um domínio de morte (DD: *Death Domain*) intracelular que contém uma sequência de aproximadamente 65 aminoácidos e se liga a moléculas adaptadoras iniciando a transdução do sinal de apoptose ⁽⁵³⁾.

Inúmeras proteínas envolvidas na apoptose podem ser recrutadas para os receptores de morte através da intermediação das proteínas adaptadoras. Em linhas gerais, a associação de um DR com seu ligante resulta em oligomerização, seguida do recrutamento da molécula adaptadora FADD (*Fas Associated Protein with Death Domain*) que se liga ao DD presente na porção intracelular do receptor. Além de FADD, outras proteínas como TRADD (*TNF-Receptor Associated Death Domain*), RIP1 (*Receptor Interacting Protein kinase 1*) e DAXX (*Death Associated Protein*) que também contém DD podem reconhecer e se ligar ao DD presente nos receptores ⁽⁵³⁾.

As pró-caspases iniciadoras -8 ou -10 e FADD interagem entre si através de um domínio efetor de morte (*DED: Death Effector Domain*) que está presente em ambas as moléculas, gerando o complexo multiprotéico de sinalização indutor de morte (*DISC: Death-Inducing Signaling Complex*).⁽⁵⁸⁾ No DISC, as pró-caspases iniciadoras sofrem proteólises para gerar sua forma ativa (caspase-8 ou -10), que posteriormente é liberada do complexo para iniciar a cascata da apoptose ^[53]. Subseqüentemente, a forma ativa da caspase-8 ou -10 cliva as pró-caspases efetoras -3, -6 e -7, gerando formas ativas que agem sobre diversos substratos celulares, conduzindo aos eventos que caracterizam o processo apoptótico ⁽⁵⁸⁾.

Algumas moléculas envolvidas nesta forma de morte celular têm funções não apoptóticas. Surpreendentemente, a caspase-8 e sua molécula adaptadora FADD são essenciais, não apenas para a apoptose induzida pelos receptores de morte, mas também para o desenvolvimento de vasos, diferenciação de macrófagos e proliferação de certos tipos celulares ^(59, 60). Para induzir a apoptose, a caspase-8 precisa ser processada e formar um tetrâmero específico, p202p102, mas as funções não apoptóticas necessitam apenas de sua forma ativada não processada ⁽⁶¹⁾. Esse tetrâmero previne a morte celular por um mecanismo chamado necroptose, um processo ativamente regulado, mediado pelas quinases RIP1 e RIP3, que se assemelha a necrose por suas características pró-inflamatórias ⁽⁵⁴⁾. A molécula TRADD pode recrutar diversas outras moléculas adaptadoras, incluindo FADD, RIP1 e TRAF (*TNF Receptor Associated Factor*); RIP1 é capaz de interagir com a caspase 2 e RAIDD (*RIP Associated Protein with Death Domain*); DAXX pode recrutar a quinase ativada por mitógenos ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*) ⁽⁵³⁾.

1.2.1 Fas-FasL

Dentre os receptores de morte já descritos, Fas (também conhecido como CD95, Apo-1 ou DR2) é o mais amplamente estudado. Trata-se de uma proteína transmembrana do tipo I de 48 kDa que é expressa em uma ampla gama de tecidos linfóides e não linfóides e, destacadamente, em linfócitos T ativados e alguns tumores.

O ligante deste receptor, FasL (também conhecido como CD95L), é uma proteína transmembrana do tipo II de 40 kDa que apresenta um sítio de clivagem para metaloprotease, gerando assim sua forma solúvel. Em humanos, a interação entre homotrímeros de Fas e FasL leva a formação de DISC e a ativação da caspase-8 ou 10, desencadeando, assim a apoptose ⁽⁵⁷⁾.

O FasL é uma citocina produzida, predominantemente, por células T ativadas e células NK (Rossi et al, 2010). A transcrição de FasL encontra-se inativa na maioria das células e a regulação da expressão do ligante controla os efeitos biológicos. Órgãos imunoprivilegiados, como a córnea e os testículos, apresentam expressão constitutiva de FasL de forma a induzir a morte de células imunológicas que penetram no tecido, protegendo-os dos potenciais danos causados por uma resposta imunológica local ⁽⁵⁷⁾.

Em condições fisiológicas, o sistema Fas-FasL está envolvido na morte de células T induzida por ativação, responsável pela deleção de linfócitos T ativados ou auto-reativos ⁽⁶²⁾. Mediante a estimulação repetitiva pelo antígeno, linfócitos passam a expressar a proteína FasL que pode se ligar a receptores Fas expressos em sua própria membrana ou em células vizinhas ⁽⁵⁵⁾.

Embora a atividade mais bem descrita do receptor Fas esteja ligada ao seu papel no sistema imune, este DR é expresso em quase todos os tecidos e tem papéis regulando variadas funções em diversos tipos celulares ⁽⁵³⁾. Além da capacidade de induzir morte, o receptor Fas também pode regular o desenvolvimento e maturação de células T e B. Por exemplo, durante a ativação de células T maduras no curso de uma infecção, os linfócitos passam a expressar Fas, que será eventualmente necessário para o desencadeamento da morte induzida por ativação (AICD: *Activation induce cell death*), embora as células recém ativadas sejam inicialmente resistentes a morte induzida por Fas. Ainda, o sistema Fas-FasL também participa da deleção de células apresentadoras de antígeno e constitui um importante mecanismo através do qual linfócitos T citotóxicos removem células que expressam antígenos *não próprios*. ⁽⁵³⁾

A expressão de FasL é altamente regulada e, em células T, requer tanto a ativação da Proteína Quinase C (PKC: *Protein Kinase C*) quanto do Fator Nuclear de Células T Ativadas (NFAT: *Nuclear Factor of Activated T Cells*), enquanto a indução de Fas exige apenas a ativação de PKC através do receptor de células T (TCR: *T Cell Receptor*). Outra forma de regulação da ativação desta via inclui, em humanos, o receptor decoy DcR3 que se apresenta na forma solúvel e não possui DD, sendo capaz de antagonizar a indução da apoptose competindo com o receptor de morte pela ligação à proteína FasL ⁽⁵⁵⁾.

Um mecanismo comum empregado no controle do aumento ou diminuição da sensibilidade a apoptose mediada por Fas é a regulação da expressão do receptor e seu ligante na superfície. *Splicing* alternativo, clivagem mediada por proteases, expressão gênica e sequestro do receptor e do ligante já foram descritos. O receptor de Fas é expresso em um único *locus* do cromossomo 10 de células humanas e já foram descritas oito variantes e sete isoformas que surgem a partir de *splicing* alternativo do RNA do receptor Fas, sendo que apenas uma das isoformas codifica proteína funcional composta por 335 aminoácidos de tamanho. A isoforma 2, com 314 aminoácidos, possui domínio extracelular rico em cisteína e um domínio de morte, mas não apresenta o domínio transmembrana. As isoformas 7 e 4 não apresentam domínio transmembrana e geram formas solúveis de Fas que podem agir sequestrando e inativando o ligante em células adjacentes. A isoforma 3 apresenta o domínio citoplasmático truncado ⁽⁵³⁾.

A eficiência da indução da apoptose após a interação entre Fas e seu ligante é variável em diferentes tipos celulares, o que permite uma classificação de acordo com a susceptibilidade a este tipo de morte. Células do tipo I, como linfócitos ativados, são sensíveis a apoptose induzida por FasL e são caracterizadas por altos níveis de formação de DISC e grande ativação de caspase-8, o que leva a mobilização das caspases efetoras diretamente. Em contraste, em células do tipo II, como hepatócitos, o desencadeamento da apoptose requer a amplificação do sinal de morte através da participação da via intrínseca da apoptose. Nestas populações, é necessária a geração de uma forma truncada da molécula Bid que, em colaboração com Bax e Bak, é capaz de induzir a liberação de citocromo c pela mitocôndria, com consequente formação do apoptossoma e ativação da pró-caspase-9. O processo de morte celular por apoptose pode ser bloqueado por proteínas da família Bcl-2 e Bcl-xL em células do tipo II, mas não em células do tipo I ^(56, 63).

Foi sugerido que a diferença de sensibilidade a apoptose induzida por Fas-FasL esteja relacionada à capacidade de formação de *clusters* do receptor em *rafts* lipídicos nas células susceptíveis a morte, que facilitariam o aparecimento de homotrimeros capazes de interagir com o ligante. Linfócitos T ativados com anti-CD3 e IL-2 apresentam menor viabilidade após estimulação com FasL; entretanto, o mesmo não ocorre para células T não ativadas, onde observa-se aumento da atividade de formação de *clusters* de Fas na população ativada em comparação a não ativada ⁽⁵⁸⁾. Neste sentido, células do tipo II também mostram baixa capacidade de formação de *clusters* e existe, neste caso, a produção de ceramida para permitir a geração de grandes agregados do receptor nos *rafts* lipídicos ⁽⁵³⁾.

A morte celular mediada por Fas pode ocorrer tanto por apoptose quanto por necrose, sendo que a última requer o recrutamento de FADD e RIP (*Receptor interacting protein kinase*), mas não o envolvimento e ativação da caspase-8. Ainda, mesmo com seu incontestável papel como indutor de morte, esse sistema também pode desencadear sinais proliferativos em células T ⁽⁶⁴⁾.

O papel da via extrínseca de apoptose no controle da homeostase e do sistema imunológico através da deleção de células é evidenciado pela observação de que camundongos com defeitos em Fas (*lpr* ou deleção do gene Fas) ou FasL (*gld*) desenvolvem síndrome linfoproliferativa, além de maior propensão a autoimunidade e hiperplasia hepática moderada ⁽⁶⁵⁾. Em humanos, defeitos na cascata de sinalização de Fas-FasL, que podem envolver mutações tanto no receptor quanto no ligante, levam a Síndrome Linfoproliferativa Autoimune (ALPS: *Autoimmune lymphoproliferative syndrome*) que é caracterizada por aumento de susceptibilidade a malignidades linfóides, citopenia autoimune e doença linfoproliferativa ⁽⁶⁶⁾. Ainda, o receptor Fas está implicado na hepatite fulminante, na degeneração neuronal pós-isquêmica em danos cerebrais traumáticos. Células tumorais regulam positivamente a expressão de FasL após o tratamento com quimioterapia, o que pode ter um papel importante na eliminação dos linfócitos que infiltrantes ⁽⁵³⁾.

1.2.2 TRAIL-TRAIL-R

O sistema TRAIL/TRAIL-R está presente em diversas células do sistema imune e é dependente do nível de estimulação da célula ^[51]. TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand 1*) é uma proteína de transmembrana do tipo II com 281

aminoácidos que pode ser clivada para gerar uma forma solúvel. A molécula se apresenta em homotrímeros coordenados por um átomo de zinco, que parece ser importante para a sua atividade biológica ⁽⁶⁷⁾.

Embora a expressão de mRNA de TRAIL seja constitutiva na grande maioria dos tecidos, a proteína é encontrada primordialmente na superfície de células NK, linfócitos T citotóxicos, macrófagos e células dendríticas e, durante o período embrionário, no fígado fetal e neonatal e em células NK. Em macrófagos e células dendríticas, TRAIL pode ser positivamente regulado através da estimulação com LPS e IFN- β ou, em células dendríticas, monócitos e células NK, com IFN- γ ⁽⁶⁷⁾.

Em humanos, este ligante foi detectado em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico após estimulação do receptor da célula T (TCR) na presença de interferons do tipo I, mas – ao contrário de FasL – a expressão de TRAIL na membrana celular não aumenta de forma significativa após estimulação apenas via TCR/CD3. Tanto o TRAIL como o FasL estão envolvidos com diferentes perfis de linfócitos T e foi demonstrado que após estimulação *in vitro* com anti-CD3, células Th1 aumentam a expressão do CD95L, enquanto que linfócitos Th2 expressam TRAIL ⁽⁶⁸⁾.

TRAIL pode interagir com cinco receptores diferentes, sendo que dois deles, DR4 (TRAIL-R1) e DR5 (TRAIL-R2), possuem domínios citoplasmáticos DD que desencadeiam uma resposta apoptótica após a estimulação pelo ligante. Três receptores *decoy* para TRAIL foram descritos – DcR1, DcR2 e osteoprotegerina –, embora este último apresente afinidade mais baixa ao ligante e seu papel fisiológico não esteja claro ^(67, 69).

A ligação entre TRAIL e seus receptores de morte leva ao recrutamento de FADD e a ativação de caspase-8 com subsequente desencadeamento da apoptose de maneira semelhante a FasL. Tanto DR4 quanto DR5 são rapidamente internalizados após a interação com o ligante, mas diferentemente do que ocorre para Fas e TNFRI, esse processo parece não ser essencial para a indução da morte celular. Assim como para o sistema Fas-FasL, diferentes tipos celulares apresentam sensibilidade variável à indução de morte por apoptose por TRAIL, sendo que a indução da apoptose em células do tipo II também é, neste caso, dependente da amplificação do sinal pró-apoptótico por Bid e da liberação de citocromo c pela mitocôndria ⁽⁶⁸⁾.

Além da caspase-8, TRAIL pode ativar vias de indução de NFκB, embora de maneira menos potente que o TNF-α. Embora o papel fisiológico desta atividade não esteja plenamente compreendido, foi sugerido que a ativação de NFκB (*Nuclear Factor κ B*) por TRAIL possa ser importante para desencadear a produção de IL-8 e MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*), que levariam ao recrutamento de macrófagos para a remoção de células apoptóticas do local ⁽⁶⁷⁾.

Em diferentes sistemas, a interação entre TRAIL e seus receptores mostrou atividade imunossupressora, imunorreguladora e na vigilância contra tumores. TRAIL se mostrou capaz de inibir autoimunidade em diversos modelos animais e camundongos TRAIL^{-/-} apresentam maior susceptibilidade a diabetes e artrite. A atividade antitumoral deste sistema está bem estabelecida e agonistas de TRAIL capazes de induzir morte primordialmente em células tumorais tem sido alvo de estudos promissores para terapias contra o câncer. Neste contexto, há relatos que mostram resultados positivos na atuação desta via na inibição metastases e crescimento tumoral em diversas linhagens e modelos animais ⁽⁶⁹⁾.

TRAIL ainda parece ter um papel significativo em respostas virais. A infecção por HIV leva a produção de interferons do tipo I por células dendríticas plasmocitóides, o que por sua vez leva ao aumento da expressão de TRAIL em linfócitos T CD4⁺. Uma vez que a ligação do vírus com essas células induz a regulação positiva de DR5, sugere-se que este mecanismo pode ser importante para a deleção seletiva dessa população ^[53]. Ainda, foi reportado um aumento da expressão de TRAIL em fibroblastos infectados por citomegalovírus humano ⁽⁶⁹⁾ e em células infectadas com vírus da hepatite C ⁽⁷⁰⁾. Por fim, a deficiência de TRAIL leva ao aumento da severidade da infecção por influenza por diminuir a atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ ⁽⁷¹⁾.

1.2.3 TNF-α-TNF-R

O TNF-α é uma citocina pleiotrópica produzida por um vasto número de tipos celulares e sua atividade envolve a mediação de diversas faces das respostas inflamatória e imunológica, incluindo proliferação, sobrevivência e diferenciação celular ^(57, 72). A interação da proteína com seus receptores pode levar a efeitos protetores, mediados por NFκB, ou induzir apoptose através da ativação das caspases ⁽⁷³⁾.

O mRNA do TNF- α é expresso em várias populações celulares, embora os principais produtores dessa citocina sejam células da linhagem monocítica. Em humanos, o TNF- α se apresenta como uma proteína de 27 kDa ancorada na membrana que pode ser clivada proteoliticamente para sua forma solúvel de 17 kDa solúvel⁽⁷²⁾.

Sua função é exercida via interação com dois receptores, TNFRI e TNFR2, sendo o primeiro amplamente expresso em todo o organismo e o segundo presente principalmente em células do sistema imune. No caso particular do receptor TNFRI, após a interação com o ligante, os DD oligomerizados são então reconhecidos pela proteína TRADD (TNF receptor-associated death domain). TRADD atua como uma molécula adaptadora que pode conduzir tanto a uma resposta apoptótica quanto inflamatória. Na primeira dessas vias, FADD se liga a TRADD, e subsequente, a pró-caspase-8 se liga a FADD, iniciando a cascata de sinalização que conduz a morte celular programada. Na via pró-inflamatória e anti-apoptótica, TRADD recruta outras moléculas adaptadoras, incluindo FADD, RIP1 (*Receptor Interacting Protein 1*) e TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor 2*), resultando na transcrição gênica de NF κ B e AP1 (*Activator Protein 1*).

O TNFR2 não possui DD e pode ser completamente ativado apenas pelo TNF ligado a membrana, mas não pelo TNF solúvel⁽⁷²⁾. Embora pareça que o TNFRII medeia apenas proliferação, há sugestão de que ambos os receptores para TNF- α transduzam sinais em cooperação uma vez que a deleção de qualquer um dos receptores bloqueia quase completamente a sinalização por TNF- α ⁽⁵⁷⁾.

Até o momento, se desconhece o motivo que determina se a ligação do TNF- α ao TNFRI ativar a via de sinalização apoptótica ou inflamatória, entretanto, essa interação parece desencadear simultaneamente sinais pró e anti-apoptóticos. Os sinais pró-apoptóticos não dependem de síntese ativa de proteínas, enquanto a atividade anti-apoptótica sim, uma vez que bloqueadores desta síntese são capazes de tornar a célula mais suscetível a citotoxicidade do TNF- α . Sendo assim, é possível que o balanço entre esses sinais seja determinante para a ativação de NF κ B ou o desencadeamento das caspases⁽⁵⁷⁾.

1.2.4 FLIP

Além de FADD e das caspases iniciadoras, outro grupo de proteínas com domínio DED, as chamadas FLIP (*FLICE-like inducing protein*) pode ser parte

integrante do DISC. FLIP é uma proteína cataliticamente inativa que apresenta domínios efetores de morte em *tandem* e alta homologia as caspases-8 e -10, sendo capaz de interferir na formação eficiente do DISC após interação entre um receptor de morte e seu ligante. Até o presente momento, três formas de FLIP celular (cFLIP) foram identificadas: uma isoforma curta com 26 kDa (cFLIP_S), uma isoforma curta com 24 kDa (cFLIP_R), e uma isoforma longa com 55 kDa (cFLIP_L). Nas formas curtas os motivos DED são seguidos por um conjunto de aminoácidos cruciais para ubiquitinação e degradação destas moléculas. Já na isoforma longa, existe nesta posição, um sítio semelhante ao da caspase sem atividade catalítica ⁽⁷⁴⁾.

A atividade de cFLIP_S e cFLIP_R parece se resumir a capacidade dessas moléculas de competir com as pro-caspases pelos domínios DED, impedindo assim o desencadeamento do processo de morte celular. Já a cFLIP_L, que apresenta maior homologia as pró-caspases-8 e -10, pode promover ou inibir a apoptose dependendo de seus níveis de expressão. Quando expressa em grandes quantidades, essa isoforma compete com as pró-caspases iniciadoras pelo recrutamento no DISC, inibindo a ativação das caspases, e conseqüentemente, a apoptose.

Em contraste, em níveis fisiológicos, essa proteína cFLIP_L parece capaz de suportar a ativação das caspases iniciadoras através da formação de heterodímeros. Ainda, cFLIP_L também é capaz de modular os sinais de morte desviando-os para vias de proliferação e sobrevivência. Há evidências de que níveis moderados de cFLIP_L ativam alostericamente a pró-caspase-8, mantendo-a restrita ao DISC. Dessa maneira a pró-caspase-8, não completamente ativa, atua sobre substratos próximos, incluindo o próprio cFLIP_L, recrutando proteínas específicas, iniciando uma sinalização anti-apoptótica ⁽⁶⁸⁾.

A expressão de cFLIP_S é regulada positivamente por NFκB e c-myc e sua atividade transcricional pode ser suprimida por interação direta entre as proteínas da família AP1 e seu promotor. A meia vida de cFLIP é baixa e sua expressão é altamente controlada pelo sistema ubiquitina-proteassoma, sendo esse sistema de degradação crucial para determinação do balanço entre morte e sobrevivência. É interessante destacar que a sinalização do TNF-α parece ser capaz de inibir a degradação de cFLIP aumentando a resistência das células à ativação da via extrínseca da apoptose ⁽⁷⁴⁾.

1.3 Apoptose em indivíduos com Imunodeficiência Comum Variável

Embora não exista uma extensa literatura sobre o papel da apoptose em células do sistema imunológico na patologia da ICV, alguns estudos reportam um aumento da susceptibilidade a apoptose de linfócitos nestes pacientes ^(27, 47, 48, 75, 76). Sugere-se que a apoptose seja um dos mecanismos implicados na linfopenia encontrada em parte desses indivíduos ^(5, 11) e que esta linfopenia deve-se principalmente à diminuição do número de células B CD19⁺ e T CD4⁺ CD45RA⁺ ^(5, 75, 76).

Os achados relativos a apoptose de linfócitos de pacientes com ICV são controversos. Alguns estudos sugerem que o sistema Fas/FasL participe do aumento da morte celular observada em linfócitos de pacientes com ICV. Saxon e colaboradores encontraram uma maior expressão do marcador Fas e um aumento da apoptose das células T nesses pacientes ⁽⁷⁶⁾. Posteriormente, outro estudo mostrou uma associação dos números absolutos reduzidos de células T CD4⁺ CD45RA⁺ com o aumento da expressão de Fas nessas células e aumento da apoptose espontânea em indivíduos com ICV com linfopenia ⁽⁷⁵⁾.

Entretanto, um estudo posterior não observou diferenças significativas na expressão de Fas e FasL em linfócitos, comparando indivíduos saudáveis e com ICV, embora um subgrupo de pacientes apresentassem linfócitos T com altos níveis de Fas e aumento nos níveis de mRNA de FasL. Não foi encontrada correlação positiva entre linfopenia de células CD4⁺ e o aumento da expressão de Fas e FasL nesse subgrupo de pacientes ⁽⁴⁷⁾, observação que difere da apresentada por Iglesias e colaboradores ⁽⁷⁵⁾.

Paralelamente, foi investigada a participação dos receptores TNFRI e TNFRII no aumento da morte celular espontânea dos linfócitos CD4⁺ em indivíduos com ICV. Foi observado aumento significativo da expressão de mRNA de ambos receptores, embora sem correlação com a contagem de células T CD4⁺ nesses indivíduos. Ainda, sugere-se que a expressão aumentada de tais receptores possa contribuir para o aumento da apoptose, por tornar as células mais susceptíveis aos níveis normais de TNF- α circulante ⁽⁴⁷⁾. A **Tabela 1** resume os estudos que avaliaram apoptose em indivíduos com imunodeficiência comum variável.

Tabela 1 - Resumo dos estudos que avaliaram apoptose em pacientes com ICV

Expressão de CD95	CD95L	Apoptose Espontânea	Apoptose induzida	TNFR1	TNFR2	Bcl-2	Bax	Bcl-xl	Correlações	Ref.
↑ em linfócitos B ↑ em linfócitos T Normal em células mielóides	N/A	↑ linfócitos B ↑ linfócitos T CD3 ⁺	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não discutidas	(76)
↑ em linfócitos CD4 ⁺ CD45RA ⁺	N/A	↑ em linfócitos T de pacientes com linfopenia	(-)*	N/A	N/A	(-)	(-)	N/A	Não discutidas	(75)
↑ em células mononucleares de pacientes linfopênicos	↑ em células mononucleares de pacientes linfopênicos	N/A	(-)*	↑ CD4 ↑ CD8	↑ CD4	(-)	(-)	(-)	Não encontradas	(47)
N/A	N/A	↑ em linfócitos CD3 ⁺	↑ linfócitos CD3 ⁺	N/A	N/A	(-)	N/A	↓ linfócitos CD3 ⁺	Não discutidas	(48)
↑ em células CD4 ⁺	N/A	↑ em linfócitos CD4 ⁺ ↑ em linfócitos CD8 ⁺	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Linfopenia CD4 ⁺ CD45RA ⁺ correlaciona-se com maior severidade de manifestações clínicas	(27)

Os quadros apresentam resultados de pacientes com ICV em relação a resultados obtidos com indivíduos saudáveis. (*) Apoptose induzida por estimulação com anti-CD95, antes e depois de ativação com anti-CD3. (**) Apoptose induzida por irradiação com ou sem estimulação com anti-CD3 e anti-CD28. (N/A) fenótipos não avaliados. Quadros rosas indicam que não foram encontradas diferenças significativas entre controles e pacientes. Quadros verdes representam resultados que foram estatisticamente significativos em comparação aos controles. Em cinza, parâmetros não avaliados pelos estudos citados.

2 OBJETIVOS

Objetivo I: Imunofenotipagem de linfócitos T e B a partir de células mononucleares de sangue venoso de pacientes com ICV e indivíduos saudáveis.

- Análise da frequência de linfócitos T CD3⁺CD4⁺, T CD3⁺CD8⁺ e CD19⁺ e de células CD4⁺ e CD8⁺ *naïve* e de memória através co-marcação com CD45RA e CD45RO.

Objetivo II: Avaliação da frequência de células em apoptose espontânea a partir de células mononucleares de sangue venoso de pacientes com ICV e indivíduos saudáveis.

- Análise da frequência de apoptose espontânea de linfócitos por externalização de resíduos de fosfatidilserina marcados com Anexina-V e incorporação de iodeto de propídio (PI)
- Análise da frequência de apoptose espontânea de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em por externalização de resíduos de fosfatidilserina e co-marcação com Anexina-V, CD4 e CD8.

Objetivo III: Avaliar a expressão dos receptores de morte, seus respectivos ligantes e moléculas adaptadoras e reguladoras envolvidas na via extrínseca da apoptose em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos com ICV e indivíduos saudáveis..

- Análise dos níveis de expressão gênica dos receptores de morte Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNF-R1 e TNF-R2;
- Análise dos níveis de expressão gênica dos ligantes dos receptores de morte FasL, TRAIL e TNF- α ;
- Análise dos níveis de expressão gênica da molécula adaptadora FADD;
- Análise dos níveis de expressão gênica das moléculas inibidoras cFLIP_L e cFLIP_S.

Objetivo IV: Investigar se há relação entre a frequência de células apoptóticas, os níveis de expressão das moléculas envolvidas na via extrínseca da apoptose e a das subpopulações de linfócitos avaliadas nos pacientes com ICV e indivíduos saudáveis.

Objetivo V: Analisar a possível identificação de fenótipo(s) comum(ns) em pacientes com ICV, a partir das análises das subpopulações de linfócitos e da apoptose espontânea.

3 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Dezenove indivíduos diagnosticados com ICV, 10 do sexo feminino e 9 do sexo masculino, com idade entre 20 e 77 anos (média: 40,7 anos) foram avaliados. No momento da coleta, apenas o Paciente 17 apresentava número absoluto de linfócitos abaixo do normal ($< 0,9$ células/mm³). O grupo controle contou com dezenove indivíduos voluntários, sem histórico de imunodeficiência, sendo 11 do sexo feminino e 8 do sexo masculino, com idade entre 21 e 75 anos (média: 38,7), recrutados no Hospital Israelita Albert Einstein.

Os pacientes recrutados encontravam-se acompanhamento na Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) ou no Hospital Israelita Albert Einstein. Os critérios diagnósticos e clínicos utilizados estão de acordo com os estabelecidos pelo Grupo Pan-Americano de Imunodeficiência (PAGID) e Sociedade Européia de Imunodeficiências (ESID) ^[22]. A seleção dos pacientes foi realizada sob a responsabilidade dos médicos Dr. Luiz Vicente Rizzo, Dra. Cristina Kokron e Dra. Myrthes Toledo Barros. A **Tabela 2** traz um resumo das informações referentes aos pacientes incluídos neste estudo.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram: (i) uso atual de drogas imunossupressoras, (ii) gravidez e (iii) menores de 18 anos de idade. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEP # 921, **Anexo 1**). A coleta de sangue dos indivíduos ocorreu após o preenchimento do consentimento informado por escrito e, no caso dos pacientes, imediatamente antes de receberem o tratamento terapêutico com Imunoglobulina Intravenosa (IgIV). Todos os procedimentos realizados não ultrapassam os limites descritos de risco mínimo de acordo com a regulamentação da convenção de Genebra para pesquisa com seres humanos e do Conselho Nacional de Saúde.

Tabela 2 – Informações clínicas e demográficas os pacientes com ICV estudados

ID	Sexo	Idade (anos)	Linfócitos (cel/mm ³)	Doença Autoimune	Infecções	Esplenomegalia	Bronquiectasia	Linfadenomegalia	Hipotireoidismo	Neoplasia
P1	F	30	3200	Retocolite Ulcerativa, Anemia Megalobástica	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
P2	M	31	1500	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
P3	F	54	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
P4	M	23	1600	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
P5	M	28	1700	Doença Celíaca	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
P6	M	56	1600	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
P7	M	55	1200	Vitiligo	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
P8	F	24	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
P9	F	26	2100	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
P10	F	28	1900	NÃO	SIM	N/D	SIM	NÃO/D	NÃO	NÃO
P11	F	33	2300	Hipotireodismo	SIM	N/D	SIM	SIM	SIM	NÃO
P12	F	31	2000	Púrpura Trombocitopênica	SIM	N/D	NÃO	NÃO/D	NÃO	NÃO
P13	F	39	2300	NÃO	SIM	SIM	NÃO	N/D	NÃO	NÃO
P14	F	60	2100	NÃO	SIM		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
P15	F	73	2800	NÃO	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
P16	M	33	2000	Púrpura Trombocitopênica	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
P17	F	20	800	Doença Desmielinizante	SIM	N/D	NÃO	N/D	NÃO	NÃO
P18	F	53	2700	Diabetes, Pancolite Hipotireodismo	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO
P19	M	77	2100	Hipotireodismo Gastrite Atrófica	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	Vesícula, Cólon

N/D: Informação não disponível.

3.2 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Venoso

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas a partir de 30 mL de sangue total heparinizado utilizando gradiente de centrifugação Ficoll/Hypaque (GE Life Sciences). Todo material foi processado imediatamente após o recebimento. Brevemente, o sangue foi diluído 1:1 (v/v) em PBS (Tampão Fosfato Salina, pH 7.4) e adicionado cuidadosamente a tubo contendo Ficoll/Hypaque em diluição (v/v, em relação a sangue e PBS). Após centrifugação por 20 minutos a 1000g a 20 °C, as células foram coletadas da interface entre o gradiente de centrifugação e o soro, e lavadas com PBS com 1% de soro humano AB (Invitrogen) por centrifugação por 5 minutos a 400g a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco) com 10% de soro humano AB (Invitrogen). Uma alíquota de 10 µL das células obtidas foi diluída 1:10 (v/v) em azul de Tripán para verificação da viabilidade das células e contagem em Câmara de Neubauer.

3.3 Cultura de células para avaliação da apoptose espontânea

Para avaliação da ocorrência de apoptose espontânea, 5×10^5 células do PBMC foram adicionadas a placas de fundo chato com 96 poços contendo DMEM (Dulbecco) com 10% de soro próprio indivíduo perfazendo um volume final de 250 µL por poço. As células foram, então, mantidas em estufa em 10% de CO₂ a 37 °C por 2 horas. Para fins de padronização, foi elaborada uma curva com diferentes tempos de cultura: 2h, 4h e 24h de incubação

3.4 Marcação de células das células mononucleares com anticorpos monoclonais

Células mononucleares foram marcadas com três painéis de anticorpos (**Tabela 3**). Antes do início da marcação do painel C, as células foram deixadas em cultura, conforme descrito no item 3.3.

Tabela 3 – Painéis de anticorpos monoclonais e Anexina-V para marcação de células mononucleares de sangue venoso de controles e pacientes com ICV e controles saudáveis

Painel	Anticorpos*			
A	Anti-CD3-FITC	Anti-CD4-PE	Anti-CD8-PerCPCy5.5	Anti-CD19-PE.Cy5
B	Anti-CD45RA-FITC	AntiCD45RO-PE	Anti-CD8-PerCPCy5.5	Anti-CD4-APC
C	Anexina-V-FITC**	Anti-CD4-PE	Anti-CD8-PerCPCy5.5	
D***		Anti-CD4-PE	Anti-CD8-PerCPCy5.5	Anti-CD19-PE.Cy5

* Todos os anticorpos utilizados, BD Pharmingen; ** Marcação realizada posteriormente conforme descrito no *item 3.5*; *** Painel de anticorpos utilizado para separação de células por *sorting* em citometria de fluxo, conforme descrito no *item 3.6*.

Para cada um dos painéis, 5×10^5 células foram transferidas para placa de fundo cônico e lavadas duas vezes com tampão de 200 μ L de tampão de marcação (PBS com 1% SFB e 0,1% azida sódica e centrifugação a 400g por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, as células receberam 50 μ L de solução contendo os anticorpos do respectivo painel. As células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C protegidas da luz e lavadas novamente com 200 μ L de tampão de marcação e centrifugação a 400g por 5 minutos a 4 °C. O pellet foi ressuscitado em 300 μ L de tampão de marcação. A análise foi feita imediatamente em citômetro de fluxo FACS Aria (BD, Biosciences) para os Painéis A e B. As células do painel C foram também marcadas com Anexina-V-FITC, conforme descrito no *item 3.5* e encaminhadas para análise por citometria de fluxo. Foram utilizados 0,5 μ L do anticorpo anti-CD8 PerCP.Cy5.5 e 5 μ L dos outros anticorpos diluídos em tampão de marcação para cada amostra.

3.5 Análise de apoptose por externalização de resíduos de fosfatidilserina e incorporação de iodeto de propídio (PI)

Após cultura de 2 horas, as células foram transferidas para placa de cultura de fundo cônico de 96 poços, e centrifugadas a 400g por 5 minutos em temperatura ambiente. O pellet foi lavado com 200 μ L de tampão de ligação de Anexina-V (10 mM

HEPES, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 1,8mM CaCl₂) seguido de centrifugação a 400g por 5 minutos em temperatura ambiente. A marcação dos resíduos de fosfatidilserina foi realizada com 95 µL de tampão de ligação e 5 µL de Anexina-V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Pharmingen), seguida de incubação por 20 minutos em temperatura ambiente protegida da exposição à luz. Após este período, as células foram transferidas para tubos e foram adicionados 400 µL de tampão de ligação e 40 µL de iodeto de propídio (PI). Como controle negativo da marcação, 5 x 10⁵ células passaram por todo o procedimento, substituindo-se a adição de Anexina-V-FITC e PI por tampão de ligação. O mesmo procedimento foi realizado para a marcação concomitante das células com Anexina-V-FITC e anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, excetuando-se a adição de iodeto de propídio. A análise foi feita imediatamente em citômetro de fluxo FACSaria (BD, Biosciences).

3.6 Separação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

A separação de células baseou-se na marcação mutuamente excludente dos marcadores de superfície CD4, CD8 e CD19 no *gate* de linfócitos discriminado por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). As estratégias de *sorting* adotadas são mostradas nas **Figuras 1** e **2**. Células mononucleares de sangue periférico foram transferidas para tubo contendo meio DMEM com 10% de soro humano AB em concentração final de 20 x 10⁶ células/mL. Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpos monoclonais (Painel D, **Tabela 3**) por 30 minutos a 4°C protegidas da luz. Após incubação, as células foram lavadas com PBS contendo 1% de soro humano AB por centrifugação a 400g por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspensionado em 1 ml de DMEM (Dulbecco) com 10% de soro humano AB (Invitrogen) e encaminhado para o procedimento de separação em citômetro de fluxo FACSaria (BD, Biosciences). Foram utilizados 100 µL de cada subpopulação de células obtidas para análise de pureza e o restante centrifugado a 400g por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de RNA Protect Cell Reagent (Quiagen), seguido de vigorosa agitação por 1 minuto, e as amostras imediatamente armazenadas a -80° C para posterior extração de RNA.

Figura 1 – Estratégia de separação de células CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ a partir de células mononucleares de sangue venoso de controles e pacientes com ICV

(A) Estratégia de *sorting* para três subpopulações de linfócitos. (B-D) Pureza das populações CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺, respectivamente, avaliada imediatamente após o *sorting* de células. Os quadros vermelhos destacam em (A) a frequência de cada população separada na amostra e em (B), (C) e (D) a porcentagem de pureza obtida para a respectiva subpopulação de linfócito.

Figura 2 – Estratégia de separação e pureza de células CD4⁺ e CD8⁺ a partir de células mononucleares de sangue venoso de controles e pacientes com ICV

(A) Estratégia de *sorting* para duas populações de linfócitos. (B) e (C) Pureza das populações CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente, avaliada imediatamente após o *sorting* de células. Os quadros vermelhos destacam em (A), a frequência de cada população separada na amostra e em (B) e (C) a porcentagem de pureza obtida para a respectiva amostra.

3.7 Extração de RNA

O protocolo de extração com RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) foi realizado de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram centrifugadas a 300g por 5 minutos em temperatura ambiente, e o pellet ressuscitado em quantidade suficiente de tampão de lise fornecido pelo kit para o número de células (350 μ L de tampão de lise para até 5×10^6 células, ou 600 μ L para amostras maiores). A amostra foi então agitada vigorosamente por um minuto, homogeneizada com auxílio de agulha de 20G por cinco vezes, transferida para coluna de eliminação de DNA e centrifugada a 8000 g por 30 segundos em temperatura ambiente. Em seguida, o mesmo volume (350 ou 600 μ L) de etanol 70% foi adicionado ao lavado e então transferido para coluna de extração de RNA, e o conjunto foi centrifugado por 15 segundos a 8000 g em

temperatura ambiente. A coluna foi, então, lavada com a adição de 700 μL de tampão RW1 seguida de centrifugação a 8000 g por 15 segundos em temperatura ambiente. A seguir, 500 μL do tampão RPE foi adicionado à coluna e, novamente, o conjunto foi centrifugado a 8000 g em temperatura ambiente, primeiramente por 15 segundos e, após adição de outros 500 μL do mesmo tampão, por 2 minutos. A coluna foi, em seguida, centrifugada a 14.000 g por 1 minuto em temperatura ambiente para retirada de resíduos do etanol ou dos tampões utilizados.

Por fim, a coluna foi transferida para tubo coletor e lavada com 30 μL de água livre de RNase, seguida de centrifugação por 1 minuto a 8000 g em temperatura ambiente.

Foi utilizado 1,0 μL do RNA obtido em cada amostra para determinação da concentração e pureza do RNA por espectrofotômetro, com qual foram avaliados três parâmetros: (i) concentração RNA em ng/ μL , (ii) razão entre as leituras obtidas nas absorvâncias em 260nm e 280nm ($A_{260/280}$), e (iii) razão entre as leituras obtidas nas absorvâncias em 260nm e 230nm ($A_{260/230}$), de acordo com instruções do fabricante do aparelho (Nano Vue, GE Life Science). A integridade do RNA de amostras de um indivíduo controle foi analisada através de fracionamento em gel de agarose 1% sob condições desnaturantes.

3.8 Preparo do controle positivo das reações de PCR

Devido a significativa expressão de parte dos genes da via extrínseca da apoptose em células T ativadas e da baixa expressão de alguns genes, como FasL, em linfócitos T *naïve*, as células Jurkat foram utilizadas como controle positivo da avaliação da funcionalidade dos oligonucleotídeos iniciadores. Células Jurkat foram estimuladas com 100 ng/mL de fitohemaglutinina (PHA) (Gibco) e 50 ng/ml de lipopolissacarídeos (LPS) (Invitrogen) por 4 ou 24 horas. Como controle positivo das reações de PCR quantitativo das amostras dos controles e pacientes, células mononucleares de sangue venoso de controles saudáveis foram coletadas e separadas conforme descrito no *item* 3.2 e estimuladas com PHA e LPS, nas mesmas condições utilizadas para as células Jurkat. O RNA dos controles positivos foi extraído como descrito no *item* 3.7

3.9 PCR Quantitativa

A transcrição reversa foi realizada a partir de 1 µg de RNA total com o kit Omniscript (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. Resumidamente, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado em reação contendo 2 µL de Buffer RT (1x), 2 µL de dNTP mix (0,5 mM de cada dNTP), 2 µL de oligo-dT (1 µM, 0,5 ug) e 1 µL da enzima Omniscript, em volume final de 20 µL, incubada por 60 minutos a 37 °C. A eficácia das reações foi avaliada através de uma reação de PCR quantitativo para o gene da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT). Alíquotas do cDNA obtidas foram diluídas 20 vezes e armazenadas.

Os oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* para os genes selecionados, mostrados na **Tabela 4**, foram desenhados através do *software* Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) ou retirados da literatura. Neste último caso, foram utilizados os seguintes parâmetros: (i) conteúdo de citosina-guanina entre 30 e 80%, (ii) temperatura de anelamento entre 58 °C e 60 °C, e (iii) iniciadores sem capacidade de anelamento entre si ou de formar estrutura secundária e *amplicon* de 50 a 150 pares de base. Ainda, os iniciadores foram desenhados, quando possível em éxons diferentes, preferencialmente separados por íntrons entre 80 e 200 pares de base para permitir o monitoramento da amplificação simultânea a partir de DNA genômico e evitar a amplificação de contaminante de amplicon de mesmo tamanho do transcrito. Quando aplicável, foram selecionados os éxons comuns às variantes de *splicing* alternativo e localizados na extremidade 3' do gene para garantir maior representatividade de todos os transcritos. As curvas de dissociação foram analisadas quanto à amplificação de DNA genômico, formação de dímeros de iniciadores e variantes de *splicing* (**Figura 3**, Painel A).

As reações de amplificação foram padronizadas inicialmente variando a concentração de iniciadores com reações de concentração final de 50, 100, 200, ou 400 nM. Foi escolhida a concentração mais adequada para cada par de iniciadores, considerando-se menor Ct e a ausência de dímeros de iniciadores. A concentração utilizada para cada par de oligonucleotídeos encontra-se na **Tabela 5**. Em seguida, foram realizadas reações para determinar a eficiência de amplificação de cada par de

iniciadores. Para isso foi construída uma curva padrão utilizando quantidades decrescentes de cDNA, obtidas diluindo seriadamente 10 vezes a cada etapa (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000) (**Figura 3**; Painei B, **Figura 4**). Os resultados referentes à eficiência de cada par de *primers* também são mostrados na **Tabela 5**. Para TNF-RI e TNF α foram utilizadas sondas *Taqman* (Applied Biosystem).

Tabela 4 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados em reações de PCR quantitativa dos genes normalizadores e genes de interesse

Gene Alvo	Nome Oficial	Sequência do iniciador 5'-3' FW (Acima); RV (Abaixo)	Amplicon	mRNA	Íntron
β-actina	ACTB	GGCACCCAGCACAAATGAAG	66pb	NM_001101	112pb
		CCGATCCACACGGAGTACTTG			
GAPDH	GAPDH	ATTGCCCTCAACGACCACTT	64pb	NM_002046	104pb
		TGCTGTAGCCAAATTCGTTGTC			
TNF-RI	TNFRSF1A	Hs01042313_m1(*)	55pb	NM_001065	N/D
TNF-II	TNFRSF1B	GGCCTTGGTTCCCTTGTGT	64pb	NM_001066	Não
		CCAGCATACAGTGCAAACCTTTCA			
DR-4	TNFRSF10A	GGTGCTGACCCCACTGAGA	61pb	NM_003844	5118pb
		AGGGCACGATGTTTGCAAA			
DR-5	TNFRSF10B	TTGGTGTCTTTCATGCTTCTG	78pb	NM_003842	Não
		CAATGTGCTTCCTTGTGTATTATAACA			
FLIP_S	CFLAR	CAAGCAGCAATCCAAAAGAGTCT	71pb	NM_001127184	934pb
		CAATGGGCATAGGGTGTATCA			
FLIP_L	CFLAR	GCTGCCACTCTAATCCTCCTCTT	72pb	NM_001127184	Não
		GGCAAATCATAGAGACAGAAAATGG			
Fas	TNFSFR6	CAACAACCATGCTGGGCATC	99pb	NM_000043	12122pb
		TGATGTCAGTCACTTGGGCATTAAC			
FasL	TNFSF6	AAAGTGGCCCATTTAACAGGC	82pb	NM_000639	Não
		AAAGCAGGACAATTCCATAGGTG			
FADD	FADD	CAGCACTCTCTAAATCTTCCTTGTA	108pb	NM_003824	2387pb
		GCCTTGGCAATTCTGTTATCAGA			
TNFα	TNFSF10	Hs00174128_m1(*)	123pb	NM_000594	N/D
TRAIL	TNFSF10	TCCTCAGAGAGTAGCAGCTCACA	133pb	NM_003810	16688pb
		TGAATGCCCACTCCTTGATG			

N/D: não disponível; (*) Número de catálogos das sondas *Taqman* para TNF α e TNFRI (Applied Biosystem). Oligonucleotídeos previamente publicados: Fas⁷³, FasL⁷⁴ e TRAIL⁷⁶.

Figura 3 – Curvas para análise da amplificação das reações de PCR quantitativa.

(A) Curva de dissociação do *amplicon* gerado com iniciadores do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). (B) Curva de amplificação de amostras com iniciadores do gene GAPDH. As abscissas representam a temperatura e as ordenadas, a intensidade de fluorescência.

As reações para avaliação da expressão gênica nas amostras estudadas foram realizadas em duplicata com 1X SYBR Green Master Mix (Qiagen), 1 μ L de cDNA diluído 20 vezes (exceto para curva padrão) e oligonucleotídeos iniciadores nas concentrações selecionadas em volume final de 15 μ L. Como controle positivo, foi utilizado cDNA das células descritas no item 3.9. Como controle negativo de cada iniciador, foi utilizada água estéril para completar o volume da reação de amplificação. Todas as reações foram realizadas no termociclador ABI Prism® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ou 35 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C ou 61 °C por 1 minuto e finalizadas com curva de dissociação a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e 95 °C por 15 segundos, conforme detalhado na **Tabela 5**.

A expressão relativa de TNF e TNFRI foi avaliada através de reações de PCR quantitativa com sondas TaqMan. Foram preparadas reações em duplicata com 1X TaqMan Gene Expression Master Mix, 1X TaqMan Gene Expression Assay (TNF: Hs00174128_m1; TNFRI: Hs01042313_m1), 2 μ L de cDNA diluído 20 vezes, em volume final de 15 μ L. Cada experimento foi acompanhado de controle negativo (água) e

controle positivo/amostra calibradora/amostra referência (cDNA de PBMC estimulado com PHA por 4 horas) preparados nas mesmas condições que as amostras. As reações foram incubadas a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto (**Tabela 5**).

Figura 4 – Curva de eficiência padrão para as reações de PCR

Curva construída a partir de reações de PCR quantitativa com o gene GAPDH. Na abscissa estão representadas quantidades decrescentes de cDNA de RNA referência (obtidas diluindo 10 vezes seriadamente). Na ordenada estão representados os valores de Ct (*Cycle threshold*). No canto direito, o *software* fornece a inclinação da curva (slope), intercepto em y e R^2 .

Após o término da reação, a qualidade das reações foi analisada através do *software* SDS 2.3 (Applied Biosystems). Com auxílio das curvas de amplificação ou *amplification plot*, foi ajustado na fase exponencial do gráfico o *threshold* ou limiar de intensidade de fluorescência na qual foram tomados os valores de ciclos ou Ct (*Cycle Threshold*) de cada reação. Para todos os experimentos de PCR quantitativo foram consideradas aceitáveis duplicatas com desvio padrão menor que 0,5.

Tabela 5 - Condições utilizadas nas reações de PCR quantitativa dos genes normalizadores e genes de interesse.

Gene Alvo	Concentração	Eficiência	Tm cDNA	Número de Ciclos	Ciclagem
βactina	400nM	1,99	82°C	40 [†]	95 °C (10 minutos) + Número de ciclos indicados na coluna anterior. 95 °C (15 segundos) 60 °C ou 61 °C (1 minuto) + Curva de dissociação 95 °C (15 segundos) 60 °C (15 segundos) 95 °C (15 segundos)
GAPDH	400nM	1,97	78 °C	40 [†]	
TNF-RI ^ε	100nM	2,00	79 °C	40 [†]	
TNF-RII	100nM	1,99	79 °C	35 ^ε	
DR-4	200nM	1,99	79 °C	35 ^ε	
DR-5	200nM	1,96	77 °C	35 ^ε	
FLIP_S	200nM	1,96	77 °C	35 ^ε	
FLIP_L	200nM	1,93	77 °C	35 ^ε	
Fas	400nM	1,96	80 °C	35 ^ε	
FasL	400nM	2,00	80 °C	35 ^ε	
FADD ^ε	400nM		75 °C	35 ^ε	
TNFα ^ε	200nM	2,00	85 °C	40 [†]	
TRAIL	50nM	1,93	82 °C	35 ^ε	

Tm= Temperatura de melting; cDNA= DNA complementar; [†]Temperatura de annealing = 60 °C; ^cTemperatura de annealing = 61 °C

A inclinação ou *slope* (S) da curva foi utilizado para o cálculo da eficiência segundo a fórmula proposta por Rasmussen (2001) ⁽⁷⁷⁾, onde Eficiência = $10^{1/S}$. Para os genes normalizadores (ACTB e GAPDH) foi calculada a diferença entre Ct_{ref} e Ct_{amostra}. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo do fator de normalização através do *software* GeNorm ⁽⁷⁸⁾. A expressão relativa dos genes selecionados foi calculada baseando-se na fórmula proposta por Pfaffl (2004) ⁽⁷⁹⁾, adicionando-se o fator de normalização:

$$\text{Expressão}_{\text{amostra}} = \frac{(\text{Ct}_{\text{REF}} - \text{Ct}_{\text{amostra}}) \cdot \text{Eficiência}_{\text{gene-alvo}}}{\text{Fator de normalização}}$$

3.10 Análise estatística

Para a comparação da frequência de linfócitos avaliados entre o grupo de pacientes com ICV e os indivíduos controle foram utilizados testes de diferença de proporção. O teste t de Student foi utilizado quando os dados apresentaram uma curva de distribuição normal, conforme o teste de normalidade D'Agostino & Pearson; caso contrário, foi aplicado o teste de Mann Whitney. Quando pertinente, a variância foi avaliada por teste F , em caso de diferença para este parâmetro, foi aplicado o teste t de Student com correção de Welch. As correlações foram realizadas por regressão linear. As análises de clusterização foram feitas com o software StatistiXL para Excel versão 1.8 para Windows (StatisXL) por correlação de Pearson. Foi considerada a probabilidade mínima de $p \leq 0,05$ para todas as análises estatísticas. Todos os demais testes foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 5.00 (Graph Software Inc.).

4 RESULTADOS

4.1 Separação das células CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺

A separação das subpopulações de linfócitos a partir de células mononucleares de sangue venoso de controles e pacientes com ICV foi realizada através de marcação mutuamente excludente de CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ *gate* de linfócitos, definido por parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Uma vez estabelecido o protocolo de separação das duas populações de linfócitos T, as células CD19⁺ também foram separadas, sem prejuízo do objetivo inicial. Os linfócitos CD19⁺ foram armazenados para análises posteriores.

Figura 5 – Análise de pureza das populações CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ obtidas

Resultados representativos da pureza das populações CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ obtidas a partir de células mononucleares de sangue venoso de um indivíduo saudável (Painéis A, B e C; Controle # 5) e paciente com ICV (Painéis D, E e F; Paciente #15). Os painéis A e D referem-se aos linfócitos CD4⁺, B e E, aos CD8⁺ e, C e F, CD19⁺. O número imediatamente ao lado do quadrante de cada população indica a frequência das células dentro do *gate* selecionado.

Imediatamente após o término de todos os ensaios de separação foi realizada a análise da pureza das populações obtidas por citometria de fluxo. Amostras com pureza inferior a 95% foram excluídas das análises por PCR em tempo real. A **Figura 5** mostra a análise da pureza de células $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD19^+$ obtidas a partir de um indivíduo saudável (Controle # 5) e de um paciente com ICV (Pacientes # 15).

4.2 Análise da frequência de células $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD19^+$

Dados da literatura relatam que parte dos indivíduos diagnosticados com ICV apresenta diminuição na contagem absoluta e redução da frequência de linfócitos T $CD4^+$, que pode estar associada à linfopenia total, entretanto a distribuição de populações celulares é variada nos diferentes estudos e coortes [43-48].

Sendo assim, como primeira etapa, foram analisadas as frequências de células $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD19^+$ nas amostras de células mononucleares de sangue venoso dos pacientes com ICV e controles saudáveis no momento da realização da separação celular. Os *gates* estabelecidos para a realização destas análises são demonstrados na **Figura 6**.

Figura 6 – Análise das de linfócitos $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD19^+$

Resultados representativos das populações $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD19^+$ avaliadas pela marcação de células mononucleares de sangue periférico de um paciente com ICV (Painéis A e B; Paciente #16) e de um indivíduo saudável (Painéis C e D; Controle #6). Os painéis mostram população selecionada a partir do *gate* de linfócitos determinado por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Ao lado dos quadros, porcentagem de células dentro do *gate* mostrado.

Como mostrado na **Figura 7** (Painel A), o grupo de pacientes com ICV apresentou menor frequência de células CD4⁺ ($32,9 \pm 13,0$, $p = 0,0047$, $n=18$) quando comparado aos indivíduos saudáveis ($43,7 \pm 7,6$, $n = 18$). Os pacientes ainda apresentavam frequência aumentada de células CD8⁺ ($29,0 \pm 11,1$, $p = 0,0153$, $n = 18$) em comparação aos controles ($21,54 \pm 5,6$, $n = 18$) (**Figura 7**, Painel B).

Embora o fenótipo da ICV seja associado a um transtorno primordialmente humoral, caracterizado pela baixa produção de anticorpos, não foi observada diferença significativa na frequência de células CD19⁺ nas amostras de pacientes com ICV ($15,2 \pm 9,6$; $n = 18$) em comparação aos indivíduos saudáveis ($13,11 \pm 3,6$; $n = 14$; $p = 0,4276$) (**Figura 7**, painel C).

Destaca-se, entretanto, que a frequência de células CD19⁺ mostrou diferença na comparação entre os grupos de controles saudáveis e pacientes com ICV quando levado em consideração o parâmetro variância (F test: $p = 0,0007$), sendo que o grupo de controles apresentou uma distribuição mais homogênea quanto à frequência células CD19⁺ no sangue. A comparação das médias dos grupos levando em conta esta diferença, através de Teste t de Student não pareado com correção de Welch, também não mostrou diferença significativa entre as médias ($p = 0,3978$)

Figura 7 – Frequência de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ em controles e pacientes com ICV.

Células mononucleares de sangue periférico foram marcadas para CD4, CD8 e CD19. Os painéis referem-se a (A) Frequência de células CD4⁺; (B) Frequência de células CD8⁺ e (C) Frequência de células CD19⁺. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

4.3 Avaliação da frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em pacientes com ICV

A primeira análise da frequência das populações de CD4⁺ e CD8⁺ foi realizada concomitantemente com a realização da separação destas células para extração de RNA, para a qual não se utilizou marcação com anticorpo anti-CD3. Para confirmar se a frequência de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ correspondia às alterações no compartimento de células T, foi realizado um ensaio de imunofenotipagem com a marcação de CD3.

Com relação à frequência de células T CD3⁺, não foram observadas diferenças na comparação entre o grupo de pacientes ($60,28 \pm 5,36$, $p = 0,09$, $n = 12$; **Figura 8**, Painel A) e indivíduos saudáveis ($70,45 \pm 2,09$, $n = 13$), embora o grupo de pacientes apresenta-se menos homogêneo do que o grupo controle. (F test: $p = 0,0028$). A aplicação da correção de Welch não impactou na comparação das médias dos grupos por teste t de Student não pareado ($p = 0,1126$).

Nesta segunda análise, confirmou-se o perfil verificado anteriormente no grupo de pacientes. Observa-se menor frequência de linfócitos T CD4⁺ ($39,93 \pm 15,15$; $p = 0,0013$, $n = 12$) quando comparados ao grupo controle ($58,06 \pm 9,14$, $n = 13$; **Figura 8** - painel B). Ainda, a frequência de linfócitos T CD8⁺ encontrada foi também semelhante, confirmando aumento desta frequência nos pacientes ($46,82 \pm 13,31$; $p = 0,0051$, $n = 12$) quando comparados ao grupo controle ($31,53 \pm 7,85$, $n = 13$; **Figura 8**, Painel C).

Como mostrado no Painel D da **Figura 8**, quanto aos linfócitos B, novamente, não foram encontradas diferenças estatísticas entre pacientes ($12,51 \pm 9,94$; $p = 0,2300$, $n = 12$) e controles ($13,57 \pm 2,27$, $n = 13$); e o grupo controle apresentou menor variação de frequência desta população de linfócitos em comparação aos pacientes com ICV, o que foi confirmado por teste F para comparar as variâncias (F test: $p > 0,0001$). A aplicação da correção de Welch não impactou na comparação das médias dos grupos por teste t de Student não pareado ($p = 0,7378$).

Figura 8 – Frequência das subpopulações de linfócitos TCD3⁺CD4⁺, TCD3⁺CD8⁺ e CD19⁺ em controles e pacientes com ICV

Células mononucleares de sangue venoso foram marcadas para CD3, CD4, CD8 e CD19. Os painéis referem-se a (A) Frequência de células CD3⁺; (B) Frequência de células CD3⁺CD4⁺; (C) Frequência de células CD3⁺CD8⁺ e (D) Frequência de células CD19⁺. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

4.4 Análise da relação entre as populações linfocitárias

Em seguida, foi analisado se a alteração na frequência dos linfócitos avaliados refletia nas razões entre estas subpopulações celulares. Cerca de 40% dos pacientes ($n = 7/18$) apresentou relação CD4/CD8 abaixo de 0,9, que representa o limite inferior do aceito como valor de referência para este parâmetro e ressalta-se que o grupo de pacientes com ICV apresentou razão CD4/CD8 significativamente menor ($1,33 \pm 0,86$; $p = 0,0008$) quando comparado ao grupo controle ($2,1 \pm 0,8$) (**Figura 9**, Painel A). Não foi observada diferença estatística para a razão CD4/CD19 entre o grupo de controles ($3,7 \pm 1,4$; $p = 0,5931$; $n = 15$) e pacientes ($3,3 \pm 2,6$; $n = 18$). (**Figura 9**, Painel B).

Figura 9 – Razão entre linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ em controles e pacientes com ICV

Razão calculada a partir da frequência de linfócitos definidos por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) marcados para CD4, CD8 e CD19 com ou sem CD3. Os painéis referem-se a (A) razão CD4/CD8 (C) razão TCD4/TCD8, (B) razão CD4/CD19 e (D) razão TCD4/CD19. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

O mesmo perfil se repetiu na segunda coleta (**Figura 9**, Painéis C e D), quando os ensaios foram realizadas com a marcação com anti-CD3 para garantir tratar-se da população de linfócitos T, com os pacientes apresentando razões CD4/CD8 menores ($1,09 \pm 0,67$; $p = 0,0051$, $n = 12$) em comparação aos controles saudáveis ($2,14 \pm 0,76$; $n = 13$) e razões CD4/CD19 comparáveis (ICV: $4,81 \pm 6,27$; $n = 12$; Controles: $3,37 \pm 0,78$; $n = 12$; $p = 0,3099$). Nesta segunda análise, 50% dos pacientes com ICV ($n = 6/12$) e um indivíduo do grupo controle (Controle # 3) apresentaram razão CD4/CD8 menor do que o valor de referência para o parâmetro (0,9).

4.5 Análise da frequência células CD3⁻CD8⁺ em pacientes com ICV

Uma vez que a separação das células foi realizada sem a adição do anticorpo anti-CD3, e que células NK podem expressar níveis baixos ou intermediários da molécula CD8⁺, foi realizada a análise da população de linfócitos CD8^{high} que não expressava CD3, para se estimar o impacto de uma possível contaminação com linfócitos não T nas amostras que foram utilizadas para extração do RNA e subsequente análise da expressão gênica dos receptores de morte e moléculas associadas. Tal análise nos permitiu verificar a baixa frequência de células CD3⁻CD8⁺, avaliada a partir do *gate* de linfócitos, tanto no grupo dos controles ($0,50 \pm 0,43$; $n = 13$) quanto nos pacientes ($0,61 \pm 0,68$; $n = 12$), descartando a possibilidade de uma contaminação significativa com células NK nas amostras separadas para análise por Real Time.

4.6 Análise da expressão de CD45RA e CD45RO em linfócitos

A expressão de CD45RA e CD45RO nos linfócitos de 10 pacientes com ICV e 10 indivíduos saudáveis foi avaliada por citometria de fluxo de acordo com o demonstrado na **Figura 10**. Foi avaliada a frequência de células que expressam esses marcadores em linfócitos totais e nas subpopulações de CD4⁺, CD8⁺ e CD8^{Low}..

Figura 10 – Análise da expressão de CD45RA e CD45RO em linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD8^{low}

O Pannel A mostra a determinação das populações CD4⁺, CD8⁺ e CD8^{low} de controles e pacientes selecionada a partir do *gate* de linfócitos determinado por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). O Pannel B trás a determinação das populações CD45RA⁺, CD45RO⁺ e CD45RA^{int}CD45RO^{int} que foi utilizada para analisar as subpopulações mostradas nos *gates* do Pannel A e em linfócitos totais.

Não houve diferença significativa na frequência de células que expressam qualquer das isoformas de CD45 em linfócitos totais (**Figura 11**). Em ambos os grupos estudados, alguns indivíduos apresentavam uma distinta população duplo-negativa para ambos os marcadores. Entretanto, a ausência ou a presença de células duplo-negativas para ambas as isoformas de CD45 avaliadas de células foi similar nos pacientes com ICV (entre 0,69% e 20,37% dos linfócitos) quanto em controles (0,19% e 16,39% dos controles) e os grupos não apresentaram diferenças significativas

Figura 11 – Frequência de linfócitos que expressam diferentes isoformas de CD45 em controles e pacientes com ICV

Células mononucleares de sangue periférico foram marcadas para CD4, CD8, CD45RA e CD45RO, em (A) Frequência de células que expressam CD45RA, (B) CD45RA^{int}CD45RO^{int} e (C) CD45RO. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) não foram encontradas entre os grupos.

Linfócitos $CD4^+$ de pacientes com ICV apresentaram expressão alterada das isoformas de CD45 com aumento da frequência de células $CD45RO^+$ (65.53 ± 6.06 , $p = 0,0112$) e diminuição das populações $CD45RA^+$ ($21,84 \pm 4,77$; $p = 0,232$) e $CD45RA/RO^{int}$ ($11,52 \pm 1,56$; $p = 0,355$) em comparação a indivíduos do grupo controle ($CD45RO^+$: 47.20 ± 2.29 ; $CD45RA^+$: $37,32 \pm 1,82$; $CD45RA/RO^{int}$: $15,00 \pm 0,89$), conforme mostrado na **Figura 12** (Painéis A, B e C).

Figura 12 – Frequência de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ que expressam diferentes isoformas de CD45 em controles e pacientes com ICV

Células mononucleares de sangue periférico foram marcadas para CD4, CD8, CD45RA e CD45RO. Os painéis A e D mostram a frequência de células que expressam CD45RA, B e E, $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ e C e F, CD45RO. A, B e C referem-se a células $CD4^+$; D, E e F, $CD8^+$. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Já para a população de linfócitos CD8⁺, foram encontradas diferenças significativas apenas na frequência de células com co-expressão intermediária de CD45RA e CD45RO, sendo que os pacientes com ICV apresentam um aumento da frequência de linfócitos CD8⁺CD45RA/RO^{int} (15.41 ± 0.9098 ; $p = 0,0334$) em comparação aos indivíduos saudáveis (20.44 ± 1.986). (**Figura 12**, painel E). Para as subpopulações expressando exclusivamente uma das duas isoformas de CD45 avaliadas, não houve diferença entre os controles e pacientes, como pode ser verificado nos Painéis D e F da **Figura 12**.

Como mostrado na **Figura 13**, também foi avaliada a expressão destas isoformas de CD45 em células CD8^{low} e foi observado que a vasta maioria das células expressa a isoforma de alto peso molecular e não foram encontradas diferenças significativas entre controles e pacientes (CD45RA⁺: $70,85 \pm 10,60$ vs. $82,88 \pm 9,721$; CD45RA^{int}RO^{int}: $9,44 \pm 5,59$ vs. $6,77 \pm 5,99$; CD45RO⁺: $7,83 \pm 5,25$ vs. $7,84 \pm 4,05$, respectivamente). Sabe-se que a frequência de linfócitos que expressam CD45RA é muito mais proeminente que a expressão de CD45RO em células NK. Assim, os resultados aqui demonstrados estão dentro do esperado, uma vez que linfócitos CD8^{low} são CD3⁻. Esse dado reforça a hipótese de que estas células, que foram excluídas durante o procedimento de separação de células para extração de RNA, não são linfócitos TCD8 convencionais.

Figura 13 – Frequência de linfócitos CD8^{low} que expressam as diferentes isoformas de CD45

Células mononucleares de sangue periférico foram marcadas para CD4, CD8, CD45RA e CD45RO. (A) Frequência de células expressando CD45RA, (B) CD45RA^{int}CD45RO^{int} e (C) CD45RO. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) não foram encontradas entre os grupos.

Dois dos pacientes incluídos nesta parte do estudo – Pacientes 14 e 16 – apresentaram frequências de células $CD4^+CD45RA^+$ abaixo de 2% e $CD4RA/RO^{int}$ abaixo de 3%. Frequências muito baixas de células *naïve* já foram descritas para um subgrupo pacientes com ICV, o que parece estar correlacionado com maior severidade da doença, em particular, com aparecimento de esplenomegalia ⁽²⁷⁾

4.6.1 Expressão atípica das isoformas de CD45 no Paciente # 2

O Paciente # 2, homem, 32 anos, apresentou um perfil atípico de expressão destas moléculas com alta frequência de células fortemente positivas para ambos os marcadores, conforme mostrado na **Figura 14**.

Figura 14 – Expressão atípica de CD45RA e CD45RO em linfócitos do Paciente # 2.

Os painéis à esquerda mostram a expressão das isoformas de CD45 em linfócitos $CD4^+$ e, à direita, linfócitos $CD8^+$ do paciente # 2 em comparação com controle # 11, avaliado no mesmo experimento.

Não parece provável se tratar de problema experimental, pois o ensaio foi realizado simultaneamente para este paciente e dois indivíduos controles, que apresentaram perfis normais de expressão de CD45RA e CD45RO, onde se utilizou a mesma solução mãe de anticorpos e compensação. Entretanto, como não foi possível realizar uma terceira coleta de material do indivíduo para repetição do experimento, existe a possibilidade de que o fenômeno seja transitório. Com base nisto, os dados referentes a expressão das isoformas de CD45 deste paciente não foram incluídos nas análises estatísticas de comparação dos grupos.

É interessante destacar que, como mostrado na **Tabela 6**, este paciente não apresentou alteração de nenhum dos outros parâmetros avaliados ligados às células T que são comparáveis aos controles saudáveis. Conforme será mostrado adiante, o paciente também não apresentou alterações significativas na expressão gênica das moléculas da via extrínseca da apoptose nestas populações celulares.

Tabela 6 – Comparação entre o Paciente # 2 e Grupo Controle

Parâmetro	Coleta	Paciente 02	Controles		
			Mínimo#	Máximo#	Média
%CD4 ⁺ em linfócitos	(1)	45,5	32,9 (C15)	55,7 (C17)	43,7
%CD8 ⁺ em linfócitos	(1)	21,8	16,7 (C16)	34,7 (C07)	21,5
%CD19 ⁺ em linfócitos	(1)	20,2	8,3 (C07)	20, 0 (C09)	13,1
%CD3 ⁺ em linfócitos	(2)	77,7	57,3 (C15)	78,7 (C19)	69,6
%CD19 ⁺ em linfócitos	(2)	2,3	11,3 (C07)	17,1 (C10)	13,7
%CD3 ⁺ CD4 ⁺ em linfócitos	(2)	45,5	25,3 (C03)	50,6 (C16)	43,8
%CD3 ⁺ CD8 ⁺ em linfócitos	(2)	26,9	31,1 (C03)	50,7 (C16)	22,0
CD4/CD8 (CD3 ⁺)	(2)	1,7	0,8 (C03)	4,0 (C16)	2,1
%Anexina ⁺ em linfócitos	(1)	32,8	18,6 (C08)	39,3 (C02)	29,5
%Anexina ⁺ em CD3 ⁺ CD4 ⁺	(2)	11,5	7,7 (C11)	24,3(C19)	16,4
%Anexina ⁺ em CD3 ⁺ CD8 ⁺	(2)	28,3	13,1 (C11)	34,2 (C19)	27,9

(1) Ensaio realizado entre Março e Junho de 2011 para os controles; 06 de Maio de 2011 para o paciente; (2) ensaio realizado entre Outubro e Dezembro para os controles; 11 de Novembro para o paciente. # Valores entre parênteses indicam o número de identificação do referido indivíduo do grupo controle.

Entretanto uma severa diminuição na frequência de células B deste paciente foi observada (20,2% para 2,45% dos linfócitos positivos para CD19⁺, em intervalo menor do que um ano entre as coletas). Clinicamente, os dados disponíveis mostram que o referido paciente apresenta quadros de infecção e bronquiectasia, sem manifestação de neoplasia, alergia/atopia ou doença autoimune.

4.7 Curva de Apoptose *versus* Tempo

Inicialmente, a avaliação de apoptose espontânea foi realizada imediatamente após a separação das células mononucleares de sangue periférico. Dados obtidos a partir de diversos controles mostraram que a frequência de células em apoptose *ex vivo* era próxima de zero para todas as amostras. Essa observação possivelmente resulta do fato de que células em processo de morte são rapidamente eliminadas do organismo de forma eficiente através da fagocitose ⁽⁸⁰⁾.

Para suplantar esta potencial limitação, realizou-se uma curva de frequência de apoptose espontânea com células de controles colocadas em cultura por 2 horas, 4 horas e 24 horas sem a adição de qualquer estímulo. A **Figura 15** trás os dados quanto à frequência de células em apoptose espontânea em diferentes tempos de cultura.

Figura 15 - Frequência de células apoptóticas após diferentes tempos de cultura

Células mononucleares do sangue de um indivíduo saudável foram colocadas em cultura em meio DMEM suplementado com 10% de soro do indivíduo analisado por 2h (painel A), 4h (painel B) e 24 horas (painel C). Após o período determinado as células foram marcadas com Anexina-V-FITC e PI. Resultados mostram as células selecionadas no *gate* de linfócitos.

Ao avaliar um indivíduo saudável, observou-se que após 2h de cultura, 16,5% dos linfócitos eram Anexina-V⁺PI⁻, 3,16% eram Anexina-V⁺PI^{int} e 6,13%, Anexina-V⁺PI⁺; após 4h de cultura, 15,5% dos linfócitos eram Anexina-V⁺PI⁻, 4,85% das células eram Anexina-V⁺PI^{int} e 9,95%, Anexina-V⁺PI⁺; enquanto que após 24h de cultura, a porcentagem de células anexina-V⁺PI⁻ observada foi de 12,5%, de Anexina-V⁺PI^{int} foi de 4,53% e a de Anexina-V⁺PI⁺, 16% dentro do *gate* de linfócitos.

Esses dados sugerem que após 2 ou 4 horas de cultura, estas células encontram-se em um estágio precoce de morte programada. Entretanto, após 24 horas, há perda significativa do número de células, e a marcação com PI se tornar evidente, com células em apoptose tardia ou necrose ⁽⁸⁰⁾; ainda, verificou-se um aumento significativo da frequência de *debris* marcados com Anexina-V-FITC. Com base nesses resultados, decidiu-se por avaliar a frequência de células apoptóticas de indivíduos saudáveis e pacientes após 2 horas de cultura.

Ressalta-se que em todos os ensaios de apoptose espontânea, o meio de cultura foi suplementado com o soro do próprio indivíduo, uma vez que a apoptose também é mediada por fatores solúveis, a fim de manter o ambiente de cultura celular o mais próximo possível do encontrado *in vivo*.

4.8 Análise da frequência de células apoptóticas

A frequência de apoptose espontânea foi avaliada na população de linfócitos após 2 horas de cultura e o *gate* Anexina-V⁺ foi definido individualmente a partir de células não marcadas, aqui chamadas de branco, de cada paciente ou controle (**Figura 16**, Painéis à esquerda). As células Anexina-V⁺ PI⁻ ou Anexina-V⁺ PI^{Low} foram consideradas em apoptose.

O grupo de pacientes com ICV apresentou diferença significativa na frequência de apoptose espontânea ($38,1 \pm 11,6$; $p = 0,0112$, $n = 19$, **Figura 17**, Painel A) quando comparado ao grupo controle ($29,54 \pm 5,9$, $n = 17$). Uma vez que parte dos pacientes apresentava nesta coleta apoptose comparável aos controles, os pacientes foram subdivididos em dois grupos de acordo com este parâmetro tomando a média do grupo como ponto de referência para divisão dos grupos.

Figura 16 – Análise da frequência de linfócitos em apoptose espontânea

Células mononucleares do sangue venoso de controles e pacientes com ICV foram colocadas em cultura em meio DMEM suplementado com 10% de soro autólogo por 2h e marcadas com Anexina-V e iodeto de propídio. Os painéis à direita trazem a expressão de linfócitos Anexina-V⁺ e PI⁺ selecionados em *gate* de linfócitos determinado por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Os painéis à esquerda trazem a análise dos linfócitos não marcados para Anexina-V ou PI e utilizados como base para estabelecimento dos *gates* de Anexina-V⁺ e PI⁺.

Figura 17 – Frequência de linfócitos em apoptose espontânea em controles e pacientes com ICV

Células mononucleares de sangue periférico foram marcadas com Anexina-V e iodeto de propídio após 2 horas de cultura. Os painéis referem-se a (A) comparação entre a frequência de células Anexina-V⁺ entre pacientes e controles. (B) comparação entre a frequência de células Anexina-V⁺ entre controles e subgrupos de pacientes (grupos ICV Apoptose^{Low} e ICV Apoptose^{High}). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

A análise destes subgrupos em separado mostrou que parte dos pacientes ($n=07/19$, 36,8%), denominados aqui ICV Apoptose^{High}, apresentou um acentuado aumento da apoptose espontânea enquanto o restante dos portadores da doença ($n=12/19$, 63,2%, referidos aqui como ICV Apoptose^{Low}) mostraram um perfil de morte celular de linfócitos semelhante aos controles.

Como mostra a **Figura 17**, Painei B, não houve diferença significativa na comparação entre as frequências de linfócitos Anexina⁺ entre o grupo Apoptose^{Low} ($30,3 \pm 5,6$; $p = 0,7452$) e o grupo controle ($29,54 \pm 5,9$). Pacientes definidos como Apoptose^{High}, entretanto, apresentaram frequência de apoptose significativamente mais alta ($51,5 \pm 3,8$; $p = 0,0002$) quando comparado aos outros dois grupos ou a cada um dos grupos individualmente ($p = 0,0002$, vs Controles; $p = 0,0003$ vs Pacientes Apoptose^{Low}).

4.9 Correlação entre apoptose espontânea e frequência de células CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺

Para verificar se o aumento da apoptose espontânea correspondia a alteração da frequência de uma subpopulação específica de células, análises de regressão linear relacionando a frequência de linfócitos Anexina-V⁺ com as populações celulares previamente avaliadas foram realizadas nos grupos controles e pacientes.

A frequência de linfócitos CD4⁺ apresentou uma correlação inversa a frequência de células apoptóticas no grupo de pacientes ($r^2 = 0,2727$; $p = 0,0262$; $n=18$), mas não para o grupo controle ($r^2 = 0,2892$; $p = 0,0797$; $n = 16$), sugerindo que há correlação entre a diminuição das células CD4⁺ e o aumento da apoptose espontânea na ICV (**Figura 18**). Embora a correlação não seja destacadamente forte entre os dois parâmetros, a análise mostrou uma inversão da linha de tendência do grupo de pacientes em comparação com a que era observada para o grupo de controles saudáveis.

Figura 18 – Correlação entre frequência de apoptose espontânea e frequência de linfócitos CD4⁺ em controles e pacientes com ICV

Regressão linear entre frequência de células em apoptose e frequência de linfócitos CD4⁺ de controles saudáveis e pacientes com ICV. (*) $p < 0,05$.

A análise de regressão linear confirmou a ausência de correlação entre a frequência de linfócitos em apoptose espontânea e a frequência de células CD8⁺ para o grupo de indivíduos saudáveis ($r^2 = 0,0259$; $p = 0,5518$; $n = 16$) e pacientes ($r^2 = 0,0472$; $p = 0,3863$; $n = 18$) ou CD19⁺ no grupo de controles ($r^2 = 0,0249$; $p = 0,6096$; $n=13$) e pacientes ($r^2 = 0,04864$; $p = 0,3792$; $n = 18$).

4.10 Correlação entre apoptose espontânea e a frequência CD4/CD8

Em seguida, foi verificado se a frequência de apoptose espontânea se correlacionava a baixa razão CD4/CD8 encontrada no grupo de pacientes com ICV. A **Figura 19** mostra as regressões lineares de indivíduos controle (Painel A) e pacientes (painel B) para os parâmetros frequência de apoptose espontânea de linfócitos e razão CD4/CD8. Para essas análises, não foram encontradas correlações significativas para nenhum dos grupos (Controles: $r^2 = 0,0769$; $p = 0,2982$; $n = 16$; grupo Pacientes: $r^2 = 0,1601$; $p = 0,0991$; $n = 18$).

Figura 19 – Correlação entre frequência de apoptose espontânea e razão CD4/CD8 em controles e paciente com ICV

Regressão linear entre frequência de células em apoptose e razão CD4/CD8 de (A) Controles saudáveis (B) Pacientes com ICV e (C) Pacientes com ICV, excetuando-se o Paciente # 15. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Entretanto, um único indivíduo (Paciente # 15) era responsável pela ausência de correlação entre esses parâmetros. Dada a grande variabilidade de perfis imunológicos encontrada nos indivíduos diagnosticados com ICV, as análises foram refeitas excluindo-se esse paciente. Assim, numa segunda análise foi encontrada correlação inversamente significativa entre a frequência de linfócitos em apoptose espontânea e a razão CD4/CD8 nos pacientes com ICV, excetuando os dados do paciente #15 ($r^2 = 0,3106$; $p = 0,0201$; $n = 17$; **Figura 19**, painel C). Destaca-se ainda, que, também para a relação da frequência de células em apoptose e as razões CD4/CD8, mesmo sem uma forte correlação entre os parâmetros, a linha de tendência do grupo de pacientes apresentou um padrão inverso ao que era encontrado no grupo controle.

Não foram encontradas correlações entre a frequência de linfócitos Anexina⁺ e a frequência de linfócitos CD8⁺ ou CD19⁺. Uma vez que análises preliminares mostraram uma correlação positiva entre aumento da idade e aumento da frequência de linfócitos em apoptose ($r^2 = 0,2339$; $p = 0,0420$, $n = 19$) no grupo de pacientes, tomou-se a precaução de incluir no grupo controle indivíduos acima dos 65 anos, descartando a possibilidade de que o aumento de apoptose de linfócitos observado num subgrupo dos portadores de ICV fosse apenas reflexo da maior idade dos indivíduos deste grupo.

4.11 Análise da frequência de linfócitos CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ em apoptose espontânea após 2 horas de cultura.

Para verificar se a correlação entre aumento da morte de linfócitos e a diminuição da frequência de células CD4⁺ correspondia ao aumento de morte nesta subpopulação foi realizado um novo ensaio de cultura para verificação da apoptose espontânea de linfócitos CD3⁺ de parte dos pacientes e controles.

Como mostra a **Figura 20**, o grupo de pacientes com ICV apresentava, de fato, uma maior frequência de células CD3⁺ CD4⁺ em apoptose espontânea ($24,18 \pm 7,43$; $p = 0,0448$, $n = 11$) quando comparados ao grupo controle ($17,83 \pm 6,06$; $n = 10$), corroborando a hipótese levantada com base nas análises de correlação.

Embora não seja uma diferença significativa, o grupo de pacientes com ICV mostrou um discreto aumento da frequência de linfócitos CD3⁺ em apoptose ($20,62 \pm 6,69$, $p = 0,0558$; $n = 11$) quando comparados aos indivíduos saudáveis ($15,48 \pm 4,57$; $n = 10$). A ausência de diferença estatística nesta análise pode ser justificada pelo baixo número de indivíduos incluídos nesta segunda etapa.

A análise de frequência de linfócitos CD3⁺ CD8⁺ dos pacientes com ICV também não mostrou diferença estatística entre os grupos (Controles: $30,13 \pm 11,70$; $n = 10$; Pacientes $40,24 \pm 15,34$; $n = 11$; $p = 0,1085$). Entretanto, foi possível observar que quatro dos 11 pacientes avaliados apresentavam uma frequência de linfócitos T CD8⁺ em apoptose acima dos valores encontrados nos controles saudáveis, com destaque para um indivíduo (Paciente #10) que apresentou duas vezes mais linfócitos CD3⁺CD8⁺Anexina⁺ que a média dos controles.

Figura 20 – Frequência de linfócitos CD3⁺ em apoptose espontânea em controles e pacientes com ICV

Células mononucleares de sangue periférico foram marcadas com Anexina-V, CD3, CD4 e CD8 após 2 horas de cultura. Da esquerda para direita: Frequência de células Anexina-V⁺CD3⁺, Anexina-V⁺CD3⁺CD4⁺ e Anexina-V⁺CD3⁺CD8⁺ e Anexina-V⁺CD3⁺CD4⁺ comparando subgrupos previamente definidos na **Figura 17** com base na avaliação da frequência de linfócitos em apoptose: grupos ICV Apoptose^{Low} e ICV Apoptose^{High}. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Embora esta análise reforçado a hipótese baseada na correlação entre o aumento da apoptose espontânea de linfócitos e a diminuição da frequência de células CD4⁺, foi observado que apenas parte dos pacientes anteriormente classificados como Apoptose^{High} mantinha o aumento da frequência de morte, se avaliadas apenas as células CD3⁺CD4⁺. Ainda, três dos pacientes que apresentavam um padrão de morte

celular comparável aos controles na primeira avaliação (Grupo Apoptose^{Low}) mostraram maior frequência de células CD3⁺CD4⁺ apoptóticas na segunda avaliação.

Uma possível explicação para esta observação é a de que outras populações de linfócitos, que não T, seja responsável pelo aumento de morte observado em linfócitos totais ou que, no caso dos pacientes que apresentaram apoptose aumentada apenas para a população CD3⁺ CD4⁺, o aumento da apoptose tenha sido minimizado pela presença de outras populações linfocitárias na primeira análise. Outra possibilidade é a de que o fenômeno observado seja transitório, esporádico ou ocorra em ondas, como consequência direta ou indireta da doença. Em qualquer um dos casos, apenas um acompanhamento prolongado com análise da variação de morte celular com o mesmo parâmetro ao longo do tempo poderia ajudar a elucidar o quadro.

4.12 Avaliação da possível identificação de fenótipo(s) comum(uns) a partir de agrupamento entre os pacientes com ICV

A observação de que parte dos indivíduos com ICV apresentaram frequência de apoptose espontânea aumentada (grupo Apoptose^{high}), além das correlações inversas encontradas entre este fenótipo e a população de células CD4⁺ e a razão CD4/CD8, levou-nos a verificar a possibilidade de reagrupamento dos pacientes com relação a apoptose espontânea e as populações linfocitárias. Não foi possível realizar a o agrupamento dos pacientes com base nos dados obtidos na segunda coleta, uma vez que nem todos os parâmetros estavam disponíveis para todos os pacientes, o que seria premissa essencial para a análise de clusterização.

A clusterização foi realizada com base na frequência de linfócitos Anexina-V⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺. O dendograma resultante (**Figura 21**) mostrou a existência de dois grupos principais diferentes: um contendo todos os pacientes com Apoptose^{High} e um segundo grupo contendo a maioria dos pacientes Apoptose^{Low}, com exceção dos Pacientes #10 e #19, que foram incluídos no grupo contendo os pacientes Apoptose^{High}, confirmando a observação anteriormente demonstrada na **Figura 16** (Painel B). A inclusão dos controles na análise e a retirada do parâmetro CD19⁺ não alterou o padrão de distribuição observado.

Figura 21 – Reagrupamento dos pacientes com ICV e controles a partir das análises de frequência de apoptose espontânea e de frequências de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺.

Dendogramas gráficos resultantes das análises de clusterização. Análises realizadas com pacientes agrupados por Anexina-V⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺; Pacientes Apoptose^{high} estão representados em rosa, Apoptose^{Low}, em verde. A similaridade foi determinada por Correlação de Pearson com média do grupo como parâmetro para agrupamento dos clusters.

A análise da estratégia de clusterização (**Tabela 7**) mostrou que os Pacientes #10 e #19 apresentam grande similaridade entre si (Cluster 4; Similaridade = 97,0%) e com o Paciente #15 (Cluster 11; Similaridade = 88,3%). No grupo de indivíduos com apoptose espontânea aumentada (Apoptose^{High}), verifica-se que há grande similaridade entre os Pacientes #13 e #7 (Cluster 2; Similaridade = 98,8%) e entre os Pacientes 11 e 6 (Cluster 5; Similaridade = 96,2%). Esses quatro pacientes também estão relacionados ao Paciente #16 (Cluster 10; Similaridade = 84,3%) e este novo grupo se assemelha ao conjunto formado pelos Pacientes #10, #15 e #19 (Cluster 14; Similaridade = 81,0%).

Tabela 7 – Estratégia de clusterização dos pacientes com ICV pelos parâmetros frequência de apoptose espontânea e frequências de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺

Cluster	Item 1	Item 2	Similaridade
1	P18	P1	0,994
2	P11	P6	0,988
3	P9	P3	0,971
4	P19	P10	0,970
5	P13	P7	0,962
6	Cluster 1	P12	0,958
7	P17	P2	0,939
8	Cluster 6	P8	0,915
9	Cluster 7	Cluster 3	0,915
10	Cluster 5	Cluster 2	0,899
11	Cluster 4	P15	0,883
12	Cluster 10	P16	0,843
13	Cluster 9	Cluster 8	0,826
14	Cluster 12	Cluster 11	0,810
15	Cluster 14	P14	0,680
16	Cluster 15	P4	0,659
17	Cluster 16	Cluster 13	0,584

Em rosa, pacientes com apoptose espontânea aumentada ou cluster formado exclusivamente por estes. Em verde, pacientes com apoptose espontânea normal ou cluster formado exclusivamente por estes. Em laranja, grupos mistos. A similaridade foi determinada por Correlação de Pearson com média do grupo como parâmetro para agrupamento dos clusters.

4.13 Análise das manifestações clínicas dos pacientes estudados

A análise geral dos dados nos incentivou a relacionar o aumento de apoptose espontânea com as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes. A **Tabela 8** traz um resumo das condições clínicas apresentadas pelos pacientes, incluindo contagem total de linfócitos, presença de doenças autoimunes, espleomegalia, bronquietasia, linfadenomegalia, hipotireoidismo, neoplasia e granulomatose. A análise foi feita com os subgrupos definidos na primeira coleta, uma vez que os dados clínicos aqui mostrados referem-se ao mesmo período.

A proporção de pacientes com hipotireoidismo foi similar em ambos os subgrupos de pacientes (Apoptose^{High}: n = 1/7; Apoptose^{Low}: n = 2/10). A incidência de manifestações autoimunes nos dois grupos também foi semelhante. (Apoptose^{High}: n = 3/7; Apoptose-V^{Low}: n = 7/11). Bronquiectasia foi a complicação clínica mais encontrada atingindo mais da metade do grupo de pacientes com ICV avaliados (n = 10/17), mas também apresentou distribuição similar nos dois subgrupos: (Apoptose^{High}: n = 4/7; Apoptose^{Low}: n = 6/10). Apenas um dos indivíduos incluídos no estudo, pertencente ao grupo Apoptose^{Low} apresenta neoplasia e nenhum dos pacientes avaliados teve quadros clínicos envolvendo granulomatose.

Entretanto, foi observado que, os pacientes Apoptose^{High} apresentavam maior frequência de esplenomegalia (n = 4/6) e linfadenopatia (n = 3/6) que os indivíduos do grupo Apoptose^{Low} (n = 2/7; n = 1/7, respectivamente).

Tabela 8 - Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com ICV aqui avaliados

ID	Linfócitos (cél./mm ³)	DAÍ*	Esplenomegalia	Bronquiectasia	Linfadenomegalia	Hipotireoidismo	Neoplasia
P1	3200	S	S	S	S	N	N
P2	1500	N	N	S	N	N	N
P3	N/D	S	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
P4	1600	N	N	S	N	N	N
P5	1700	S	S	S	N	N	N
P6	1600	N	N	S	N	N	N
P7	1200	S	S	N	N	N	N
P8	N/D	S	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
P9	2100	N	N	N	N	N	N
P10	1900	N	N/D	S	N/D	N	N
P11	2300	S	N/D	S	S	S	N
P12	2000	S	N/D	N	N/D	N	N
P13	2300	N	S	N	N/D	N	N
P14	2100	N	N	N	N	N	N
P15	2800	N	S	S	S	N	N
P16	2000	S	S	S	S	N	N
P17	800	S	N/D	N	N/D	N	N
P18	2700	S	N	S	N	S	N
P19	2100	S	N	N	N	S	S

Em verde, destacam-se os pacientes do grupo Anexina^{Low}, em rosa, Anexina^{High}

*DAÍ = Doença Automune; N/D = Dados não disponíveis; S = Sim, N = Não.

Tendo em vista que os dados clínicos disponíveis referem-se ao período no qual foi realizada a primeira coleta de material, as análises de manifestações clínicas foram comparadas apenas aos dados da análise inicial. Além disso, nem todos os parâmetros da segunda coleta estavam disponíveis para todos os pacientes, tanto do ponto de vista clínico, quanto laboratorial, não permitindo, assim, uma análise aprofundada no presente momento.

4.14 Análise da expressão gênica dos receptores de morte e ligantes nos pacientes com ICV

Foi avaliada a expressão de diversos genes relacionados à indução da apoptose através da via extrínseca, mediada pela ativação de receptores de morte. Os resultados encontrados para estas análises encontram-se dispostos na **Tabela 9**.

Células CD4⁺ de pacientes com ICV apresentaram uma expressão reduzida da expressão dos receptores TRAIL-R1 ($p = 0,0309$) e TRAIL-R2 ($p = 0,0113$) em comparação aos indivíduos saudáveis (**Figura 22**, Painel C). Para os linfócitos CD8⁺ também foi encontrada uma alteração de expressão gênica relacionado ao sistema TRAIL-TRAIL-R, mas, neste caso, os pacientes com ICV apresentaram marcada redução da expressão do ligante de morte TRAIL ($p = 0,0003$, **Figura 22**, Painel D) em comparação aos controles, sem diferença na expressão dos receptores deste sistema.

Ainda, em comparação com os controles, células CD8⁺ de indivíduos com ICV apresentaram discreta diminuição dos níveis de expressão gênica de TNF-R1 ($p = 0,0441$, **Figura 22**, Painel E) e aumento da expressão de FLIP_s ($p = 0,0138$, **Figura 23**, Painel C). Uma expressão pelo menos duas vezes maior de FLIP_s em relação a mediana dos controles foi observada para 68,4% ($n = 13/19$) dos pacientes avaliados. Ainda, destaca-se que o Paciente #18 apresentou uma expressão severamente aumentada da molécula inibidora da apoptose FLIP_s em células CD8⁺, o que não refletia, no momento da coleta do sangue para extração de RNA, em um aumento exacerbado da frequência de células CD8⁺ (34,3% dos linfócitos) ou impactava na relação CD4/CD8 observada neste indivíduo (Razão CD4/CD8 do Paciente #18: 1,19).

Tabela 9 – Expressão gênica dos receptores de morte, seus ligantes e moléculas adaptadoras e inibidoras da apoptose em controles e pacientes com ICV

Gene	População Celular	Indivíduos Saudáveis			Pacientes com ICV			Valor de <i>p</i>
		Média	DP	(n)	Média	DP	(n)	
Fas	CD4 ⁺	0.5061	0.3340	15	0.3729	0.1249	19	0.1031
Fas	CD8 ⁺	0.2246	0.3126	15	0.2302	0.2174	19	0.6029
FasL	CD4 ⁺	0.03828	0.03249	15	0.09197	0.07477	19	0.3580
FasL	CD8 ⁺	0.03638	0.04706	15	0.07039	0.07596	19	0.4988
TRAIL-R1	CD4 ⁺	1.059	0.2572	15	0.7957	0.3894	19	0.0309 (*)
TRAIL-R1	CD8 ⁺	0.4495	0.2232	15	0.3464	0.2650	19	0.0892
TRAIL-R2	CD4 ⁺	1.035	0.4819	15	0.6496	0.5365	19	0.0113 (*)
TRAIL-R2	CD8 ⁺	0.2776	0.2900	15	0.2034	0.1459	19	0.2383
TRAIL	CD4 ⁺	0.07016	0.03732	15	0.04924	0.04061	19	0.0959
TRAIL	CD8 ⁺	0.2045	0.08640	15	0.09231	0.06343	19	0.0003 (***)
TNF-R1	CD4 ⁺	0.2147	0.1791	15	0.1448	0.1506	19	0.2248
TNF-R1	CD8 ⁺	0.2254	0.2046	15	0.08338	0.08398	19	0.0441 (*)
TNF-R2	CD4 ⁺	0.1272	0.04286	15	0.1224	0.09518	19	0.1452
TNF-R2	CD8 ⁺	0.1661	0.1830	15	0.1441	0.08293	19	0.7287
TNF- α	CD4 ⁺	0.05198	0.03654	15	0.04307	0.03098	19	0.4879
TNF- α	CD8 ⁺	0.02553	0.02732	15	0.02034	0.02081	19	0.6141
FLIP _L	CD4 ⁺	0.9271	0.4514	14	0.6973	0.5026	19	0.0302 (*)
FLIP _L	CD8 ⁺	1.038	0.8474	15	0.7141	0.3551	19	0.1550
FLIP _S	CD4 ⁺	12.19	21.39	15	10.50	19.76	19	0.8125
FLIP _S	CD8 ⁺	0.1178	0.1270	15	0.7263	2.278	19	0.0138 (*)
FADD	CD4 ⁺	0.2725	0.1141	15	0.1257	0.1203	19	0.0004 (***)
FADD	CD8 ⁺	0.3000	0.1623	15	0.1450	0.1323	19	0.0036 (**)

DP = Desvio Padrão; (n) número de indivíduos incluídos no grupo para a análise. (*) Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. (**) e (***) indicam valores de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Figura 22 – Expressão gênica de receptores de morte e seus ligantes em controles e pacientes com ICV

Expressão dos genes da via extrínseca da apoptose em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ avaliada através de PCR quantitativo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

A expressão da molécula adaptadora FADD estava reduzida no grupo de pacientes com ICV em comparação aos controles saudáveis tanto nos linfócitos CD4⁺ ($p = 0,004$, **Figura 23**, Painel D) quanto nos CD8⁺ ($p = 0,036$, **Figura 23**, Painel D) e apenas dois dos pacientes incluídos no estudo (Paciente #1 e #3) apresentavam a expressão desta molécula acima da mediana dos controles em ambas as populações celulares avaliadas. Destaca-se que embora o Paciente #3 tenha apresentado uma expressão comparável aos controles para o mRNA do gene FADD, este indivíduo apresentou expressão aumentada de FAS, FASL, TNFR1 e TNF- α em células CD4⁺.

Figura 23 – Expressão gênica das moléculas adaptadora e inibidoras da via extrínseca da apoptose em controles e pacientes com ICV

Expressão dos genes da via extrínseca da apoptose em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ avaliada através de PCR quantitativo. Excepcionalmente, no Painel B é mostrada a mediana dos grupos ao invés da média com desvio padrão tendo em vista o impacto do valor encontrado para o paciente 18 para o elemento gráfico. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$

Dada a variabilidade encontrada na expressão dos receptores de morte no grupo dos pacientes com ICV e a natureza heterogênea do transtorno, optou-se por realizar, em paralelo a comparação entre os grupos, uma análise individualizada da expressão gênica. Tal procedimento foi adotado tanto para resultados obtidos a partir do RNA de células CD4⁺ (**Figura 22 e 24**) como CD8⁺ (**Figura 23 e 24**). Para as análises individuais, foram criadas razões entre a expressão relativa de cada gene avaliado pela média, em caso de distribuição normal, ou mediana, caso contrário, dos indivíduos saudáveis incluídos no estudo.

Figura 24 – Expressão gênica de receptores de morte e moléculas relacionadas em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ dos indivíduos com ICV

CD4 ⁺	Fas	FasL	TRAIL-R1	TRAIL-R2	Trail	TNFA	TNF-R1	TNF-R2	FLIP-L	FLIP-S	FADD	Legenda
P6	0,92	0,55	0,79	0,27	0,89	1,07	1,15	0,88	0,68	0,26	0,20	Até 0,25
P7	0,52	0,13	1,44	2,06	0,38	0,32		3,95	2,76		0,71	Até 0,50
P11	1,12	1,70	0,27	0,19	1,08	0,82	1,56	0,75	0,59	0,17	0,19	Até 0,75
P13	0,28	0,07	1,37	0,66	0,33	0,95	0,74	0,57	0,49	0,30	0,22	Até 1,00
P14	1,67	0,36	0,97	0,79	0,15	0,71	0,72	0,95	0,53	0,33	0,56	Até 1,25
P15	0,41	1,10	0,68	0,25	0,41	0,73	0,97	0,94	0,58	0,27	0,24	Até 1,50
P16	0,16		0,72	0,63	0,44	0,89	0,03	0,61	0,48	6,87	0,20	Até 1,75
P1	1,30	0,21	0,93	1,44	0,50	1,67		0,66	0,90		1,94	Até 2,00
P2	1,45	0,02	0,73	0,78	0,59	1,08	1,33	0,65	0,77	0,26	0,65	Acima de 2
P3	2,45	2,37	0,89	1,65	0,17	3,33	3,82	0,92	0,62	0,07	1,10	
P4	0,32	0,68	1,08	1,48	0,32	0,73	0,16	1,07	1,42	3,91	0,57	
P5	0,49	0,19	1,29	0,67	0,87	1,32	1,16	0,85	0,59	0,23	0,34	Não Detectável
P8	1,00	0,68	0,80	0,31	1,17	1,25	0,78	0,43	0,46	0,26	0,24	
P9	0,09		0,36	0,28	0,80	0,74	0,17	0,99	0,37	0,97	0,09	
P10	1,40	0,06	1,23	0,25	0,23	0,52	0,33	0,78	1,06	1,44	0,40	
P12	0,41	0,16	0,20	0,41	0,38	0,42	1,01	1,29	0,63	0,28	0,27	
P17	0,41	0,42	0,94	0,33	0,23	0,69	1,14	0,61	0,39	0,16	0,35	
P18	0,10	0,57	0,32	0,34	2,29	0,47	0,35	0,42	0,33	0,42	0,17	
P19	0,19	2,93	0,22	0,18	1,68	0,26	0,44	1,22	0,86	0,89	0,22	

CD8 ⁺	Fas	FasL	TRAIL-R1	TRAIL-R2	Trail	TNFA	TNF-R1	TNF-R2	FLIP-L	FLIP-S	FADD	Legenda
P6	0,23	0,10	0,49	1,04	0,33	0,56		1,91	2,12	5,01	0,33	Até 0,25
P7	0,12		0,24	1,49	0,88			3,19	1,85	7,94	0,50	Até 0,50
P11	3,96	0,11	2,33	1,13	0,19	2,93	0,81	0,89	1,44	3,28	0,31	Até 0,75
P13	0,36	0,44	0,46	0,70	0,42	0,19	0,04	1,02	0,79	3,06	0,21	Até 1,00
P14	2,62	1,81	0,31	0,45	0,24	1,06	0,74	1,27	0,65	3,50	0,64	Até 1,25
P15	1,91	0,95	0,52	0,83	0,35	3,22	0,84	1,36	0,71	3,42	0,19	Até 1,50
P16	0,68	0,10	0,76	0,69	0,13	2,00	0,27	1,04	0,54	0,58	0,16	Até 1,75
P1	1,73	0,49	0,28	2,15	0,97	0,14	0,02	2,09	1,42	4,31	1,50	Até 2,00
P2	0,96	0,61	0,78	0,45	0,47	1,16	0,79	0,48	0,54	2,24	0,51	Acima de 2
P3	1,80	2,59	1,03	1,09	1,01	0,00	0,03	2,04	1,39	3,12	1,71	
P4	0,38	1,23	0,37	0,42	1,11	0,39	0,03	1,03	0,98	2,73	0,36	
P5	0,11	0,26	0,37	0,64	0,44		0,03	1,02	0,81	1,73	0,29	Não Detectável
P8	1,01	0,57	1,09	0,70	0,36	1,62	0,98	0,58	0,76	1,14	0,30	
P9	1,17	0,57	0,54	0,47	0,17	0,78	0,68	0,69	0,61	1,23	0,21	
P10	1,27	0,76	0,88	0,43	0,62	0,60	0,82	0,72	0,59	2,60	0,21	
P12	0,57	1,60	0,29	0,38	0,21	1,15	0,59	1,90	0,77	1,81	0,31	
P17	0,03	0,13	0,47	0,64	0,92	0,13	0,09	0,22	0,52	0,51	0,22	
P18	0,99	0,10	1,90	1,94	0,14	1,51	0,31	0,75	1,00	141,80	0,37	
P19	0,28	0,03	1,67	2,99	0,22	0,40	0,01	1,72	1,87	3,30	0,48	

Expressão relativa ao grupo de controles saudáveis. A razão foi calculada em relação à média (distribuição normal) ou mediana (distribuição não normal) dos indivíduos saudáveis. Em verde, destacam-se os pacientes previamente determinados como grupo Apoptose^{low}, em rosa, os Apoptose^{high}. O painel superior traz os resultados para CD4⁺; o inferior, para CD8⁺

4.15 Análise da expressão gênica de moléculas anti-apotóticas da via intrínseca em pacientes com ICV

Embora o objetivo do presente trabalho fosse investigar o papel da via extrínseca da apoptose nos indivíduos com ICV, a via intrínseca da apoptose tem um importante papel em regular a sobrevivência de linfócitos. Duas das principais moléculas que compõem a via são Bcl-2, sua versão homóloga por *splicing* alternativo BCL-xL. A expressão aumentada de qualquer uma dessas duas proteínas diminui a susceptibilidade da célula à morte ⁽⁴⁸⁾. Sendo assim, decidiu-se por fim analisar a expressão gênica destas moléculas anti-apotóticas no pacientes com ICV.

Como mostrado na **Figura 26**, foi observado que o grupo de pacientes com ICV apresenta uma diminuição significativa de Bcl-2 nas células CD4⁺ ($7,15 \pm 6,5$; $p = 0,0009$; $n = 19$) em comparação aos indivíduos saudáveis ($12,31 \pm 5,3$; $n = 16$). O mesmo perfil foi observado para linfócitos CD8⁺, com os pacientes apresentando uma expressiva diminuição de Bcl-2 em comparação aos controles ($0,66 \pm 0,38$; $p < 0,0001$; $n = 19$ vs $1,54 \pm 0,79$; $n = 16$).

Ainda na **Figura 26**, pode-se observar que a expressão gênica de Bcl-xL estava alterada apenas para linfócitos CD8⁺, com uma leve diminuição nos indivíduos com ICV ($1,06 \pm 0,97$; $p = 0,0359$; $n = 19$) em relação à expressão relativa do grupo controle ($2,06 \pm 1,63$; $n = 16$).

Figura 26 – Expressão gênica das moléculas anti-apoptóticas da via intrínseca da apoptose em controles e pacientes com ICV

Expressão dos genes da via extrínseca da apoptose em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ avaliada através de PCR quantitativo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

A Imunodeficiência Comum Variável – imunodeficiência primária sintomática diagnosticada com mais frequência em humanos – é caracterizada por hipogamaglobulinemia com redução de duas ou mais classes de anticorpos e conseqüente aumento de susceptibilidade a infecções do trato respiratório e gastrointestinal. Desde que foi descrita pela primeira vez por Janeway e colaboradores em 1953, a ICV tem sido amplamente estudada por diversos grupos que buscam compreender os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da doença. Entretanto, na grande maioria dos casos, a etiologia da ICV permanece desconhecida, o que se deve em parte a heterogeneidade de perfis imunológicos encontrados nos indivíduos diagnosticados sob esta classificação.

Posto que a característica unificadora dos indivíduos com ICV é a hipogamaglobulinemia, muitos dos estudos acerca da patogênese desta desordem e a grande maioria dos sistemas de classificação propostos têm como foco o fenótipo e a capacidade funcional de linfócitos B. A ampla investigação da imunidade humoral destes pacientes forneceu evidências de que, em parte deles, a linhagem de células B apresenta-se intrinsecamente normal ⁽⁸¹⁾, o que leva a hipótese de que a etiologia da doença estaria, em alguns casos, ligada a incapacidade das células T de prover sinais adequados para os linfócitos B prejudicando, conseqüentemente, a produção de anticorpos.

Disfunções no compartimento de células T - incluindo linfopenia total ou diminuição da frequência de células TCD4⁺ - acometem até metade dos pacientes com ICV. Estudos anteriores sugerem que o aumento da susceptibilidade à apoptose de linfócitos nos pacientes com ICV poderia explicar parcialmente a linfopenia encontrada nesses indivíduos.

Para investigar o impacto da via extrínseca da apoptose nos indivíduos com ICV, avaliou-se a expressão genica dos receptores de morte (Fas, TNFR1, TNFR2, TRAIL-R1 e TRAIL-R2), seus respectivos ligantes (FasL, TNF α e TRAIL) e moléculas adaptadoras e reguladoras (FADD e cFLIP) em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, o estado geral do

compartimento de células T, a apoptose espontânea de linfócitos, com ênfase em CD4⁺ e CD8⁺ em células do sangue venoso dos pacientes com ICV.

Inicialmente avaliou-se as freqüências de células CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ nos indivíduos com ICV comparativamente aos controles. No grupo de pacientes, a freqüência de linfócitos CD4⁺ encontra-se significativamente reduzida em comparação aos indivíduos do grupo controle, embora apenas um dos pacientes apresentasse discreta linfopenia (Paciente #17, 800 linfócitos/mm³). Ainda, há maior freqüência de linfócitos CD8⁺ nos indivíduos com ICV apresenta aumento da freqüência de células CD8⁺. Não houve diferença estatística na freqüência de linfócitos B CD19⁺ entre os grupos; porém, nota-se maior homogeneidade da freqüência de linfócitos CD19⁺ circulantes no grupo controle que nos indivíduos com ICV.

Uma vez que o objetivo principal deste estudo foi avaliar a expressão gênica de moléculas que medeiam a via extrínseca da apoptose, e considerando que a ligação do anti-CD3 aos linfócitos T poderia desencadear ativação dessas células com consequente regulação positiva dos receptores de morte e seus ligantes, a marcação da molécula CD3 não foi realizada. Esse fato nos levou a questionar se as alterações observadas na freqüência de células CD4 e CD8 de fato corresponderiam a alterações no compartimento de linfócitos T, apesar da inversão da relação CD4/CD8 ser um parâmetro/fenótipo bem estabelecido em indivíduos com ICV ^(13, 27). Para tanto, novos ensaios foram realizados com marcação concomitante da molécula CD3, que confirmaram os dados anteriormente obtidos de menor freqüência de linfócitos T CD4 e aumento da freqüência de linfócitos T CD8, com consequente inversão da razão CD4/CD8 nos pacientes com ICV.

Ainda, foram avaliadas outras populações celulares que expressam CD4 ou CD8 em sua superfície celular, que poderiam interferir tanto nas análises de freqüência das populações CD4, CD8 e CD19 quanto na separação dessas para posterior extração de RNA. Monócitos podem expressar níveis intermediários de CD4, portanto, a população de linfócitos foi isolada por tamanho e granulosidade (FSC x SSC). Ainda, é sabido que células NK podem expressar níveis baixos ou intermediários da molécula CD8, sendo esse outro potencial interferente nas amostras separadas para extração de RNA. A avaliação da freqüência de células T definidas pela marcação com anti-CD3 nos pacientes e controles

saudáveis nos permitiu estimar o impacto de populações diferentes das de interesse na separação celular realizada. Verificou-se que a frequência de células $CD3^+CD8^+$ presentes dentro do *gate* de células $CD8^{High}$ utilizado na estratégia de *sorting* correspondia a cerca de 0,5%. Essa interferência pode ser considerada inócua para a avaliação dos genes, uma vez que, mesmo excetuando-se essa população, a pureza das populações individualmente separadas foi maior de 95%.

A avaliação da apoptose espontânea de linfócitos totais em células mononucleares de sangue venoso de indivíduos com ICV mostrou que parte dos pacientes apresentava frequência aumentada de células Annexina-V⁺ enquanto outra porção destes apresentava apoptose equiparada aos controles saudáveis. Com base neste resultado, os pacientes foram subdivididos em Apoptose^{High} e Apoptose^{Low}; em cinco dos sete pacientes do grupo Apoptose^{High} foi observada frequência reduzida de linfócitos $CD4^+$ (< 26%), valores abaixo dos encontrados em indivíduos saudáveis. A frequência de células apoptóticas no grupo pacientes como um todo estava correlacionada com a diminuição da razão $CD4/CD8$ e com a redução na frequência de linfócitos $CD4^+$. Tais associações corroboram a hipótese de que os linfócitos T *helper* poderiam ser a principal população celular afetada pelo aumento da apoptose espontânea observado.

Essa hipótese foi confirmada quando da avaliação de apoptose espontânea em linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$, onde observou-se novamente maior frequência de células em apoptose na população de linfócitos T *helper*, com destacada formação de dois subgrupos de pacientes.

Entretanto, observou-se que o fenótipo Apoptose^{High} não era mantido nesses pacientes. A análise da frequência de células em apoptose espontânea nas duas coletas de sangue, mostrou que apenas dois dos pacientes se mantiveram Apoptose^{High} na população $CD4^+$, enquanto que outros três indivíduos com ICV que possuíam apoptose espontânea de linfócitos comparável aos controles saudáveis apresentaram aumento da frequência de morte em $CD4^+$.

Os dois pacientes com apoptose espontânea aumentada sustentada em ambas as coletas (Paciente # 6 e Paciente # 7) apresentaram frequência de linfócitos $CD4^+$ diminuídas e razões $CD4/CD8$ abaixo de 0,9 em ambos os momentos avaliados.

Destaca-se também que o Paciente #10, antes considerado parte do grupo Apoptose^{Low}, exibiu um discreto aumento da apoptose espontânea dos linfócitos totais nas análises realizadas na primeira coleta e, na segunda avaliação, um significativo aumento da frequência de todas as populações de T marcadas com Anexina-V. É interessante ressaltar, entretanto, que embora esse indivíduo tenha apresentado o fenótipo Apoptose^{High} para células CD4⁺ as análises de clusterização realizadas quando da primeira coleta de sangue já sugeriam sua inclusão no grupo dos pacientes com apoptose espontânea aumentada. Ressalta-se que os indivíduos que apresentaram aumento da frequência de apoptose espontânea apenas para as populações TCD4⁺ não foram incluído no Apoptose^{High} para as análises que consideraram os pacientes como subgrupos uma vez que, como nem todos os pacientes foram incluídos na segunda etapa de avaliação, impossibilitando a realização de novas análises de clusterização no presente momento. .

O Paciente # 17 apresentou aumento da apoptose exclusivamente em células TCD4⁺ no segundo experimento sem alteração das frequências de células T e com razões CD4/CD8 normais em ambas as análises, embora apresentasse no momento da primeira coleta uma discreta linfopenia (800 linfócitos/mm³).

A análise de frequência de linfócitos CD3⁺CD8⁺Anexina⁺os pacientes com ICV também não mostrou diferença estatística entre pacientes e controles saudáveis. Entretanto, 4 dos 11 pacientes com ICV avaliados apresentavam uma frequência de linfócitos T CD8⁺ em apoptose acima dos valores encontrados nos indivíduos saudáveis, com destaque para um indivíduo (Paciente #10) que apresentou duas vezes mais linfócitos CD3⁺CD8⁺Anexina-V⁺ que a média dos controles.

O aumento da frequência de apoptose espontânea tanto de linfócitos T quanto de linfócitos B de indivíduos com ICV foi relatado pela primeira vez por Saxon e colaboradores. Esse grupo mostrou que um grupo específico de pacientes apresentava um aumento da apoptose em linfócitos B com fenótipo CD20^{bright}/ CD62L^{dim} (76). Entretanto, o perfil específico de pacientes avaliados no referido estudo limita a possibilidade de comparação dessas observações com os nossos resultados ou com os estudos que avaliaram morte celular de linfócitos na ICV.

Nossos resultados corroboram os reportados por Renzo e colaboradores ⁽⁴⁷⁾ e por Iglesias e colaboradores ⁽⁷⁵⁾ que relataram aumento da frequência de apoptose espontânea dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ nos pacientes com ICV, embora esse último estudo tenha descrito apenas apoptose aumentada nos pacientes com contagens de linfócitos T CD4⁺ abaixo de 600 cel/mm³ e CD4⁺CD45RA⁺ abaixo de 160 cel/mm³.

A apoptose espontânea de linfócitos de pacientes com ICV também foi avaliada por Giovanetti e colaboradores ⁽²⁷⁾ que mostraram que sessenta indivíduos com ICV classificados em três grupos de acordo com a frequência de células TCD4⁺ *naïves* apresentavam aumento da morte celular proporcional a diminuição desta subpopulação de linfócitos. Essas observações estão de acordo com as reportadas por Iglesias e colaboradores que mostraram que o aumento da apoptose afetava linfócitos CD4⁺CD45RA⁺ de maneira mais pronunciada. A avaliação da expressão de diferentes isoformas da proteína CD45 permite identificar, em linhas gerais, linfócitos *naïve* e de memória. Células que apresentam a proteína de alto peso molecular, CD45RA, demonstram características funcionais de células *naïve*, enquanto linfócitos que expressam CD45RO, a proteína de baixo peso molecular, demonstram características funcionais ligadas a células de memória. Após estimulação com mitógeno ou aloantígeno *in vitro*, uma série de alterações fenotípicas ocorre nas células *naïves* que, gradativamente, perdem a expressão de CD45RA para adquirir a expressão de CD45RO, levando a existência de uma população transitória característica onde ambos os antígenos são expressos em quantidades inversamente proporcionais. Células que co-expressam as duas isoformas de CD45 apresentam características funcionais intermediárias e podem, assim como as células *naïve*, suprimir a produção de imunoglobulinas por linfócitos B, ao contrário de células de memória CD45RO⁺ que estimulam a produção de anticorpos ⁽⁸²⁾.

Essa distinção entre células *naïves* e de memória é corroborada pelas seguintes observações: (i) a frequência de células CD45RO⁺ é diminuída em condições de baixa exposição a antígenos, como em sangue de cordão umbilical humano e camundongos recém nascidos; (ii) células CD45RO⁺ estão praticamente ausentes em animais criados em ambientes livres de germes; (iii) o envelhecimento em humanos e a imunização de animais provoca um aumento da proporção de células CD45RO⁺; (iv) células

CD4⁺CD45⁺ são as principais responsáveis pelo desencadeamento da resposta a antígenos vacinais, como o toxóide tetânico ⁽⁸³⁾. Entretanto, é importante ressaltar que algumas populações de células de memória são capazes de voltar a expressar a isoforma CD45RA sem perda significativa de CD45RO. A expressão concomitante destas isoformas tem sido associada com o fenótipo efetor.⁽⁸³⁾

Assim, decidimos por também observar a expressão das isoformas de CD45 nos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos com ICV. Essas análises mostram que a expressão de CD45RA⁺ e CD45RA^{int}CD45RO^{int} nos pacientes com ICV estavam diminuídas nos linfócitos CD4⁺, com destaque para dois pacientes (#14 e #16) que apresentaram frequências abaixo de 2% de linfócitos T CD4⁺ *naïves* e de 3% de células com expressão intermediária dos marcadores. Cabe destacar que a expressão de CD45RA destes dois indivíduos é equiparável ao grupo controle em células CD8⁺ e CD8^{Low}, bem como em linfócitos totais, deixando clara a capacidade deste indivíduos de expressar a proteína com alto peso molecular e sugerindo uma importante diferença no estado de ativação das subpopulações de linfócitos CD4⁺ destes pacientes. O estudo de Giovannetti e colaboradores ⁽²⁷⁾ também mostrou correlação positiva entre o aumento de apoptose espontânea, a diminuição da frequência de células *naïve* e a severidade da doença, além de correlação entre os números absolutos de células T e quadros clínicos que envolvem esplenomegalia e imunodeficiência severas em comparação com pacientes que não apresentam problemas neste compartimento celular. Dos dois pacientes com alta redução da frequência de células CD4⁺CD45RA⁺, apenas o Paciente # 14 apresentava esplenomegalia, entretanto, 5 pacientes com frequências baixas de linfócitos CD4⁺ apresentavam o mesmo quadro. Ainda, os pacientes Apoptose^{high} durante a primeira análise, apresentaram uma maior proporção de esplenomegalia e/ou linfadenomegalia. . Dos pacientes com frequência de apoptose espontânea aumentada em linfócitos CD4⁺, os dados sobre esses parâmetros clínicos estavam disponíveis apenas para o Paciente # 5 que apresentava esplenomegalia.

A observação de que pacientes com ICV podem apresentar aumento da apoptose espontânea de células T CD4⁺, seja esta transitória, cíclica ou permanente, poderia explicar a diminuição da frequência dessa subpopulação de linfócitos e a baixa relação CD4/CD8 que freqüentemente é encontrada nos pacientes. Em casos onde a

apoptose espontânea afeta ambas as populações CD3⁺, um mecanismo que poderia justificar o encolhimento específico do compartimento de células CD4⁺ poderia estar relacionado a diferenças nas vias regenerativas de células CD4 e CD8. Linfócitos citotóxicos são rapidamente substituídos por um mecanismo de expansão periférica independente do timo, enquanto a reposição de células T CD4⁺ é mais lenta e dependente do *output* tímico. Giovanetti e colaboradores⁽²⁷⁾ também mostraram que os pacientes com ICV apresentam níveis reduzidos de células CD31⁺, marcador de linfócitos CD4⁺ recém emigrados do timo, e redução do repertório de TCR, e que justificaria a capacidade prejudicada de combater infecções e cânceres. Além disso, um aumento sustentado da apoptose de linfócitos T pode resultar na exaustão progressiva da capacidade do timo de renovar esta população.

Por outro lado, outra explicação plausível para a existência de ciclos de apoptose aumentada nos pacientes poderia estar ligada não diretamente à doença, mas ao tratamento ao qual eles são submetidos. Foi relatado que o tratamento com imunoglobulina intravenosa (IVIg) é capaz de induzir apoptose de monócitos e linfócitos de maneira caspase-dependente⁽⁸⁴⁾. A capacidade da IVIg de induzir ou prevenir a morte celular por apoptose é dependente de múltiplos fatores ligados tanto a sensibilidade das células do indivíduo recipiente a morte quanto ao preparado de imunoglobulinas utilizado. Variações entre diferentes lotes, títulos de anticorpos específicos e a razão entre anticorpos agonistas ou antagonistas dos receptores de morte, como é sabido haver para anticorpos anti-Fas, nas IVIG comercialmente disponíveis podem resultar em diferentes efeitos do tratamento com IVIg quanto a apoptose das células⁽⁸⁴⁾.

Entretanto, com base no fato de que os anticorpos ministrados por IVIg tem vida média de 21 dias⁽⁸⁵⁾ a potencial interferência do tratamento no aumento da apoptose espontânea observado nos pacientes incluídos em nosso estudo, pode ser considerado de menor impacto, uma vez que a coleta de sangue para análise ocorreu antes do recebimento da infusão de imunoglobulinas e que os pacientes haviam recebido o tratamento há mais de 28 dias.

Neste estudo, além da avaliação da apoptose espontânea de linfócitos, avaliou-se molecularmente a via extrínseca de indução de apoptose nos pacientes com ICV, a

partir da expressão gênica dos receptores de morte (Fas, TNFR1, TNFR2, TRAIL-R1 e TRAIL-R2), seus respectivos ligantes (FasL, TNF α e TRAIL) e moléculas adaptadoras e reguladoras (FADD, e cFLIP) em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ separados a partir de sangue venoso de pacientes com ICV em comparação com indivíduos saudáveis.

Em relação aos receptores de morte, observou-se que embora parte dos pacientes apresentassem aumento de apoptose (grupo Apoptose^{High}), havia redução nestes da expressão gênica das moléculas importantes para indução da apoptose pela via extrínseca. Também inversa ao esperado, houve aumento da expressão dos inibidores dessa via, apesar do aumento da morte dos linfócitos. Entretanto, qualquer que seja o mecanismo que leva a aparente regulação negativa de alguns dos genes da via extrínseca da apoptose nos indivíduos com ICV, ficou claro que, para a maioria dos genes avaliados, há alta variabilidade individual tanto no grupo de controles quanto de pacientes.

Das observações coletadas a partir da expressão gênica destaca-se que, em células CD4⁺, apenas um dos pacientes (# 3) apresentava aumento da expressão de Fas e FasL, e um outro, aumentada expressão gênica de FasL (Paciente # 19) em comparação aos controles; ressalta-se que nenhum destes pacientes apresentou apoptose espontânea aumentada, diminuição da frequência de CD4 ou inversão da relação CD4/CD8 nas duas coletas realizadas.

Em células CD8⁺, o perfil da expressão gênica de Fas e FasL nos pacientes com ICV foi bastante variado e equiparável tanto no grupo de pacientes quanto nos indivíduos saudáveis.

Cabe ressaltar que o Paciente # 3, também apresentou expressão gênica aumentada, em comparação aos controles, para TNF α e TNF1 e aumento da expressão de Fas e FasL em CD8⁺. Essas observações foram associadas a um discreto aumento da população CD4⁺, levando a hipótese de que este paciente apresentasse alterações nesses fenótipos devido a ativação do sistema imune em resposta a um processo infeccioso, manifestação clínica comum nesse grupo de pacientes.

Renzo e colaboradores (2000) avaliaram, por citometria de fluxo, a expressão de Fas em células T de indivíduos com ICV, e relataram também alta variabilidade entre os pacientes, embora tenha observado que parte desses apresentava aumento da

expressão deste receptor de morte, porém não houve diferença significativa quando comparados com o grupo controle. Entretanto, ao classificar os pacientes pela expressão desta molécula, os autores verificaram altos níveis de mRNA de FasL apenas no grupo com aumento da expressão de Fas.

O aumento da expressão de Fas em linfócitos de pacientes com ICV também foi visto por Saxon e colaboradores por citometria de fluxo. Iglesias e colaboradores mostraram, também por citometria de fluxo, que pacientes com ICV que apresentavam diminuição de linfócitos $CD4^+$ ($< 600 \text{ cel/mm}^3$) e $CD4^+CD45RA^+$ ($< 160 \text{ cel/mm}^3$) também mostravam aumento de Fas nestas duas subpopulações de linfócitos. Entretanto, pacientes que apresentavam números absolutos normais de linfócitos T $CD4$ mostravam uma expressão dos receptores de morte equiparável aos controles saudáveis. A equiparação de nossos dados quanto a esse parâmetro aos existentes na literatura mostra-se complexa, uma vez que os estudos que avaliaram Fas-FasL nos pacientes com ICV apresentam drásticas diferenças no perfil dos pacientes avaliados, nas subpopulações de linfócitos estudadas e nos protocolos e métodos utilizados, além da potencial interferência da variação do balanço de anticorpos agonistas e antagonistas de Fas em diferentes preparações de IvIG. Para o sistema $TNF-\alpha/TNF-R$, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para as células $CD4^+$ e apenas uma discreta diminuição da expressão nos linfócitos $CD8^+$.

Renzo e colaboradores (2000) avaliaram a expressão destes receptores na população de linfócitos $CD4^+$ e encontraram um aumento da expressão de ambos os receptores nos pacientes com ICV. Entretanto, a análise foi realizada por PCR semi-quantitativo e os autores não detectaram a expressão dos receptores em parte dos indivíduos avaliados. Além da variabilidade existente entre as diferentes coortes de pacientes, as diferenças entre as técnicas utilizadas poderiam justificar as distintas observações entre os dados aqui apresentados e os reportados por Renzo e cols. No presente estudo, foi avaliado pela primeira vez o sistema TRAIL/TRAIL-R em pacientes com ICV, e uma das diferenças mais marcadas na expressão dos receptores de morte foi a consistente diminuição da expressão gênica de TRAIL nas células $CD8^+$ dos pacientes com ICV. Visto que TRAIL está envolvido em um importante mecanismo para a atividade citotóxica desta população de células, a diminuição expressiva desta

molécula poderia impactar diretamente na capacidade de resposta dos linfócitos TCD8⁺ destes pacientes. Embora os indivíduos com ICV sejam particularmente susceptíveis a infecções bacterianas, pacientes com comprometimento do compartimento de células T também podem apresentar, infecções virais, em particular, por herpes-vírus, Epstein-Barr-vírus e CMV. Com base nesta observação, a avaliação da atividade citotóxica dos linfócitos TCD8⁺ dos pacientes com ICV que apresentam baixa expressão de TRAIL faz-se interessante.

Também foi avaliado pela primeira vez a expressão das moléculas inibidoras da via de apoptose nos pacientes com ICV, e novamente a alteração de destaque ocorreu nos linfócitos CD8⁺, com a vasta maioria dos pacientes avaliados apresentando aumento da expressão de cFLIP_s nestas células. A atividade de cFLIP_s parece se resumir a capacidade dessas moléculas de competir com as pro-caspases pelos domínios DED, impedindo assim o desencadeamento do processo de morte celular.

O aumento da expressão da molécula capaz de bloquear a via extrínseca da apoptose em células CD8⁺, mas não em células CD4⁺, poderia indicar um mecanismo parcialmente responsável pela inversão CD4/CD8 destes indivíduos, uma vez que o aumento cFLIP_s tornaria as células CD8 menos susceptível a morte, ao menos por esta via, justificando a frequência aumentada desta população celular.

O aumento de cFLIP_s também poderia fornecer uma explicação viável para os resultados encontrados pelos dois estudos ^(47, 75) que tentaram, sem sucesso, induzir a apoptose em linfócitos dos pacientes com ICV quando em cultura com agonistas de Fas, nem mesmo nos pacientes que apresentavam aumento da expressão do receptor de morte em linfócitos.

Um paciente (#18) apresentou uma expressão de cFLIP_s particularmente alta em células CD8⁺ em relação tanto aos controles saudáveis (141.8 em relação a mediana dos controles). Embora essa alteração não tenha impactado nos demais parâmetros aqui avaliados, destaca-se neste paciente, clinicamente, quadros variados de autoimunidade como pancolite, diabetes tipo I e hipotireoidismo, Embora este paciente não apresente diagnóstico de neoplasia, estudos recentes tem mostrado uma associação de altos níveis de cFLIP_s podem estar relacionados a falha nos mecanismo de controle de infecções virais e desenvolvimento de tumores. Destaca-se também que

vírus como o Herpes Vírus Associado ao Sarcoma de Kaposi, podem mediar resistência a apoptose através da expressão de isoformas de vFLIP, isoforma viral da proteína que se assemelha ao cFLIP_s, colaborando para a progressão tumoral ^(86, 87).

De todos os genes avaliados, a expressão gênica da adaptadora de FADD estava significativamente diminuída em células CD4⁺ e CD8⁺ dos pacientes com ICV. Esta observação é interessante tendo em vista que a ausência de FADD está relacionada a um programa de morte celular controlado e pró inflamatório mediado por RIP3 conhecido como necroptose. A presença de FADD no ripotossoma, complexo formado por FADD, RIP3 e RIP1, é importante para o recrutamento da caspase-8 para o complexo, sendo esta última responsável pela degradação da molécula RIP 1 e, consequentemente, para a inibição desta via de morte ^(86, 88).

Por fim, os resultados da expressão gênica das moléculas da via intrínseca da apoptose Bcl-2 e Bcl-xL se mostraram interessantes pois ser a primeira demonstração de moléculas anti-apoptóticas moduladoras da via intrínseca em pacientes com ICV. Foi observada uma severa diminuição da expressão de Bcl-2 tanto em células CD4⁺ quanto CD8⁺ dos indivíduos com ICV avaliados. Para Bcl-xL, apenas houve diminuição da expressão gênica em linfócitos CD8⁺, enquanto as células CD4⁺ mostraram valores equiparados aos encontrados nos controles saudáveis. .

Em um estudo anterior, Iglésias e colaboradores não encontraram diferença na expressão de Bcl-2 por citometria de fluxo, quando avaliando dois grupos de pacientes com ICV, com ou sem linfopenia CD4⁺, mesmo tendo encontrado diminuição da média de intensidade de fluorescência no último grupo ⁽⁷⁵⁾. Ressalta-se, entretanto, este estudo contou apenas com três pacientes por grupo avaliado, o que pode justificar a ausência de diferença estatística relatada.

Di Renzo e colaboradores haviam relatado, avaliando linfócitos T estimulados com anti-CD3/CD28, a existência de grande variabilidade de expressão de Bcl-2 nos pacientes e que linfócitos CD3⁺ de pacientes com ICV não eram capazes de regular positivamente a expressão de Bcl-xL após estimulação com anti-CD28. Num estudo subsequente, os mesmos autores relataram que os pacientes apresentavam expressão equiparada destas proteínas anti-apoptóticas, quando avaliadas por citometria de fluxo ⁽⁴⁷⁾. As diferenças no grupo de pacientes avaliado e na metodologia empregada nestes

estudos e em nosso trabalho, entretanto, podem explicar a diferença observada para a expressão destas moléculas.

Ate o presente momento, esse transtorno foi relacionado à perda de função de moléculas importantes para a sobrevivência de células B e para diferenciação destas células em plasmócitos, dentre as quais destacam-se a deficiência de TACI, que corresponde cerca de 10% dos casos de ICV, e defeitos individuais ou familiares em BAFF-R, CD19, CD20 e CD81 ⁽²⁶⁾.

A deficiência de ICOS, primeira ligada diretamente a células T, é um importante indicador de que a falta de comunicação adequada entre linfócitos T e B pode desencadear uma doença que se enquadra nos critérios diagnósticos da ICV. Além disso, diversas anormalidades ligadas à função dos linfócitos T foram descritas, incluindo a significativa depleção de células *naïves*, ativação massiva, disfunções na proliferação e produção alterada de citocinas, reforçando a hipótese de significativa participação desta subpopulação no desenvolvimento do transtorno. Um dos grandes desafios impostos pelo diagnóstico de ICV e a identificação de possível (is) fenótipo(s) em comum que permitam agrupar os pacientes de forma mais homogênea, ligando achados laboratoriais a manifestações clínicas.

A ICV é, por definição, uma deficiência predominantemente humoral, entretanto já foi sugerido que parte dos pacientes seja portadora de imunodeficiência combinada devido ao comprometimento acentuado do compartimento celular ^(89, 90). Giovanetti e colaboradores (2007) reforçam a necessidade da inclusão de parâmetros relacionados a número e função dos linfócitos T para a criação de sistemas de classificação mais adequados e abrangentes ⁽²⁷⁾.

Pesquisas realizadas por diferentes grupos compartilham a hipótese da existência de aumento da susceptibilidade a apoptose de linfócitos T nos pacientes com ICV e nossos resultados se encontram em concordância com os achados da literatura.

O acompanhamento individual dos pacientes com ICV quanto à susceptibilidade à morte por apoptose de linfócitos mostra-se interessante, visto que há constante observação de aumento de apoptose espontânea dos linfócitos, principalmente de células CD4⁺, em parte dos pacientes com ICV em diferentes coortes, e a inconstância do aumento deste parâmetro do ponto de vista individual que encontramos ao avaliar

dois pontos de tempo diferentes, Adicionalmente, o acompanhamento pormenorizado de aspectos clínicos, como a presença de infecções, o período entre a recepção da última infusão de imunoglobulinas e o momento da avaliação da apoptose, tornam-se imprescindíveis para a determinação de relação causa-efeito.

Compreender as potenciais causas da diminuição do compartimento de células T CD4⁺ nestes indivíduos pode representar um importante avanço na investigação da ICV. Ainda, desvendar o papel das células T na patogênese da ICV mostra-se interessante não apenas do ponto de vista do entendimento da doença, mas também por possibilitar o desenvolvimento de abordagens terapêuticas e profiláticas mais específicas para a melhoria da qualidade de vida desses pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 564 p.
2. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(4):776-94.
3. Vihinen M. Immunodeficiency, primary: affecting the adaptive immune system. *Encyclopedia of life sciences*; 2010. [1-6]
4. Bonilla FA, Geha RS. 2. Update on primary immunodeficiency diseases. *The Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2 Suppl):S435-S41.
5. Giovannetti A, Pierdominici M, Di Iorio A, Cianci R, Murdaca G, Puppo F, et al. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. *Curr Pharm Des*. 2008;14(3):253-68.
6. Wood PM. Primary antibody deficiency syndromes. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(4):356-61.
7. Ballou M. Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(4):581-91.
8. Wood P, Stanworth S, Burton J, Jones A, Peckham DG, Green T, et al. Recognition, clinical diagnosis and management of patients with primary antibody deficiencies: a systematic review. *Clin Exp Immunol*. 2007;149(3):410-23.
9. Gathmann B, Binder N, Ehl S, Kindle G. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: update 2011. *Clin Exp Immunol*. 2012;167(3):479-91.
10. Primary immunodeficiency diseases. Report of a WHO scientific group. *Clin Exp Immunol*. 1997;109 Suppl 1:1-28.
11. Cunningham-Rundles C. Common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001;1(5):421-9.

12. Kokron CM, Errante PR, Barros MT, Baracho GV, Camargo MM, Kalil J, et al. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. *An Acad Bras Cienc.* 2004;76(4):707-26.
13. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol.* 1999;92(1):34-48.
14. Yong PL, Orange JS, Sullivan KE. Pediatric common variable immunodeficiency: immunologic and phenotypic associations with switched memory B cells. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21(5):852-8.
15. Weiler CR, Bankers-Fulbright JL. Common variable immunodeficiency: test indications and interpretations. *Mayo Clin Proc.* 2005;80(9):1187-200.
16. Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher AJ, Gaspar HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(3):401-9.
17. Bryant A, Calver NC, Toubi E, Webster AD, Farrant J. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990;56(2):239-48.
18. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol.* 1999;93(3):190-7.
19. Saiki O, Ralph P, Cunningham-Rundles C, Good RA. Three distinct stages of B-cell defects in common varied immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(19):6008-12.
20. Janeway CA, Apt L, Gitlin D. Agammaglobulinemia. *Trans Assoc Am Physicians.* 1953;66:200-2.
21. Webster AD. Clinical and Immunological Spectrum of Common Variable Immunodeficiency (CVID). *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2004;3(3):103-13.
22. Bonilla FA, Geha RS. 12. Primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2 Suppl):S571-S81.

23. Webster AD. Clinical and Immunological Spectrum of Common Variable Immunodeficiency (CVID). *Iran J Allergy Asthma Immunol. Asthma and Immunology*. 2004;3(3):11.
24. Blanco-Quiros A, Solis-Sanchez P, Garrote-Adrados JA, Arranz-Sanz E. Common variable immunodeficiency. Old questions are getting clearer. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2006;34(6):263-75.
25. Di Renzo M, Pasqui AL, Auteri A. Common variable immunodeficiency: a review. *Clin Exp Med*. 2004;3(4):211-7.
26. Eibel H, Salzer U, Warnatz K. Common variable immunodeficiency at the end of a prospering decade: towards novel gene defects and beyond. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(6):526-33.
27. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, et al. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol*. 2007;178(6):3932-43.
28. Goldacker S, Warnatz K. Tackling the heterogeneity of CVID. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5(6):504-9.
29. Bayry J, Hermine O, Webster DA, Levy Y, Kaveri SV. Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. *Trends Mol Med*. 2005;11(8):370-6.
30. Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarstrom Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet*. 2005;37(8):820-8.
31. van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castano D, van Noesel CJ, van Tol MJ, et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med*. 2006;354(18):1901-12.
32. Losi CG, Silini A, Fiorini C, Soresina A, Meini A, Ferrari S, et al. Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2005;25(5):496-502.
33. Kopecky O, Lukesova S. Genetic defects in common variable immunodeficiency. *Int J Immunogenet*. 2007;34(4):225-9.
34. Kuribayashi JS, Bombardieri CR, Baracho GV, Aliberti J, Machado FS, Kalil J, et al. Slower rescue of ER homeostasis by the unfolded protein response pathway

- associated with common variable immunodeficiency. *Mol Immunol*. 2008;45(10):2990-7.
35. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Galicier L, Lepelletier Y, Webster D, et al. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. *Blood*. 2004;104(8):2441-3.
 36. Viallard JF, Camou F, Andre M, Liferman F, Moreau JF, Pellegrin JL, et al. Altered dendritic cell distribution in patients with common variable immunodeficiency. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(5):R1052-5.
 37. Cunningham-Rundles C, Radigan L. Deficient IL-12 and dendritic cell function in common variable immune deficiency. *Clin Immunol*. 2005;115(2):147-53.
 38. Aspalter RM, Sewell WA, Dolman K, Farrant J, Webster AD. Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol*. 2000;121(3):506-14.
 39. Fevang B, Mollnes TE, Holm AM, Ueland T, Heggelund L, Damas JK, et al. Common variable immunodeficiency and the complement system; low mannose-binding lectin levels are associated with bronchiectasis. *Clin Exp Immunol*. 2005;142(3):576-84.
 40. Sneller MC. Common variable immunodeficiency. *Am J Med Sci*. 2001;321(1):42-8.
 41. Fevang B, Yndestad A, Sandberg WJ, Holm AM, Muller F, Aukrust P, et al. Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: association with chronic inflammation in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(3):521-5.
 42. Genre J, Errante PR, Kokron CM, Toledo-Barros M, Camara NO, Rizzo LV. Reduced frequency of CD4(+)CD25(HIGH)FOXP3(+) cells and diminished FOXP3 expression in patients with Common variable immunodeficiency: a link to autoimmunity? *Clin Immunol*. 2009;132(2):215-21.
 43. Farrant J, Spickett G, Matamoros N, Copas D, Hernandez M, North M, et al. Study of B and T cell phenotypes in blood from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Immunodeficiency*. 1994;5(2):159-69.
 44. Wright JJ, Wagner DK, Blaese RM, Hagengruber C, Waldmann TA, Fleisher TA. Characterization of common variable immunodeficiency: identification of a subset of patients with distinctive immunophenotypic and clinical features. *Blood*. 1990;76(10):2046-51.

45. Bloch-Michel C, Viallard JF, Blanco P, Liferman F, Neau D, Moreau JF, et al. [Common variable immunodeficiency: 17 observations in the adult]. *Rev Med Interne*. 2003;24(10):640-50.
46. Guazzi V, Aiuti F, Mezzaroma I, Mazzetta F, Andolfi G, Mortellaro A, et al. Assessment of thymic output in common variable immunodeficiency patients by evaluation of T cell receptor excision circles. *Clin Exp Immunol*. 2002;129(2):346-53.
47. Di Renzo M, Serrano D, Zhou Z, George I, Becker K, Cunningham-Rundles C. Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas/fasligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS. *Clin Exp Immunol*. 2001;125(1):117-22.
48. Di Renzo M, Zhou Z, George I, Becker K, Cunningham-Rundles C. Enhanced apoptosis of T cells in common variable immunodeficiency (CVID): role of defective CD28 co-stimulation. *Clin Exp Immunol*. 2000;120(3):503-11.
49. Warnatz K, Denz A, Drager R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*. 2002;99(5):1544-51.
50. Piqueras B, Lavenu-Bombed C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol*. 2003;23(5):385-400.
51. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008;111(1):77-85.
52. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. 2008;112(2):277-86.
53. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal*. 2003;15(11):983-92.
54. Strasser A, Cory S, Adams JM. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J*. 2011;30(18):3667-83.
55. Hacker G, Bauer A, Villunger A. Apoptosis in activated T cells: what are the triggers, and what the signal transducers? *Cell Cycle*. 2006;5(21):2421-4.

56. Mahmood Z, Shukla Y. Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res.* 2010;316(6):887-99.
57. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(9):745-56.
58. Nakayama J, Ogawa Y, Yoshigae Y, Onozawa Y, Yonemura A, Saito M, et al. A humanized anti-human Fas antibody, R-125224, induces apoptosis in type I activated lymphocytes but not in type II cells. *Int Immunol.* 2006;18(1):113-24.
59. Newton K, Harris AW, Bath ML, Smith KG, Strasser A. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J.* 1998;17(3):706-18.
60. Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, et al. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity.* 1998;9(2):267-76.
61. Kang TB, Oh GS, Scandella E, Bolinger B, Ludewig B, Kovalenko A, et al. Mutation of a self-processing site in caspase-8 compromises its apoptotic but not its nonapoptotic functions in bacterial artificial chromosome-transgenic mice. *J Immunol.* 2008;181(4):2522-32.
62. Pinkoski MJ, Green DR. Lymphocyte apoptosis: refining the paths to perdition. *Curr Opin Hematol.* 2002;9(1):43-9.
63. Hippe D, Lytovchenko O, Schmitz I, Luder CG. Fas/CD95-mediated apoptosis of type II cells is blocked by *Toxoplasma gondii* primarily via interference with the mitochondrial amplification loop. *Infect Immun.* 2008;76(7):2905-12.
64. Xu G, Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res.* 2007;17(9):759-71.
65. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica.* 2003;88(2):212-8.
66. Rensing-Ehl A, Warnatz K, Fuchs S, Schlesier M, Salzer U, Draeger R, et al. Clinical and immunological overlap between autoimmune lymphoproliferative syndrome and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol.* 2010;137(3):357-65.

67. Gonzalez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene*. 2010;29(34):4752-65.
68. Falschlehner C, Schaefer U, Walczak H. Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology*. 2009;127(2):145-54.
69. Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D, et al. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol*. 1999;163(2):920-6.
70. Saitou Y, Shiraki K, Fuke H, Inoue T, Miyashita K, Yamanaka Y, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors in viral hepatic diseases. *Hum Pathol*. 2005;36(10):1066-73.
71. Brincks EL, Katewa A, Kucaba TA, Griffith TS, Legge KL. CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection. *J Immunol*. 2008;181(7):4918-25.
72. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010;20(2):87-103.
73. Sawanobori M, Yamaguchi S, Hasegawa M, Inoue M, Suzuki K, Kamiyama R, et al. Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2003;27(7):583-91.
74. Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(2):210-3.
75. Iglesias J, Matamoros N, Raga S, Ferrer JM, Mila J. CD95 expression and function on lymphocyte subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID); related to increased apoptosis. *Clin Exp Immunol*. 1999;117(1):138-46.
76. Saxon A, Keld B, Diaz-Sanchez D, Guo BC, Sidell N. B cells from a distinct subset of patients with common variable immunodeficiency (CVID) have increased CD95 (Apo-1/fas), diminished CD38 expression, and undergo enhanced apoptosis. *Clin Exp Immunol*. 1995;102(1):17-25.
77. Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, editors. *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Heidelberg: Springer Press; 2001. p. 21-34.

78. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):RESEARCH0034.
79. Pfaffl PW. Quantification strategies in real-time PCR In: A. BS, editor. A-Z of quantitative PCR. La Jolla, CA, USA: International University Line (IUL); 2004. p. 87 - 112.
80. Rieder SA, Chauhan A, Singh U, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology.* 2010;215(8):598-605.
81. Nonoyama S, Farrington M, Ishida H, Howard M, Ochs HD. Activated B cells from patients with common variable immunodeficiency proliferate and synthesize immunoglobulin. *J Clin Invest.* 1993;92(3):1282-7.
82. Summers KL, O'Donnell JL, Hart DN. Co-expression of the CD45RA and CD45RO antigens on T lymphocytes in chronic arthritis. *Clin Exp Immunol.* 1994;97(1):39-44.
83. Arlettaz L, Barbey C, Dumont-Girard F, Helg C, Chapuis B, Roux E, et al. CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4(+)CD45RA(-)RO(+) memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO. *Eur J Immunol.* 1999;29(12):3987-94.
84. von Gunten S, Simon HU. Cell death modulation by intravenous immunoglobulin. *J Clin Immunol.* 2010;30 Suppl 1:S24-30.
85. Berger M. Principles of and advances in immunoglobulin replacement therapy for primary immunodeficiency. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2008;28(2):413-37.
86. Feoktistova M, Geserick P, Kellert B, Dimitrova DP, Langlais C, Hupe M, et al. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell.* 2011;43(3):449-63.
87. Punj V, Matta H, Schamus S, Chaudhary PM. Integrated microarray and multiplex cytokine analyses of Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus viral FLICE Inhibitory Protein K13 affected genes and cytokines in human blood vascular endothelial cells. *BMC Med Genomics.* 2009;2:50.
88. Weinlich R, Dillon CP, Green DR. Ripped to death. *Trends Cell Biol.* 2011;21(11):630-7.

89. Malphettes M, Gerard L, Carmagnat M, Mouillot G, Vince N, Boutboul D, et al. Late-onset combined immune deficiency: a subset of common variable immunodeficiency with severe T cell defect. *Clin Infect Dis*. 2009;49(9):1329-38.
90. Duarte AJ, Vasconcelos DM, Sato MN, Sales JM, Yamaguchi NH, Brigido LF, et al. [Common variable immunodeficiency (hypogammaglobulinemia of late onset or acquired hypogammaglobulinemia): initial follow-up of 11 cases]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1990;45(3):95-104.