ANNA CRISTINA COLLANIERI

Imunodeficiência comum variável: distúrbio de diferenciação dos linfócitos B ou distúrbio de ativação dos linfócitos T?

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Dermatologia
Orientador: Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Anna Cristina Collanieri
Imunodeficiência comum variável : distúrbio de diferenciação dos linfócitos B ou distúrbio de ativação dos linfócitos T? / Anna Cristina Collanieri. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Dermatologia.
Orientador: Dewton de Moraes Vasconcelos.

Descritores: 1.Imunodeficiência de comum variável 2.Imunodeficiências primárias 3.Antígenos CD27 4.Linfócitos T

USP/FM/DBD-313/10

"O tesouro mais bem guardado é aquele que está

em um lugar onde todos vêem."

Le Yi-King

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um

novo começo, qualquer um pode começar

e fazer um novo fim".

Chico Xavier

Naquele tempo, um discípulo perguntou ao vidente: Mestre, qual é a diferença entre o céu e o inferno? O vidente respondeu:
Ela é muito pequena e, contudo, tem grandes conseqüências.

Vi um grande monte de arroz cozido e preparado como alimento. Ao redor dele muitos homens, quase a morrer. Não podiam se aproximar do monte de arroz. Mas possuíam longos palitos de 2 a 3 metros de comprimento (os chineses naquele tempo já comiam arroz com palitos) e acompanhavam, é verdade, o arroz. Mas não conseguiam levá-lo à própria boca. Porque os palitos em suas mãos eram muito longos. E assim, famintos e moribundos, embora juntos, solitários permaneciam, curtindo uma fome eterna, diante de uma fartura inesgotável. E isso era o inferno.
Vi outro grande monte de arroz cozido e preparado como alimento. Ao redor dele muitos homens. Famintos, mas cheios de vitalidade. Não podiam se aproximar do monte de arroz. Mas possuíam longos palitos de 2 a 3 metros de comprimento. Acompanhavam o arroz, mas não conseguiam levá-lo à própria boca porque os palitos em suas mãos eram muito longos. Mas com seus longos palitos, em vez de levá-los à própria boca, serviam-se uns aos outros o arroz. E assim matavam sua fome insaciável. Numa grande comunhão fraterna, juntos e solidários. Gozando a excelência dos homens e das coisas. E isso era o céu.

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da Criação seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."
Albert Schweitzer

"Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.
Onde houver ódio, que eu leve o amor;
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;
Onde houver discórdia, que eu leve a união;
Onde houver dúvida, que eu leve a fé;
Onde houver erro, que eu leve a verdade;
Onde houver desespero, que eu leve a esperança;
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;
Onde houver trevas, que eu leve a luz.
Ó Mestre, Fazei que eu procure mais
Consolar, que ser consolado;
compreender, que ser compreendido;
amar, que ser amado.
Pois, é dando que se recebe,
é perdoando que se é perdoado,
e é morrendo que se vive para a vida eterna"

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que fazem de sua vida a extensão da felicidade e da esperança daqueles que sofrem.

Aos pacientes que, com seu consentimento, doam o que de mais preciso possuem em prol de um ideal. Agradeço a confiança e a dedicação de todos vocês.

A meus pais, Sonia e Nelson, pela dedicação, amor e orientação

Ao meu namorado, Angelo, pelo carinho, incentivo e compreensão

Obrigada a todos pelo exemplo

de vida e de amor

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a ***Deus*** pelas oportunidades.
Pela dádiva da vida;
pelos momentos e amigos;

Aos meus pais, ***Sonia e Nelson***, pelo carinho que me dedicaram;
pelos sacrifícios e exemplos;
pela confiança e compreensão;
por me ensinarem a sempre perseguir meus sonhos.
Que possamos nos lembrar sempre de que
cada dia é um novo começo e que
sempre é tempo de aprender e recomeçar.
"*A verdadeira felicidade está dentro de nós*".

Ao meu querido amigo e namorado ***Ângelo Tiago***.
Por todos os momentos;
por me ensinar a ver que:
a felicidade está na simplicidade da vida;
que a realização de nossos desejos depende
unicamente de nós e de nossa determinação;
pela importância em aproveitar cada momento
dos nossos dias, pois eles são únicos;
e por continuar me amando mesmo sendo imperfeita.

Ao meu orientador, ***Dr. Dewton de Moraes Vascocelos***.
pela orientação e determinação;
pela paciência e compreensão;
por me ensinar a ser não somente uma pesquisadora
mas sim o que sou hoje, uma amante da pesquisa.

A ***Ilse de C. Salles Vasconcelos***, pela amizade e auxílio.
pelos conselhos e carinho.

A ***Maria Cecília Pereira Soares*** e ao ***Thiago***;
pelo auxílio;
pela amizade e paciência;
pelos momentos de descontração.

A ***Soraya Ogusuku***, ***Noemia Mie Orii***
e ***Rosangela Maria de Aráujo***;
pelo auxílio e complementação da parte
técnica dos ensaios

Ao ***Rafael Martins Oliveira***,
Dra. Claúdia Barreto
e ***Dra. Telma Oshiro***;
pelo auxílio material e técnico.

Ao **Anderson**;
pelo auxílio na coleta de material biológico.

Ao pessoal técnico da ***Invitrogen*** e ***LGC***;
pelos esclarecimentos metodológicos.

Aos ***pacientes*** participantes desse trabalho;
meus sinceros agradecimentos
pela confiança em mim depositada.

Ao ***Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte***;
por abrir as portas para a realização de meu trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram
para o desenvolvimento da pesquisa
aqui apresentada.

Gostaria de fazer um agradecimento
especial à ***Dra. Vera Lúcia Salles***;
por me mostrar que o verdadeiro amor
está na dedicação ao nosso próximo;
que nossos atos refletem nossa essência;
e por me encaminhar até aqui.

Agradeço aos membros da ***banca de qualificação***
pelas sugestões atribuídas ao presente trabalho

Agradecimento Especial

À FAPESP **- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**

Pela oportunidade que nos confere e pela confiança que dedica aos pesquisadores e à pesquisa científica do Estado de São Paulo.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço 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. 2º Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas
Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Resumo
Summary

1. INTRODUÇÃO..... 01
   1.1 Justificativa..... 14

2. OBJETIVOS..... 15

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS 17
3.1. Casuística..... 18
3.2. Fenotipagem dos marcadores de superfície celular de linfócitos B e T..... 19
3.3. Cultura para a ativação celular para análise de expressão da molécula CD154 (CD40L) em linfócitos T..... 20
3.4. Análise da expressão da molécula CD154 (CD40L) após ativação dos linfócitos T..... 22
3.5. Obtenção das células mononucleares do sangue periférico – PBMCs..... 23
3.6. Ensaio de linfoproliferação..... 24
3.7. Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo..... 25

4. RESULTADOS 27
4.1. Casuística..... 28

4.2. Fenotipagem dos marcadores de Superfície Celular de Linfócitos B em indivíduos controle..... 31
4.3. Fenotipagem dos marcadores de superfície celular de linfócitos B de pacientes ICV..... 35
4.4. Avaliação dos demais marcadores de células B..... 39
4.5. Fenotipagem dos marcadores de superfície celular de linfócitos T de indivíduos controle x pacientes..... 42
4.6. Análise da expressão da molécula CD154 (CD40L) após ativação dos linfócitos T..... 46
4.7. Ensaio de linfoproliferação..... 48
4.8. Análise da viabilidade celular das células submetidas a linfoproliferação por citometria de fluxo..... 49

5. DISCUSSÃO..... 51
6. CONCLUSÕES..... 61
7. REFERÊNCIAS..... 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Nomenclatura
ADEE-3003	Ambulatório de Manifestações Dermatológicas das Imunodeficiências Primárias – Serviço de Dermatologia - HCFMUSP
BAFF	*B-cell activation factor of the TNF family*
BAFF-R	*B-cell activation factor of the TNF family receptor*
CD	*Cluster of differentiation*. Nomenclatura utilizada para diferenciar moléculas de superfície celular.
CD2	Molécula de adesão encontrada na superfície de células T e NK. Também denominado LFA-2.
CD3	Complexo protéico presente em células T composto por uma cadeia CD3γ, uma CD3δ e duas cadeias CD3ε, que junto com receptor TCR e a cadeia ζ resultam na ativação celular.
CD4	Glicoproteína expressa na superfície de algumas células T, macrófagos, monócitos e nas células dendríticas. Sua afinidade pelo complexo MHC II acoplado ao peptídeo resulta na ativação de células T auxiliadoras responsáveis pela potencialização da resposta imune.
CD5	CD5 é encontrado em células B secretoras de IgM denominadas de B1 e também em células T.
CD8	Glicoproteína atuante como co-receptor de T, cuja afinidade com o complexo MHC I acoplado ao peptídeo resulta em uma resposta celular citotóxica. Também pode ser encontrado em células citotóxicas naturais (NK, de *natural killer*).

CD19 Molécula expressa em células dendríticas foliculares e linfócitos B. Atua como co-receptor dessas, em conjunto com CD21 e CD81.

CD20 Expresso em células B com exceção de plasmócitos e células pró-B. Não possui um ligante natural conhecido, sendo sua função pouco esclarecida.

CD21 Receptor de complemento (CR2), participante do complexo CD19/21/81, importante para reduzir o limiar de ativação dos linfócitos B, fundamental para a resposta a antígenos polissacarídicos.

CD27 Molécula pertencente à superfamília de receptores TNF. Em união com seu receptor (CD70) atua na regulação da ativação de células B e síntese de imunoglobulina. Nos linfócitos T são importantes para a geração e manutenção de células T. Também é utilizado como marcador de memória, mais especificamente para células B.

CD28 Molécula coestimuladora expressa em células T, com afinidade pelas moléculas B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) presentes em células apresentadoras de antígenos.

CD40 Molécula coestimuladora presente em células apresentadoras de antígeno, cuja ligação com seu receptor CD40L (CD154) é responsável pela ativação da resposta imune.

CD45RA Proteína tirosina fosfatase que exerce função essencial na regulação da sinalização de linfócitos T *naïve*, através da interação aos componentes do complexo de reconhecimento de antígenos ou a quinases da família Src necessárias para a sinalização desse complexo. A presença do domínio RA dificulta a ativação dessas células e, pelo

	fato de suprimir as JAK quinases funciona como regulador da sinalização pelos receptores de citocinas.
CD70	Molécula ligante de CD27
CD154	Proteína pertencente à família do TNF, expressa em células T ativadas, que se ligam ao CD40 expresso em células apresentadoras de antígenos
CO_2	Dióxido de carbono
D IgA	Deficiência de Imunoglobulina A
dL	Decilitros
EDTA	*Ethylenediamine tetraacetic acid*
ESID	*European Society for Immunodeficiencies*
et al	E outros
FITC	*Fluorescein isothiocyanate*
HC	Hospital das Clínicas
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da USP
ICOS	*Inducible CoStimulator*
ICV	Imunodeficiência Comum Variável
IDP	Imunodeficiência Primária
IE	Índice de estimulação
Ig	Molécula de imunoglobulina (anticorpo)
IgA	Imunoglobulina A, encontrada em áreas de mucosas como o intestino, trato respiratório e trato urogenital, prevenindo sua colonização por patógenos.
IgD	Atua principalmente como receptor de células B sendo sua função pouco esclarecida; acredita-se que esteja envolvida com ativação celular.

IgG	Ig presente em grande quantidade no plasma, responsável pela fixação de complemento, opsonização e ativação de fagócitos.
IgIV	Imunoglobulina para uso por via intra venosa
IgM	Imunoglobulina expressa na superfície das células B *naïve*. Elimina patógenos nos estágios iniciais da imunidade mediada pelas células B antes que haja desenvolvimento de memória anticórpica.
I	Ionomicina
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NFkB	*Nuclear factor-kappa B*
NK	*Natural Killer cells* (células citotóxicas naturais)
OKT3	Anticorpo monoclonal anti CD3
PAGID	*Pan American Group for Immunodeficiency*
PBMC	*Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PE	*Phycoerythrin*
PE-Cy5	PE + *cyanine 5* (fluorocromo em tandem)
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	*Phorbol Miristil Acetato*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
TACI	*Transmembrane activator and calcium-modulating and cyclophilin ligand interactor*
TCR	*T cell receptor*
TNF	*Tumor necrosis factor*

TRAF	*TNF-R associated factors*
µL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Classificação de Freiburg. Avaliação quantitativa de células CD27+IgD- (células B de memória) nos pacientes com ICV. 11

Figura 2 Distribuição dos marcadores de linfócitos B em indivíduos controle. Moléculas de superfície como CD19, CD27, CD20 e CD40 foram avaliadas a partir do *gate* em linfócitos. As demais moléculas (CD5, CD27, IgM, IgD, BAFFR, CD40, CD21+ e CD21-) foram analisadas a partir da população de linfócitos B..... 31

Figura 3 Avaliação fenotípica de linfócitos B (expressão da molécula de superfície celular CD19+) em linfócitos totais de pacientes ICV x controles..... 35

Figura 4 Avaliação fenotípica de CD21- (redução da expressão da molécula de superfície celular CD21+) em linfócitos B (CD19+) de pacientes ICV x controles..... 36

Figura 5 Avaliação fenotípica de CD21+ (expressão da molécula de superfície celular CD21+) em linfócitos B (CD19+) de pacientes ICV x controles..... 36

Figura 6 Avaliação fenotípica de linfócitos B tipo 1 (expressão da molécula de superfície celular CD5+) em linfócitos B (CD19+) de pacientes ICV x controles..... 37

Figura 7 Avaliação fenotípica de células *naïve* (expressão da molécula de superfície celular IgM+) e de memória (CD27+) em linfócitos B (CD19+) de pacientes ICV x controles..... 38

Figura 8 Avaliação fenotípica de IgD+ (expressão da molécula de superfície celular IgD) em linfócitos B (CD19+) de pacientes ICV x controles..... 39

Figura 9 Avaliação fenotípica de CD40+ (expressão da molécula de superfície celular CD40) em linfócitos B (CD19+) de pacientes ICV x controles..... 40

Figura 10 Avaliação fenotípica de CD20 e BAFFR (expressão da molécula de superfície celular CD20 e BAFFR) em linfócitos B (CD19+) de pacientes ICV x controles..... 40

Figura 11 Avaliação da expressão de BAFF-R por intensidade de fluorescência nas células B de indivíduos com redução e sem redução de células B de pacientes com ICV..... 41

Figura 12 Avaliação fenotípica de células T CD4+ e T CD8+ (expressão da molécula de superfície celular CD4+ e CD8+) em linfócitos T (CD3+) de pacientes ICV x controles..... 42

Figura 13 Avaliação fenotípica de CD27 (expressão da molécula de superfície celular CD27) em linfócitos totais de pacientes ICV x controles..... 44

Figura 14 Porcentagem de células e intensidade de fluorescência da molécula CD154 em diferentes períodos de incubação com ou sem estímulo..... 46

Figura 15 Fenotipagem de CD154+ em controle "normal"..... 47

Figura 16 Avaliação fenotípica de CD154+ (expressão da molécula de superfície celular CD154) em linfócitos totais de pacientes ICV x controles..... 48

Figura 17 Ensaio de linfoproliferação de indivíduos controles x

pacientes frente aos mitógenos por três dias..... 49

Figura 18 Análise estatística de apoptose inicial (Anexina V) entre controles e pacientes..... 50

Figura 19 Análise estatística de apoptose tardia (PI) entre controles e pacientes..... 50

Figura 20 Classificação de Freiburg. Avaliação quantitativa de células CD27+IgD- (células B de memória) nos pacientes com ICV. 53

Figura 21 Distribuição dos grupos de 16 pacientes com ICV do ambulatório ADEE-3003 pela classificação de Freiburg..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Imunodeficiências relacionadas com a produção de anticorpos..... 06

Tabela 2 Dosagem de imunoglobulinas dos pacientes com ICV..... 29

Tabela 3 Manifestações clínicas dos pacientes com ICV..... 30

Tabela 4 Definição dos pontos de corte para a expressão de cada molécula definida após análise estatística dos resultados obtidos nos indivíduos controle..... 32

Tabela 5 Fenotipagem dos marcadores de superfície celular de linfócitos B de pacientes com ICV..... 34

Tabela 6 Fenotipagem dos marcadores de superfície celular de linfócitos T de pacientes com ICV..... 43

Tabela 7 Associação de pacientes com redução de células T CD27+ e manifestações autoimunes..... 45

RESUMO

Collanieri AC. *Imunodeficiência Comum Variável: distúrbio de diferenciação dos linfócitos B ou distúrbio de ativação dos linfócitos T?* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

A imunodeficiência comum variável (ICV) é uma imunodeficiência primária de origem heterogênea, definida como uma diminuição de pelo menos dois isótipos de imunoglobulinas, a falta de resposta anticórpica a imunizações e a exclusão de outras causas primárias de hipogamaglobulinemia. A ausência de níveis adequados de anticorpos em pacientes com ICV resulta em infecções bacterianas recorrentes, mais freqüentes no trato respiratório e digestivo, que podem levar a seqüelas sinusais e pulmonares. Nos últimos 6 anos iniciou-se a descoberta de genes relacionados à causa de doenças com o fenótipo de ICV, como os genes de TACI, BAFF-R, CD19 e ICOS. Dentre as alterações imunológicas, podemos também relatar deficiência de células B de memória (CD19+IgM-IgD-CD27+), levando a distúrbio de comutação isotípica e redução da secreção de imunoglobulinas. Atualmente tal característica vem sendo utilizada para classificar a ICV. No decorrer do presente trabalho pudemos observar que pacientes com ICV apresentam alterações na expressão de CD27 não somente em células B, mas também em células T, além de resposta linfoproliferativa ao estímulo de PHA reduzida. O CD27 consiste em uma molécula da família TNF presente constitutivamente em células T e após ativação em células B. Sua atuação na resposta imune está relacionada com a proliferação e co-ativação de células T específicas que atuam na interação T-B, na resposta de células B dependente de T. Dessa forma deficiências na via de CD27 podem resultar em defeitos nos mecanismos de comutação isotípica e de diferenciação de células B do centro germinativo, assim como

de células de memória. Essas características podem ser observadas em modelos murinos de deficiências de CD27/CD70. Nossos achados permitem que uma nova janela se abra para o estudo da ICV. A avaliação dos distúrbios associados a defeitos de sinalização de CD27/CD70 em humanos pode se tornar uma nova ferramenta para a compreensão de uma deficiência tão pouco esclarecida. Tal enfoque pode eventualmente contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos, atuando diretamente na molécula em questão. Além disso, sugerimos também a utilização da fenotipagem das moléculas CD27 em linfócitos B e T, além da IgM e IgD de membrana para a caracterização da ICV, mais a análise da molécula CD154 para exclusão de outras imunodeficiências.

Descritores - Imunodeficiência de comum variável, imunodeficiências primárias, antígeno CD27, linfócitos T.

SUMMARY

Collanieri AC. *Common Variable Immunodeficiency: disturbance of differentiation of B lymphocytes or disorder of activation of T lymphocytes?* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Common variable immunodeficiency (CVID) is a primary immunodeficiency disorder of heterogeneous origin, defined by a decrease of at least two immunoglobulin isotypes, lack of antibody response to immunization and the exclusion of other causes of primary hypogammaglobulinemia. The absence of adequate levels of antibodies in patients with CVID results in recurrent bacterial infections, most frequently in the respiratory and digestive tract, which can lead to sinusal and lung sequels. Over the past six years the discovery of genes related to the phenotype of CVID began, such as the genes of TACI, BAFF-R, CD19 and ICOS. Among the immunological changes, there is impairment of memory B cells (CD19+/IgM-IgD-CD27+), leading to disturbance of isotypic switching and reduced secretion of immunogobulins. Currently this feature has been used to classify CVID. During the present study we observed that patients with CVID present changes in the expression of CD27 not only in B cells, but also in T cells, and reduced lymphoproliferative response to PHA. CD27 molecule is a member of the TNF family present constitutively in T cells, and after activation in B cells. Its importance in the immune response is related to the proliferation and co-activation of specific T cells that act in T-B interaction, in the T cell dependent B cells response. Thus disturbances in the CD27 pathway can result in defects in isotypic switch and differentiation of germinal center B cells, as well as memory cells. These characteristics can be observed in

murine models of CD27/CD70 deficiency. Our findings allow a new approach for the study of CVID. The evaluation of defects in CD27/CD70 signaling in humans might become a new tool for understanding an incompletely understood disease. Such an approach may contribute to the development of new treatments, acting directly on the molecule in question. In addition, we also suggest the use of phenotyping of CD27 molecules on B and T lymphocytes, in addition to membrane IgM and IgD to characterize CVID, associated to the analysis of the molecule CD154 to exclude other immunodeficiencies.

Descriptors - common variable immunodeficiency, primary immunodeficiency, CD27 antigen, T lymphocytes

O ambiente no qual vivemos consiste em um sistema extremamente hostil, onde somente os organismos capazes de se adaptar às pressões impostas pelo ambiente no decorrer da evolução foram capazes de perpetuar sua espécie.

Nos mamíferos existe um mecanismo, conhecido como sistema imunológico, composto por uma complexa rede de unidades celulares e moleculares que interagem entre si de forma harmoniosa e coordenada resultando na proteção do indivíduo e homeostase do organismo.

O sistema imunológico pode ser didaticamente dividido em dois ramos: inato e adaptativo. A imunidade inata compreende os mecanismos de fagocitose e seus sistemas amplificadores, como as cascatas de coagulação/fibrinólise, cininas e complemento, as células dendríticas e as células citotóxicas naturais (NK, do inglês *natural killers*). Esse sistema apresenta respostas rápidas e reconhece estruturas invariáveis apresentadas pelos agentes patogênicos denominadas PAMPs (do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). Por outro lado a imunidade adaptativa depende da geração de células (linfócitos T e B) que reconhecem moléculas estranhas ao organismo (antígenos) diferenciando dessa forma o próprio (do inglês *self*) do não próprio (do inglês *non-self*) e permitindo um reconhecimento específico dos diversos agentes patogênicos. Apesar desse

sistema ser mais lento que a imunidade inata é um sistema cognitivo e dessa forma "aprende e tem memória", fazendo com que em um segundo contato com o mesmo patógeno (ou similar) a resposta seja mais rápida e eficaz.

Contudo, falhas nessa fina rede de interações complexas podem ocorrer, levando a um desequilíbrio funcional que irá resultar em diversas manifestações patológicas que se dividem em 2 grandes grupos, as reações de hipersensibilidade e as imunodeficiências[1,2].

Imunodeficiências são alterações na capacidade funcional do sistema imune que resultam na impossibilidade do indivíduo em manter a homeostase do organismo. De acordo com sua origem, podemos classificar as imunodeficiências como primárias, quando resultam de alterações genéticas que levam a falhas ou ausência de resposta imunológica, e secundárias quando decorrentes de fatores como infecções por determinados patógenos como vírus e fungos, por doenças metabólicas, neoplásicas ou pelo uso de drogas imunossupressoras, dentre muitas outras causas.

As imunodeficiências primárias (IDP) são distúrbios hereditários ocasionados usualmente por mutações em um gene, cujo efeito deletério depende de como a expressão ou função da proteína codificada pelo gene seja alterada, resultando em danos que podem ser mais ou menos graves .

Descritas originalmente como doenças raras, a verdadeira incidência e prevalência nas diferentes populações ainda não são conhecidas, uma vez que não existem métodos de diagnóstico apropriados em algumas partes do

mundo e um processo de triagem adequado para esses indivíduos, passando muitas vezes por simples infecções[3].

Por esse motivo a Organização Mundial da Saúde (WHO – do inglês *World Health Organization*) definiu como critério de classificação das IDPs a manifestação ou não de aspectos clínicos e imunológicos, freqüentemente observados nesses indivíduos, dentre os quais podemos citar as infecções recidivantes e incomuns, além de alterações imunológicas como linfomas e autoimunidade. As imunodeficiências primárias são caracterizadas por um elevado grau de suscetibilidade a infecções, geralmente mais graves e disseminadas, resistência às terapias-padrão e infecções ocasionadas por organismos incomuns de reduzida patogenicidade (agentes oportunistas)[4,5].

Dentre as alterações imunológicas descritas, podemos citar danos na resposta mediada por Linfócitos T e/ou B, células NK, fagócitos e complemento, entre outras. Dependendo do componente afetado as imunodeficiências podem ser classificadas como: Imunodeficiências combinadas, Deficiências de anticorpos, Defeitos de apoptose em linfócitos, Defeitos na função de fagócitos, Defeitos da imunidade inata, Defeitos em receptores e componentes de sinalização, Síndromes associadas a quebras de DNA, Síndromes por modificação epigenética de DNA, Defeitos de complemento e síndromes de febre periódica, também conhecidas como doenças autoinflamatórias[6] (*Immunodeficiency resource* – IDR).

Em 2004, a realização de um estudo envolvendo 12 países da América Latina, dentre eles o Brasil, demonstrou que a distribuição das

imunodeficiências primárias apresentava as seguintes características: 53.2% são predominantemente deficiências de anticorpos; 22.6% outras imunodeficiências bem definidas; 9.5% imunodeficiências combinadas; 8.6% defeitos de fagócitos; 3.3% doenças de desregulação imunológica; e 2.8% deficiência de complemento.

Assim como nos países da América Latina, Estados Unidos, Austrália e Irã, no Brasil as imunodeficiências mais freqüentes são derivadas de defeitos na produção de anticorpos correspondendo a 51% das IDPs sendo que, ainda em território nacional, observa-se 16% de outras imunodeficiências bem definidas; 10% de imunodeficiências combinadas; 14% de defeitos de fagócitos; 3% de doenças de desregulação imune; e 6% de deficiências de complemento.

As imunodeficiências humorais, relacionadas às deficiências de anticorpos, manifestam-se freqüentemente a partir do 6°-12° mês de vida, quando a IgG materna passada por via placentária é consumida, sendo por esse motivo caracterizadas na infância por infecções bacterianas no trato respiratório, digestivo e episódios sépticos, bem como infecções por enterovírus.

Até o momento foram descritas 27 tipos de imunodeficiências relacionadas com produção de anticorpos (tabela 1), que resultam em falhas no desenvolvimento e função dos linfócitos B.

Tabela 1 – Imunodeficiências relacionadas com a produção de anticorpos

Agamaglobulinemias
Agamaglobulinemia ligada ao X
Agamaglobulinemia ligada ao X com deficiência de hormônio do crescimento
Deficiência de BLNK
Deficiência de Igα (CD79a)
Deficiência da cadeia pesada μ
Deficiência da cadeia leve transitória λ5
Agamaglobulinemia autosômica dominante não Bruton (LRRC8)
Deficiência de Igβ (CD79b)
Deficiência de cadeia leve
Deficiência de cadeia leve κ
Deficiência seletiva de subclasses de IgG, IgE e/ou classe ou subclasses de IgA
Deficiência de isótipo γ1
Deficiência de isótipo γ2
Deficiência Parcial de isótipo γ3
Deficiência de isótipo γ4
Deficiência de isótipo α1

Deficiência de isótipo α2

Deficiência de isótipo ε

Deficiência de subclasses de IgG com ou sem deficiência de IgA
Deficiência de IgA

Imunodeficiência comum variável

Deficiência de ICOS

Deficiência de TNFRSF13B (TACI)

Deficiência de TNFRSF13C (BAFF-R)

Outras deficiências de anticorpos

Deficiência de anticorpos com níveis normais de imunoglobulinas

Hipogamaglobulinemia transitória da infância

Deficiência de CD19

Defeitos de recombinação de comutação de classe e hipermutação somática (síndromes de Hiper-IgM) afetando as células B

Deficiência de AID

Deficiência de UNG

Deficiência de CD40

Deficiência seletiva na recombinação de comutação isotípica de Ig de origem desconhecida

Embora as deficiências de anticorpos sejam as mais prevalentes dentre as imunodeficiências primárias, sua etiologia e mecanismos fisiopatológicos são em grande parte desconhecidos. Podemos dizer que aproximadamente 60% dos pacientes portadores de agamaglobulinemia de herança autossômica e mais de 90% das hipogamaglobulinemias não são definidas geneticamente, dificultando o desenvolvimento de uma terapia curativa mais eficiente, necessária para a substituição das infusões mensais de imunoglobulina, que apresentam risco residual para os pacientes como aquisição de infecções hematogênicas, reações pirogênicas, autoimunidade, etc.

Dentre as imunodeficiências primárias de anticorpos, podemos destacar a imunodeficiência comum variável (ICV), definida como uma diminuição de pelo menos dois isótipos de imunoglobulinas abaixo de dois desvios-padrão da referência para a idade e a falta de resposta anticórpica a imunizações, associada à exclusão de outras causas primárias de hipogamaglobulinemia (critérios do PAGID/ESID; www.esid.org).

Clinicamente, a deficiência de anticorpos resulta em infecções bacterianas recidivantes no trato respiratório e no trato gastrintestinal, que podem levar a seqüelas pulmonares e gastrointestinais[7]. Inúmeros casos de granulomas não infecciosos em diversos órgãos, inclusive na pele, vêm sendo descritos em pacientes com ICV [8,9.]

A ICV pode manifestar-se na infância ou na idade adulta, com picos entre os seis e dez e entre os 26 e 40 anos de idade, respectivamente[10].

Dependendo do *background* genético a prevalência de ICV varia de 1:25.000 a 1:66.000[11].

A despeito dos defeitos imunológicos causadores da ICV serem por definição desconhecidos, diversas anormalidades imunológicas foram identificadas em pacientes com ICV. Alguns apontam para distúrbios da interação cognata de linfócitos T-B e/ou da formação de centros germinativos como um dos princípios patogênicos subjacentes.

Os defeitos de células T descritos incluem ativação e proliferação reduzidas[12], produção prejudicada de citocinas[13, 14,15] e expressão alterada de algumas moléculas de superfície induzidas pela ativação como o CD154[16,17], CD62-L[18] e atractina[19], sugerindo algumas anormalidades na sinalização pelo TCR[20,21]. Outros relatos descrevem uma geração reduzida de células T de memória antígeno-específicas[22] e uma supressão aumentada de células T [23].

Do lado das células B, vários estudos sugeriram defeitos intrínsecos levando a distúrbios da diferenciação terminal destas células[24,25], hipermutações somáticas reduzidas[26], *feedback* positivo de CD86 e CD70 reduzidas[27,28] e desenvolvimento alterado de células B de memória que passaram por *switching* isotípico (comutação isotípica)[29,30].

Mais recentemente, as células dendríticas têm sido implicadas na patogênese da ICV, pelo fato dessas células apresentadoras de antígenos terem um papel fundamental na reação do centro germinativo através do contato direto com as células B e T e a secreção de citocinas apropriadas [31].

Tentativas de classificação incluíram sintomas clínicos[32], síntese de imunoglobulina *in vitro* [33] ou o número e subtipos de células B periféricas

Outra teoria vigente há bastante tempo é de que a ICV seja causada por uma infecção. Infecções virais latentes como a infecção pelo EBV (vírus de Epstein-Barr) pode bloquear o desenvolvimento das células B a plasmócitos e causar ICV com o passar dos anos.

Finalmente uma hipótese autoimune para a deficiência de IgA e ICV foi recentemente levantada. O fato de pacientes portadores de ICV ou D IgA serem freqüentemente filhos de mães deficientes de IgA que têm anticorpos anti-IgA circulantes levantou a hipótese de que a D IgA pode se desenvolver como conseqüência de *priming* negativo durante a vida embrionária[34].

Um dos principais fatores associados ao desenvolvimento de ICV é a redução numérica de células B de memória (CD19+CD27+) observadas nesses pacientes, embora nem todos apresentem tal característica.

Atualmente existem dois tipos de classificação, baseadas nas subpopulações de linfócitos B, capazes de auxiliar na caracterização dos subgrupos de pacientes com ICV.

A primeira, denominada classificação de Paris, consiste de três grupos diferentes de pacientes: o primeiro apresenta número normal de células B de memória; o segundo apresenta redução de células B de memória com comutação isotípica (IgD-CD27+) com números normais de células B de memória sem comutação isotípica (IgD+CD27+), e o terceiro grupo é caracterizado pela ausência de células B[35].

Baseando-se nas alterações celulares observadas em Paris, Warnatz *et al*[36] e colaboradores desenvolveram então uma segunda classificação onde os pacientes eram subdivididos em: um primeiro grupo composto por indivíduos com células B de memória abaixo de 0,4% da população total de leucócitos circulantes com elevação de células B imaturas (CD19+CD21-) e manifestações clínicas como esplenomegalia e citopenia autoimune (grupo Ia); ou em um grupo composto por indivíduos com número normal de células CD19+CD21- (grupo Ib). O grupo II por sua vez é caracterizado pelo número normal de células B de memória comutadas.

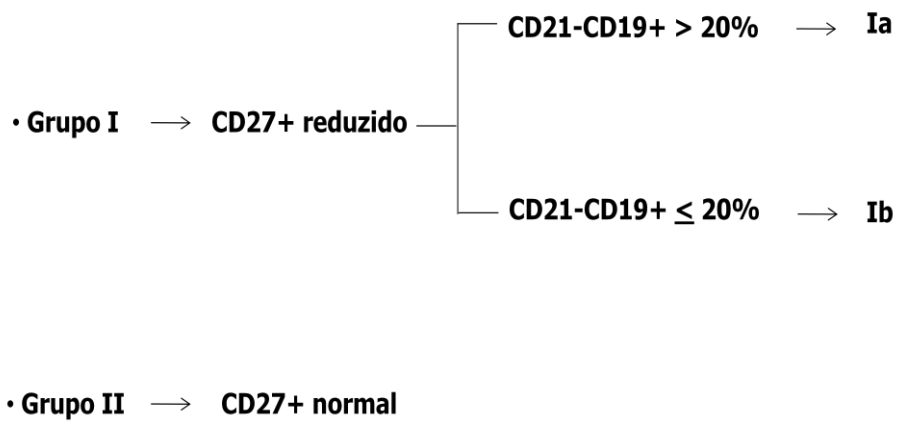

Figura 1 - Classificação de Freiburg. Avaliação quantitativa de células CD27+IgD- (células B de memória) nos pacientes com ICV. Os pacientes que apresentam redução nas células B de memória são distribuídos em um grupo denominado Grupo I, que pode ainda ser subdividido em grupo Ia quando ocorre elevação de células B CD21- acima de 20% de linfócitos B totais, e Ib quando não ocorre tal elevação. Por sua vez, indivíduos sem alteração da expressão de CD27 classificam-se no grupo II

A molécula CD27 consiste em uma proteína de membrana do tipo I da família do TNF com domínios ricos em cisteínas que atua na expansão, diferenciação e sobrevivência celular[37] pela interação de sua porção intracelular com proteínas como TRAF 2 e 5 que resultam na ativação de Jun N-terminal quinase e NFκB[38],[39],[40].

A molécula CD27 é expressa em linfócitos T *naïve*, células B ativadas e células NK. Em células T *naïve* a expressão de CD27 é constitutiva sendo elevada após a ativação celular via complexo TCR-CD3. Subseqüentemente, a interação entre CD27 e seu ligante, CD70, induz uma redução na expressão de membrana de CD27 e liberação de sua forma solúvel, dessa forma células T efetoras apresentam redução na expressão de CD27[41,42] .

CD70 é uma molécula de ativação de células T e B, que após ativação pelos receptores para antígenos passa a ser expressa[43, 44].

A molécula CD27 é observada em aproximadamente 30% dos linfócitos B periféricos[45], sendo considerado um importante marcador de memória em células B uma vez que linfócitos B maduros, *naïve*, CD27-IgM+IgD+ passam a expressar CD27 após a ativação da resposta T-dependente[46]. Por esse motivo acredita-se que a sinalização CD27/CD70 seja um fator primordial no desenvolvimento da resposta T-dependente, embora a exata natureza da sinalização CD27/CD70 permaneça desconhecida[47,48,49]

Diversos estudos vêm demonstrando um papel antagônico entre essas moléculas, uma vez que a adição de anticorpo anti-CD27 resulta na elevação da diferenciação de células B para células de memória e plasmócitos, assim

como na produção de IgG[49,50,51,52]. Por sua vez a ativação de CD70 resulta em inibição da diferenciação celular e significativa redução na produção de IgG, como demonstrado em animais transgênicos para CD70[53, 54].

Nos linfócitos T a molécula CD27 é expressa em aproximadamente 75% das células periféricas, sendo sua expressão elevada em linfócitos T CD4+CD45RA+ após ativação[55,56.]

Uma vez ativadas, as células T CD4+CD45RA+ proliferam elevando a produção de células T reguladoras que inibem a produção de imunoglobulinas. Podemos destacar também a atuação de CD27 na elevação da molécula CD154 (CD40L), cuja função está relacionada com a ativação da resposta de células T-dependentes[64].

Embora a via CD27/CD70 seja de grande importância na manutenção da ativação de células B, alguns trabalhos vêm discutindo os possíveis mecanismos resultantes da interação de CD27/CD70 em células T[57,42.]

Diversos estudos relatam a importância na interação da via CD27/CD70 para o desenvolvimento de uma resposta anticórpica adequada, contudo até o momento não existem relatos de hipogamaglobulinemias, como a ICV, relacionadas a defeitos na expressão das moléculas CD27/CD70, assim como em suas vias de ativação.

Sabendo que a ICV pode estar relacionada redução de células B de memória (CD19+CD27+), levantamos a seguinte questão: pode a ICV estar relacionada com defeitos de sinalização da via CD27/CD70 de células B dependentes de células T?

1.1 JUSTIFICATIVA

Até o momento não existem relatos de alterações na expressão da molécula CD27 em células T de pacientes com ICV, contudo entendemos que a constatação de tal fato poderia resultar em melhor compreensão de uma doença tão heterogênea e pouco compreendida, que pode estar relacionada a defeitos de comunicação celular e não somente a alterações na produção de anticorpos resultantes da alteração numérica de células B de memória, como é descrito até o momento.

- Avaliar o fenótipo dos linfócitos B nos portadores de ICV acompanhados em nosso Serviço.

- Avaliar nos pacientes com ICV a correlação entre as manifestações clínicas e as possíveis alterações imunofenotípicas desses pacientes.

- Avaliar a expressão da molécula CD27 nos linfócitos T de pacientes com ICV.

3.1 CASUÍSTICA

Para a realização deste trabalho foram selecionados 20 pacientes diagnosticados previamente como portadores de imunodeficiência comum variável do ambulatório de Manifestações Dermatológicas das Imunodeficiências Primárias – ADEE-3003 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Concomitantemente foram selecionados indivíduos supostamente sadios.

A participação de todos os indivíduos ocorreu voluntariamente após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com a resolução N° 196/96 do Ministério da Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

Como critério de inclusão os pacientes deveriam ser diagnosticados como portadores de ICV (pacientes com valores de imunoglobulinas séricas abaixo de dois desvios-padrão da referência de normalidade - IgA: 69-382 mg/dL; IgG: 952-1538 mg/dL; IgM: 73-171 mg/dL), exclusão de outras imunodeficiências (como os defeitos de comutação isotípica denominados de síndromes de Hiper IgM).

Como critérios de exclusão foram selecionados aspectos como presença de neoplasias hematológicas, mulheres grávidas e indivíduos abaixo de 18 anos.

3.2 FENOTIPAGEM DOS MARCADORES DE SUPERFICÍE CELULAR DE LINFÓCITOS B e T

Para a realização da fenotipagem celular de linfócitos B, foram obtidos aproximadamente 5 ml de sangue periférico venoso coletado em tubo com anticoagulante EDTA, sendo as células (100µL de sangue adicionado em tubos de polipropileno para citometria de fluxo) incubadas com 5 µL de anticorpos monoclonais anti-CD19, CD20, CD21, CD40, BAFF-R, CD27, CD5, IgM e IgD (Caltag laboratories) para avaliação de células B e anticorpos monoclonais anti-CD3, CD4, CD8 e CD27 (Caltag laboratories) para a avaliação de linfócitos T, conjugados com fluorocromos específicos, por 20 minutos no escuro a 4°C.

Após o período de incubação as hemácias foram lisadas utilizando solução de lise (Immunoprep-Beckman Coulter Inc.-Indianapolis, USA) sendo então submetidas a análise no citômetro de fluxo Coulter EPICS XL-MCL, após a calibração da voltagem e da compensação utilizando-se os controles de coloração de superfície (controle isotípico).

A aquisição de eventos foi realizada utilizando a dispersão frontal e lateral de luz, analisando-se a região correspondente à localização dos linfócitos.

Tamanhos de amostra suficientemente grandes foram adquiridos durante a citometria de fluxo (aproximadamente 10.000 células da população de linfócitos), de modo a se conseguir medidas de freqüência estatisticamente significativas.

A aquisição dos eventos e análise dos resultados foi realizada com o auxílio do programa *Coulter Epics XL Flow Cytometer System II* e *Summit V4.0 for Cyan Acquisition* sendo os dados armazenados em arquivos *listmode* e cópias impressas.

3.3 CULTURA PARA ATIVAÇÃO CELULAR PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD154 (CD40L) EM LINFÓCITOS T

A ativação da molécula CD27 em linfócitos T resulta na amplificação da resposta de células T CD4+ não primadas, que passam a expressar moléculas de ativação como o CD40L (CD154) e padrões de citocinas próprios, que podem interferir na resposta de células B dependentes de T pela diferenciação de células B em células do centro germinativo e células de memória, assim como ativação da comutação isotípica e mutação somática.

Sabendo disso nós avaliamos a capacidade de expressão da molécula CD154 em linfócitos T CD4+ ativados com *Phorbol Miristil Acetato* + Ionomicina (PMA+I), para descartar possíveis interferências derivadas de defeitos na expressão dessa molécula, uma vez que indivíduos com Hiper IgM podem mimetizar ICV observando-se incapacidade de comutação isotípica levando a ausência ou redução dos demais isótipos de imunoglobulina (IgA e IgG) mantendo-se apenas a produção de IgM, como ocorre em alguns casos de ICV.

Para avaliar a expressão da molécula CD154, utilizou-se sangue periférico heparinizado diluído em uma proporção de 1:5 com meio de cultura RPMI 1640. As células foram então mantidas em placas de microtitulação com 24 alvéolos (Costar), seguindo a seguinte distribuição: um alvéolo contendo somente as células com o meio de cultura RPMI 1640, e um segundo alvéolo contendo as células em meio de cultura, suplementado com os estímulos (Phorbol Miristil Acetato 150 ng + Ionomicina 1,5 µg – Sigma Aldrich). As placas foram então mantidas em estufa a 37°C com 5 % de CO_2 por 0 horas, 4 horas, 8 horas e 12 horas para a avaliação da cinética de expressão da molécula supracitada.

3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD154 (CD40L) APÓS ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T.

Após o período de incubação as células foram retiradas dos alvéolos com o auxílio de uma pipeta e distribuídas em tubos para a realização da marcação, onde foram adicionados 5 µL de anticorpo monoclonal anti-CD154 marcado com PE, 5 µL de anti-CD8 FITC e 5 µL de anti-CD3 PE-Cy5 (Caltag laboratories). Em um segundo tubo foram acrescentados os controles isotípicos.

Após a marcação, as células foram incubadas por 20 minutos no escuro a 4°C, sendo que ao final do período de incubação as hemácias foram lisadas e as células submetidas a análise no citômetro de fluxo Coulter EPICS XL-MCL, equipado com laser de Argônio de 15 mW, 488 nm, refrigerado a ar, após a calibração da voltagem e da compensação utilizando-se os controles de coloração de superfície (controle isotípico).

A aquisição inicial de eventos, cada um correspondendo a uma célula, foi realizada utilizando-se a dispersão frontal e lateral de luz, que representam, respectivamente, o tamanho e a complexidade celular, analisando-se a região correspondente à localização dos linfócitos.

Tamanhos de amostra suficientemente grandes foram adquiridos durante a citometria de fluxo (aproximadamente 10.000 células da população de linfócitos), de modo a se conseguir medidas de freqüência estatisticamente significativas.

A aquisição dos eventos e análise dos resultados foi realizada com o auxílio do programa *Coulter Epics XL Flow Cytometer System II* e *Summit V4.0 for Cyan Acquisition* sendo os dados armazenados em arquivos *listmode* e cópias impressas.

3.5 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO – PBMCs

Para a realização dos ensaios de linfoproliferação e viabilidade celular foram utilizadas células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Para obtenção das células o sangue foi diluído em salina isotônica estéril em uma proporção de 1:1, e posteriormente transferido para um tubo contendo Ficoll-Hypaque (1:3) (Sigma-Aldrich) sendo então centrifugado a 867 x g por 20 minutos em centrífuga refrigerada. Passado o tempo de centrifugação, o anel composto de células mononucleares foi retirado e passado para um tubo previamente preparado com 2 mL de salina sendo as células novamente centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, onde após a lavagem o sobrenadante foi retirado e as células submetidas a nova lavagem. Ao final da terceira lavagem as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI e contadas em um contador hematológico automatizado (Abbott Cell-Dyn 1400® – Cell-Dyn).

3.6 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

As PBMCs foram plaqueadas em triplicatas em placas de microtitulação com 96 alvéolos (Costar) em uma concentração de 2 x 10^5 / alvéolo, onde cada alvéolo recebeu o mitógeno, ou apenas o meio de cultura, sendo então cultivadas.

Cada placa contém os estímulos, Fitohemaglutinina (PHA) a 2,5 µg/ml e OKT3 a 5 µg/ml. As placas foram mantidas em estufa a 37ºC com 5% de CO_2 por três dias.

De 16-20 horas antes do final das culturas, adicionou-se Timidina Tritiada (18,5 MBq - 0,5 µCi – Amersham International, UK) diluída em meio de cultura (RPMI) a cada alvéolo da placa, sendo ao final da incubação as células aspiradas em membrana de papel de fibra de vidro (Wallac) por meio de um coletor de células (*Cell harvester* – Skatron Combi cell harvester). Depois de secas as membranas, os níveis do radioisótopo incorporado foram quantificados com auxílio de um contador de radiação beta (Wallac Beta Plate) sendo os resultados expressos como índice de estimulação (IE = cpm [contagens por minuto] das células estimuladas / cpm das células não estimuladas), transferidos para planilhas dos programas *Microsoft Excel* (Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA) e *Graph Pad Prism* (Graph Pad Software Incorporated), para realização da análise estatística.

3.7 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Até o momento diversos trabalhos vêm contestando a capacidade linfoproliferativa dos pacientes[58] com o que poderia ser um fator relevante na classificação dos subgrupos desses indivíduos. Para descartar a influência da morte celular nos resultados do ensaio de linfoproliferação, nós realizamos uma análise de viabilidade celular por citometria de fluxo das células que foram submetidas à cultura.

Para isso as PBMCs sem estímulo e estimuladas com PHA, como descrito no ensaio de linfoproliferação, foram coletadas de um alvéolo após o período de incubação e submetidas à análise de viabilidade celular. Passado o período de incubação da cultura, as células foram aspiradas e lavadas, sendo então ressuspensas em 100 µL de solução Tampão para anexina e incubadas com 5 µL de Anexina V-FITC (Caltag laboratories) por 20 minutos, no escuro, a 4°C. Os tubos foram completados com 700 µL de tampão e então submetidos à análise, sendo momentos antes da aquisição adicionados 5 µL de iodeto de propídio na concentração de 50 µg/ml.

A quantificação das células apoptóticas foi obtida por meio da avaliação da ligação de anexina V à superfície das células, fluorescentes em FL_1, podendo ser diretamente avaliadas, pois as células viáveis não expressam fosfatidil-serina na superfície celular, molécula essa que se associa à anexina V. Por esse método, mesmo células em início do processo

de apoptose podem ser identificadas. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células apoptóticas (identificadas pela marcação pela anexina V e exclusão do PI) em 20.000 células contadas na janela pré-determinada.

4.1 CASUÍSTICA

Inicialmente nossa intenção era realizar uma análise fenotípica e genotípica nos 20 pacientes com ICV que compunham a coorte do ambulatório, contudo tivemos três baixas.

Laboratorialmente, todos os pacientes apresentavam dosagem de imunoglobulinas abaixo do normal (Tabela 2) e manifestações clínicas características de ICV como infecções recidivantes (Tabela 3).

Dentre esses, nove pacientes apresentavam manifestações autoimunes. Todos os pacientes fazem uso de IgIV ao menos uma vez ao mês.

Foram avaliados 14 indivíduos-controle onde nenhum apresentou manifestação clínica que pudesse sugerir alguma imunodeficiência.

Tabela 2 - Dosagem de imunoglobulinas dos pacientes com ICV

Paciente	Sexo	Imunoglobulina**		
		IgA ***(69-382 mg/dL)***	**IgG** ***(952-1538 mg/dL)***	**IgM** ***(73-171 mg/dL)***
1	M	55	495	46
2	M	4	257	4
3	M	4	743	30
4	F	4	714	16
5	F	99	564	181
6	F	4	916	12
7	F	4	965	4
8	M	4	464	4
9	F	-	-	-
10	M	4	464	4
11	F	4	774	4
12	F	4	725	5
13	M	4	694	4
14	M	4	794	17
15	F	7	1071	4
16	F	<40	742	<25
17	M	9	518	32

** Valores de referência para dosagem de imunoglobulinas pela Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP: IgA (69-382 mg/dL); IgG (952-1538 mg/dL); IgM (73-171 mg/dL). Método utilizado: Imunoturbidimétrico. Prontuário do paciente 9 não foi encontrado

Tabela 3 - Manifestações clínicas dos pacientes com ICV

Paciente	Manifestações Clínicas***		
	Respiratórias	**Gástricas**	**Autoimunes**
1	X	X	
2	X	X	X
3	X	X	
4	X	X	X
5	X	X	X
6	X	X	
7	X	X	X
8	X	X	
9	X	X	X
10	X	X	X
11	X	X	
12	X	X	X
13	X	X	X
14	X	X	
15	X	X	X
16	X	X	X
17	X	X	

4.2 FENOTIPAGEM DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR DE LINFÓCITOS B DE INDIVÍDUOS CONTROLE.

Excluída então a possibilidade de outras imunodeficiências em nossos pacientes, nosso próximo passo foi determinar os pontos de corte na expressão das moléculas CD19, CD20, CD21, CD27, CD40, IgM, IgD e BAFF-R. A definição da mediana e dos pontos de corte para a expressão de cada molécula foi definida após análise estatística (Coluna estatística) dos resultados obtidos nos indivíduos controle (Figura 2).

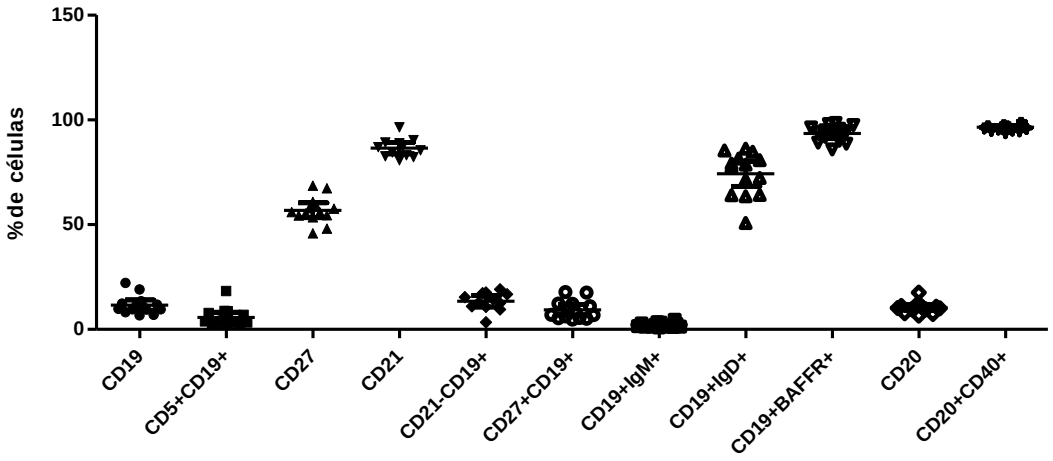

Figura 2 - Distribuição dos marcadores de linfócitos B em indivíduos controle. Moléculas de superfície como CD19, CD27, CD20 e CD40 foram avaliadas a partir do *gate* em linfócitos. As demais moléculas (CD5, CD27, IgM, IgD, BAFFR, CD40, CD21+ e CD21-) foram analisadas a partir da população de linfócitos B. N=14 indivíduos controle. Os valores de referência para os dados da figura acima estão na tabela 4

Tabela 4 - Definição dos pontos de corte para a expressão de cada molécula definida após análise estatística dos resultados obtidos nos indivíduos controle

Percentil	CD19	CD5 em B	CD27 em linfo	CD21 em B	CD21- em B	CD27 em B	IgM em B	IgD em B	BAFFR em B	CD20	CD40 em B
***5%**	6,690	2,240	45,94	80,79	3,490	4,680	0,9800	50,78	85,88	6,520	94,22
****95%**	22,17	18,35	68,69	96,51	19,21	17,85	4,620	86,35	98,54	17,56	99,22

*Percentil 5% valor mínimo de referência; **Percentil 95% valor máximo de referência

Após a definição dos pontos de corte, todos os pacientes foram avaliados de acordo com a expressão de suas moléculas de superfície. CD19, CD27, CD20 e CD40 foram avaliadas a partir do *gate* em linfócitos. As demais moléculas (CD5, CD27, IgM, IgD, BAFFR, CD40 e CD21) foram analisadas a partir da população de linfócitos B.

Dessa forma pudemos inicialmente subdividir os pacientes com ICV nos grupos sugeridos por Warnatz *et al* [36]. Nessa classificação os pacientes que apresentam redução nas células B de memória são distribuídos em um grupo denominado Grupo I, que pode ainda ser subdividido em grupo Ia quando ocorre elevação de células B CD21-, acima de 20% de linfócitos B totais, e Ib quando não ocorre tal elevação. Por sua vez, indivíduos sem alteração da expressão de CD27 se encontram dentro do grupo II.

A análise de nossos pacientes, de acordo com os pontos de corte (percentil de 5 e 95) pode ser vista na tabela 5, onde os indivíduos com valores abaixo do percentil 5 são caracterizados pela cor verde e os acima do percentil 95 são caracterizados pela cor laranja.

Tabela 5 - Fenotipagem dos marcadores de superfície celular de linfócitos B de pacientes com ICV

Paciente	CD19	CD5+CD19+	CD27	CD21	CD21-CD19+	CD27+CD19+	CD19+IgM+	CD19+IgD+	BAFFR	BAFFR IMF	CD20	CD20+CD40+
1	11.53	4.52	55.21	90.95	9,05	5.60	4.04	91.33	97.34	56.53	12,09	97.87
2	4.70	5.42	31.31	74.09	25,91	1.70	90.00	89.04	79.75	34.31	4,74	96.30
3	20.26	1.51	49.55	91.22	8,78	5.86	4.29	93.76	97.40	64.64	20,80	98.74
4	12.03	4.49	42.61	88.62	11,38	5.20	13.09	96.21	92.18	47.89	11,27	98.64
5	7.37	6.95	22.61	62.25	37,75	4.93	14.79	89.37	84.08	71.62	8,81	97.23
6	1.99	11.96	56.47	87.31	12,69	0.00	96.46	96.22	64.18	17.94	2,55	88.18
7	6.04	3.15	53.06	87.28	12,72	5.05	60.77	98.20	84.16	26.84	6,07	96.43
8	1.24	21.50	59.15	64.44	35,56	8.06	71.77	79.85	75.86	22.00	0,80	98.78
9	6.83	3.07	22.91	80.00	20	6.58	16.60	94.23	95.11	41.35	14,15	92.23
10	2.54	2.87	30.10	48.30	51,7	0.85	82.91	98.19	85.61	34.63	2,67	97.40
11	3.49	5.73	59.04	79.63	20,37	4.28	39.76	97.05	77.46	23.33	1,50	91.67
12	9.50	3.40	39.47	88.52	11,48	9.01	43.50	92.28	91.27	35.08	8,11	96.41
13	8.32	7.31	30.49	80.35	19,65	5.01	88.30	84.71	88.81	46.58	6,13	95.75
14	17.03	4.71	37.26	91.77	8,23	2.65	8.48	97.85	97.05	38.85	17,87	98.76
15	15.54	2.40	17.22	22.85	75,3	1.86	22.65	94.81	83.10	23.81	15,44	97.89
16	1.33	0.49	32.58	63.77	36,23	0.63	33.01	80.00	73.08	28.67	0,41	95.00
17	7.59	0.41	44.66	-	-	1.98	6.99	96.18	96.03	51.02	6,68	97.98
***5% Percentile**	**6,690**	**2,240**	**45,94**	**80,79**	**3,490**	**4,680**	**5,730**	**50,78**	**85,88**	**31,00**	**6,5**	**94,22**
****95% Percentile**	**22,17**	**18,35**	**68,69**	**96,51**	**19,21**	**17,85**	**20,84**	**86,35**	**98,54**	**64,17**	**17,56**	**99,22**

*Dados marcados em verde: valores abaixo do percentil 5; **Dados marcados em laranja: valores acima do percentil 95

4.3 FENOTIPAGEM DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR DE LINFÓCITOS B DE PACIENTES ICV.

Como podemos observar no tabela 5, alterações estatisticamente significativas no número de células B (CD19+) dos pacientes foram encontradas quando comparadas com indivíduos controle (figura 3), de modo que essa alteração corresponde a 40% dos pacientes de nossa coorte.

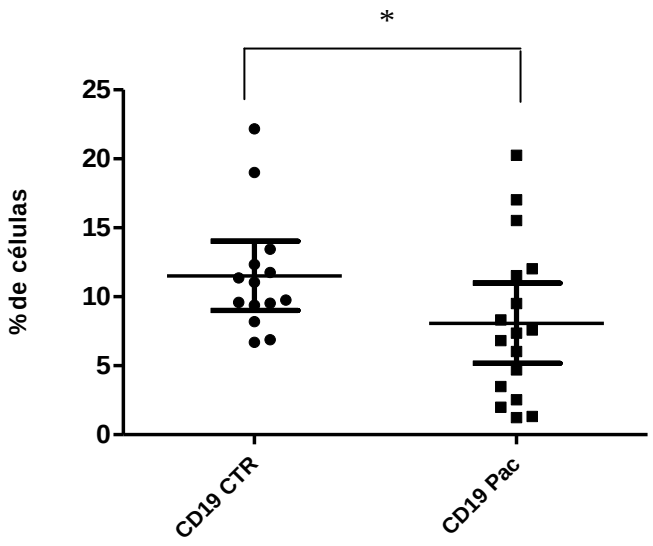

Figura 3 - Avaliação fenotípica de linfócitos B (expressão da molécula de superfície celular CD19+) em linfócitos totais de pacientes ICV x controles. *p=0,0450 (teste não paramétrico de Mann-Whitney). N=14 indivíduos CTR e 17 pacientes com ICV

Contudo não foram observadas alterações na capacidade de maturação dessas células, como podemos observar na figura 4, assim como na expressão de CD21 (figura 5). Com isso podemos concluir que nesse

caso, alterações numéricas de linfócitos B não resultam de interferências de sua maturação.

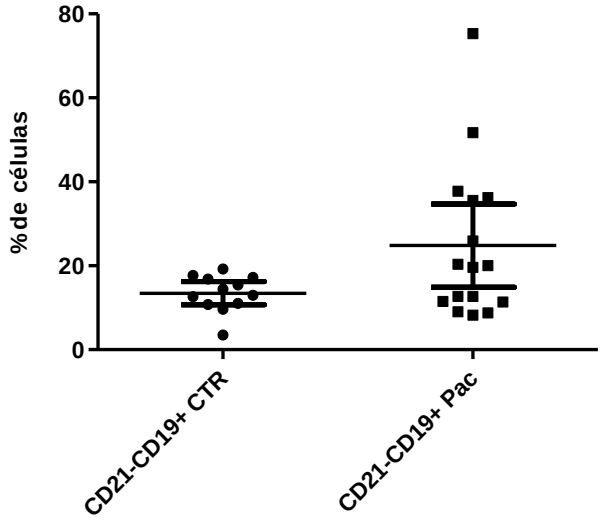

Figura 4 - Avaliação fenotípica de CD21- (redução da expressão da molécula de superfície celular CD21+) em linfócitos B (CD19+) de pacientes ICV x controles (teste não paramétrico de Mann-Whitney). N=14 indivíduos CTR e 17 pacientes com ICV

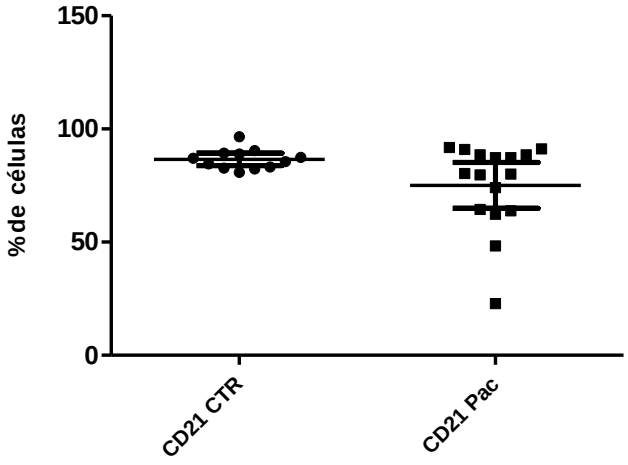

Figura 5 - Avaliação fenotípica de CD21+ (expressão da molécula de superfície celular CD21+) em linfócitos B (CD19+) de pacientes ICV x controles (teste não paramétrico de Mann-Whitney). N=14 indivíduos CTR e 17 pacientes com ICV

Embora as células B2 (CD19+CD5-) estivessem alteradas, não foram encontradas interferências numéricas no subtipo B1 (CD19+CD5+) (figura 6).

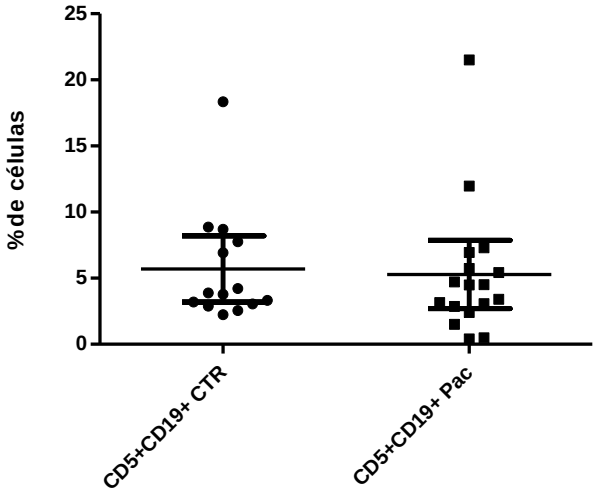

Figura 6 - Avaliação fenotípica de linfócitos B tipo 1 (expressão da molécula de superfície celular CD5+) em linfócitos B (CD19+) de pacientes ICV x controles (teste não paramétrico de Mann-Whitney). N=14 indivíduos CTR e 17 pacientes com ICV

Sabendo que as alterações quantitativas e qualitativas nos linfócitos B de pacientes com ICV podem ser o principal fator no desenvolvimento da doença, avaliamos então a capacidade de diferenciação das células B desses indivíduos em células B de memória, avaliando dessa forma sua capacidade de ativação e diferenciação frente a uma resposta antigênica.

Durante a avaliação pudemos observar alterações estatisticamente significativas na diferenciação de células B *naïve* (IgM+) para células B de

memória (CD19+CD27+), ou seja, pacientes com ICV apresentam elevação no número de células B *naïve* e redução em células B de memória (Figura 7).

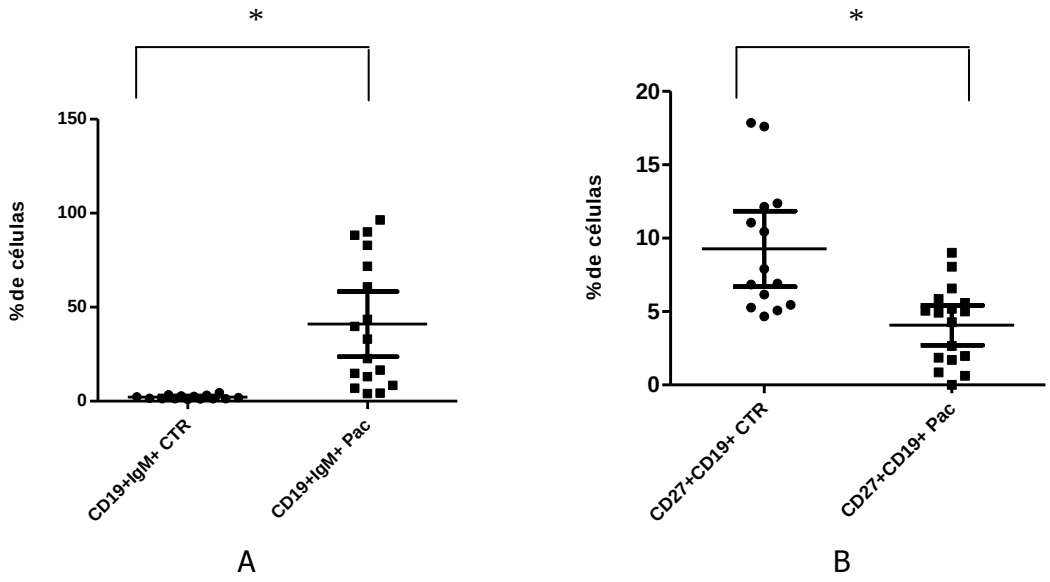

Figura 7 - A - Avaliação fenotípica de células *naïve* (expressão da molécula de superfície celular IgM+); B - de memória (CD27+) em linfócitos B (CD19+) de pacientes ICV x controles (teste não paramétrico de Mann-Whitney), *p=<0,0001 e *p=0,0008 respectivamente. N=14 indivíduos CTR e 17 pacientes com ICV

Sabendo que a expressão de IgM na superfície de células B dos pacientes se encontrava alterada, nós avaliamos também a expressão de IgD de superfície, onde pudemos observar uma elevação em sua expressão quando comparadas com indivíduos controles (figura 8), caracterizando dessa forma uma incapacidade desses indivíduos em promover comutação isotípica adequada.

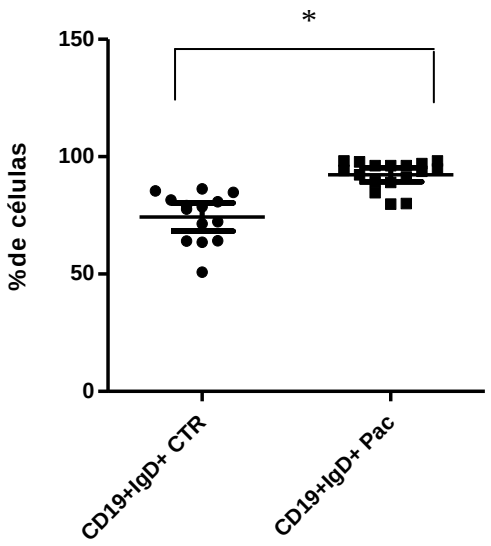

Figura 8 - Avaliação fenotípica de IgD+ (expressão da molécula de superfície celular IgD) em linfócitos B (CD19+) de pacientes ICV x controles (teste não paramétrico de Mann-Whitney), *p=<0,0001. N=14 indivíduos CTR e 17 pacientes com ICV

4.4 AVALIAÇÃO DOS DEMAIS MARCADORES DE CÉLULAS B

Nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada na expressão de CD40 e CD20 em linfócitos B (Figura 9) dos pacientes quando comparados aos indivíduos controle, contudo BAFF-R apresentou alterações (Figura 10).

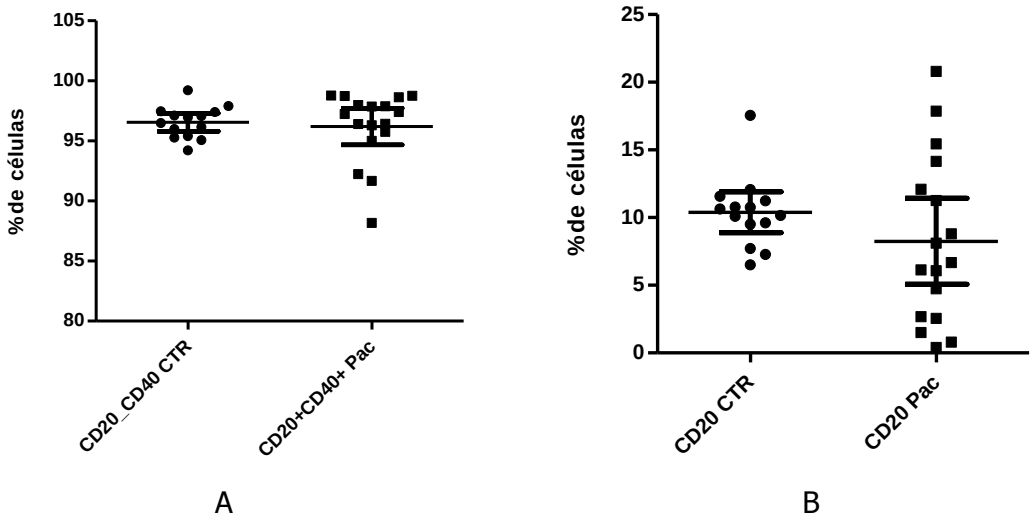

Figura 9 - A - Avaliação fenotípica de CD40+ (expressão da molécula de superfície celular CD40) em linfócitos B (CD19+); B – Avaliação fenotípica de CD20+ de pacientes ICV x controles (teste não paramétrico de Mann-Whitney). N=14 indivíduos CTR e 17 pacientes com ICV

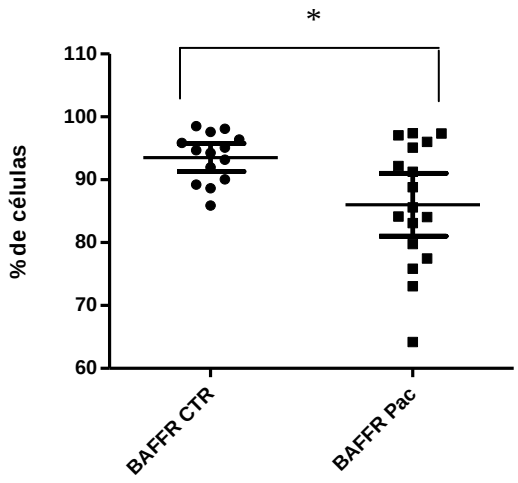

Figura 10 - Avaliação fenotípica de CD20 e BAFFR (percentagem de células B [CD19+] expressando BAFFR) de pacientes ICV x controles (teste não paramétrico de Mann-Whitney), *p=0,0276. N=14 indivíduos CTR e 17 pacientes com ICV

Na tabela 5 podemos observar que oito pacientes apresentavam redução concomitante da expressão de BAFF-R e do número de células B (CD19+). A avaliação da expressão de BAFF-R nesses pacientes que apresentaram redução numérica desse marcador foi complementada pela análise da intensidade de fluorescência dessa molécula. Observamos nesse grupo de pacientes redução estatisticamente significativa da expressão de BAFFR (n=6 e p=0,0006) (Figura 11).

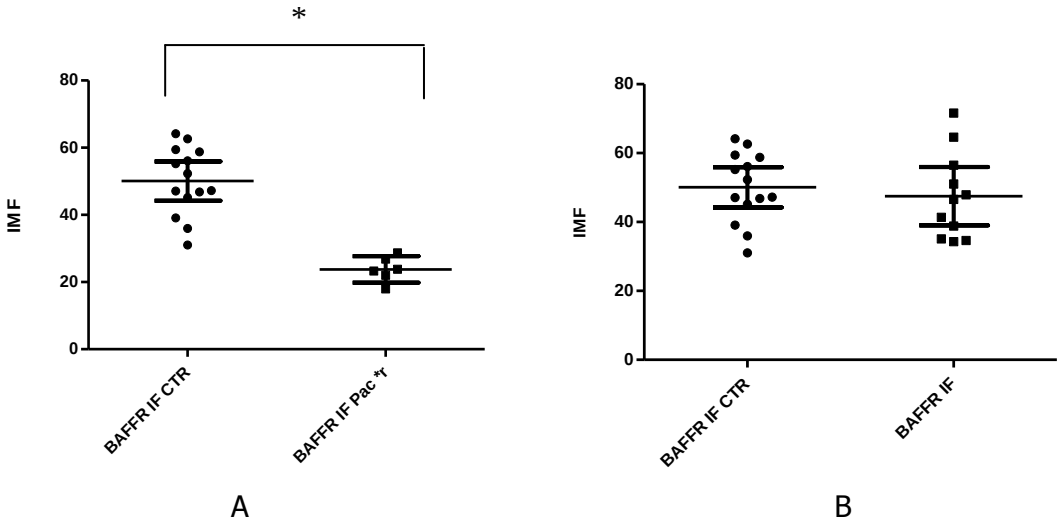

Figura 11 - A - Avaliação da expressão de BAFF-R por intensidade de fluorescência em pacientes com valores abaixo da referência; B - Avaliação da expressão de BAFF-R por intensidade de fluorescência em pacientes com valores normais de intensidade de fluorescência de BAFF-R de pacientes com ICV (teste não paramétrico de Mann-Whitney), *p=0,0006. N=14 indivíduos CTR e 17 pacientes com ICV

4.5 FENOTIPAGEM DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR DE LINFÓCITOS T DE INDIVÍDUOS CONTROLE X PACIENTES.

Sabendo que a ICV pode ainda estar relacionada com defeitos em células T, nós realizamos uma avaliação fenotípica dessas células dos pacientes portadores de ICV, fato que talvez possa explicar a presença da doença em indivíduos que possuem o número normal de células B.

Na análise dos linfócitos T de indivíduos controles X pacientes pudemos observar a existência de alterações estatisticamente significativas em células T CD4+ e T CD8+ (Figura 12 e Tabela 6).

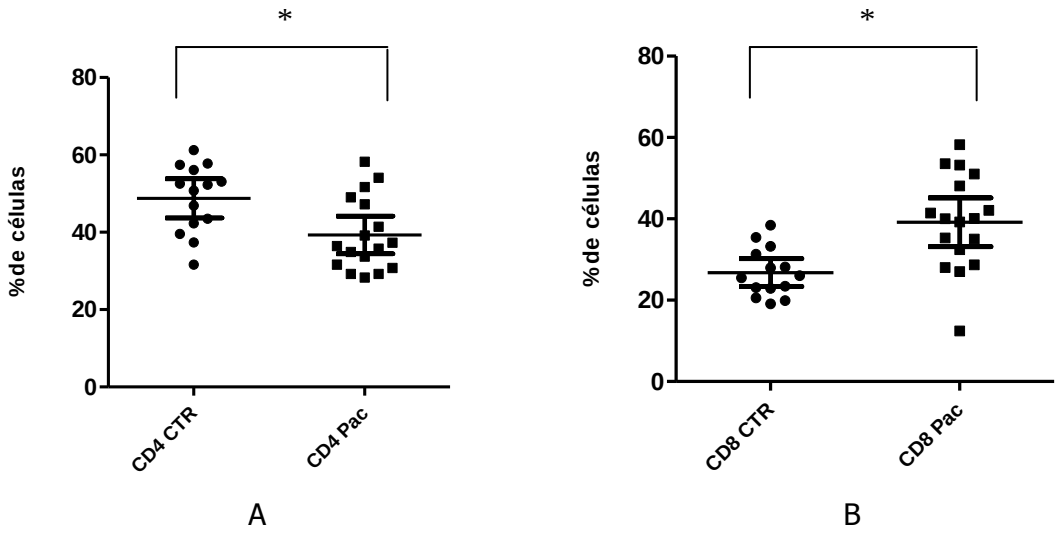

Figura 12 - A - Avaliação fenotípica de células T CD4+; B – Avaliação fenotípica de células T CD8+ em linfócitos T (CD3+) de pacientes ICV x controles (teste não paramétrico de Mann-Whitney), *p=0,0088 e *p=0,0011 respectivamente. N=14 indivíduos CTR e 17 pacientes com ICV

Tabela 6 - Fenotipagem dos marcadores de superfície celular de linfócitos T de pacientes com ICV

Pacientes	CD3	CD3+CD5+	CD27+CD3+	CD8	CD4
1	72.93	98.23	49,61	28	37,3
2	88,6	89.51	29,61	53,2	29,2
3	76,23	90.51	43,69	32,42	41,41
4	73,9	94.79	37,41	35	34,9
5	81,2	89.48	17,68	51	28,3
6	88,5	95.32	56,47	40,1	54,1
7	78,7	93.76	48,01	39,2	35,8
8	91	84.44	50,04	42,1	47,2
9	67,7	91.58	16,33	28,7	36,4
10	80.57	94.90	29,25	41.43	39.14
11	81.36	92.05	54,76	27.01	49.03
12	85,3	94.65	30,46	35,3	51,7
13	77,8	88.15	25,48	40	33,7
14	60.25	94.41	34,61	12.45	58.21
15	81,1	64.01	15,36	53,6	29,2
16	90,5	83.91	31,95	58,2	30.8
17	82,5	84.20	42,68	48,1	31,6
***5% Percentile**	**67,36**	**92,02**	**35,65**	**19,09**	**31,60**
****95% Percentile**	**86,29**	**99,54**	**61,85**	**38,43**	**61,25**

*Dados marcados em verde: valores abaixo do percentil 5; **Dados marcados em laranja: valores acima do percentil 95

Contudo nossa maior surpresa foi na avaliação de células T expressando o marcador de ativação CD27 (CD3+CD27+), onde pudemos observar que a redução de células CD27+, presente nos pacientes (Tabela 6), não ocorre exclusivamente por ausência de células B de memória, mas em alguns casos por redução de sua expressão em células T (Figura 13)

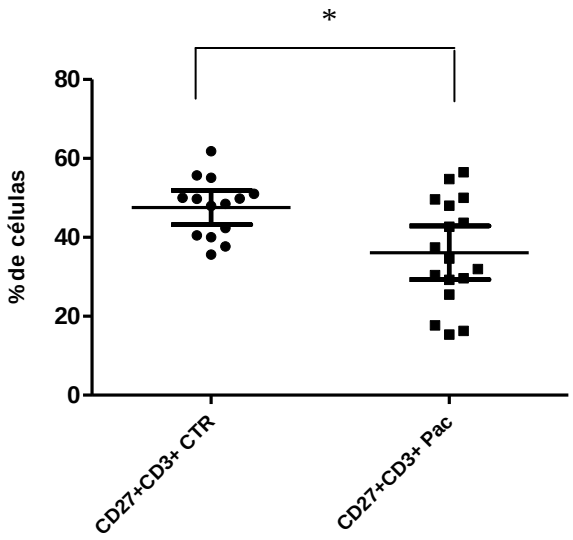

Figura 13 - Avaliação fenotípica de CD27 (expressão da molécula de superfície celular CD27) em linfócitos totais de pacientes ICV x controles (teste não paramétrico de Mann-Whitney), *p=0,01683. N=14 indivíduos CTR e 17 pacientes com ICV

Curiosamente, todos os pacientes que apresentaram redução na expressão de CD27 em células T possuíam manifestações autoimunes (tabela 7).

Tabela 7 - Associação de pacientes com redução de células T CD27+ e manifestações autoimunes

*Pacientes	**CD27+CD3+
1	49,61
2	**29,61**
3	43,69
4	37,41
5	**17,68**
6	56,47
7	48,01
8	50,04
9	**16,33**
10	**29,25**
11	54,76
12	**30,46**
13	**25,48**
14	**34,61**
15	**15,36**
16	**31,95**
17	42,68
Percentil 5%	35,65
Percentil 95%	61,85

*Dados marcados em vermelho: pacientes com manifestações autoimunes

**Dados marcados em verde: valores abaixo do percentil 5

4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD154 (CD40L) APÓS ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T.

Uma vez determinada a nossa coorte, nosso próximo passo foi avaliar a expressão da molécula CD154 nos pacientes diagnosticados como ICV. Para isso nós realizamos primeiramente a padronização da curva de tempo para análise da expressão da molécula CD154, como podemos observar nas figuras 14 e 15.

O melhor período de incubação para a análise da molécula foi de quatro horas.

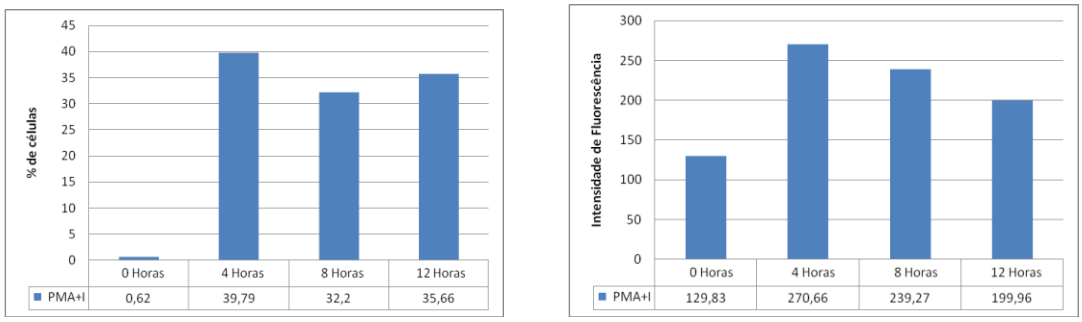

Figura 14 - Porcentagem de células e intensidade de fluorescência da molécula CD154 em diferentes períodos de incubação com ou sem estímulo

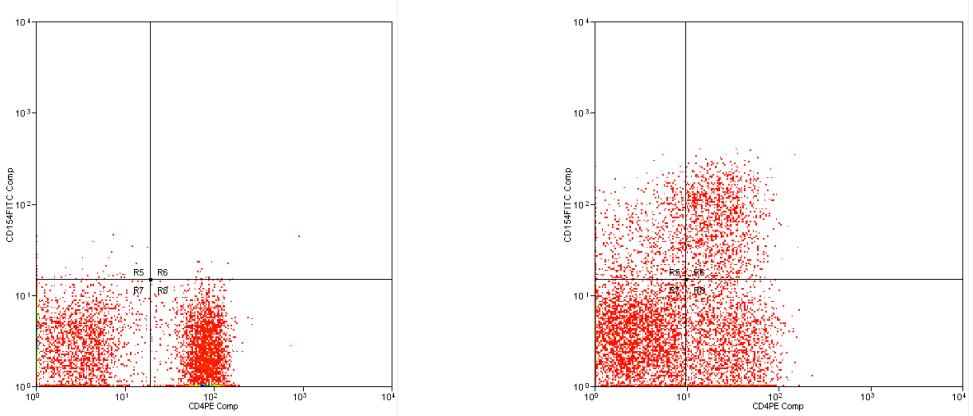

Figura 15 - Fenotipagem de CD154+ em controle "normal" (A e B). A: Células não estimuladas, B: Células estimuladas com *Phorbol Miristil acetato* + ionomicina (PMA+I)

Determinado o tempo adequado passamos então a avaliar a expressão de CD154 em nossos pacientes, onde observamos uma expressão normal quando comparada com os indivíduos controles, não apresentando nenhuma alteração estatisticamente significativa (Figura 16).

Além da avaliação da molécula CD154 nos pacientes ICV, tal resultado também nos permitiu excluir outras imunodeficiências que fossem capazes de mimetizar o quadro de ICV, uma vez que a ICV consiste em uma imunodeficiência caracterizada por redução de IgG e IgA, sendo a redução de IgM pouco observada. Contudo pacientes portadores de síndromes de hiper IgM podem apresentar as mesmas características, dificultando dessa forma a distinção dessas doenças. Por esse motivo a utilização de técnicas capazes de excluir possíveis diagnósticos errôneos de ICV foi de grande importância[59,60,61].

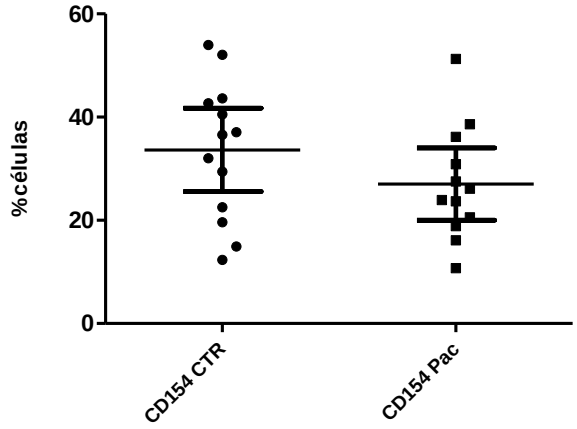

Figura 16 - Avaliação fenotípica de CD154+ (expressão da molécula de superfície celular CD154) em linfócitos totais de pacientes ICV x controles (teste não paramétrico de Mann-Whitney). N=14 indivíduos CTR e 12 pacientes com ICV

4.7 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

Como podemos observar na figura 17, na cultura com estímulos de três dias, não houve diferenças significativas entre o resultado de linfoproliferação dos controles com os pacientes para o mitógeno OKT3, contudo a resposta à PHA apresentou alterações estatisticamente significativas.

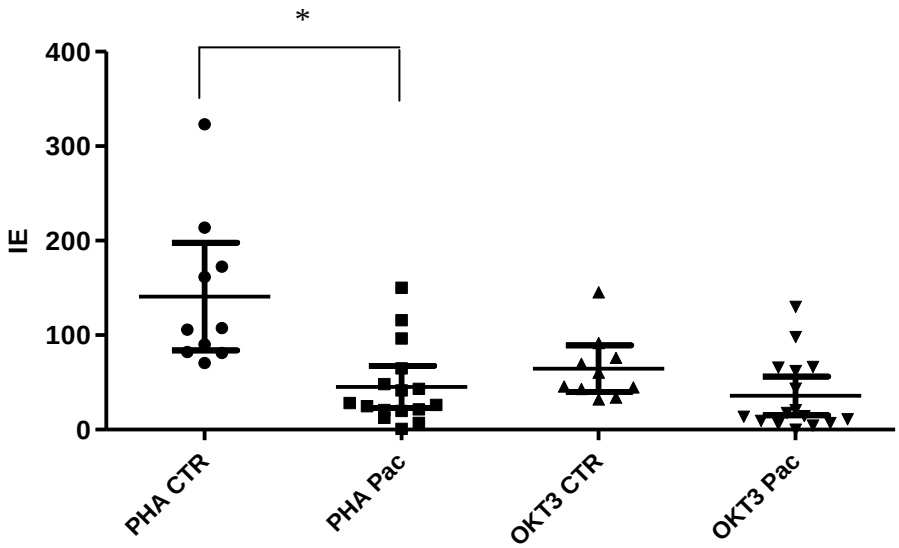

Figura 17 - Ensaio de linfoproliferação de indivíduos controles x pacientes frente aos mitógenos por 3 dias, *p=0,008 para PHA N=10 indivíduos CTR e 16 pacientes com ICV.

4.8 PADRONIZAÇÃO DA ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS CÉLULAS SUBMETIDAS À LINFOPROLIFERAÇÃO

Após o período de incubação as células submetidas a linfoproliferação foram marcadas com anexina V e iodeto de propídio para análise de viabilidade celular.

Pacientes com ICV não apresentam alterações na apoptose dos linfócitos quando comparadas com indivíduos controle, contudo observa-se uma discreta elevação na apoptose tardia desses indivíduos (Figura 18 e 19).

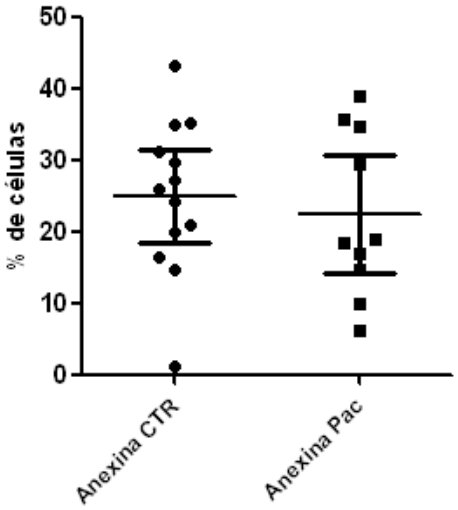

Figura 18 - Análise estatística de apoptose inicial (Anexina V) entre controles e pacientes N=12 indivíduos CTR e 10 pacientes com ICV

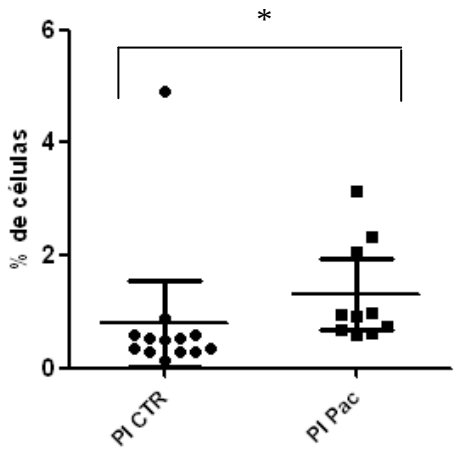

Figura 19 - Análise estatística de apoptose tardia (PI) entre controles e pacientes. *p=0,0026. N=14 indivíduos em ambos os grupos

5 DISCUSSÃO

A ICV consiste em uma imunodeficiência primária que se caracteriza por redução dos níveis de imunoglobulina sérica, levando os indivíduos a inúmeras infecções recidivantes do trato respiratório e gastrointestinal. Como pudemos observar todos os pacientes apresentados nesse trabalho apresentavam tais características, sendo por esses motivos diagnosticados como ICV.

Uma vez caracterizada a coorte nosso próximo passo foi a caracterização dos pontos de corte dos demais marcadores (CD19, CD20, CD21, CD27, CD40, IgM, IgD e BAFF-R), onde a análise estatística de 14 indivíduos controles resultou na determinação dos percentis de 5% e 95% (ponto de corte mínimo e máximo, respectivamente.

Uma vez criada a possibilidade de caracterizarmos os indivíduos com possíveis alterações fenotípicas para as moléculas já mencionadas, nós passamos então a aplicar os conceitos de classificações desenvolvidos por Warnatz em 2002[36] nos pacientes do ambulatório ADEE 3003.

Tal classificação, denominada de classificação de Freiburg, consiste na avaliação quantitativa de células CD27+IgD- (células B de memória) nos pacientes com ICV. Dessa forma indivíduos que apresentam redução em células B de memória são distribuídos em um grupo denominado Grupo I, que pode ainda ser subdividido em grupo Ia quando ocorre elevação de células B CD21-, acima de 20% de linfócitos B totais, e Ib quando não ocorre

tal elevação. Por sua vez, indivíduos sem alteração de memória se encontram dentro do grupo II .

A escolha de tal classificação é justificada por sua capacidade em distribuir os indivíduos de forma mais objetiva quando comparada com a classificação de Paris[35].

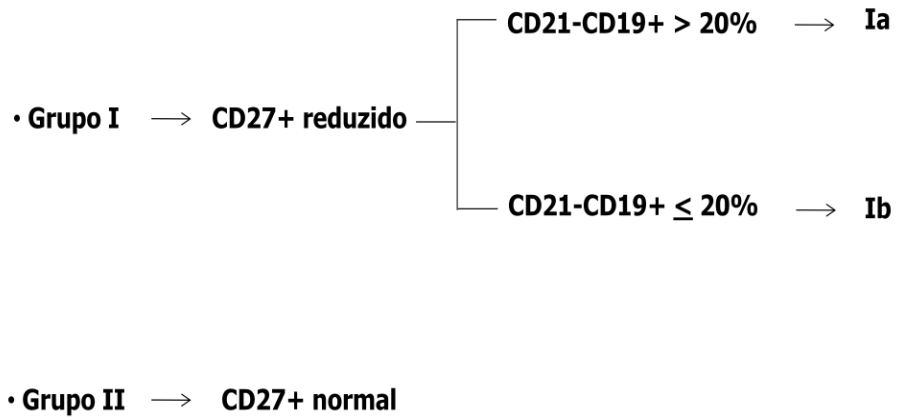

Figura 20 - Classificação de Freiburg. Avaliação quantitativa de células CD27+IgD- (células B de memória) nos pacientes com ICV. Os pacientes que apresentam redução nas células B de memória são distribuídos em um grupo denominado Grupo I, que pode ainda ser subdividido em grupo Ia quando ocorre elevação de células B CD21- acima de 20% de linfócitos B totais, e Ib quando não ocorre tal elevação. Por sua vez, indivíduos sem alteração da expressão de CD27 classificam-se no grupo II

Até o momento diversos estudos vem potencializando a influência da redução de células B de memória (CD19+CD27+) no desenvolvimento da doença excluindo contudo a influência da própria molécula no desenvolvimento de uma resposta imune adequada.

Sabendo disso nosso primeiro passo foi caracterizar nossos pacientes de acordo com as classificações descritas até o momento. Nós optamos pela classificação de Freiburg[36] por se tratar de uma metodologia mais abrangente.

Nas descrições encontradas na literatura, a ICV consiste em uma imunodeficiência com redução de linfócitos B (observado somente em 30% dos pacientes) ou incapacidade funcional de células B (relacionadas principalmente a falhas na diferenciação de células *naïve* para células de memória).

Como pudemos observar somente sete de nossos pacientes apresentavam redução numérica de células B.

Embora descrito como um dos responsáveis pelo desenvolvimento de ICV, a ausência da molécula CD19 não foi observada nas células B remanescentes desses pacientes.

Ainda no contexto de redução de células B, nosso próximo passo foi avaliar a elevação de linfócitos B imaturos (CD19+CD21-), cujo resultado seria a redução de células B maduras no sangue periférico. Como pudemos observar somente oito pacientes apresentavam tal alteração sendo que a redução de células B foi observada em seis deles.

No que se refere à expressão da molécula CD21, sete pacientes demonstram redução, sendo cinco pacientes relacionados com a redução de células B (intensidade de fluorescência normal).

Sabendo que nem todos os pacientes apresentavam problemas na contagem de linfócitos B, nosso próximo passo foi avaliar sua capacidade funcional pela análise de diferenciação de células *naïve* (CD19+IgM+) para células B de memória (CD19+CD27+IgM-IgD-).

Como observado, a expressão de ambas as moléculas estava alterada nas células dos pacientes de nossa coorte, demonstrando um defeito na capacidade de diferenciação de *naïve* para células de memória, resultando assim em uma possível interferência na resposta anticórpica, uma vez que as células B de memória são as grandes responsáveis pela manutenção da produção de anticorpos específicos.

Na figura 8 podemos ver que tal incapacidade de comutação isotípica é reforçada pela elevação na expressão da molécula IgD de membrana.

Tais resultados nos permitem crer que a utilização desses marcadores (CD27, IgM e IgD) associados aos aspectos clínicos contribuam para o refinamento do diagnóstico da ICV.

Retornando à expressão da molécula CD27 nos pacientes, pudemos observar que nem todos os pacientes apresentavam tais alterações, subdividindo-os em dois grupos: pacientes ICV com redução de células B de memória (CD19+CD27+) e pacientes com B de memória em números normais.

A visualização deste quadro nos leva aos resultados obtidos por Warnatz, onde ele descreve a divisão dos pacientes com ICV dentro de uma classificação.

Uma vez obtidos os resultados necessários, a distribuição de nossa coorte, segundo a classificação de Freiburg, apresentou-se da seguinte forma:

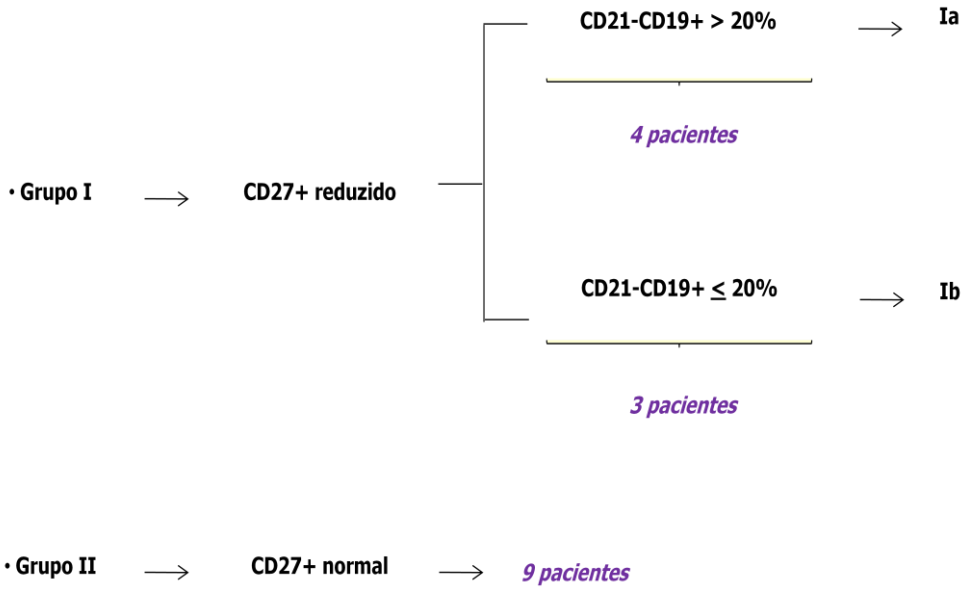

Figura 21 - Distribuição dos grupos de 16 pacientes com ICV do ambulatório ADEE-3003 pela classificação de Freiburg

Para finalizar as análises referentes à fenotipagem de células B, nossos pacientes não apresentaram alterações na expressão de CD40 e CD20, contudo CD20 e BAFF-R seguiram a redução de CD19, sendo a expressão dessas moléculas normal nas células remanescentes. Uma análise individual dos pacientes de nossa coorte revelou que cinco pacientes que apresentavam redução de células B tinham redução de BAFF-R na superfície das células remanescentes, embora um paciente com expressão normal de células B também apresentassem redução de intensidade de fluorescência de BAFF-R.

Nossa maior surpresa ocorreu quando analisamos a expressão de CD27 em células T desses pacientes, onde pudemos observar que a redução na expressão total da molécula estava mais relacionada com alterações em linfócitos T do que em linfócitos B, como descrito até o momento na literatura.

Como pudemos observar 64,7% de nossos pacientes com alteração na expressão de CD27 apresentavam linfócitos B de memória normais, sendo sua alteração de expressão nos linfócitos T.

A molécula CD27 consiste em uma proteína de membrana do tipo I da família do TNF, responsável pela expansão, diferenciação e sobrevivência celular[37] após interação com seu ligante[62].

Embora a via CD27/CD70 seja de grande importância na manutenção da ativação de células B, alguns trabalhos vêm discutindo os possíveis mecanismos resultantes da interação de CD27/CD70 em células T[57,63.]

Nesses trabalhos Kobata *et al*[57] e Hintzen *et al*[63] demonstram que CD27 está possivelmente relacionada com sinais co-estimuladores de linfócitos T, uma vez que o bloqueio desta via resulta na redução, em aproximadamente 40%, da capacidade linfoproliferativa de células T após o estímulo com anti-CD3, CD2 e mitógenos como a PHA.

Curiosamente nossos pacientes também apresentaram redução na linfoproliferação a PHA, sendo o estímulo por anti-CD3 preservado.

Os autores ainda relatam que a proliferação resultante da sinalização CD27/CD70 resulta na elevação de células T CD4+CD45RA+, assim como na expressão da molécula CD27 das células filhas.

Sabendo disso pudemos elaborar a seguinte seqüência de eventos: a ativação de células T por CD27 resulta na amplificação da resposta T CD4+CD45RA+ não primada que passa a expressar moléculas de ativação como o CD40L (CD154) e padrões de citocinas próprios que podem interferir na resposta de células B dependentes de T, uma vez que o contato de linfócitos B com células CD4+CD45RA+CD27+CD154+ resultam em sua diferenciação para células do centro germinativo e células de memória, assim como na ativação da comutação isotípica e mutação somática. Por sua vez a interação de células B com células T CD4+CD154-CD70+ resulta na sua diferenciação para plasmócitos[64].

Embora nossos pacientes não tenham apresentado alterações significativas na expressão de CD154, a redução na capacidade linfoproliferativa à PHA pode ser resultante de defeitos na interação T-B pela ausência de CD27 ou defeitos decorrentes dessa via, inibindo a resposta anticórpica adequada, uma vez que nenhuma elevação apoptótica foi observada nesses indivíduos antes e após ativação.

Até o momento não existem relatos de tais alterações, contudo entendemos que a constatação de tal fato pode resultar em melhor compreensão de uma doença tão heterogênea e pouco compreendida, que pode estar relacionada a defeitos de comunicação celular e não somente a

alterações na produção de anticorpos resultantes da alteração numérica de células B de memória, como é descrito até o momento.

Outro achado curioso em nosso trabalho é a possível associação da redução na expressão de células CD3+CD27+ com a presença de manifestações autoimunes (tabela 6), onde pudemos observar que todos os pacientes caracterizados pela redução na expressão da molécula CD27 nos linfócitos T apresentavam algum tipo de manifestação autoimune, o que não foi observado em indivíduos sem tal redução.

Sabendo disso, passamos a questionar se a classificação atual para ICV que avalia somente as células B de memória é apropriada, levando-nos a crer que a ICV pode estar mais intimamente relacionada com defeitos na interação de células T-B durante a resposta imune, uma vez que somente três pacientes apresentavam redução no número de linfócitos CD19+CD27+ concomitante com redução nos linfócitos CD3+CD27+.

Dos pacientes que apresentavam expressão normal de CD27 três tinham redução significante de células B sendo que a expressão de BAFF-R nas células remanescentes se encontrava abaixo do ponto de corte. Uma análise estatística revelou que essa redução é estatisticamente significativa quando comparada com os demais pacientes que apresentavam números normais de células B.

Nos últimos seis anos iniciou-se a descoberta de genes relacionados à causa de doenças com o fenótipo de ICV, como os genes de TACI, BAFF-R, CD19 e ICOS[65,66,67,68,69,70,71]).

Os últimos achados são de que mutações no receptor de BAFF (*B-cell Activation Factor of the TNF family*) (BAFF-R) levam a um fenótipo de ICV leve, com um fenótipo distinto de células B: pacientes com deficiência de BAFF-R têm número total de células B diminuída, mas uma expansão das células B transicionais, visto que o sinal de BAFF é um sinal de sobrevivência específico de células B depois do estágio transicional[71].

Os achados aqui apresentados reforçam o fato de que a ICV consiste de um grupo heterogêneo, contudo se faz necessário o refinamento das classificações para ICV apresentadas até o momento, uma vez que todas se baseiam na avaliação de células B de memória, sendo que a avaliação de células T não é realizada.

Nosso trabalho também permite que uma nova janela se abra para o estudo da ICV, onde as deficiências de CD27 podem se tornar uma nova ferramenta para a compreensão de uma deficiência tão pouco esclarecida, o que pode eventualmente contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos, atuando diretamente na molécula em questão.

Além disso, sugerimos também a utilização da fenotipagem das moléculas CD27, IgM e IgD de membrana para a confirmação do diagnóstico de ICV, além da análise da molécula CD154 para exclusão de outras imunodeficiências.

- A avaliação fenotípica dos linfócitos B nos pacientes portadores de ICV acompanhados em nosso Serviço demonstrou:

    - ✓ que nem todos apresentavam alterações nas células B, como previamente descrito na literatura.
    - ✓ Embora eficaz, a classificação de Freiburg apresenta limitações, uma vez que alguns pacientes não se encaixaram nas condições sugeridas
    - ✓ Um possível subgrupo de pacientes ICV com alterações na expressão de BAFF-R na superfície de células B foi identificado no presente trabalho, demonstrando a heterogeneidade da doença.

- A avaliação da expressão da molécula CD27 nos linfócitos T de pacientes com ICV demonstrou que mais de 50% dos pacientes aqui estudados apresentavam redução na expressão da molécula.

- Todos os pacientes apresentavam manifestações clínicas gastrointestinais e respiratórias, contudo somente os pacientes com redução na expressão da molécula CD27 nos linfócitos T apresentavam manifestações autoimunes.

[1] Ammann AJ. Mechanisms of Immunodeficiency. In Stites DP, Terr AL, Parslow TG (eds): Basic and Clinical Immunology, Ed. 8. E Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1994.

[2] Paller AS. Genetic Immunodeficiency Disorders. Clinics in *Dermatology*. 2005; 23(1):68-77.

[3] Boyle JM, Buckley RH. Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States**.** *J Clin Immunol.* 2007; 27(5):497-502.

[4] Bonilla FA, Geha RS. Primary Immunodeficiency Disease. *J. Allergy Clin Immunol.* 2003; 111(2):S571-S581.

[5] Fischer A. Human Primary Immunodeficiency Disease: a perspective. *Nat Immunol*. 2004; 5(1):23-30.

[6] Kumar AS, Gershwin ME. Current perspectives on primary immunodeficiency diseases. *Clin Dev Immunol*. 2006; 13(2-4):223-259.

[7] Rosen FS. Primary Immunodeficiency Disease: Report of an IUIS Scientific Committee, International Union of Immunological Societies. *Clin Exp Immunol*.1999; 118:01 1999;

[8] Cornejo P, Romero A, López S, Guerra A, Gil R, Iglesias L. Cutaneous and hepatic granulomas in a young woman with common variable immunodeficiency. *Br J Dermatol*. 1999; 140(3):546-547.

[9] Paul C, Teillac-Hamel D, Freitag S, Bodemer C, Fischer A, De Prost Y. Lésions Granulomateuses Cutanées Au Cours Des Déficits Immunitaires Congénitaux: Cinq Observations. *Ann Dermatol Venereol.* 1995;122:501-506.

[10] Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common Variable Immunodeficiency: Clinical and Immunological Features of 248 Patients. *Clin Immunol*. 1999; 92(01):34-48.

[11] Cunningham-Rundles C. Common Variable Immunodeficiency. *Cur Allergy Asthma Rep*. 2001;1:421-429.

[12] North ME, Spickett GP, Allsop J, Webster AD, Farrant J. Defective DNA synthesis by T Cells in Acquired "Common-Variable"

Hypogammaglobulinemia on Stimulation with Mitogens. *Clin Exp Immunol*. 1989; 16:19-23.

13 Pastorelli G, Roncarolo MG, Touraine JL, Peronne G, Tovo PA, De Vries Je. Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Common Variable Immunodeficiency (CVI) Produce Levels of Interleukin-4, Interleukin-2 and Interferon-gamma, but Proliferate Normally Upon Activation by Mitogens. *Clin Exp Immunol*. 1989; 78:334-340.

14 Sneller Mc, Strober W. Abnormalities of Lymphokine Gene Expression in Patients with Common Variable Immunodeficiency. *J Immunol*. 1990; 144:3762-3769.

15 Rump JA, Jahreis A, Schlesier M, Dräger R, Melchers I, Peter HH. Possible Role of IL-2 Deficiency for Hypogammaglobulinemia in Patients with Common Variable Immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 1992; 89:204-210.

16 Farrington M, Grosmaire LS, Nonoyama S, Fischer SH, Hollenbaugh D, Ledbetter JA, Noelle RJ, Aruffo A, Ochs HD. CD40 Ligand Expression is Defective in a Subset of Patients with Common Variable Immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:1099-1103.

17 Fischer MB, Ma M, Goerg S, Zhou X, Xia J, Finco O, Han S, Kelsoe G, Howard RG, Rothstein TL, Kremmer E, Rosen FS, Carroll MC. Regulation of the B Cell Response to T-dependent Antigens by Classical Pathway Complement. *J Immunl*. 1996; 157:549-556.

18 Zhang J-G, Morgan L, Spickett GP. L-Selectin in Patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID): A Comparative Study with Normal Individuals. *Clin Exp Immunol*. 1996; 104:275-279.

19 Pozzi N, Gaetaniello L, Martire B, De Mattia D, Balestrieri B, Cosentini E, Schlossman SF, S, Pignata C. Defective Surface Expression of Attractin on T Cells in Patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 2001; 123:99-104.

20 Thon V, Eggenbauer H, Wolf HM, Fischer MB, Litzman J, Lokaj J, Eibl MM. Antigen Presentation by Common Variable Immunodeficiency (CVID) B Cells and Monocytes is Unimpaired. *Clin Exp Immunol*. 1997; 108:1-8.

21 Boncristiano M, Majolini MB, D'elios MM, Pacini S, Valensin S, Ulivieri C, Amedei A, Falini B, Del Prete G, L, Baldari CT. Defective Recruitment and Activation of ZAP-70 in Common Variable

Immunodeficient Patients with T cell Defects. *Eur J Immunol*. 2000; 30:2632-2638.

22 Kondratenko I, Amiot PL, Farrant J. Lack of Specific Antibody Response in Common Variable Immunodeficiency (CVID) Associated with Failure in Production of Antigen-Specific Memory T Cells. *Clin Exp Immunol.* 1997; 108:9-13.

23 Jaffe JS, Eisenstein E, Sneller MC, Strober W. T-Cell Abnormalities in Common Variable Immunodeficiency. *Pediatr res*. 1993; 33(1S):S24-7.

24 Saiki O, Ralph P, Cunningham-Rundles C, Good RA. Three Distinct Stages of B-Cell Defects in Common Varied Immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982; 79:6008-6012.

25 Eisentein EM, Strober W. Evidence for a Generalized Signaling Abnormality in B-Cells from Patients with Common Variable Immunodeficiency. *Ad Expl Med Biol*. 1995; 371B:699-704.

26 Levy I, Gupta N, Le Deist F, Garcia C, Fischer A, Weill JC, Reynaud CA. Defect in IgV Gene Somatic Hypermutation in Common Variable Immunodeficiency Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:13135-13140.

[27] Denz A, Eibel H, Illges H, Kienzle G, Schlesier M, Peter HH. Impaired Upregulation of CD86 in B Cells of "Type A" Common Variable Patients. *Eur J Immunol*. 2000; 30:1069-1077.

[28] Groth C, Drager R, Warnatz K, Wolff-Vorbeck G, Schmidt S, Eibel H, Schlesier M, H. Impaired up-regulation of CD70 and CD86 in naïve (CD27) B cells from Patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 2002; 129:133-139.

[29] Brouet JC, Chedeville A, Fermand JP, Royer B. Study of the B Cell Memory Compartment in Common Variable Immunodeficiency. *Eur J Immunol.* 2000; 30:2516-2520.

[30] Jacqout S, Maçon-Lemaître L, Paris E, Kobata T, Tanaka Y, Morimoto C, Schlossman SF, Tron F. B Cell Co-receptors Regulating T Cell-Dependent Antibody Production in Common Variable Immunodeficiency: CD27 Pathway Defects identify Subsets of Severely Immunocompromised Patients. *Int Immunol*. 2001;13:871-876.

[31] Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Galicier L, Lepelletier Y, Webster D, Lévy Y, Eibl MM, Oksenhendler E, Hermine O, Kaveri SV.

Common Variable Immunodeficiency is Associated with Defective Functions of Dendritic Cells. *Blood*. 2004; 104:2441-2443.

[32] P, Farrant J, North ME, Zhang JG, Morgan L, Webster AD. Common Variable Immunodeficiency: How Many Diseases? *Immunol Today*. 1997; 18:325-328.

[33] Bryant A, C, Toubi E, Webster AD, Farrant J. Classification of patients with Common Variable Immunodeficiency by B Cell Secretion of IgM and IgG in Response to Anti-IgM and Interleukin-2. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990; 56:239-248.

[34] Vorechovský I, Webster AD, Plebani A, Hammarström L. Genetic Linkage of IgA Deficiency to the Major Histocompatibility Complex: Evidence for Allele Segregation Distortion, Parent-of-origin Penetrance Differences, and the role if Anti-IgA Antibodies in Disease Predisposition. *Am J Hum Genet.* 1999; 64:1096-1109.

[35] Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-Van Der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, Debre P, Schmitt C, Oksenhendler E. Common Variable Immunodeficiency Patient Classification Based on Impaired B Cell Memory Differentiation Correlates with Clinical Aspects. *J Clin Immunol*.. 2003; 23(5):385-0.

[36] Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Severe Deficiency of Switched Memory B Cells (CD27+IgM-IgD-) in Subgroups of Patients with Common Variable Immunodeficiency: A new Approach to Classify a heterogeneous disease. *Blood.* 2002; 99: 1544-51.

[37] Arens R, Tesselaar K, Baars PA, van Schijndel GM, Hendriks J, Pals ST, Krimpenfort P, Borst J, van Oers MH, van Lier RA. Constitutive CD27/CD70 interaction Induces Expansion of Effector-type T Cells and Results in IFN-γ Mediated B Cell Depletion*. Immunity*. 2001; 15: 801-12.

[38] Akiba H, Nakano H, Nishinaka S, Shindo M, Kobata T, Atsuta M, Morimoto C, Ware CF, Wallach D, *et al*. CD27, a Member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Activates NF-kB and Stress-Activated protein kinase/c-jun N-terminal Kinase Via TRAF2, TRAF5, and NF-kB-inducing Kinase. *J Biol Chem*. 1998; 273:13353-58.

[39] Nolte MA, van Olffen RW, van Gisbergen KP, van Lier RA.Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. *Immunol Rev*. 2009; 229 (1):216-31.

[40] Prasad KV, AO Z, Yoon Y, Wu MX, Rizk M, Jacquot S, Schlossman SF. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(12):6346-51.

[41] De Jong R, Loenem WA, Brouwer M, Van Emmerik L, De Vries EF, Borst J, Lier RA. Regulation of Expression of CD27, a T cell-specific Member of a Novel Family of Membrane Receptors. *J immunol*. 1991; 146:2488-2494.

[42] Hitzen RQ, Lens SM, Beckmann MP, Goodwin RG, Lych D, Van Lier RA. Characterization of the human CD27 Ligand, a Novel Member of the TNF gene Family. *J Immunol*. 1994; 152: 1762-73.

[43] Lens SM, De Jong R, Hooibrink B, Koopman G, Pals ST, Van Oers MH, Van Liers RA. Phenotype and Function of Human B cells Expressing CD70 (CD27 ligand), *Eur J Immunol.* 1996; 26: 2964-71.

[44] Tesselaar K, Gravestein LA, Van Schijndel GM, Borst, J, Van Lier RA. Characterization of Murine CD70, the Ligand of the TNF Receptor Family Member CD27*. J Immunol.* 197; 159:4959-65.

[45] Maurer D, Holter W, Majdic O, Fischer GF, Knapp W. CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1990; 20(12):2679-84.

[46] Tarlinton D. Antigen presentation by memory B cells: the sting is in the tail. *Science*. 1997; 276 (5311):374-5.

[47] Sugita K, Torimoto Y, Nojima Y, Daley JF, Schlossman SF, Morimoto C. The 1A4 molecule (CD27) is involved in T cell activation. *J Immunol.* 1991; 147(5):1477-83.

[48] Agematsu K, Kobata T, Sugita K, Freeman GJ, Beckmann MP, Schlossman SF, Morimoto C. Role of CD27 in T cell immune response. Analysis by recombinant soluble CD27. *J Immunol*. 1994; 153(4):1421-9.

[49] Kobata T, Jacquot S, Kozlowski S, Agematsu K, Schlossman SF, Morimoto C. CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(24):11249-53.

50 Morimoto S, Kanno Y, Tanaka Y, Tokano Y, Hashimoto H, Jacquot S, Morimoto C, Schlossman SF, Yagita H, Okumura K, Kobata T. CD134L engagement enhances human B cell Ig production: CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L interactions coordinately regulate T cell-dependent B cell responses. *J Immunol.* 2000;164(8):4097-104.

51 Raman VS, Akondy RS, Rath S, Bal V, George A. Ligation of CD27 on B cells in vivo during primary immunization enhances commitment to memory B cell responses. *J Immunol.* 2003;171(11):5876-81.

52 Jacquot S, Kobata T, Iwata S, Morimoto C, Schlossman SF. CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling. *J Immunol*. 1997; 159(6):2652-7.

53 Hodgkin PD, Lee JH, Lyons AB. B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *J Exp Med*. 1996;184(1):277-81.

54 Arens R, Nolte MA, Tesselaar K, Heemskerk B, Reedquist KA, Van Lier RA, Van Oers MH. Signaling through CD70 regulates B cell activation and IgG production. *J Immunol*. 2004; 173(6):3901-8.

[55] Turner CA Jr, Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell*. 1994;77(2):297-306.

[56] Nagumo H, Agematsu K, Shinozaki K, Hokibara S, Ito S, Takamoto M, Nikaido T, Yasui K, Uehara Y, Yachie A, Komiyama A. CD27/CD70 interaction augments IgE secretion by promoting the differentiation of memory B cells into plasma cells. *J Immunol.* 1998;161(12):6496-502.

[57] Kobata T, Agematsu K, Kameoka J, Schlossman SF, Morimoto C. CD27 is a signal-transducing molecule involved in CD45RA+ naive T cell costimulation. *J Immunol*. 1994; 153(12): 5422-32.

[58] Fischer MB, Hauber I, Eggenbauer H, Thon V, Vogel E, Schaffer E, Lokaj J, Litzman J, Wolf HM, Mannhalter JW. Defect in the early phase of T-cell receptor-mediated T-cell activation in patients with common variable immunodeficiency*. Blood.* 1994; 84:4234-41

[59] Quartier P, Bustamante J, Sanal O, Plebani A, Debré M, Deville A, Litzman J, Levy J, Fermand JP, Lane P, Horneff G, Aksu G, Yalçin I, Davies G, Tezcan I, Ersoy F, Catalan N, Imai K, Fischer A, Durandy A. Clinical, immunologic and genetic analysis of 29 patients with autosomal recessive hyper-IgM syndrome due to Activation-Induced Cytidine Deaminase deficiency. *Clin Immunol.* 2004; 110(1):22-9.

[60] Lougaris V, Badolato R, Ferrari S, Plebani A. Hyper immunoglobulin M syndrome due to CD40 deficiency: clinical, molecular, and immunological features. *Immunol Rev.* 2005; 203:48-66.

[61] Durandy A, Revy P, Imai K, Fischer A. Hyper-immunoglobulin M syndromes caused by intrinsic B-lymphocyte defects. *Immunol Rev.* 2005; 203:67-79

[62] Borst J, Hendriks J, Xiao Y. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17:275-81.

[63] Hintzen RQ, Lens SM, Lammers K, Kuiper H, Beckmann MP, Van Lier RA. Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation*. J Immunol.* 1995; 154(6): 2612-23.

[64] Jacquot, S. CD27/CD70 interactions regulate T dependent B cell differentiation. *Immunol Res*. 2000; 21(1): 23-30.

[65] Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczek RA. ICOS is an inducible T-cell costimulator, structurally and functionally related to CD28. *Nature.* 1999; 397: 263– 66.

[66] Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA, Gosselin M, Owen LR, Rudd CE,

Gutierrez-Ramos JC. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses*. Immunity*. 2000; 13:95– 105.

67 Ihara K, Ahmed S, Nakao , Kinukawa N, Kuromaru R, Matsuura N, Iwata I, Nagafuchi S, Kohno H, Miyako K, Hara T. Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in the Japanese population. *Immunogenetics.* 2001; 53:447–54.

68 Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, Heuck C, Rauch A, Buchner K, Ludewig B, Ochs HD, Mages HW, Kroczek RA. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30:3707– 17.

69 Van Zelm MC, Reisli I, Van Der Burg M, Castaño D, Van Noesel CJ, Van Tol MJ, Woellner C, Grimbacher B, Patiño PJ, Van Dongen JJ, Franco JL. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med.* 2006; 354 (18): 1901-12.

[70] Rachid R, Castigli E, Geha RS, Bonilla FA. TACI mutation in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2006; 6(5):357-62.

[71] Losi CG, Salzer U, Gatta R, Lougaris V, Cattaneo G, Meini A, Soresina A, Grimbacher B, Plebani A. Mutational analysis of human BLyS in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2006; 26(4):396-9.