CAMILA DE LOLLO

**Avaliação das células TCD4+ reguladoras e efetoras na
Imunodeficiência Comum Variável**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Notomi Sato

São Paulo
2015

CAMILA DE LOLLO

**Avaliação das células TCD4+ reguladoras e efectoras na
Imunodeficiência Comum Variável**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Notomi Sato

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lollo, Camila de

Avaliação das células TCD4+ reguladoras e efectoras na imunodeficiência comum variável / Camila de Lollo. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientador: Maria Notomi Sato.

Descritores: 1.Imunodeficiência de variável comum 2.Imunidade inata
3.Linfócitos T reguladores 4.Receptores toll-like 5.Imunoglobulinas 6.Interleucinas

USP/FM/DBD-381/15

Dedicatória

A meus pais Terezinha e Geraldo (*in memoriam*) por serem meu alicerce e por todo o amor e carinho.

Ao meu irmão Fabio, minha tia-madrinha Mazé e a minha avó Antonia por todo amor e pelo constante incentivo ao longo da minha vida.

Agradecimentos

A Prof^a. Dr^a. Maria Notomi Sato, minha orientadora, professora, por toda a sua paciência, zelo, dedicação e por acreditar em mim.

Aos amigos queridos do LIM-56, que me ajudaram a desenvolver este projeto: Luanda M.S. Oliveira (Lu), Josenilson Feitosa de Lima (Joseph), Tiago de Oliveira Titz (Titz), Gabrielle Mitsunari (Gabi), Vanessa Gonçalves dos Santos (Valeusca), Rosana Domingues (Rô), Gabriel Carvalho (Gabis), Kelly Cristina Manfrere (Kellynha), Anna Claudia C.C. Branco (Aninha), Luana Mendonça (Lu) e Raquel Leão Orfali, pela amizade, pelas boas risadas e por todo carinho.

Ao Prof^o Dr^o Alberto José da Silva Duarte, por todo o apoio institucional.

Aos Profs. Drs. Dewton de Mores Vasconcelos, Cristina Maria Kokron e Josenilson Feitosa de Lima, pela grata contribuição na elaboração deste trabalho.

A todos os outros amigos do LIM-56 e do departamento de Dermatologia do HC-FMUSP, que direta ou indiretamente contribuíram com este projeto.

Aos pacientes que gentilmente aceitaram participar e tornaram este trabalho possível.

A FAPESP, pelo suporte financeiro.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação: 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Imunodeficiência Comum Variável.....	1
1.2. Imunidade inata: ativação via os receptores Toll-like	3
1.3. Células TCD4 em ICV	5
1.4. Células TCD4+ reguladoras na ICV	8
2. OBJETIVOS.....	11
3. MÉTODOS.....	13
3.1. Casuística	13
3.2. Obtenção de células mononucleares (CMNs) do sangue periférico	13
3.3. Cultura para sobrenadantes com ligantes de TLRs.....	13
3.4. Marcação de células B e linfócitos TCD4+ por citometria de fluxo	14
3.5. Análise de linfócitos T foliculares por citometria de fluxo	15
3.6. Análise de células TCD4+ e CD8+ reguladoras por citometria de fluxo	16
3.7. Análise de células TCD4+ e CD8+ polifuncional por citometria de fluxo	16
3.8. Dosagem de citocinas e quimiocinas por citometria de fluxo	17
3.9. Análise estatística	18
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Dados demográficos em ICV	20
4.2. Perfil fenotípico de células B	21
4.3. Perfil de maturação das células TCD4+ no sangue periférico de pacientes com ICV.....	23
4.4. Análise do perfil fenotípico das células TCD4+reguladoras	27
4.5. Análise da frequência dos linfócitos T foliculares em sangue periférico	29

4.6.	Frequência de células TCD4+ e TCD8+ secretoras de citocinas após estímulos com agonistas de receptores Toll-like	31
4.7.	Análise da frequência de células Th22 e Tc22 circulantes	37
4.8.	Avaliação de células TCD4+ e TCD8+ polifuncionais	39
4.9.	Avaliação sérica de quimiocinas e citocinas.....	43
4.10.	Avaliação da secreção de citocinas e quimiocinas após estímulo com agonistas TLRs	44
4.11.	Avaliação da secreção de IFN- α após estímulo com agonistas TLRs	47
5.	DISCUSSÃO.....	49
6.	CONCLUSÃO	57
7.	ANEXO.....	59
8.	REFERÊNCIAS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

APC:	Células apresentadoras de antígenos
CAPPesq:	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
BCMA:	<i>B-cell maturation antigen</i>
BTLA:	<i>co-inhibitor B and T lymphocyte attenuator</i>
CBA:	<i>Cytometric bead array</i>
CCL:	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD:	<i>Cluster differentiation</i>
Células NK:	Célula <i>natural killer</i>
CMNs:	Células mononucleares
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
CXCL:	<i>Chemokine (C- X-C motif) ligand</i>
DCs	Células dendríticas
DNA:	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dsRNA:	RNA dupla fita
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra- acético
FACS:	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC:	<i>Fluorescein Issothiacynate</i>
FMO:	<i>Fluorescence Minus One</i>
FSC:	<i>Foward scatter</i>
GATA-3:	<i>GATA-binding protein-3</i>
GITR	<i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor family receptor</i>
HC-FMUSP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV:	Vírus da imunodeficiência humana
ICOS:	<i>Inducible T-cell costimulator</i>
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ :	Interferon gama
IgA:	Imunoglobulina da classe A
IgD:	Imunoglobulina da classe D
IgM:	Imunoglobulina da classe M
IgG:	Imunoglobulina da classe G
IL:	Interleucina
IRF:	<i>Interferon regulatory factor</i>
MHC:	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA:	RNA mensageiro
MyD88:	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NFAT:	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- κ B:	Fator nuclear kappa B
PAMPs:	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS:	Tampão fosfato-salino
pDC:	<i>Plasmacytoid dendritic cells</i>
PD-1	<i>Programmed cell death -1</i>
PE:	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP:	<i>Peridinin chlorophyll protein</i>
pH:	Potencial hidrogeniônico
PKC:	<i>Protein kinase C</i>

PMA:	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
PRR:	<i>Pattern recognition receptors</i>
pTreg:	Células T reguladoras induzidas periféricamente
Ras/Raf:	<i>Serine/threonine-specific protein kinases</i>
RNA:	<i>Ribonucleic acid</i>
ROR γ t:	<i>Retinoid-related orphan receptor gamma t</i>
RPM:	Rotações por minuto
SAP:	<i>SLAM Associated Protein</i>
SEB:	Enterotoxina de <i>Staphylococcus aureus</i> B
SSC:	<i>Side scatter</i>
ssRNA:	RNA simples fita
STAT:	Signal transducer and activator of transcription
T-bet:	<i>T box expressed in T cells</i>
TCR:	Receptor de células T
Tfh:	Células T foliculares
TGF- β :	Fator de crescimento transformante beta
Th:	Células T auxiliaries
TLRs:	<i>Toll-like receptors</i>
TNF:	Fator de necrose tumoral
tTreg:	Células T reguladoras tímicas

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
µg	Micrograma
µL	Microlitro
<	Menor que
=	Igual a
>	Maior que
≤	Menor ou igual a
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
N	Tamanho da amostra
Ng	Nanograma
Fg	Fentograma
Pg	Picograma
+	Positivo
-	Negativo
G	Unidade gravitacional

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos subtipos de TLR e vias de sinalização.....	4
Figura 2: Representação ilustrativa das subpopulações de células TCD4+	5
Figura 3. Frequência de células B no sangue periférico de controles saudáveis e pacientes com ICV.....	22
Figura 4. Estratégia de gate para linfócitos TCD4+ no sangue periférico.	24
Figura 5. Perfil de diferenciação/maturação de células T CD4+ PD-1+ no sangue periférico de controles saudáveis e pacientes com ICV.	25
Figura 6. Perfil de diferenciação/maturação de células T CD8+CD127+ e TCD8+ CD127- CD38+ no sangue periférico de controles saudáveis e pacientes com ICV.	26
Figura 7. Caracterização das células T reguladoras em controles saudáveis e pacientes com ICV.	28
Figura 8. Caracterização dos linfócitos T foliculares em controles saudáveis e pacientes com ICV.	30
Figura 9. Estratégia de gate para linfócitos TCD4+ e TCD8+ monofuncionais.	32
Figura 10. Avaliação de células TCD4+ secretoras de IFN- γ , IL-17a ou IL-22 após estímulos com agonistas de TLRs, SEB ou PMA/IONO.	33
Figura 11. Avaliação de células TCD4+ secretoras de IL-10 ou TNF após estímulos com agonistas de TLRs, SEB ou PMA.	34
Figura 12. Avaliação de células TCD8+ secretoras de IFN- γ , IL-17a ou IL-22 após estímulos com agonistas de TLRs, SEB ou PMA.	35
Figura 13. Avaliação de células TCD8+ secretoras de IL-10 ou TNF após estímulos com agonistas de TLRs, SEB ou PMA.	36
Figura 15. Análise da frequência de células Th22 e Tc22 circulantes.	38
Figura 16. Estratégia de gate para linfócitos TCD4+ e TCD8+ polifuncionais.	40
Figura 17. Avaliação da polifuncionalidade de células TCD4+ e TCD8+ na ICV.....	41
Figura 18. Avaliação da polifuncionalidade de células TCD4+ e TCD8+ com expressão de CD38 na ICV.	42
Figura 19. Avaliação sérica de citocinas e quimiocinas.....	43
Figura 20. Avaliação de citocinas após estímulo com agonistas TLRs	45
Figura 21. Avaliação de quimiocinas após estímulo com agonistas TLRs	46
Figura 22. Avaliação da secreção de IFN- α após estímulo com agonistas TLRs.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Pannel de anticorpos para marcação das células B	14
Quadro 2: Pannel de anticorpos para marcação das células T de sangue periférico	15
Quadro 3: Pannel de anticorpos para marcação das células T foliculares.....	15
Quadro 4: Pannel de anticorpos para marcação das células T reguladoras	16
Quadro 5: Pannel de anticorpos para marcação das células T polifuncional	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes com ICV	20
--	----

Resumo

Lollo C. Avaliação das células TCD4⁺ reguladoras e efetoras na Imunodeficiência Comum Variável [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015. 71p.

INTRODUÇÃO: As infecções causadas por bactérias ou vírus são frequentes em pacientes com imunodeficiência comum variável (ICV) devido à deficiência de anticorpos e associação com alteração da função das células T. **OBJETIVOS:** Avaliar o efeito da ativação de receptores *Toll-like* (TLR) utilizando ligantes de TLRs em células T monofuncionais ou polifuncionais em pacientes com ICV. **MÉTODOS:** Foram selecionados 16 pacientes com ICV do Ambulatório de Manifestações Dermatológicas das Imunodeficiências Primárias ADEE3003 HC-FMUSP e 16 controles saudáveis. Os métodos utilizados de citometria de fluxo foram: a) análise em sangue periférico de linfócitos B, linfócitos T quanto ao perfil de ativação/maturação, linfócitos T foliculares (Tfh) e células T reguladoras (Treg); b) dosagem de citocinas e quimiocinas em amostras de soro e em sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMNs) estimuladas com agonistas de TLRs; c) avaliação das células TCD4⁺ mono e polifuncionais secretoras de IL-17a, IL-22, TNF, IFN- e IL-10, e expressão de marcador de ativação crônica de CD38 estimuladas por agonistas de TLR2, TLR3 e TLR7/8 e estímulos policlonais como enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) e acetato miristato de forbol e ionomicina (PMA/IONO); d) células Th22 e Tc22 estimuladas com TLR e SEB. **RESULTADOS:** Na ICV, os linfócitos B do sangue periférico mostram diminuída frequência, sendo em maior frequência de linfócitos B naïve (CD19⁺IgD⁺CD27⁻), e ausência de células B de memória. Além disto, um aumento na expressão do marcador de exaustão PD-1 foi observado nas células TCD4⁺ de memória efetora (CD45RA⁻CCR7⁻) e na expressão de CD38, em células TCD8⁺ terminalmente diferenciadas (CD45RA⁺ + CCR7⁻). Em contraste, houve diminuição na frequência de células T reguladoras naïve nos pacientes com ICV. Nos indivíduos com ICV foi observado aumento na frequência de células TCD4⁺ TNF⁺ sob estímulo TLR2 e TLR7/8 comparado ao grupo controle, enquanto que sob estímulo com PMA/IONO houve menor frequência de células TCD4⁺ e TCD8⁺ secretoras de IFN- γ IL-17a, IL-22 ou TNF. Já em células TCD8⁺ houve importante redução na ativação via TLR3 na resposta de IL-22, IFN- γ e IL-17a. Contudo, os estímulos com TLR7/8 e SEB foram capazes de aumentar a frequência de células Th22 e Tc22 nos pacientes com ICV. Em geral, as células TCD4⁺, que secretam simultaneamente 4 a 5 citocinas induzidas por

TLR foram preservadas em ICV. Embora as células TCD4+ polifuncionais secretoras de 3 citocinas, foram capazes de responder a estímulos via TLR2 e TLR7/8, as células TCD8+ não responderam para qualquer estímulo via TLRs. Além disso, as células T que expressam CD38 mostraram menor polifuncionalidade aos estímulos via TLRs e PMA/IONO. O perfil inflamatório nos pacientes com ICV foi observado pela elevação sérica de IL-6, CCL-2, CCL-5, CXCL8, CXCL-9, CXCL-10. Alteração na resposta aos agonistas de TLRs em ICV pode ser observada com a ativação dos agonistas de TLRs em CMNs, que mostrou maior produção de TNF e diminuição de CCL2 e CXCL8 após ativação via TLR4. Em contraste, o agonista de TLR7/8, teve ação oposta induzindo CXCL10 e reduzindo os níveis de CXCL9. Chama atenção no ICV, à reduzida secreção de IFN- α induzida por TLR7/8, que não foi observada com a ativação via TLR9.

CONCLUSÕES: Até o momento, os achados em ICV mostram alterações nas células T, seja quanto à baixa frequência de células T reguladoras naïve e a reduzida resposta efetora, em especial das células TCD8+. Contudo, enfatiza o potencial de adjuvante dos agonistas de TLR7/8 na ativação das células T.

Descritores: 1.Imunodeficiência de variável comum 2.Imunidade inata 3.Linfócitos T reguladores 4.Receptores *Toll-like* 5.Imunoglobulinas 6. Interleucinas

Abstract

Lollo C. Evaluation of CD4⁺ T regulatory and effector cells in the Common Variable Immunodeficiency [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015. 71p.

INTRODUCTION: Infections caused by bacteria or viruses are common in patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID), due to antibody deficiency and association with altered function of T cells. **OBJECTIVES:** To evaluate the effect of Toll-like receptors (TLR) activation using TLR agonists on the monofunctional or polyfunctional T cells in patients with CVID. **METHODS:** We selected 16 patients with ICV from the Dermatologic Manifestations of Primary Immunodeficiencies Clinic ADEE3003 HC-FMUSP and 16 healthy controls. The methods used for flow cytometry were: a) analysis of peripheral blood B lymphocytes, T lymphocytes were assessed by the activation/maturation profile, follicular T cells (Tfh) and regulatory T cells (Treg); b) evaluation of cytokines and chemokines serum levels and in supernatants of mononuclear cell cultures from peripheral blood (PBMC) stimulated with TLR agonists; c) evaluation of mono and polyfunctional CD4⁺ T cells secreting IL-17a, IL-22, TNF, IFN- γ and IL-10, and expression chronic activation marker of CD38 stimulated by agonists of TLR2, TLR3 and TLR7/8 and polyclonal stimuli such as *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) and phorbol myristate acetate and ionomycin (PMA / IONO); d) analysis of Tc22 and Th22 cells stimulated with TLR and SEB. **RESULTS:** In the CVID, the peripheral blood B cells show decreased frequency, being higher frequency of naïve B cells (IgD⁺ CD19⁺ CD27⁻) and lack of memory B cells. Moreover, an increased expression of PD-1, an exhaustion marker, was detected in the CD4⁺ T cell effector memory (CD45RA⁻ CCR7⁻) and expression of CD38 on CD8⁺ T terminally differentiated cells (CD45RA⁺ CCR7⁻). In contrast, a decreased frequency of naïve regulatory T cells was detected in the patients with CVID. In CVID patients it was observed increased frequency of T CD4⁺ TNF⁺ cells upon TLR2 and TLR7/8 agonists compared to the control group, while under stimulation with PMA / IONO there was a lower frequency of CD4⁺ and CD8⁺T cells secreting IFN- γ , IL-17a, IL-22 or TNF. The CD8⁺T cells showed a significant reduction of in the IL-22 response, IFN- γ and IL-17a induced by TLR3 activation. However, stimulation with TLR7/8 and SEB were able to increase the frequency of Th22 and TC22 cells in the patients with CVID. In CVID patients it was observed increased frequency of T CD4⁺ TNF⁺ cells upon TLR2 and TLR7/8 agonists compared to the control group, while

under stimulation with PMA /IONO there was a lower frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells secreting IFN- γ , IL-17a, IL-22 or TNF. The CD8⁺ T cells showed a significant reduction of in the IL-22 response, IFN- γ and IL-17a induced by TLR3 activation. However, stimulation with TLR7/8 and SEB were able to increase the frequency of Th22 and TC22 cells in the patients with CVID. In general, CD4⁺ T cells that secrete simultaneously 4 to 5 cytokines induced by TLR were preserved in CVID. Although polyfunctional CD4⁺ T cells secreting 3 cytokines were able to respond to TLR2 and TLR7/8 agonists, the CD8⁺ T cells did not respond to any stimuli. In addition, T cells expressing CD38, showed lower polyfunctionality to the stimuli via TLRs and PMA/IONO. Furthermore, the inflammatory status in the patients with CVID was observed by the increased serum levels of IL-6, CCL-2, CCL-5, CXCL8, CXCL-9, CXCL-10. In contrast, the agonist of TLR7/8 had opposite action inducing CXCL10 and reducing the CXCL9 levels. Noteworthy in CVID, that the reduced secretion of IFN- α induced by TLR7/8 was not observed with TLR9 activation. CONCLUSIONS: To date, the CVID findings shows alterations in the T cells, as the low frequency of naïve regulatory T cells and reduced effector response, mainly of CD8⁺ T cells. However, it emphasizes the adjuvant potential of the TLR7/8 agonist in the T cells activation.

Descriptors: 1.Common variable immunodeficiency 2.Immunity, innate 3. T-Lymphocytes, regulatory 4.Toll-like receptors 5.Immunoglobulins 6.Interleukins

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Imunodeficiência Comum Variável

A imunodeficiência comum variável (ICV) é uma imunodeficiência primária caracterizada por susceptibilidade às infecções recorrentes devido à quantidade e qualidade inadequada de anticorpos protetores (1). Há imensa heterogeneidade fenotípica de pacientes com ICV, o que pode ser observado na variabilidade de início da doença e as morbidades relacionadas, incluindo doenças autoimunes, neoplasias, doenças pulmonares crônicas, esplenomegalia e doenças gastrointestinais (2) (3).

Entre as imunodeficiências primárias, a ICV é a mais comum das deficiências de anticorpos com necessidade de reposição de imunoglobulina. O tratamento atual consiste na reposição intravenosa de IgG (IVIG) a cada 3-4 semanas (4) com o objetivo de proteger os pacientes contra infecções por patógenos extracelulares. A incidência de ICV é de 1: 10.000 a 1: 100.000. Geralmente a doença surge na primeira (5-10) anos ou da segunda à quinta década de vida (5).

Há uma história familiar em 20-25% dos casos de ICV, o que indica a importância das alterações genéticas na patogênese deste subgrupo de pacientes (6). Várias anomalias genéticas têm sido descritas nos pacientes com ICV e incluem mutações de genes como co-estimulador indutível (ICOS), ativador transmembrana e modulador de cálcio e ciclofilina (TACI), fator de ativação de células B da família do receptor do fator de necrose tumoral (BAFF-R), CD19, CD20, CD21, ou CD81 (7). Apesar deste progresso, muitos defeitos subjacentes não são conhecidos, mas uma série de novos conjuntos de genes tem sido descrito, como os TLRs, que podem estar associados geneticamente ou funcionalmente com ICV (8). As mutações nesses genes afetam a expressão destes fatores, todos envolvidos na resposta imunológica. As alterações funcionais na sinalização de células dendríticas plasmocitoides podem potencializar os defeitos de células B aos agonistas de receptores *Toll-like* (9).

Os defeitos desses genes nas vias de sinalização podem ser diversos e contribuir não só para imunodeficiência, como também, no desenvolvimento das doenças autoimunes. Embora na maioria dos casos de ICV não haja mutação patogênica identificável, 7% -10% dos pacientes possuem uma mutação no gene que codifica a TNFRSF13B TACI, um receptor membro da superfamília do fator de necrose tumoral expresso em células B (10). O receptor TACI pode ligar-se a dois ligantes, um indutor

de proliferação (APRIL) e um fator de ativação de células B (BAFF), ambos encontrados em níveis elevados nos soros de pacientes com ICV (11). Membros da família do receptor de TNF (TNF-R), como receptor de BAFF (BAFF-R), TACI e antígeno de maturação de células B (BCMA), regulam a homeostase e sobrevivência das células B em diferentes fases da diferenciação dos linfócitos B (12).

A molécula ICOS é expressa em células T e exerce um efeito importante sobre a diferenciação terminal das células B, como as células B de memória. O defeito na expressão de ICOS pode levar a desregulação das células B, conduzindo ao desenvolvimento de autoimunidade (13). A molécula CD20 faz parte de um complexo de proteína multimérica expressa na superfície das células B e está envolvida na regulação do transporte de cálcio através da membrana celular (14). Apesar do início precoce, os achados clínicos e imunológicos na deficiência de CD20 são relativamente leves, possivelmente refletindo mais na deficiência da subclasse IgG, resposta a antígenos T-independentes como os polissacarídeos de cápsulas bacterianas, nos pacientes com ICV (15).

As mutações no gene CD19 também foram descritos como uma causa para a deficiência de anticorpos. A molécula CD19 forma um complexo em conjunto com as moléculas CD21, CD81 e CD225, e defeitos neste complexo podem comprometer a ativação de células B. O complexo reduz o limiar de sinalização pelo receptor das células B através da amplificação do sinal do BCR em resposta a antígenos circulantes em baixas concentrações ou por imunocomplexo (14).

Devido à heterogeneidade na ICV, a hipótese de uma única mutação genética é improvável, embora uma gama de genes candidatos que afetam pequenos grupos de pacientes tenham sido identificados (16). Pacientes com ICV possuem predisposição para desenvolver autoimunidade e estados inflamatórios em aproximadamente 25%, embora as razões não estejam esclarecidas (17).

Várias investigações imunológicas na ICV centraram-se em fenótipos de células B, que conduzem a classificação da doença (18). Além disto, defeitos das células T e células dendríticas, também têm sido relatados em pacientes com ICV (2) (19).

Entre os defeitos de células T, incluem as alterações de células T auxiliares foliculares, essenciais para a comutação de imunoglobulinas, geração de células B de memória e de plasmablastos (20).

1.2. Imunidade inata: ativação via os receptores Toll-like

Um conjunto de moléculas com importante papel na imunidade inata é denominado como receptores de reconhecimento de padrão (PRR), capazes de detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ou seja, estruturas conservadas presentes nos diversos microorganismos (21). Dentre os PRRs, destaca-se a família dos TLRs.

Estes receptores podem responder a produtos bacterianos, tais como as lipoproteínas bacterianas, lipomananas e ácido lipoteicoico de bactérias gram positivas (TLR2), lipopolissacáride (TLR4) e flagelina bacteriana (TLR5), que estão localizados na membrana plasmática e reconhecem componentes extracelulares (22) (23). Por outro lado, TLRs intracelulares como o TLR3 reconhece a ácidos nucleicos como RNA de dupla fita (dsRNA), o TLR7 e TLR8 reconhecem o RNA de fita simples (ssRNA) e o TLR9 os motivos CpG de DNA. Esses TLRs estão localizados em compartimentos endossômicos por uma interação com a proteína de membrana UNC93B (24).

A ligação de PAMPs aos TLRs induz a produção de citocinas pró-inflamatórias que são capazes de regular positivamente a expressão de moléculas de adesão celular e quimiocinas bem como a produção de IFN do tipo I e II. Outro papel fundamental é o elo entre a detecção e o reconhecimento de patógenos microbianos na ativação da resposta imune adaptativa (25). As vias de sinalização do TLR são reguladas por moléculas adaptadoras intracelulares, tais como MyD88, MAL, TRIF, TRAM e SARM (26). A maioria dos TLRs, com exceção do TLR3, sinaliza via MyD88, iniciando a sinalização de uma série de quinases e outras proteínas que culmina na ativação do NF- κ B. Outros adaptadores como os membros da família de fatores de transcrição IRF (fator regulador de IFN), particularmente o IRF 1, 3, 5 e 7 são recrutados pela MyD88 ou TRIF e são cruciais para produção de IFN tipo I. Os subtipos de TLR, bem como, as vias de sinalização estão esquematizadas na Figura 1.

Adaptado de Zhao Zhang *et al.*, (2014) (27)

Figura 1: Representação esquemática dos subtipos de TLR e vias de sinalização.

Defeitos na resposta imunológica adaptativa com comprometimento da maturação e ativação de células T e B são características muito comuns em pacientes imunodeficientes, principalmente com ICV (28). Diferentes subgrupos de pacientes com ICV apresentam distúrbios na sinalização de TLR9 em células B e nas células dendríticas plasmocitoides (pDCs), gerando diminuição da expressão de moléculas coestimuladoras e da produção de citocinas pró-inflamatórias (29) (30). Além disso, no ICV pode ocorrer defeito na sinalização via TLR7 e TLR9 nas pDCs com deficiente secreção de IFN- α , que influenciam na função das células B na resposta mediada pelos TLRs. Possivelmente, *in vivo* pode conduzir a um aumento na susceptibilidade às infecções por enterovírus e rinovírus (29) (31). Além disto, a estimulação *in vitro* das vias TLR4 e TLR5 em células mononucleares de pacientes com ICV mostram diminuição na produção de TNF- α (32).

1.3.Células TCD4 em ICV

Devido à heterogeneidade clínica e imunológica do ICV, um dos principais objetivos tem sido a concepção de classificação mais precisa, e para isso, é necessário caracterizar subgrupos homogêneos de pacientes (1). As primeiras classificações foram baseadas na síntese de imunoglobulina e nos marcadores de maturação das células B (33). No entanto, os pacientes portadores de ICV possuem muitas vezes anormalidades imunológicas adicionais não atribuíveis às células B, tais como a deficiência de células T reguladoras, um achado clínico relacionado com autoimunidade (3).

As células T CD4⁺ após o reconhecimento de peptídeos apresentados por DCs têm a capacidade de se proliferarem e diferenciarem em diversos subtipos celulares, que incluem: Th1, Th2, Th3, Th17, Th22, além das células T auxiliares foliculares (34). O destino das células será determinado por diversos fatores do ambiente e principalmente pelas citocinas secretadas. As células T reguladoras podem ser originadas no timo (tTreg) ou induzidas na periferia (pTreg) (35) (Figura 2).

Figura 2: Representação ilustrativa das subpopulações de células TCD4⁺

Os linfócitos T podem ser classificados de acordo com o estágio de diferenciação, como células naïve, memória central, memória efetora e memória efetora CD45RA⁺. Os linfócitos T naïve, ou virgens, ainda não interagiram com antígenos e

podem ser caracterizados fenotipicamente pelos marcadores CD45RA⁺ e CD62^{high} CCR7⁺. Já os linfócitos T de memória central recirculam como células naïve em órgãos linfoides e proliferam para gerar células efetoras e células CCR7⁺ e CD45RA⁻ (ou CD45RO⁺) de memória central em infecções secundárias. As células T de memória efetora possuem características de células efetoras e circulam em órgãos não linfoides com capacidade de produção rápida de citocinas. Já as células T de memória RA são pouco exploradas em especial para as células CD4⁺ (36).

Um novo subtipo de células T de memória descrito possui características de células progenitoras (*stem cell T cell memory*), ou seja, capaz de autorrenovação e geração de células de memória central e efetora (37).

As células T foliculares (Tfh) inicialmente foram descritas como uma população única de células T CD4⁺ ativadas nos centros germinativos (GCs) das amígdalas humanas que expressam o receptor de quimiocina CXCR5 e que eram proficientes na cooperação de célula B, por promovem a sobrevivência e diferenciação em células B de memória e plasmócitos (20). As Tfh CXCR5⁺ migram para os folículos linfoides em resposta específica ao ligante CXCL13. As células Tfh secretam IL-4, IL-10 e IL-21, citocinas que promovem o crescimento, a diferenciação e a troca de classe de Ig pelas células B. Estudos relatam que defeitos nas células Tfh podem conduzir a uma imunodeficiência primária, apesar das células B serem normais (38).

Com posterior análise da expressão genética e fenotípica, as células Tfh diferem de outras populações de células T com base na localização anatômica e elevada expressão de proteínas da superfície celular, como a morte celular programada (PD)-1, coestimulador induzível de células T (ICOS), atenuador de linfócitos T e B (BTLA) e ligante de CD40 (CD40L). Estas células também expressam a molécula de ativação da sinalização linfocítica (SLAM) associada à proteína (SAP), necessária para as interações dos linfócitos, e o fator de transcrição linfoma de células B (Bcl)-6, necessário para a diferenciação das células Tfh, e para a secreção de IL-21 (39).

As células Tfh são essenciais para o desenvolvimento dos GCs, e as mutações que impedem a diferenciação celular ou função das Tfh interferem na formação dos GCs e no desenvolvimento da imunidade humoral. No entanto, as células Tfh podem secretar citocinas características de outras células Th efetoras, como a IL-4 e o IFN- γ , favorecendo assim a troca de determinada classe de imunoglobulinas (40).

O papel fundamental das células Tfh na imunidade humoral vem suscitando estudos para compreender o seu papel nas infecções e na vacinação. Além disso, as células Tfh podem desempenhar papel relevante em doenças autoimunes, tais como lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e artrite reumatoide. Porcentagens reduzidas de Tfh de sangue periférico foram relatadas em pacientes com deficiência de ICOS e consequente defeito no centro germinativo (41).

Defeitos das células T, tais como diminuição da proliferação de linfócitos a antígenos (2), aumento de apoptose (42), deficiência de produção de citocinas (43), expressão reduzida de CD40L nas células T ativadas e alteração na indução de células T após vacinação profilática (44) têm sido relatados na ICV.

Além disso, há várias alterações celulares T CD4+ e alterações funcionais do ICV, como a redução do número de células T CD4+, redução da capacidade de proliferação e/ou produção de citocinas (2) (41) (45). As células T CD4+ com resposta específica a bactérias nos pacientes com ICV estão funcionalmente prejudicadas e expressam níveis elevados de PD-1 (46). O tratamento com IVIg reduz significativamente a endotoxemia e a expressão de PD-1 nas células T CD4+, restabelece a produção de citocinas e a proliferação das células TCD4+ (46) como também reduz a ativação de células T CD8+ (47).

As células apresentadoras (APCs) de antígenos tem sido o foco principal na pesquisa de TLR, embora esses receptores também sejam expressos, em menor intensidade, pelas células do sistema imune adaptativo, tais como as células T e B. As células T naïve geralmente não respondem aos ligantes TLR, mas a ativação de TCR regula positivamente a expressão de TLR, tornando-as responsivas aos agonistas de TLR, como TLR5 e TLR7 / TLR8 (48) (49). Tem sido sugerido que a estimulação das células T por ligantes de TLRs pode funcionar como um coestimulador durante a iniciação de uma resposta imune adaptativa, favorecendo na indução e na sobrevivência de células T de memória (50). As perturbações de células T em CVID pode ser atenuado por tratamento IVIg, ao passo que o papel coadjuvante de ativação TLR, por influências diretas ou indiretas sobre a resposta das células T CD4 / CD8, poderia ser de grande interesse.

Quanto à produção de IFN tipo I no ICV há diminuição após estímulos com TLR7 ou TLR9 por células B e pDCs (29). O IFN- γ , IFN tipo II, protótipo de citocina

Th1 desempenha um papel importante tanto no sistema imune inato quanto adaptativo. Na ICV, há aumento na secreção de IFN- γ pelas células T CD4+ e células T CD8+ (51).

A IL-17a é uma citocina pró-inflamatória produzida por células Th17, importante na resposta a bactérias extracelulares como também pode estar associada com doenças autoimunes e inflamatórias. O aumento da expressão de IL-17a é descrito em uma variedade de doenças autoimunes, embora não tenha sido evidenciada em pacientes com ICV (52). Estudos em células mononucleares (CMNs) revelou diminuição na secreção de IL-17a na ICV com enteropatia autoimune (53). Contudo, ainda são escassos os estudos sobre IL-17a e principalmente de IL-22 na ICV.

Como citocina anti-inflamatória, a IL-10 secretada por células T e monócitos, é capaz de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF. Além disso, a IL-10 regula a diferenciação de células B, células T auxiliares e células NK (54). Pacientes com ICV possuem redução da secreção de IL-10 por células T (55), embora nenhuma alteração tenha sido identificada por outros autores (56). Já os níveis plasmáticos de IL-10 estão elevados nos pacientes com ICV (57), provavelmente devido a uma menor frequência de haplótipo genético associado com baixa produção de IL-10 (43).

1.4. Células TCD4+ reguladoras na ICV

Células TCD4+ reguladoras (Treg) CD4+CD25+Foxp3+ são essenciais na regulação e homeostase imunológica, e pode exibir potencial terapêutico para as doenças inflamatórias e/ou autoimunes (58). Essas células podem ser classificadas de acordo com a sua origem: células T reguladoras derivadas do timo como tTreg e as células T reguladoras induzidas na periferia, pTreg (59). Ambas, respondem ao reconhecimento antigênico através da expansão, aumento da capacidade supressiva e acúmulo no tecido onde está localizado o antígeno (60). As células Treg expressam o fator de transcrição *forkhead-winged helix* (Foxp3) crucial no desenvolvimento desta linhagem (61). A mutação no gene Foxp3 é descrita em humanos na Síndrome denominada IPEX (*Immune Desregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked*), caracterizada pelo desenvolvimento grave e de intensa inflamação e autoimunidade com quadros de enteropatia, endocrinopatias e dermatite (62).

As Treg são capazes de suprimir respostas através de mecanismos como contato célula-célula e citocinas reguladoras que suprimem a ativação, proliferação e funções efetoras de diversas células como CD4, CD8, NK, NKT e de APCs (58).

Além da expressão de Foxp3 estas células expressam moléculas reguladoras em sua superfície como o fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoides (GITR) e antígeno associado a linfócito T citotóxico (CTLA-4). A interação via esses receptores pode resultar na supressão de células TCD4+CD25-, resultando na regulação negativa do receptor de IL-2 α nas células alvo e consequente supressão da resposta. Embora o contato célula-célula seja um dos principais mecanismos de supressão das Treg, outros fatores também exercem supressão como as citocinas reguladoras, IL-10, IL-35 e TGF- β (63).

Desde 1982, foram descritos possíveis distúrbios nos mecanismos reguladores envolvidos na associação de outra imunodeficiência primária, a seletiva de IgA (IgAD) e doenças autoimunes (64). Contudo, há uma evidência de menor frequência células T reguladoras em pacientes com IgAD, mas em coortes que incluem casos de pacientes com doenças autoimunes (65). Na ICV, tem sido descrito que a frequência das Treg está reduzida em pacientes com e sem doença autoimune em comparação a indivíduos saudáveis (3) (66). A diminuição de células Treg em pacientes com ICV tem sido associada com a expansão de células B CD21^{low} (3).

Considerando a grande heterogeneidade da ICV, além dos defeitos de células B, as IDs podem estar associadas com o desequilíbrio das células T CD4+, sejam efetoras como as reguladoras. A compreensão funcional dos subtipos de células TCD4+, bem como a ativação da resposta imune inata será essencial para compreensão das IDs.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral: A proposta de Projeto é avaliar o perfil das células T CD4+ reguladoras, foliculares e efectoras em resposta aos ligantes de receptores *Toll- like* na imunodeficiência comum variável.

Objetivos específicos:

- Avaliar a frequência de células B e células T CD4+ em diferentes estágios de maturação e células T foliculares no sangue periférico,
- Avaliar a frequência de subtipos de células T reguladoras em células mononucleares do sangue periférico,
- Avaliar a frequência de células T CD4+ secretoras de IL-17a, IL-10, IL-22, TNF, IFN- γ simultâneas ou não em células mononucleares, após estímulo com agonista de TLR2 (Pam3CKS4), de TLR3 (Poly-RIG), TLR7/8 (CL097), acetato de forbol miristato (PMA) e ionomicina, e enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB),
- Avaliação das citocinas e quimiocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α , CCL-2, CCL-5, CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10 em amostras de soro ou de sobrenadantes de culturas de células mononucleares, após estímulo com agonista de TLR2 (Pam3CKS4), de TLR4 (LPS *Salmonella Minnesota*), TLR7/8 (CL097) e TLR9 (CpG) por citometria de fluxo.

Métodos

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

Os pacientes com ICV (n=16 pacientes), com idade de (21-65) anos, 6 mulheres e 10 homens foram selecionados do Ambulatório de Manifestações Dermatológicas das Imunodeficiências Primárias ADEE3003 e foi baseado em critérios internacionais, que inclui uma redução de pelo menos 2 isotipos de imunoglobulina (Ig) no soro (IgG, IgA, e IgM), e a exclusão de outras causas genéticas de hipogamaglobulinemia. O uso de medicação imunossupressora ou corticosteroides constituíram critérios de exclusão.

Todos os pacientes com ICV estavam em tratamento de reposição mensal de gamaglobulina endovenosa e as amostras de sangue foram coletadas no mesmo dia previamente à reposição de gamaglobulinas. O grupo controle foi composto por indivíduos sadios (n=16), 9 mulheres e 7 homens, com idade entre (20-55 anos). Todos foram informados do conteúdo da pesquisa, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo (n0295/09).

3.2. Obtenção de células mononucleares (CMNs) do sangue periférico

Para obtenção de CMNs, amostras de sangue periférico dos indivíduos foram coletadas em tubo heparinizado estéril e diluídas com solução fisiológica, volume a volume, em tubo plástico. As suspensões das CMNs foram obtidas, após centrifugação por 20 minutos a 2200 rpm, através de gradiente de concentração Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) de densidade. As células obtidas foram quantificadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada de acordo com o ensaio realizado. A viabilidade celular foi observada com auxílio do corante Azul de Tripán.

3.3. Cultura para sobrenadantes com ligantes de TLRs

As concentrações das suspensões de CMNs foram ajustadas para 2×10^5 células/mL para sobrenadantes em meio de cultura RPMI (Gibco, Invitrogen, EUA), enriquecido com 10% de pool de soro AB (Sigma) suplementado de gentamicina (10mg/mL). Foram distribuídos a suspensão de células em microplacas de 96 poços

(Costar, Cambridge, MA, EUA) e incubados com agonistas de TLRs, Pam3CSK4 (TLR2, 0,5µg/mL), Poly-RIG (TLR3, 20ng/mL), LPS *S. minnesota* (TLR4, 1,25 µg/mL), CL097 (TLR7/8, 2,5 µg/mL) e CpG (TLR9, 4 µM/mL) (Invivogen, San Diego, CA, EUA) a 37°C e 5% de CO₂. Após incubações de 48 horas (cinética de tempos de incubação realizada em estudo prévio do nosso grupo, os sobrenadantes de culturas foram coletados, centrifugados a 1500rpm, por 5 minutos, aliquotados e congelados a -80°C para posterior dosagem de citocinas e quimiocinas por citometria de fluxo. As amostras de sangue periférico dos indivíduos foram também coletadas em tubo seco estéril. O sangue foi centrifugado por 10 minutos, a 1500 rpm, e o soro coletado e armazenado a -80°C para posterior dosagem de citocinas e quimiocinas.

3.4.Marcação de células B e linfócitos TCD4+ por citometria de fluxo

A marcação extracelular das células de sangue periférico foi realizada adicionando os anticorpos para CD3 (BV605), CD19 (Horizon V500), IgD (PE), CD27 (APC). Para linfócitos TCD4+ foram adicionados anticorpos para CD3 (BV605), CD4(Horizon V500), CD45RA (APC-H7), CCR7(Alexa 647), CD38 (Alexa 700), CD127 (PE-Cy7), PD-1 (PE).

Posteriormente, as hemácias foram lisadas com a solução (BD FACS™ *Lysing*, BD Pharmingen, San Jose, EUA). Após a marcação das células, foram adquiridos 300.000 eventos em aparelho de citometria de fluxo Fortessa (LSRFortessa, BD, Califórnia, USA) com auxílio do software Diva (BD – USA). As compensações e análises das células e dos marcadores utilizados foram realizadas com auxílio do software FlowJo (Tree Star – USA).

Quadro 1: Pannel de anticorpos para marcação das células B

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Empresa
CD3	BV605	SP34-2	BD
CD19	Horizon V500	H1B19	BD
CD27	APC	L128	BD
IgD	PE	IA6-2	BD

Quadro 2: Pannel de anticorpos para marcação das células T de sangue periférico

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Empresa
CD3	BV605	SP34-2	BD
CD4	Horizon V500	RPA-T4	BD
CD45RA	APC-H7	HI100	BD
CCR7	Alexa-647	3D12	BD
CD38	Alexa 700	HIT2	BD
CD127	PE-Cy7	HIL-7R-M21	BD
PD-1	PE	EH12.1	BD

3.5. Análise de linfócitos T foliculares por citometria de fluxo

A marcação extracelular das células de sangue periférico foi realizada adicionando anticorpos para CD3 (BV605), CD4 (Horizon V500), CXCR-5 (PercP Cy5.5), ICOS (PE), PD-1 (FITC). Posteriormente, as hemácias foram lisadas com a solução (BD FACS™ *Lysing*, BD *Pharmingen*, San Jose, EUA). Após a marcação das células, foram adquiridos 300.000 eventos em aparelho de citometria de fluxo Fortessa (LSR Fortessa, BD, Califórnia, USA) com auxílio do software Diva (BD – USA).

Quadro 3: Pannel de anticorpos para marcação das células T foliculares

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Empresa
CD3	BV605	SP34-2	BD
CD4	Horizon V500	RPA-T4	BD
CXCR-5	PercP Cy5.5	RF8B2	BD
ICOS	PE	2D3/B7-H2	BD
PD-1	FITC	MIH4	BD

3.6. Análise de células TCD4+ e CD8+ reguladoras por citometria de fluxo

A avaliação das células T reguladoras foi realizada de acordo com as instruções do kit de marcação para Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA, EUA). Para tal, CMNs foram marcadas extracelularmente com os anticorpos CD3 (BV605), CD4 (Horizon V500), CD8 (Alexa 700), CD25 (FITC), CD45RA (APC-H7), CD127 (PE-Cy7) e Foxp3 (PE). Foram adquiridos 300.000 eventos. A aquisição foi realizada com o citômetro de fluxo Fortessa (LSR Fortessa, BD).

Quadro 4: Painel de anticorpos para marcação das células T reguladoras

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Empresa
CD3	BV605	SP34-2	BD
CD4	Horizon V500	RPA-T4	BD
CD8	Alexa 700	RPA-T8	BD
CD25	FITC	M-A251	BD
CD45RA	APC-H7	HI100	BD
CD127	PE-Cy7	HIL-7R-M21	BD
Foxp3	PE	PCH101 –CE	eBioscience

3.7. Análise de células TCD4+ e CD8+ polifuncional por citometria de fluxo

Para avaliar a capacidade o perfil polifuncional, as CMNs foram cultivadas em meio de cultura RPMI (Gibco, Invivogen CA, USA) suplementado com 10% de soro humano do tipo AB (Sigma-aldrich MO, USA) e distribuídas 2×10^6 células/mL em placas de cultura de 48 poços (Costar, Cambridge, MA, EUA). As células foram estimuladas com agonistas de TLRs, Pam3CSK4 (TLR2, $1,0 \mu\text{g/mL}$), Poly-RIG (TLR3, 40 ng/mL), CL097 (TLR7/8, $5,0 \mu\text{g/mL}$) (Invivogen, San Diego, CA, EUA). Após quatro horas foi colocado $5 \mu\text{g/mL}$ de brefeldina (Sigma-aldrich MO, USA) e incubado por mais 16 horas a 37°C a 5% CO_2 . Outros estímulos foram enterotoxina de *Staphylococcus aureus* B (SEB) $10 \mu\text{g/mL}$ (Sigma-aldrich MO, USA), PMA acetato de forbol miristato (PMA, 10 ng/mL) e Ionomicina ($1 \mu\text{g/mL}$), após duas horas foi colocado $5 \mu\text{g/mL}$ de brefeldina (Sigma-aldrich MO, USA) e incubado por mais 4 horas a 37°C a 5% CO_2 .

As células foram lavadas e incubadas com tampão de fixação Cytofix Cytoperm (BD) e marcadas com os anticorpos para CD3 (BV605), CD4 (Horizon V500), CD8 (PerCP-Cy5.5), CD38 (Alexa 700), IL-17a (Alexa 488), IL-22 (PE), IFN- γ (Horizon V450), TNF (PE-Cy7) e IL-10 (APC) e Live/Dead (Texas-RED). Os anticorpos foram provenientes da B&D (*BD biosciences, San Jose, EUA*). Para a análise do comportamento polifuncional foram utilizadas combinações booleanas criadas usando o software FlowJo. Esta análise determina a frequência de expressão de cada citocina com base em todas as combinações possíveis das cinco citocinas avaliadas. Foi realizada a técnica de FMO (todas as fluorescências menos uma), que tem por objetivo auxiliar nas compensações e definir o positivo para cada marcador. Foram adquiridos 500.000 eventos. A aquisição foi realizada com o citômetro de fluxo Fortessa (LSRFortessa, BD) e analisadas através do Software FlowJo (Tree Star – USA).

Quadro 5: Pannel de anticorpos para marcação das células T polifuncional

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Empresa
CD3	BV605	SP34-2	BD
CD4	Horizon V500	RPA-T4	BD
CD8	PerCP-Cy5.5	SK1	BD
CD38	Alexa 700	HIT2	BD
IL-17	Alexa 488	O33-782	eBioscience
IL-22	PE	1H8PWSR	eBioscience
IFN-g	Horizon V450	B27	BD
TNF	PE-Cy7	MAb11	BD
IL-10	APC	JES3-19F1	BD

3.8.Dosagem de citocinas e quimiocinas por citometria de fluxo

Os níveis circulantes das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF e IFN- α foram avaliadas em amostras de soro por citometria de fluxo, utilizando-se um kit-CBA Human Enhanced Sensitivity Flex Set, (BD Biosciences, CA, USA). Além disso, foram avaliadas citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF e quimiocinas CCL-2, CCL-5, CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10 de amostras de sobrenadantes de culturas estimulados com ligantes TLR utilizando-se kit-CBA Human Inflammatory Cytokine e kit-CBA

Human Chemokine, (BD Biosciences, CA, USA), respectivamente. O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras e os padrões do kit foram incubados com esferas de captura, recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas. As amostras foram incubadas com anticorpos conjugados com ficoeritrina (PE). A aquisição das amostras foi realizada por citômetro Fortessa (LSRFortessa, BD), e os resultados obtidos foram analisados com o uso do programa *BD FCAP Array* 3,0 (BD Biosciences). O limite de detecção para as referidas citocinas e quimiocinas foi: IL-1 β : 48,4 ft/mL IL-6: 68,4 ft/mL, TNF: 67,3 ft/mL e IFN- α : 1,5 pg/mL para kit-CBA Human Enhanced Sensitivity Flex Set; IL-1 β : 7,2 pg/mL, IL-6: 2,5 pg/mL, IL-8: 3,6 pg/mL, IL-10: 3,3 pg/mL, IL-12p70: 1,9 pg/mL, TNF: 3,7 pg/mL para kit-CBA Human Inflammatory Cytokine; CCL-2: 2,7 pg/mL, CCL-5: 1,0 pg/mL, CXCL-8: 0,2 pg/mL, CXCL-9: 2,5 pg/mL e CXCL-10: 2,8 pg/mL.

3.9. Análise estatística

Os dados foram analisados com auxílio do software GraphPadPrism (Versão 5.0). Na correlação estatística entre os grupos foi utilizado o teste não paramétrico teste Mann-Whitney. Todas as comparações que resultaram em $P \leq 0.05$ foram consideradas significantes. Os dados foram representados com a mediana e interquartis.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Dados demográficos em ICV

Na Tabela 1 estão descritos as características clínicas dos pacientes com ICV. Os pacientes com ICV foram selecionados com idade de 21- 65 anos com média de 37 anos, 10 homens e 6 mulheres.

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes com ICV

Patients CVID	Total (n=16)
Gênero (homens/mulheres)	10/6
Início da doença (precoce/tardio)	9/7
Autoimunidade (%)	19
Bronquiectasia(%)	62,50
Esplenomegalia(%)	50
Linfoadenopatia (%)	1,50
Sintomas GI (%)	25
Granuloma (%)	12,50
Linfoma (%)	0
Média tempo de IVIg (anos)	9,81± 7,25
Imunoglobulina G (mg/mL)	211,31± 403,66
Imunoglobulina A (mg/mL)	20,59 ± 20,30
Imunoglobulina M (mg/mL)	17,38 ± 9,63

*valores expressos em média ± desvio.

4.2. Perfil fenotípico de células B

Alterações nas subpopulações de linfócitos B, como diminuição na frequência de células B de memória, e aumento de células B transitórias e CD21⁻ são descritas ocorrerem na ICV (67). Para avaliar o perfil de células B dos pacientes com ICV e controles saudáveis as populações de células B no sangue periférico de pacientes, foram analisadas de acordo com o perfil de maturação (IgD e CD27) por citometria de fluxo. Para tal, a população de células CD3-CD19⁺ foi selecionada na região de linfócitos e a população IgD/CD27 foi avaliada, como ilustra a Figura 3A.

A Figura 3B mostra que as frequências das células B (CD3-CD19⁺) no sangue periférico foram significativamente diminuídas nos pacientes com ICV em relação aos controles saudáveis (CTL). As células B foram avaliadas de acordo com a expressão de IgD e CD27 em: células B naïve (IgD+CD27⁻), células B memória sem troca de classe (IgD+CD27⁺) e células B de memória comutadas (IgD⁻CD27⁺). A Figura 3B mostra que há aumento da frequência de células B naïve e diminuição do percentual de células B de memória nos pacientes com ICV em relação aos controles.

Figura 3. Frequência de células B no sangue periférico de controles saudáveis e pacientes com ICV. A. Estratégia de gate para linfócitos B no sangue periférico. Inicialmente foram selecionadas a partir do gate SSC-A e SSC-H (*Singlet*), com intuito de excluir *doublers*. Em seguida foi selecionado o gate de linfócitos. Posteriormente, exclusão de CD3- e seleção de CD19+. As populações foram definidas em células B naíve e memória através da expressão de CD27 e IgD.; B. As populações foram selecionadas dentro da população de linfócitos CD3- CD19+ e foram definidas como: naíve (IgD+CD27-) e memória (IgD-CD27+). O traço corresponde à mediana e interquartis. Controles n=16 e ICV n=16. **p≤0.01, ***p≤0.001.

4.3. Perfil de maturação das células TCD4+ no sangue periférico de pacientes com ICV

Para avaliar as células TCD4+ iniciamos com a avaliação do perfil de maturação e ativação (CCR7, CD45RA, CD38 e CD127) no sangue periférico de pacientes com ICV (n=14) e controles saudáveis (n=16). A população de células TCD3+ foi selecionada na região de linfócitos e a população CD3+CD4+ foi avaliada quanto à expressão de marcadores de maturação (CCR7, CD45RA), ativação (CD38, CD127) e exaustão (PD-1) por citometria de fluxo. A estratégia de seleção das populações (gate) utilizada está ilustrada na Figura 4.

A Figura 5 mostra aumento na frequência de células TCD4+ PD-1+ em pacientes com ICV em comparação ao grupo controle saudável. No entanto, as células TCD8+ não há diferença entre os grupos.

As células TCD4+ PD1+ foram avaliadas de acordo com o estágio de maturação das células T: naïve (CCR7+CD45RA+), memória central (TCM, CD45RA-CCR7+), memória efetora RA (TEMRA, CCR7-CD45RA+) e efetoras (TEM, CD45RA-CCR7-). A avaliação da maturação celular em células T CD4+ mostrou aumento na expressão de PD-1 em células T de memória, incluindo nas células TCM (CD45RA⁻CCR7⁺) e TEM (CD45RA⁻CCR7⁻) no grupo ICV em relação ao controle. Considerando a variabilidade das características clínicas encontradas frequentemente em pacientes com ICV, tal como esplenomegalia (50%), que pode ser associado com alterações imunológicas nesses pacientes, nós comparamos a expressão de PD-1 em células TCD4+ de pacientes ICV com e sem esplenomegalia, entretanto, não foi observada diferença entre os grupos.

Além disso, há diminuição na porcentagem de células TCD8+CD127+, mas não de TCD4+ (dados não mostrados) quando observamos os pacientes com ICV comparados com o grupo controle (Figura 6). Como esperado em ICV, há um aumento na frequência de células TCD8+CD127-CD38+ ativadas, como foi verificado em TCM, TEM e TEMRA, independente da presença de esplenomegalia dos pacientes.

Figura 4. Estratégia de gate para linfócitos TCD4+ no sangue periférico. Inicialmente foram selecionadas a partir do gate SSC-A e SSC-H (*Singlet*), com intuito de excluir *doublers*. Em seguida foi selecionado o gate de linfócitos. Posteriormente, CD3+ e CD4+. A maturação das populações de TCD4+ foi definida através de CD45RA e CCR7. Os marcadores CD38, CD127, PD-1 foram avaliados através da frequência.

Figura 5. Perfil de diferenciação/maturação de células T CD4+ PD-1+ no sangue periférico de controles saudáveis e pacientes com ICV. As células T foram selecionadas dentro da população de linfócitos T CD3+CD4+ e avaliada a expressão de PD-1 e foram definidas como: naïve (CD45RA+CCR7+), memória central - TCM (CD45RA-CCR7+), memória efetora RA - TEMRA (CD45RA+CCR7-) e memória efetora - TEM (CD45RA-CCR7-). Assim como, a presença e ausência de esplenomegalia. O traço corresponde à mediana e interquartis. Controles (n=16), ICV (n=14) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$.

Figura 6. Perfil de diferenciação/maturação de células T CD8+CD127+ e TCD8+CD127-CD38+ no sangue periférico de controles saudáveis e pacientes com ICV. As células T foram selecionadas dentro da população de linfócitos T CD3+CD4+ e avaliada a expressão de CD127 e CD38 e foram definidas como: naïve (CD45RA+CCR7+), memória central - TCM (CD45RA-CCR7+), memória efetora RA - TEMRA (CD45RA+CCR7-) e memória efetora - TEM (CD45RA-CCR7-). Análise de células TCD8+CD127-CD38+ na presença e ausência de esplenomegalia. O traço corresponde à mediana e interquartis. Controles (n=16), ICV (n=14). **p≤0.01.

4.4. Análise do perfil fenotípico das células TCD4+reguladoras

Entre as populações de células TCD4+ é importante averiguar a frequência de células T reguladoras, considerando que são escassos os estudos sobre esta população celular em ICV sem associação com autoimunidade. Dessa forma, foram utilizados para caracterizar as células T reguladoras os marcadores: CD25, CD127, CCR7, CD45RA (marcação extracelular) e Foxp3 (marcação intracelular) em CMNs por citometria multiparamétrica. A Figura 7A mostra a estratégia de análise das células T CD4+ reguladoras (35).

A Figura 7B mostra que a percentagem de células T reguladoras naïve (CD45RA+Foxp3+) é maior nos indivíduos controles do que em pacientes com ICV. Já as Treg periféricas foram similares entre os grupos analisados. A análise clássica para Treg (CD3+CD4+CD127-Foxp3+) não mostrou diferença significativa (dados não mostrados). Os dados evidenciam que as alterações na população T reguladoras no ICV são devido à diminuição da frequência das Treg naturais (Treg naïve), e não as induzidas na periferia. Em relação à esplenomegalia, os dados mostraram que a diminuição de células T reguladoras ocorre no grupo com presença de esplenomegalia.

Figura 7. Caracterização das células T reguladoras em controles saudáveis e pacientes com ICV. A. Estratégia de gate para linfócitos TCD4+ reguladoras. Inicialmente foram selecionadas SSC-A e SSC-H (*Singlet*), com intuito de excluir *doublets*. Em seguida foi selecionado o gate de linfócito e posteriormente, CD3+ e CD4+. As populações de TCD4+ reguladoras foram definidas através de CD45RA e Foxp3. B. A seleção de células T reguladoras naïve (CD3+CD4+CD45RA+Foxp3+) e T reguladoras ativadas (CD3+CD4+CD45RA-Foxp3^{high}). A relação de células T reg de pacientes com presença ou ausência de esplenomegalia. O traço corresponde à mediana e interquartis. *p≤0.05**p≤0.005.

4.5. Análise da frequência dos linfócitos T foliculares em sangue periférico

Considerando a deficiência tanto na ativação quanto na troca de classes de imunoglobulinas dos pacientes com ICV, caracterizamos os linfócitos TCD4+ auxiliares foliculares. Essas possuem um papel crucial no desenvolvimento de centros germinativos, e na diferenciação de linfócitos B. Os linfócitos Tfh foram caracterizados pela expressão de marcadores CD3, CD4, CXCR5, PD-1 e ICOS por citometria multiparamétrica. A Figura 8A mostra a estratégia de análise das células Tfh no sangue periférico.

A figura 8B mostra que não há alteração na frequência das Tfh e no MFI para ICOS no grupo ICV comparado ao CTL. Apesar de serem encontrados em similar frequência entre os grupos, há uma maior frequência de baixo percentual de Tfh no ICV que no grupo controle.

Figura 8. Caracterização dos linfócitos T foliculares em controles saudáveis e pacientes com ICV. A. Estratégia de gate para linfócitos TCD4⁺ auxiliares foliculares. Inicialmente foram selecionadas a partir do gate SSC-A e SSC-H (*Singlet*), com intuito de excluir *doublets*, seleção de gate de linfócitos e de células CD3⁺, CD4⁺ com CXCR5⁺. As populações de TCD4⁺ foliculares foram definidas através do duplo positivo para ICOS e PD-1, B. As CMNs foram avaliadas por citometria de fluxo com os marcadores CD3, CD4, CXCR5, PD-1 e ICOS de controles (n=16) e ICV (n=11). A seleção dos linfócitos T auxiliares foliculares (CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD-1⁺). Avaliação de média de intensidade de fluorescência (MFI) para ICOS. O traço corresponde à mediana e interquartis.

4.6.Frequência de células TCD4+ e TCD8+ secretoras de citocinas após estímulos com agonistas de receptores Toll-like

Os ligantes de TLRs mimetizam patógenos extracelulares ou intracelulares, assim, para averiguar o perfil de secreção de citocinas das células TCD4+ foram utilizados agonistas de TLR2 (Pam3CSK4), TLR 3 (Poly-RIG) e TLR 7/8 (CL097). Esses estímulos foram selecionados para averiguar uma resposta para antígeno bacteriano (Pam3CSK4) e dois agonistas intracelulares, relacionados à resposta antiviral, sejam para RNA e DNA vírus. Como controle positivo foi utilizado enterotoxina *S.aureus* do tipo B (SEB) e forbol acetato de miristato (PMA) e ionomicina. As populações de células TCD4+ foram analisadas através da expressão de citocinas tanto inflamatórias (IL-17a, IL-22, TNF e IFN- γ) quanto reguladora (IL10) em pacientes com ICV e controles saudáveis.

A estratégia de seleção das populações (gate) utilizada está ilustrada na Figura 9. A população de células TCD3+ foi selecionada na região de linfócitos, a partir de células vivas e logo após em células CD4+ ou CD8+ e cada citocina de maneira individualizada para IFN- γ , IL-17a, IL-22, TNF e IL-10.

A Figura 10 mostra a frequência de secretoras de citocinas na condição basal ou estimulada. A frequência de células TCD4+ IL17+ na condição basal em pacientes ICV mostra-se elevada quando comparados aos indivíduos controles, porém quando estimulada com PMA há uma queda na secreção desta citocina. Similarmente, a população TCD4+ secretora de IFN- γ sob estímulo com PMA/IONO também mostra uma frequência diminuída nos pacientes portadores de ICV.

A frequência de células TCD4+ secretoras de IL-10 é baixa, mesmo após estímulos seja via TLRs ou PMA e SEB e mostram aumento para CL097 em pacientes com ICV quando comparados aos controles saudáveis (Figura 11). Já para as células TCD4+ secretoras de TNF quando estimuladas com PMA mostram diminuição nos pacientes com ICV e em contraste, aumento percentual em resposta aos estímulos com Pam3CK4 e CL097.

Os dados de células TCD4+ no ICV mostram um estado basal elevado para IL-17a e TNF, e que a resposta induzida por PMA está alterada para IFN- γ , IL-17a e TNF.

A Figura 12 mostra que os linfócitos TCD8+, quando estimulados com agonista Poly-RIG, diminuem a frequência de secreção para IL-17a, IFN- γ e IL-22 nos pacientes ICV quando comparados aos controles. Já com o estímulo PMA esta diminuição é

observada nas células TCD8+ secretoras de IL-17a e IL-22. No entanto, há aumento na secreção de IFN- γ quando estimuladas com SEB.

Além disto, tanto a secreção de IL-10 como de TNF no ICV estão diminuídas em relação aos indivíduos controles para PMA, sendo que TNF já mostra diminuição na situação basal (Figura 13). Os achados evidenciam que a resposta para PMA pelas células TCD8+ é deficiente para IL-17a, IL-22, IL-10 e TNF nos pacientes com ICV.

Figura 9. Estratégia de gate para linfócitos TCD4+ e TCD8+ monofuncionais.

Inicialmente foram selecionadas a partir do gate SSC-A e SSC-H (*Singlet*), com intuito de excluir *doublets*. Em seguida foi selecionado o gate de linfócitos. Posteriormente foram selecionadas as células vivas, CD3+ e CD4+ ou CD8+. Cada citocina foi definida individualmente, IL-17a, IL-22, TNF, IL-10 e IFN- γ .

Figura 10. Avaliação de células TCD4+ secretoras de IFN- γ , IL-17a ou IL-22 após estímulos com agonistas de TLRs, SEB ou PMA/IONO. As CMNs foram avaliadas por citometria de fluxo com os marcadores CD3, CD4, CD8 (para exclusão) e intracelular de IFN- γ , IL-17a e IL22. Controles (n=16) e ICV (n=16). Todos os dados estimulados foram subtraídos do basal. O traço corresponde à mediana e interquartis. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,0001$.

Figura 11. Avaliação de células TCD4+ secretoras de IL-10 ou TNF após estímulos com agonistas de TLRs, SEB ou PMA. As CMNs foram avaliadas por citometria de fluxo com os marcadores CD3, CD4, CD8 (para exclusão) e intracelular de IL-10 ou TNF. Todos os dados estimulados foram subtraídos do basal. O traço corresponde à mediana e interquartis * $p \leq 0,05$.

Figura 12. Avaliação de células TCD8+ secretoras de IFN- γ , IL-17a ou IL-22 após estímulos com agonistas de TLRs, SEB ou PMA. As CMNs foram avaliadas por citometria de fluxo com os marcadores CD3, CD8, CD4 (para exclusão) e intracelular de IFN- γ , IL-17a e IL22. Todos os dados estimulados foram subtraídos do basal. O traço representa a à mediana e interquartis. * $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0005$.

Figura 13. Avaliação de células TCD8+ secretoras de IL-10 ou TNF após estímulos com agonistas de TLRs, SEB ou PMA. As CMNs foram avaliadas por citometria de fluxo com os marcadores CD3, CD8, CD4 (para exclusão) e intracelular de IL-10 ou TNF. Controles (n=16) e ICV (n=16). Todos os dados estimulados foram subtraídos do basal. O traço corresponde à mediana e interquartis.* $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0001$.

4.7. Análise da frequência de células Th22 e Tc22 circulantes

Com intuito de avaliar a secreção de IL-22, tanto em células TCD4+ como TCD8+, foi realizada a exclusão da secreção de IFN- γ e IL-17a, para caracterizar as células Th22 e Tc22 (68). A estratégia de gate utilizada para analisar as subpopulações Th22 e Tc22 está na Figura 14.

A Figura 15 mostra que a frequência das células Th22 (TCD4+ secretoras de IL-22) está elevada na situação basal e para estímulo com SEB e CL097 e uma diminuição para Poly-RIG nos ICV em relação aos controles. Similarmente, as células Tc22 mostraram aumento em resposta ao estímulo com CL097 e SEB. Os dados mostram no ICV que a frequência de Th22 já está elevada e é potencializada via TLR7/8 e SEB, como as células Tc22.

Figura 14. Estratégia de gate para linfócitos TCD4+ e TCD8+ secretoras de IL-22.

Inicialmente foram selecionadas a partir do gate SSC-A e SSC-H (Singlet), com intuito de excluir doublets. Em seguida selecionado o gate de linfócitos. Posteriormente, foram selecionadas as células vivas, CD3+ e CD4+ ou CD8+. Em seguida, IFN- γ e IL-17a duplo negativo, com intuito de excluir Th17e secreção de IL-22.

Figura 15. Análise da frequência de células Th22 e Tc22 circulantes. Frequência de células (A) TCD4⁺ secretoras de IL-22(Th22) e (B) TCD8⁺ secretoras de IL-22 (Tc22) obtidas através da exclusão de IFN- γ e IL-17a, induzidas por Pam3CSK4, Poly-RIG, CL097, PMA e SEB, e avaliados por citometria de fluxo. Controle (n=16) e ICV (n=16). Todos os dados estimulados foram subtraídos do basal. O traço corresponde à mediana e interquartis.* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

4.8. Avaliação de células TCD4+ e TCD8+ polifuncionais

As células T polifuncionais são diferenciadas e de perfil de memória central, que em infecções crônicas como o HIV-1, são correlacionadas com boa evolução da doença (69). Para avaliar a secreção simultânea de citocinas, IFN- γ , IL-10, IL-17a, IL-22 e TNF, após um estímulo de resposta inata, foram utilizados agonistas de TLR2 (Pam3CSK4), TLR3 (Poly-RIG) e TLR7/8 (CL097) e como controle positivo, estímulos policlonais SEB e PMA.

A estratégia de gate para secreção simultânea de citocinas é mostrada na figura 16. De maneira geral, as células TCD4+ secretoras de 5 citocinas simultâneas bem como as de 5 combinações de 4 citocinas foram similares no ICV em relação ao CTL. Já as células TCD4+ secretoras de 3 citocinas (IL-17a, IL-22 e TNF) simultaneamente foram elevadas em resposta ao CL097 e Pam3CKS4 no ICV quando comparados aos controles (Figura 17A). Para o estímulo com PMA, foi observada uma diminuição na polifuncionalidade de 4 citocinas (IL-10, IL-17a, IL-22 e TNF).

Quanto às células TCD8+ não foi observado secreção simultânea de citocinas para os estímulos via TLRs (Figura 17B). Enquanto que a resposta para PMA/IONO promoveu diminuição da frequência de IFN- γ , IL-10 e IL-22 e na resposta de IFN- γ , IL-17a e IL-22 induzidos por SEB, o que demonstra uma diminuição na polifuncionalidade de células TCD8+ em pacientes com ICV. Os dados mostram que somente as células TCD4+ mostram polifuncionalidade para os agonistas de TLRs e alteração na via PKC (PMA/IONO) pelas células T secretoras de 3-4 citocinas simultâneas no ICV comparadas aos indivíduos controles.

Na sequência foi avaliado na questão de polifuncionalidade na presença de um marcador de ativação crônica CD38. Desta forma, foi avaliada a secreção das citocinas na dependência ou não da expressão de CD38.

A Figura 18A mostra que na dependência de CD38, há uma diminuição na frequência de células secretoras de 4 combinações de citocinas no ICV, seja induzido por CL097 ou PMA/IONO. Curiosamente, para SEB houve um aumento na polifuncionalidade com secreção de 5 citocinas (IFN- γ , IL-17a, IL-22 e TNF e IL10) em pacientes com ICV em células TCD4+. Já na ausência de CD38 a frequência de 4 combinações e 3 foram detectadas para PMA/IONO e SEB, respectivamente, nos pacientes com ICV.

A resposta polifuncional de células TCD8⁺ (Figura 18B), independente de CD38, é diminuída em resposta aos estímulos de TLR, PMA/IONO e SEB.

Os dados evidenciam um diferente perfil de resposta polifuncional pelas células TCD4 e TCD8, sendo deficiente para a ativação via TLRs e PMA/IONO para as células T CD4⁺ e deficiente nas células TCD8⁺ de maneira independente do estímulo e da expressão de CD38.

Figura 16. Estratégia de gate para linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ polifuncionais.

Inicialmente foram selecionadas a partir do gate SSC-A e SSC-H (Singlet), com intuito de excluir doublets. Em seguida selecionado o gate de linfócitos. Posteriormente, foram selecionadas as células vivas, CD3⁺ com cada citocina e o mesmo para CD4⁺ e CD8⁺. Em seguida, foi avaliada a secreção de cada uma das citocinas.

Figura 17. Avaliação da polifuncionalidade de células TCD4+ e TCD8+ na ICV.

Secreção de IFN- γ , IL-10, IL-17a, IL-22 e TNF por células TCD4+ (A) e TCD8+ (B) induzidas por Pam3CSK4, Poly-RIG, CL097, PMA e SEB, e avaliados por citometria de fluxo. Controle (n=16) e ICV (n=16). Todos os dados estimulados foram subtraídos do basal. O traço corresponde à mediana e interquartis.* $p \leq 0,05$.

Figura 18. Avaliação da polifuncionalidade de células TCD4+ e TCD8+ com expressão de CD38 na ICV. Secreção simultânea em diferentes combinações de IFN- γ , IL-10, IL-17a, IL-22 e TNF por células TCD4+ (A) e TCD8+ (B) induzidas por Pam3CSK4, Poly-RIG, CL097, PMA e SEB, e avaliados por citometria de fluxo. Controle (n=16) e ICV (n=16). Todos os dados estimulados foram subtraídos do basal. O traço corresponde à mediana e interquartis.* $p \leq 0,05$.

4.9. Avaliação sérica de quimiocinas e citocinas

Para avaliar a secreção de citocinas e quimiocinas no soro de pacientes com ICV, avaliamos a secreção de CCL-2, CCL-5, CXCL-9, CXCL-8 e CXCL-10, e de citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β . Esta avaliação foi realizada através citometria de fluxo por cytometry bead array (CBA).

Os dados mostram que todas as quimiocinas séricas avaliadas estão elevadas nos pacientes com ICV quando comparados ao controle (Figura 19A). Quanto aos níveis de citocinas, apenas os níveis de IL-6 foram elevados nos pacientes com ICV (Figura 19B).

Figura 19. Avaliação sérica de citocinas e quimiocinas. Análise de CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5 e CXCL8 (A), e de citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β (B) e avaliados por citometria de fluxo. Controle (n=16) e ICV (n=16). Todos os dados estimulados foram subtraídos do basal. O traço corresponde à mediana e interquartil.* p < 0,05; **p < 0,005 e ***p < 0,0001.

4.10. Avaliação da secreção de citocinas e quimiocinas após estímulo com agonistas TLRs

Para avaliar o potencial de resposta de citocinas de CMNs de pacientes e controles após 48 horas de estímulo com agonistas de TLR, como TLR2 (Pam3CSK4), TLR 4 (LPS *S. minnesota*) e TLR 7/8 (CL097) de pacientes com ICV, avaliamos a secreção de IL-12p70, TNF, IL-6, IL-1 β e IL-10, e as quimiocinas CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10 e CCL2. por CBA.

A Figura 20 mostra que os níveis basais de IL-6 estão elevados nos pacientes com ICV, enquanto para TNF, IL-1 β e IL-10 estão diminuídos em relação ao grupo controle. Para IL-12p70, houve indução de resposta somente com o estímulo via TLR7/8, enquanto que a secreção de TNF, IL-6, IL-1 β e IL-10 foram induzidos pelos 3 agonistas utilizados, via TLR2, TLR4 e TLR7/8, em ambos os grupos. Após os estímulos tanto o ICV como o CTL responderam em níveis similares de citocinas, exceto para o estímulo via TLR4, que induziu secreção mais elevada de TNF nos pacientes ICV que nos controles (Figura 20).

A figura 21 mostra que os níveis basais de CCL-5, CXCL-8 e CXCL-10 estão elevados nos pacientes com ICV em relação ao grupo controle. Para CCL-2 e CXCL-8 houve diminuição quando estimulados via TLR4, enquanto que para CXCL-10 houve indução de resposta somente com o estímulo via TLR7/8, já CXCL-9 foi diminuído em pacientes com ICV quando comparados ao controle.

Os dados mostram que a resposta induzida pelos agonistas nos pacientes com ICV é heterogênea, mas similar aos controles, embora já apresentem potencial mais pró-inflamatório, seja pela pronunciada secreção basal de IL-6 pelas CMNs e do nível sérico.

Figura 20. Avaliação de citocinas após estímulo com agonistas TLRs. Para avaliar a secreção de citocinas após estímulo com agonistas TLR2 (Pam3CSK4), TLR 4 (LPS *S. minnesota*) e TLR 7/8 (CL097) de pacientes com ICV, avaliamos a secreção de IL-12p70, TNF, IL-6, IL-1β e IL-10 e avaliados por citometria de fluxo. Controle (n=16) e ICV (n=16). O traço corresponde à mediana e interquartis. **p≤0,005 # comparado ao basal.

Figura 21. Avaliação de quimiocinas após estímulo com agonistas TLRs.

Para avaliar a secreção de quimiocinas após estímulo com agonistas TLR2 (Pam3CSK4), TLR 4 (LPS *S. minnesota*) e TLR 7/8 (CL097) de pacientes com ICV, avaliamos a secreção de CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10 e CCL2 e avaliados por citometria de fluxo. Controle (n=16) e ICV (n=16). O traço corresponde à mediana e interquartil. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$. # comparado ao basal.

4.11. Avaliação da secreção de IFN- α após estímulo com agonistas TLRs

Para avaliar a secreção de IFN tipo I, IFN- α após estímulo com agonistas TLR 7/8 (CL097) e TLR 9 (CpG), relacionados com a resposta antiviral, em pacientes com ICV e controles, por CBA.

Na Figura 22, os dados mostram um aumento da secreção de IFN- α , após o estímulo com agonista de TLR9. Em contraste, com o estímulo via TLR7/8 houve uma diminuída resposta de IFN tipo pelos pacientes com ICV. Esta resposta diferencial pode ser observada quando comparamos a resposta individual para TLR7/8 e TLR9, pode-se observar que alguns indivíduos que tiveram baixa resposta para ativação para TLR7/8, tiveram maior resposta para TLR9, e vice-versa.

Os resultados mostram que nos pacientes com ICV há um menor potencial de resposta aos estímulos via TLR7/TLR8.

Figura 22. Avaliação da secreção de IFN- α após estímulo com agonistas TLRs. Foi avaliada a secreção de IFN- α após estímulo com agonistas TLR 7/8 (CL097) e TLR9 (CpG) de pacientes com ICV por citometria de fluxo. Controle (n=16) e ICV (n=16). O traço corresponde à mediana e interquartis. ** $p \leq 0,005$.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os pacientes com ICV desenvolvem infecções bacterianas recorrentes, e uma proporção significativa podem desenvolver doenças autoimunes, inflamatórias ou complicações linfoproliferativas. Em decorrência dessas frequentes infecções bacterianas ou virais que ocorrem nos pacientes com ICV, avaliamos o perfil da imunidade inata utilizando os ligantes de TLRs que mimetizam os PAMPs, na resposta mediada por células T, pela capacidade de secreção de citocinas.

Avaliamos 16 pacientes com ICV, que estavam sob tratamento de reposição de gamaglobulina endovenosa por um longo período ($9,81 \pm 7,25$ anos). Nesta coorte de pacientes ICV, 3/16 possuíam manifestações autoimunes, e entre as comorbidades mais prevalentes foram bronquiectasia (71%) e esplenomegalia (50%).

Nesses pacientes foi verificado um aumento característico na porcentagem de células B naïve e ausência de células B de memória comutadas (IgD-CD27+). Na ICV há uma vasta gama de defeitos imunológicos, sendo que uma das mais proeminentes é o defeito na diferenciação de células B de memória (IgD-CD27+) (67).

A alteração da maturação periférica das células B pode ser decorrente a um defeito intrínseco das enzimas necessárias para a recombinação na troca de classe de Ig, como a citidina-desaminase induzida por ativação (AID) e uracil-DNA-glicosilase (UNG). Além disto, pode ser decorrente de alterações na cooperação de células T e B nos centros germinativos, onde as moléculas coestimuladoras são essenciais para esse processo. Neste contexto, a frequência de células TCD4+ foliculares (Tfh) no sangue periférico dos pacientes com ICV foi similar aos indivíduos controles, contudo, os aspectos funcionais desta população celular não foram analisados. A expressão de ICOS nas células Tfh também não se alterou. No entanto essa molécula possa mostrar alterações na expressão nos pacientes com ICV (13).

O aumento da expressão da molécula de exaustão PD-1 nas células T CD4+ foi detectado principalmente no subtipo de células de memória efetora (TEM, CD45RA-CCR7-), apesar do longo período de tratamento com IVIg nos pacientes com ICV. Nossos achados corroboram com a descrição de que após a reconstituição com IVIg ocorre uma diminuição na ativação das células TCD8+, mas não em células TCD4+ (70). Além disso, foi observado que o tratamento com IVIg não altera a expressão de marcadores de inibição/exaustão como PD-1 e CTLA4, principalmente em células T,

sugerindo que a ativação imunológica das células T e a exaustão celular pode ser progressiva e estar associada ao envelhecimento do sistema imune (70). Por outro lado, tem sido descrito que as células T CD4⁺ PD-1⁺ e a incapacidade funcional dessas células em pacientes com ICV, parecem estar associadas com a translocação bacteriana, sendo que o tratamento com IVIg é capaz de diminuir essa translocação bacteriana, e isso pode restaurar as funções células T CD4⁺ (46). Interessante notar que os autores observaram que as células TCD4⁺ específicas às bactérias, mas não as células T CD4⁺ vírus-específicas expressam um nível mais elevado de PD-1 (46).

Em paralelo, observamos nos pacientes com ICV um aumento na frequência de células TCD8⁺CD127⁻CD38⁺ ativadas em células terminalmente diferenciadas (TEMRA CD45RA⁺CCR7⁻). Além disto, foi detectado que os marcadores de exaustão em células TCD4⁺ e de ativação em células T CD8⁺, não foram associados com a presença de esplenomegalia, uma característica clínica predominante de ICV.

Iniciamos a análise das células TCD4⁺ reguladoras nos pacientes com ICV, para avaliar a proporção entre células reguladoras e efetoras. As células Treg são cruciais para controlar a resposta imune bem como a ativação imune persistente (63).

Avaliamos a frequência de células Treg de acordo com a presença ou ausência de esplenomegalia em ICV, e verificamos que houve uma associação da presença de esplenomegalia com a baixa porcentagem de células Treg do subtipo naïve. Em ICV, observamos que entre os subtipos de Treg, a Treg naïve e a induzida periféricamente, houve diminuição percentual somente das células Treg naïve. Tem sido descrito que pacientes com ICV com autoimunidade e/ou esplenomegalia possuem redução na frequência de Treg CD4⁺CD25^{high}, mais acentuada nos que possuem esplenomegalia; além disso, são associados com a expansão das células B CD21^{low} (3). O subgrupo de pacientes com ICV com expansão de células B CD21^{low} mostram aumento na incidência de esplenomegalia e citopenias autoimunes (71).

Em nossa coorte de ICV, a presença de autoimunidade ocorreu em 19% dos pacientes e esplenomegalia em 50%. A reconstituição imune com IVIg por longo período, não parece controlar as células Treg naïve nos pacientes com esplenomegalia, já que são essenciais para limitar a ativação imune persistente. Uma possível explicação é que esteja ocorrendo *homing* das células Treg do sangue para o local da inflamação. Em contraste, outros estudos evidenciam que a redução de células Treg (HLA-DR⁺ e CCR5⁺) em ICV não é relacionada com ativação imune crônica (72).

Além disto, deve ser considerado um defeito no desenvolvimento tímico para explicar a redução de células Treg, pois defeito na timopoiese tem sido relatado em alguns estudos de pacientes com ICV, em especial às associadas com doenças autoimunes (65).

A molécula ICOS pode também desempenhar um papel na ativação de células Treg, como ocorre com as células T convencionais, considerando que o defeito genético no gene *ICOS* é associado com a susceptibilidade à ICV e defeitos funcionais de Treg (73). Portanto, a avaliação da expressão de ICOS pode fornecer dados adicionais na patogênese da ICV.

Quanto à funcionalidade das células TCD4+, foi observado aumento na frequência de células TCD4+ secretoras de TNF e IL-17a na condição basal, ou seja, na ausência de estímulo, que reflete mais a situação *ex vivo*. Este achado sugere que alguns pacientes com ICV possuem um status pró-inflamatório, a despeito da reposição de IVIg.

Curiosamente, observou-se que a resposta de citocinas mediada por TLR4 em células T CD4+ foi inalterada em pacientes com ICV (dados não apresentados), enquanto houve diminuição na resposta de TCD8+ quanto a secreção de IFN- γ , IL-17a e IL-22 induzido pelo agonista de TLR3/Poly-RIG, mas não pelas células T CD4+. A via de TLR3 é essencial para estimular a secreção de IFN tipo I através da sinalização de IRF3. Defeitos de sinalização de TLR3 são específicos para a susceptibilidade à encefalite por vírus herpes simples tipo 1 (9).

A maior propensão de secreção de TNF pelas TCD4+ foi detectada tanto pelos níveis basais elevados como também na resposta aos agonistas de TLR2 e TLR7/TLR8. Este aumento de resposta ao TNF, não foi detectado com as demais citocinas analisadas, IFN- γ , IL-17a e IL-22. Exceto para IL-10 em resposta ao CL097, o que pode sugerir alterações genéticas dos genes de citocinas ou da via de sinalização dos TLRs. Neste contexto, tem sido descrito que aumento na secreção de TNF- α em alguns casos de ICV está relacionado com frequência de genótipos/haplótipos para polimorfismos do gene dessa citocina (43).

Além disto, aumento de resposta para TNF- α em alguns casos de ICV, tem sido associado com doença granulomatosa ou envolvimento de doenças gastrointestinais (Kalha e Sellin, 2004). Para o controle de algumas manifestações no ICV tem sido considerado o uso de inibidores de TNF- α (74). Em nossa coorte de ICV, houve

presença de 1/12 caso de granuloma, como também, de 3/13 com sintomas gastrintestinais.

Houve importante diminuição na secreção de IL-17a, IL-22, IFN- γ e TNF em resposta a PMA/Iono, sejam pelas células TCD4+ ou TCD8+ nos pacientes com ICV. O estímulo com PMA/Iono sinaliza a via da proteína quinase C (PKC) que atua nas vias dependentes de cálcio. Estes achados podem evidenciar um comprometimento na via PKC em ICV. Um defeito na ativação de PKC e da via Ras-ERK é capaz de limitar a produção de IL-2 e a proliferação de células TCD4+CD25+ reguladoras em condições fisiológicas (75). O importante acometimento da via PCK nas células TCD4+/TCD8+ dos pacientes com ICV, pode ser um mecanismo adicional, que contribui com a redução na frequência de células T reguladoras.

Além disto, em decorrência do *crosstalk* das vias de sinalização intracelulares poderia induzir a ativação da via NF- κ B, o que poderia explicar a resposta inflamatória encontrada no ICV. A reconstituição com IVIg não parece influenciar na deficiência da ativação da via da PKC, contudo, é preciso investigar esses achados com mais detalhes.

Pacientes com ICV mostram defeito de sinalização das vias TLR7 e TLR9 em células B e pDCs (29), entretanto as CMNs estimuladas com ligantes de TLR produzem quantidades normais de TNF- α , IL-6 e IL-12 (29). Contudo, avaliando os pacientes ICV na presença ou ausência de complicações inflamatórias (incluindo autoimunidade hematológica, infiltração granulomatosa, doença pulmonar intersticial, hiperplasia linfóide e/ou doença inflamatória gastrintestinal), as CMNs do grupo que apresentava presença de complicações inflamatórias em resposta aos agonistas de TLR7 ou TLR7/8 produzem menos IFN- α . A expressão de genes de interferon do tipo I por microarray é mais pronunciada no grupo com presença de complicações inflamatórias (76). A deficiente secreção de citocinas *in vitro* não exclui que ocorra uma contínua ativação de TLR *in vivo*, levando a um excesso de ativação e exaustão celular.

Quanto ao perfil de secreção de citocinas induzidas por TLRs observamos que a resposta de células TCD4+ no ICV não é totalmente restaurada, mas as células TCD8+ mostram uma diminuição na ativação via TLRs. De fato, Paquin-Proulx et al. 2013 (70), mostraram que a reconstituição com IVIg atenua a ativação principalmente das células TCD8, mas não das células TCD4+.

Em nossos pacientes com ICV, a ativação via TLR7/TLR8 causa um aumento na frequência de células secretoras de IL-22, denominadas Th22/Tc22. É possível que a

ativação da via TLR8 compense os defeitos de resposta via TLR7. O composto CL097, agonista de TLR7/TLR8, é um importante adjuvante para estimular a resposta antiviral (77) (78). O aumento da frequência de células Th22/Tc22 em resposta ao agonista de TLR7/8 em ICV pode contribuir na proteção das mucosas. De fato, a IL-22 propicia proteção contra infecções fúngicas e bacterianas nas superfícies de mucosa e promove a inflamação e proliferação de células epiteliais e de reparação (79) (80).

As células T sigmoides produtoras de IL-22 e células Th22 são drasticamente depletadas durante a infecção crônica pelo HIV, o que contribui para danos epiteliais e translocação microbiana, levando à ativação imunológica (81). É importante salientar que os pacientes com ICV são propensos à doença inflamatória intestinal e hiperplasia nodular linfóide do trato gastrointestinal (GI), que é uma evidência de ativação crônica do sistema imune do trato GI. Se a ativação/exaustão das células T está associado com a translocação bacteriana em ICV (46), a ativação Th22/Tc22 estimulados pela via TLR7/8 pode ser uma interessante estratégia para potencializar a resposta funcional.

Embora as principais funções de TLR sejam atribuídas principalmente para as APCs, o seu papel nas células T é menos conhecido. A ativação *in vitro* de CMNs com agonistas de TLRs pode levar a estimulação das APCs e outras células, e indiretamente conduzir à ativação de células T. No entanto, os TLRs também são expressos em células T (82) e capaz de induzir sinais coestimuladores para a ativação das células T (83) (84). Tem sido descrito que o TLR2 pode servir como um receptor coestimulador para o desenvolvimento de células T antígeno-específicas, participando assim, na manutenção de células T de memória (49). Estes resultados sugerem que os agentes patogênicos podem contribuir diretamente para a perpetuação da ativação de células T de memória em longo prazo, tanto em forma dependente ou independente de antígeno.

A capacidade para produzir múltiplas citocinas, ou seja, a polifuncionalidade tem sido associada com respostas imunes benéficas. Desta forma, foi avaliada em ICV a secreção de citocinas simultâneas pelas células T após a ativação com agonistas de TLRs. Os dados mostram em ICV, as células TCD4⁺ e TCD8⁺ com capacidade para secretar 5 citocinas induzidas TLR estão preservadas, além disto, que as células TCD8⁺ são menos polifuncionais do que as células TCD4⁺ para estímulos TLR. Os agonistas de TLR extracelular (TLR2 / Pam3CKs4) e intracelulares (TLR7/8 / CL097) induziram células T CD4⁺ capazes de secretar 3 citocinas, como a IL-17a, IL-22 e TNF em ICV, comparado com o grupo controle. É conhecido que a estimulação via TLR2 impulsiona

as células Treg naïve ativadas humanas a assumirem um fenótipo Th17 com reduzida função supressora (85).

Para o estímulo com PMA/IONO houve diminuição na frequência de células T polifuncionais intensificando um possível defeito nessa via de ativação como já evidenciado na análise de secreção individual das citocinas. A ativação mediada por PMA/IONO e a sinalização por NFAT pode mimetizar a ativação completa da sinalização por TCR e coestimulação ou anergia (86). O envolvimento da sinalização via Ca^{2+} em ICV ainda precisa de maiores investigações.

Além disto, células que expressam CD38, marcador de ativação crônica, possuem uma diminuição na polifuncionalidade para estímulos via TLR e PMA/IONO, ou seja, a polifuncionalidade é detectada em células T CD4+ que são CD38- na resposta à ativação via TLR na ICV, enquanto que as células T CD8+ foram indiferentes. Estes dados sugerem que a resposta monofuncional ou polifuncional pelas células TCD8+ em resposta à ativação de TLR estão diminuídas no ICV.

Já para o estímulo do superantígeno SEB houve aumento de citocinas pelas células TCD4+, independente da expressão de CD38. Há descrição que infecções latentes como citomegalovírus (CMV) induzem a produção de células polifuncionais induzidas por SEB (87). Os infectados por CMV estão entre 60-90% da população adulta, sendo um importante patógeno em hospedeiros imunocomprometidos, e também está associado com ICV de perfil inflamatório (88). O vírus Epstein-Barr produz IL-10 nos linfócitos B, pois entra na célula B via CD21 e modula negativamente a apresentação de antígenos por APCs e as respostas Th1 e Th17 (89).

Quanto à avaliação sérica de citocinas e quimiocinas foi observado um aumento de CCL-5, CXCL-8, CXCL-10 e CCL-2 em pacientes com ICV em comparação aos controles saudáveis. Estes fatores são produzidos diretamente ou estão associados com um recrutamento e ativação de células da linhagem mieloide, incluindo monócitos, macrófagos e neutrófilos. A ativação dos monócitos e outras células mieloides é um importante fator que contribui para a patogênese de várias condições inflamatórias (90). A ativação crônica de monócitos representa uma característica de ICV (52). Níveis alterados de produção de citocinas em ICV foram relatados previamente, como de IL-6, IL-8 e TNF- α em pacientes com ICV em comparação com controles saudáveis (91) (45).

Alteração secreção espontânea pode ser observado pelas CMNs dos pacientes, com aumento dos níveis de CCL5, CXCL8, CXCL10 e IL-6, enquanto que a secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-10 estão diminuídas. Os níveis de TNF- α quando estimulados por agonistas via TLR4 são potencializados em pacientes com ICV, o que não ocorre em CXCL8 e CCL2 em relação aos controles. Em contraste, foi relatado diminuição na produção de TNF- α quando estimulados por ligantes de TLR4 (32). Além disso, quando avaliamos a resposta de Interferon do tipo I, IFN- α , mostrou diminuição na resposta induzida pela ativação via TLR7/8. É possível que esta alteração esteja relacionada com os defeitos em TLR7 e TLR9 em células B e pDCs (29), que refletem em na secreção detectada pelas CMNs.

Nossos resultados mostram que, apesar da longa duração de tratamento com IVIg, os pacientes com ICV exibem importantes alterações nas respostas à ativação via TLRs, principalmente pelas células TCD8+. Os resultados em ICV mostram um aumento na frequência de células T de memória central e efetora, que estão associados a uma reduzida frequência de células T reguladoras naïve. A diminuída resposta monofuncional de citocinas pelas células TCD8+ via ativação TLR3, contrasta com a ação dos agonistas de TLR7/TLR8 que potencializaram as células Th22/Tc22 em ICV. A ativação com agonistas de TLR2 e TLR7/8 induz resposta polifuncional de células TCD4+, mas não em células TCD4+ CD38+ e células TCD8+. Estes dados mostram em ICV, um importante papel dos agonistas de TLRs, como adjuvantes, para estimular respostas adaptativas de células T, contudo, evidenciam que a população de células TCD8+ não é respondedora aos estímulos inatos.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Nossos achados permitem concluir que nos pacientes com ICV:

- Alterações como aumento da frequência de células TCD4+PD-1+ e de células TCD8+CD38+, redução da frequência de células Treg naive, salientam as disfunções das células T;
- As alterações séricas das quimiocinas e citocinas e a capacidade de resposta aos ligantes de TLRs pelas células mononucleares configuram o status pró-inflamatório;
- A ativação por agonistas de TLRs foi capaz de induzir importantes alterações nas respostas de células T, sendo as células TCD4+ com perfil pró-inflamatório e as células TCD8+ menos responsivas;
- Os estímulos via TLRs são capazes de induzir resposta polifuncional de células T CD4+, mas não de células TCD8+ e com função não associada à expressão de CD38;
- Apesar da elevada frequência de infecções bacterianas/virais, os agonistas de TLR2 e TLR7/TLR8 foram capazes de aumentar a resposta das células Tc22 e Th22, sugerindo uma estratégia para potencializar a resposta adaptativa.

Anexos

7. ANEXO 1

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0295/09

Título: ESTUDO DOS MECANISMOS DE MANUTENÇÃO DA TOLERÂNCIA PERIFÉRICA NA DEFICIÊNCIA SELETIVA DE IGA COM OU SEM MANIFESTAÇÃO AUTO-IMUNE

Pesquisador Responsável: Maria Notomi Sato

Pesquisador Executante: Camila de Lollo

Departamento: DERMATOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 07/03/2012, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• **Carta datada de 23/01/12 - Mudança de Pesquisador Executante para: Camila de Lollo; Relatório de Andamento do Estudo**

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 08 de Março de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO 2

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA *"Avaliação das células TCD4+ polifuncionais e reguladoras na deficiência Seletiva de IgA e Comum Variável"*

PESQUISADOR: Maria Notomi Sato

CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 1690

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

- 1 – Desenho do estudo e objetivo(s) essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa estudar na deficiência Seletiva de IgA e Imunodeficiência Comum Variável os mecanismos de regulação mediados por células T reguladoras e por autoanticorpos naturais
- 2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros. Serão realizadas análises experimentais, não rotineiras, para avaliar a presença de anticorpos por ensaio imunoenzimático e de cultura celular para análise dos marcadores extra e intracelular de células por citometria de fluxo
- 3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos;
Será realizada coleta de sangue, 15 mL, por punção periférica da veia do antebraço
- 4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3
A picada da agulha pode levar a um leve desconforto que passará em poucos minutos. Um dia após pode se sentir em torno da picada uma mancha roxa que desaparece em poucos dias sem maiores problemas
- 5 – Benefícios para o participante : Não há benefício direto para o participante pois trata-se de estudo experimental testando a hipótese se há um desequilíbrio de células T reguladoras que pode contribuir ao desenvolvimento de doenças auto-imunes.
- 6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;
- 7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra Maria Notomi Sato que pode ser encontrado no endereço Instituto de Medicina Tropical, Prédio II, Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar 500 Telefone(s) 30617499/30617457. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br
- 8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "*Avaliação das células TCD4+ polifuncionais e reguladoras na deficiência Seletiva de IgA e Comum Variável*"

Eu discuti com o Dr. Maria Notomi Sato sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha _____ Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXO 3

Tabela 2: Dados demográficos dos pacientes com ICV

Identif.	Gênero	Idade	AI	Sintomas do TGI	Bronq.	Esplen.	Tempo IVIg (anos)	Granuloma	Linfoma	IgA	IgG	IgM
PC1	M	65	Não	Sim	Sim	Não	2	Não	Não	0,3	948	33,5
PC2	F	35	Sim	Sim	Sim	Sim	12	ND	Não	5	818	5
PC3	M	35	Sim	Sim	Sim	Sim	28	Não	Não	0	0	0
PC4	M	40	Não	Não	Sim	Sim	15	Não	Não	50	721	31,3
PC5	M	22	Não	Não	Não	Não	1	Não	Não	5	924	1,4
PC6	M	21	Não	Não	Não	Não	6	Não	Não	5,9	678	15,4
PC7	F	37	Não	Não	Sim	Sim	15	Sim	Não	241,2	1598	58,3
PC8	M	24	Não	Não	Sim	Sim	16	Não	Não	0,1	439	9,7
PC9	F	42	Não	Sim	Sim	Sim	10	Não	Não	8,8	725	54,8
PC10	F	34	Sim	Não	Não	Sim	7	Não	Não	5	929	5
PC11	M	29	Não	Não	Não	Não	1	Não	Não	1,4	479	2,3
PC12	F	47	Não	Não	Sim	Sim	16	Não	Não	0	0	0
PC13	M	55	Não	Não	Não	Não	4	Não	Não	2,7	294	12,5
PC14	F	42	Não	Não	Não	Não	3	Não	Não	50	860	10,7
PC15	M	28	Não	Não	Sim	Não	12	Não	Não	50	1060	38,1
PC16	M	38	Não	Não	Sim	Não	9	Não	Não	0,1	908	0,1

M = masculino; F = feminino; Identif. = identificação; AI = autoimunidade; TGI = Trato Gastrointestinal; Bronq. = bronquiectasia; Esplen. = esplenomegalia; ND = não determinado; IgA, IgG e IgM (mg/dL).

ANEXO 4**Tabela 3: Dados demográficos do grupo controle**

Identificação	Gênero	Idade
C1	M	54
C2	F	35
C3	M	35
C4	F	40
C5	M	22
C6	F	21
C7	F	37
C8	M	24
C9	F	42
C10	F	34
C11	M	51
C12	F	47
C13	M	55
C14	F	42
C15	M	28
C16	F	20

M = masculino; F = feminino

Referências

8. REFERÊNCIAS

1. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *Br J Haematol*. 2009;145(6):709-27.
2. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol*. 1999;92(1):34-48.
3. Arumugakani G, Wood PM, Carter CR. Frequency of Treg cells is reduced in CVID patients with autoimmunity and splenomegaly and is associated with expanded CD21^{lo} B lymphocytes. *J Clin Immunol*. 2010;30(2):292-300.
4. Cunningham-Rundles C. How I treat common variable immune deficiency. *Blood*. 2010;116(1):7-15.
5. Yazdani R, Hakemi MG, Sherkat R, Homayouni V, Farahani R. Genetic defects and the role of helper T-cells in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Adv Biomed Res*. 2014;3:2.
6. Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, et al. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis*. 2008;46(10):1547-54.
7. Warnatz K, Voll RE. Pathogenesis of autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Front Immunol*. 2012;3:210.
8. 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.
9. Maglione PJ, Simchoni N, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor signaling in primary immune deficiencies. *Ann N Y Acad Sci*. 2015.
10. Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarström 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.
11. Kreuzaler M, Rauch M, Salzer U, Birmelin J, Rizzi M, Grimbacher B, et al. Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *J Immunol*. 2012;188(1):497-503.
12. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(7):491-502.
13. Xu H, Li X, Liu D, Li J, Zhang X, Chen X, et al. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature*. 2013;496(7446):523-7.
14. van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castaño 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.
15. Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IA, Dolman KM, et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest*. 2010;120(1):214-22.
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. Cunningham-Rundles C. Autoimmune manifestations in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2008;28 Suppl 1:S42-5.

18. 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.
19. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marzali 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.
20. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011;34(1):108-21.
21. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(9):712-25.
22. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001;410(6832):1099-103.
23. Browne EP. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology*. 2012;136(4):370-9.
24. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*. 2008;452(7184):234-8.
25. Lee JY, Zhao L, Hwang DH. Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids. *Nutr Rev*. 2010;68(1):38-61.
26. O'Neill LA. TAMpering with toll-like receptor signaling. *Cell*. 2007;131(6):1039-41.
27. Zhao S, Zhang Y, Zhang Q, Wang F, Zhang D. Toll-like receptors and prostate cancer. *Front Immunol*. 2014;5:352.
28. Bayry J, Hermine O, Webster DA, Lévy Y, Kaveri SV. Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. *Trends Mol Med*. 2005;11(8):370-6.
29. Yu JE, Knight AK, Radigan L, Marron TU, Zhang L, Sanchez-Ramón S, et al. Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(2):349-56, 56.e1-3.
30. Trujillo CM, Muskus C, Arango J, Patiño PJ, Montoya CJ. Quantitative and functional evaluation of innate immune responses in patients with common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(3):207-15.
31. Dropulic LK, Cohen JI. Severe viral infections and primary immunodeficiencies. *Clin Infect Dis*. 2011;53(9):897-909.
32. Koval'chuk LV, Khoreva MV, Varivoda AS, Pashchenko OE, Gracheva LA, Bykova LP, et al. [Effect of toll-like receptors (TLR) ligands on in vitro synthesis of proinflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells from healthy persons and from patients with common variable immunodeficiency]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2007(1):38-42.
33. Piqueras B, Lavenu-Bombléd 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.
34. Yamane H, Paul WE. Cytokines of the $\gamma(c)$ family control CD4⁺ T cell differentiation and function. *Nat Immunol*. 2012;13(11):1037-44.
35. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, et al. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3⁺CD4⁺ regulatory T cells,

- evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(44):17945-50.
36. Taylor JJ, Jenkins MK. CD4⁺ memory T cell survival. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(3):319-23.
 37. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011;17(10):1290-7.
 38. Durandy A, Kracker S, Fischer A. Primary antibody deficiencies. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(7):519-33.
 39. Crotty S. Follicular helper CD4⁺ T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-63.
 40. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:429-57.
 41. Bateman EA, Ayers L, Sadler R, Lucas M, Roberts C, Woods A, et al. T cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency disorders: associations with clinical phenotypes in comparison with other groups with recurrent infections. *Clin Exp Immunol*. 2012;170(2):202-11.
 42. 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.
 43. Rezaei N, Aghamohammadi A, Mahmoudi M, Shakiba Y, Kardar GA, Moradi B, et al. Association of IL-4 and IL-10 gene promoter polymorphisms with common variable immunodeficiency. *Immunobiology*. 2010;215(1):81-7.
 44. Oraei M, Aghamohammadi A, Rezaei N, Bidad K, Gheflati Z, Amirkhani A, et al. Naïve CD4⁺ T cells and recent thymic emigrants in common variable immunodeficiency. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2012;22(3):160-7.
 45. Hel Z, Huijbregts RP, Xu J, Nechvatalova J, Vlkova M, Litzman J. Altered serum cytokine signature in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2014;34(8):971-8.
 46. Perreau M, Vigano S, Bellanger F, Pellaton C, Buss G, Comte D, et al. Exhaustion of bacteria-specific CD4⁺ T cells and microbial translocation in common variable immunodeficiency disorders. *J Exp Med*. 2014;211(10):2033-45.
 47. Paquin-Proulx D, Sandberg JK. Persistent Immune Activation in CVID and the Role of IVIg in Its Suppression. *Front Immunol*. 2014;5:637.
 48. Caron G, Duluc D, Frémaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, et al. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4⁺ T cells. *J Immunol*. 2005;175(3):1551-7.
 49. Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):3029-34.
 50. MacLeod H, Wetzler LM. T cell activation by TLRs: a role for TLRs in the adaptive immune response. *Sci STKE*. 2007;2007(402):pe48.
 51. Serrano D, Becker K, Cunningham-Rundles C, Mayer L. Characterization of the T cell receptor repertoire in patients with common variable immunodeficiency: oligoclonal expansion of CD8(+) T cells. *Clin Immunol*. 2000;97(3):248-58.
 52. Barbosa RR, Silva SP, Silva SL, Melo AC, Pedro E, Barbosa MP, et al. Primary B-cell deficiencies reveal a link between human IL-17-producing CD4⁺ T-cell homeostasis and B-cell differentiation. *PLoS One*. 2011;6(8):e22848.

53. Mannon PJ, Fuss IJ, Dill S, Friend J, Groden C, Hornung R, et al. Excess IL-12 but not IL-23 accompanies the inflammatory bowel disease associated with common variable immunodeficiency. *Gastroenterology*. 2006;131(3):748-56.
54. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:929-79.
55. Holm AM, Aukrust P, Aandahl EM, Müller F, Taskén K, Frøland SS. Impaired secretion of IL-10 by T cells from patients with common variable immunodeficiency--involvement of protein kinase A type I. *J Immunol*. 2003;170(11):5772-7.
56. Oliva A, Scala E, Quinti I, Paganelli R, Ansotegui IJ, Giovannetti A, et al. IL-10 production and CD40L expression in patients with common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol*. 1997;46(1):86-90.
57. Kasztalska K, Ciebiada M, Cebula-Obrzut B, Górski P. Intravenous immunoglobulin replacement therapy in the treatment of patients with common variable immunodeficiency disease: an open-label prospective study. *Clin Drug Investig*. 2011;31(5):299-307.
58. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006;212:8-27.
59. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol*. 2013;14(4):307-8.
60. Gratz IK, Rosenblum MD, Abbas AK. The life of regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1283:8-12.
61. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-6.
62. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27(1):20-1.
63. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531-64.
64. De la Concha EG, Subiza JL, Fontán G, Pascual-Salcedo D, Sequí J, Bootello A. Disorders of regulatory T cells in patients with selective IgA deficiency and its relationship to associated autoimmune phenomena. *Clin Exp Immunol*. 1982;49(2):410-8.
65. Soheili H, Abolhassani H, Arandi N, Khazaei HA, Shahinpour S, Hirbod-Mobarakeh A, et al. Evaluation of natural regulatory T cells in subjects with selective IgA deficiency: from senior idea to novel opportunities. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;160(2):208-14.
66. Carter CR, Aravind G, Smalle NL, Cole JY, Savic S, Wood PM. CVID patients with autoimmunity have elevated T cell expression of granzyme B and HLA-DR and reduced levels of Treg cells. *J Clin Pathol*. 2013;66(2):146-50.
67. Clemente A, Pons J, Lanio N, Matamoros N, Ferrer JM. CD27+ B cells from a subgroup of common variable immunodeficiency patients are less sensitive to apoptosis rescue regardless of interleukin-21 signalling. *Clin Exp Immunol*. 2013;174(1):97-108.
68. Luan L, Ding Y, Han S, Zhang Z, Liu X. An increased proportion of circulating Th22 and Tc22 cells in psoriasis. *Cell Immunol*. 2014;290(2):196-200.
69. Van Braeckel E, Desombere I, Clement F, Vandekerckhove L, Verhofstede C, Vogelaers D, et al. Polyfunctional CD4(+) T cell responses in HIV-1-infected viral controllers compared with those in healthy recipients of an adjuvanted polyprotein HIV-1 vaccine. *Vaccine*. 2013;31(36):3739-46.

70. Paquin-Proulx D, Santos BA, Carvalho KI, Toledo-Barros M, Barreto de Oliveira AK, Kokron CM, et al. IVIg immune reconstitution treatment alleviates the state of persistent immune activation and suppressed CD4 T cell counts in CVID. *PLoS One*. 2013;8(10):e75199.
71. Warnatz K, Wehr C, Dräger R, Schmidt S, Eibel H, Schlesier M, et al. Expansion of CD19(hi)CD21(lo/neg) B cells in common variable immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune cytopenia. *Immunobiology*. 2002;206(5):502-13.
72. Melo KM, Carvalho KI, Bruno FR, Ndhlovu LC, Ballan WM, Nixon DF, et al. A decreased frequency of regulatory T cells in patients with common variable immunodeficiency. *PLoS One*. 2009;4(7):e6269.
73. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol*. 2003;4(3):261-8.
74. Smith KJ, Skelton H. Common variable immunodeficiency treated with a recombinant human IgG, tumour necrosis factor- α receptor fusion protein. *Br J Dermatol*. 2001;144(3):597-600.
75. Hickman SP, Yang J, Thomas RM, Wells AD, Turka LA. Defective activation of protein kinase C and Ras-ERK pathways limits IL-2 production and proliferation by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2006;177(4):2186-94.
76. Park J, Munagala I, Xu H, Blankenship D, Maffucci P, Chaussabel D, et al. Interferon signature in the blood in inflammatory common variable immune deficiency. *PLoS One*. 2013;8(9):e74893.
77. Domingues R, de Carvalho GC, da Silva Oliveira LM, Futata Taniguchi E, Zimbres JM, Aoki V, et al. The dysfunctional innate immune response triggered by Toll-like receptor activation is restored by TLR7/TLR8 and TLR9 ligands in cutaneous lichen planus. *Br J Dermatol*. 2015;172(1):48-55.
78. Cardoso EC, Pereira NZ, Mitsunari GE, Oliveira LM, Ruocco RM, Francisco RP, et al. TLR7/TLR8 Activation Restores Defective Cytokine Secretion by Myeloid Dendritic Cells but Not by Plasmacytoid Dendritic Cells in HIV-Infected Pregnant Women and Newborns. *PLoS One*. 2013;8(6):e67036.
79. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol*. 2011;12(5):383-90.
80. De Luca A, Zelante T, D'Angelo C, Zagarella S, Fallarino F, Spreca A, et al. IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol*. 2010;3(4):361-73.
81. Kim CJ, Nazli A, Rojas OL, Chege D, Alidina Z, Huibner S, et al. A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis. *Mucosal Immunol*. 2012;5(6):670-80.
82. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol*. 2002;168(2):554-61.
83. Kulkarni R, Behboudi S, Sharif S. Insights into the role of Toll-like receptors in modulation of T cell responses. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):141-52.
84. Salem ML. Triggering of toll-like receptor signaling pathways in T cells contributes to the anti-tumor efficacy of T cell responses. *Immunol Lett*. 2011;137(1-2):9-14.
85. Reynolds JM, Pappu BP, Peng J, Martinez GJ, Zhang Y, Chung Y, et al. Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity*. 2010;32(5):692-702.

86. Macián F, García-Cózar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, Rao A. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell*. 2002;109(6):719-31.
87. Pera A, Campos C, Corona A, Sanchez-Correa B, Tarazona R, Larbi A, et al. CMV latent infection improves CD8⁺ T response to SEB due to expansion of polyfunctional CD57⁺ cells in young individuals. *PLoS One*. 2014;9(2):e88538.
88. Marashi SM, Raeiszadeh M, Enright V, Tahami F, Workman S, Chee R, et al. Influence of cytomegalovirus infection on immune cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(5):1349-56.e3.
89. Harris-Arnold A, Arnold CP, Schaffert S, Hatton O, Krams SM, Esquivel CO, et al. Epstein-Barr Virus Modulates Host Cell MicroRNA-194 to Promote IL-10 Production and B Lymphoma Cell Survival. *Am J Transplant*. 2015.
90. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.
91. Ibáñez C, Suñé P, Fierro A, Rodríguez S, López M, Alvarez A, et al. Modulating effects of intravenous immunoglobulins on serum cytokine levels in patients with primary hypogammaglobulinemia. *BioDrugs*. 2005;19(1):59-65.