ANA KAROLINA BARRETO BERSELLI MARINHO

**Avaliação do perfil de subpopulações de linfócitos T de
memória em pacientes com ICV submetidos à vacinação
contra influenza**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Dra. Cristina Maria Kokron

São Paulo

2019

ANA KAROLINA BARRETO BERSELLI MARINHO

**Avaliação do perfil de subpopulações de linfócitos T de
memória em pacientes com ICV submetidos à vacinação
contra influenza**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências
Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Cristina Maria Kokron

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Marinho, Ana Karolina Barreto Berselli

Avaliação do perfil de subpopulações de linfócitos
T de memória em pacientes com imunodeficiência comum
variável submetidos à vacinação contra influenza /
Ana Karolina Barreto Berselli Marinho. -- São
Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Cristina Maria Kokron.

Descritores: 1.Imunodeficiência de variável
comum 2.Vacinas 3.Influenza humana 4.Vírus da
influenza A subtipo H1N1 5.Vacinação 6.Produção de
anticorpos 7.Linfócitos T

USP/FM/DBD-067/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Agradecimentos

Epígrafe

Normalização adotada

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

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

1. Introdução	1
Imunodeficiência Comum Variável.....	1
Alterações Imunológicas na Imunodeficiência Comum variável.....	3
Alterações genéticas na Imunodeficiência Comum Variável.....	10
Linfócitos T de Memória e ICV	12
Influenza e Vacinação	17
Imunização em pacientes com ICV	23
2. Objetivos.....	28
Geral	28
Específicos.....	28
3. Materiais e métodos.....	29
Casuística.....	29
Desenho Experimental.....	31
Vacinação e coleta das amostras de Sangue	32
Processamento do soro autólogo	31
Obtenção de células mononucleares de sangue periférico	32
Cultura de Linfócitos	34
Imunofenotipagem para identificação das subpopulações de linfócitos T	36
Determinação da dosagem sérica de Imunoglobulinas.....	41
Análise Estatística.....	42
4. Resultados.....	43
Casuística.....	43
Segurança.....	44
Dosagem sérica de Imunoglobulinas	45

Subpopulações de Linfócitos T <i>naive</i> e de memória.....	45
Análise funcional dos linfócitos T CD4+ e CD8+ antígeno-específicos	72
5. Discussão.....	74
6. Conclusões.....	85
7. Referências Bibliográficas.....	86
Anexos	1
Anexo 1: TCLE do presente estudo.....	1
Anexo 2: Aprovação ética do estudo.....	4
Anexo 3: Tabela de valores de referência de linfócitos/mm ³ em população brasileira saudável	5
Anexo 4: Características laboratoriais dos pacientes do estudo	1
Anexo 5: Pré Vacinação CVID	2
Anexo 6: Pré vacinação CTRL.....	3
Anexo 7: Pós 1 mês da vacinação CVID.....	4
Anexo 8: Pós 1 mês de vacinação CTRL	5
Anexo 9: Pós 3 meses de vacinação CVID	6
Anexo 10: Pós 3 meses de vacinação CTRL	7

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

ACD - Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose

APC - Células apresentadoras de antígenos

BAFF - *B-cell activating factor*

BAFFR - *B-cell activating factor receptor*

BCL-6 - *B-cell lymphoma 6 protein*

BCR - Receptor de linfócito B

CCR7- Receptor de quimiocina tipo 7

CD - *Cluster of differentiation* (designação de grupos)

CD3 - Molécula marcadora de células T

CD4 - Molécula marcadora de células T auxiliador

CD8 - Molécula marcadora de células T citotóxica

CD14 - Molécula marcadora de monócitos

CD19 - Molécula marcadora de células B

CD20 - Molécula marcadora de células B

CD21 - Molécula marcadora de subpopulação de células B

CD24 - Molécula marcadora de subpopulação de células B

CD27 - Molécula marcadora de Linfócito B de memória

CD38 - Molécula marcadora de subpopulação de célula B e ativação celular

CD40L - Ligante do CD40

CVID - *Common variable immunodeficiency*

CMSP - Células mononucleares do sangue periférico

CMV - Citomegalovírus

CTLA-4 - Proteína 4 associada a Linfócito T Citotóxico

CXCR5 - Receptor de quimiocina do motivo C-X-C tipo 5

DC - Células dendríticas

DMSO – Dimetilsufóxido

ELISA- ensaio de imunoabsorção enzimática

LB - Linfócito B

LBFH - Linfócito B helper folicular

LT - Linfócito T

LTFH - Linfócito T helper folicular

TFHreg - Linfócito T helper folicular regulador

FMUSP- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GC - Centro germinativo

GI - Gastrointestinal

HC - Hospital das Clínicas

HNL - hiperplasia nodular linfoide

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

ICOS - Co-Estimulador Indutível

ICV - Imunodeficiência Comum Variável

IDPs – Imunodeficiências primárias

IgA - Imunoglobulina A

IgAD - Deficiência seletiva de Imunoglobulina A

IgD - Imunoglobulina D

IgG - Imunoglobulina G

IGIV - Imunoglobulina Intravenosa

IGSC - Imunoglobulina Subcutânea

IgM - Imunoglobulina M

Igμ - imunoglobulina μ

Igα - imunoglobulina alfa

Igβ - imunoglobulina beta

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-17 - Interleucina 17

IL-21 - Interleucina 21

IL-21R- Receptor de Interleucina 21

IFN-γ - Interferon Gama

iNKT - células NK T invariáveis

ITIM - *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*

ml - mililitros

MO - Medula óssea

MZB - Células B de zona marginal

NFKB1- Fator-Kappa nuclear humano B1

NFKB2- Fator-Kappa nuclear humano B2

ng- nanograma

PBL - Plasmoblastos

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Proteína C Reativa

PD-1 - Marcador de Morte Programada-1

PD-L1 - Ligante 1 do Marcador de Morte Programada -1

PFA – Paraformaldeído

PIK3CD – Fosfatidilinositol -4,5-Bifosfato 3- Quinase catalítica Delta, gene codificante

PLCG2- *Phospholipase C Gamma 2* proteína codificante

PRÓ-B- Células B progenitoras

PRÉ-B- Células precursoras de células B

TACI - *Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor*

TCM – Células de memória central

TEM – Células de memória efetora

TEMRA- Células de memória efetora altamente diferenciadas

TCLE - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TNF – Fator de necrose tumoral

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

TGI – Trato gastrointestinal

TLR - *Toll-Like Receptor*

TLR9 - Toll-Like Receptor 9

Treg - Linfócito T regulador

TNFSF12- Membro da superfamília de ligante de fator de necrose tumoral

TNFRS13B- Membro da superfamília de receptor de fator de necrose tumoral

TNFRS13C- Membro da superfamília de receptor de fator de necrose tumoral

USP - Universidade de São Paulo

XLA - Agamaglobulinemia Ligada ao Cromossomo X

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MODELO DE DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T EM LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA.....	13
FIGURA 2. AS FUNÇÕES DAS CÉLULAS T DE MEMÓRIA NA INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA.....	22
FIGURA 3. DESENHO EXPERIMENTAL	30
FIGURA 4. DEMONSTRAÇÃO DA PLACA PARA REALIZAÇÃO DA CULTURA DE LINFÓCITOS DE 6 DIAS EM DUPLICATA COM OS SEGUINTE ESTÍMULOS	36
FIGURA 5. ESTRATÉGIA DE ANÁLISE PARA CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T	40
FIGURA 6. ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DOS SUBTIPOS DE LINFÓCITOS T EM INDIVÍDUO SAUDÁVEL	41
FIGURA 7. FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4⁺ NAIVE, TCM, TEM E TEMRA PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA NA CONDIÇÃO BASAL (NÃO ESTIMULADA).....	47
FIGURA 8. FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4⁺ NAIVE, TCM, TEM E TEMRA PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA APÓS CULTURA DE 6 DIAS COM O LISADO VIRAL DE INFLUENZA.	48
FIGURA 9. FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4⁺ NAIVE, TCM, TEM E TEMRA PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA APÓS CULTURA DE 6 DIAS COM O ESTÍMULO PEPTÍDEO HEMAGLUTININA.	49
FIGURA 10. FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD8⁺ NAIVE, TCM, TEM E TEMRA PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA NA CONDIÇÃO BASAL (NÃO ESTIMULADA).....	51
FIGURA 11. FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD8⁺ NAIVE, TCM, TEM E TEMRA PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA APÓS ESTÍMULO COM LISADO VIRAL DE INFLUENZA (CULTURA DE 6 DIAS).	53
FIGURA 12. FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD8⁺ NAIVE, TCM, TEM E TEMRA PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA APÓS CULTURA COM O PEPTÍDEO HEMAGLUTININA.	54
FIGURA 13. A FREQUÊNCIA DA SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD4⁺ NAIVE PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA.	57

FIGURA 14. A FREQUÊNCIA DA SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD4⁺ TCM PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA.....	58
FIGURA 15. A FREQUÊNCIA DA SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD4⁺ TEM PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA.....	60
FIGURA 16. A FREQUÊNCIA DA SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD4⁺ TEMRA PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA.....	61
FIGURA 17. A FREQUÊNCIA DA SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD8⁺ NAIVE PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA.....	63
FIGURA 18. A FREQUÊNCIA DA SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD8⁺ TCM PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA.....	64
FIGURA 19. A FREQUÊNCIA DA SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD8⁺ TCM PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA.....	66
FIGURA 20. A FREQUÊNCIA DA SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD8⁺ TEMRA PRÉ E PÓS VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA.....	68
FIGURA 21. REPRESENTAÇÃO DA CINÉTICA DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4⁺ EM PACIENTES ICV E CONTROLES SAUDÁVEIS.	70
FIGURA 22. REPRESENTAÇÃO DA CINÉTICA DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD8⁺ EM PACIENTES ICV E CONTROLES SAUDÁVEIS.	71
FIGURA 23. A, B, C E D. FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E CD8⁺ PRODUTORES DE CITOCINAS IL-2⁺ E IFN-γ⁺ EM PACIENTES ICV E CONTROLES SAUDÁVEIS. ...	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ANORMALIDADES IMUNOLÓGICAS DESCRITAS EM PACIENTES COM ICV....	9
TABELA 2. SELETAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS DESCRITAS NA ICV	11
TABELA 3. SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS EM PACIENTES COM ICV	16
TABELA 4. ANTICORPOS PARA MARCAÇÃO PAINEL DE MARCAÇÃO DE SUPERFÍCIE CELULAR E CITOCINAS INTRACITOPLASMÁTICAS	37
TABELA 5. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES ICV	44
TABELA 6. DOSAGENS DE IMUNOGLOBULINAS E LINFÓCITOS T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ ..	45

Resumo

Marinho AKBB. *Avaliação do perfil de subpopulações de linfócitos T de memória dos pacientes com imunodeficiência comum variável submetidos à vacinação contra influenza* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: O vírus da influenza causa doença generalizada e pode ser fatal. A vacinação diminuiu a morbimortalidade. A Imunodeficiência Comum Variável (ICV) é uma imunodeficiência primária caracterizada por defeitos na maturação e diferenciação dos linfócitos B (LB) resultando em hipogamaglobulinemia, ausência de resposta aos antígenos específicos e infecções de repetição. A maior susceptibilidade a infecções reforça o benefício da vacinação em pacientes com imunodeficiências. O questionamento sobre a vacinação neste grupo de indivíduos se deve a eficácia, uma vez que na ICV as medidas sorológicas não se mostraram úteis como correlatos de proteção. Estudos recentes do nosso grupo observaram a melhora clínica em relação ao número de infecções de vias aéreas em pacientes com ICV após a vacinação contra influenza, porém sem produção de anticorpos específicos em níveis protetores. **Objetivos:** Diante das observações apontadas, este trabalho tem o objetivo de investigar o envolvimento das subpopulações de linfócitos T *naive* e de memória, CD4⁺ e CD8⁺, na proteção induzida pela vacina influenza em pacientes com ICV. **Casuística e Métodos:** Foram selecionados 16 pacientes ICV e 16 controles saudáveis. Amostras de sangue foram colhidas antes e após a administração das vacinas contra A H1N1/H3N2 e B (cepas: A/Califórnia/7/2009, A/Victoria/361/2011, B/Brisbane/60/2008). A resposta específica de células T de memória foi avaliada nas condições sem estímulo pré e pós-vacina nos períodos de 1 mês, 3 meses e 6 meses, além da realização de culturas de linfócitos com a hemaglutinina de *influenza* (HA) e lisado viral, nos mesmos tempos. As subpopulações de linfócitos T *naive* e de memória foram avaliados a partir da marcação CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ e CCR7⁺ detectados por citometria de fluxo. Esta marcação nos permitiu identificar quatro subtipos de linfócitos: LT *naive* (CD45⁺RA⁺CCR7⁺); LT de memória efetora (TEM, CD45⁺RA⁻CCR7⁻); LT de memória central (TCM, CD45⁺RA⁻CCR7⁺) e LT de memória terminalmente diferenciado (TEMRA, CD45⁺RA⁺CCR7⁻). A avaliação funcional dos linfócitos T após estímulo foi realizada através da marcação intracelular de IFN- γ e IL-2. **Resultados:** Este estudo demonstrou uma redução na frequência de linfócitos T CD4⁺, linfócitos CD4⁺ + TCM e CD8⁺ + TCM em pacientes com ICV e controles saudáveis após a vacina contra influenza. Observamos uma frequência aumentada de linfócitos TEM CD4⁺ + e CD8⁺ + em controles saudáveis e aumento da frequência de linfócitos CD8⁺ + TEMRA em pacientes com ICV, bem como em controles saudáveis. A vacina contra influenza foi capaz de induzir a proliferação de subpopulações de linfócitos T que pode ser caracterizada pela hipótese de diferenciação linear de células sugerida por alguns

autores (*naive* - TCM - TEM / TEMRA). Os peptídeos de HA e o lisado viral foram capazes de estimular subpopulações de linfócitos T de memória específica em pacientes com ICV e controles saudáveis, dependendo do período e das condições dos estímulos. Os resultados mostraram que nos linfócitos T CD4⁺, a vacinação induziu uma resposta predominantemente IL-2⁺, enquanto no compartimento T CD8⁺ observamos uma resposta polifuncional com a produção de IL-2⁺ e IFN- γ ⁺. **Conclusões:** Este é o primeiro estudo a avaliar as subpopulações de linfócitos T de memória em pacientes com DCV vacinados contra Influenza A (H3N2) / B e Influenza A H1N1. Nossos resultados mostraram mudanças no padrão de distribuição das subpopulações de linfócitos T *naive*, TCM, TEM e TEMRA e na produção de IL-2⁺ e IFN- γ ⁺ após a vacinação contra influenza, dados que sugerem e possivelmente justificam a resposta clínica e celular protetora observada em pacientes com ICV.

Descritores: imunodeficiência de variável comum; vacinas; influenza humana; vírus da influenza A subtipo H1N1; vacinação; produção de anticorpos; linfócitos

Abstract

MarinhoAKBB. *Evaluation of T cell subpopulations' profile common variable immunodeficiency patients submitted to influenza vaccination* [thesis]. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Introduction: Influenza viruses infect humans causing widespread, sometimes fatal, disease. Common Variable Immunodeficiency (CVID) is a primary immunodeficiency characterized by defects in B lymphocyte maturation and differentiation resulting in hypogammaglobulinemia, failure to produce specific antigens and recurrent infections. The increased susceptibility to infections reinforces the benefit of vaccination in patients with immunodeficiencies. The major discussion regarding vaccination of CVID patients is the efficacy once these patients do not produce antibodies which are used as correlates of protection. Recent studies from our group showed reduced respiratory infection rates in influenza vaccinated CVID patients demonstrating a clinical response however with no production of specific antibodies in protective levels. **Objective:** Considering the above observations, this study has the objective of investigating the involvement of naïve and memory T lymphocytes subpopulations, CD4⁺ and CD8⁺, in the protection of influenza vaccination CVID in patients. **Patients and Methods:** Sixteen CVID patients and 16 healthy controls were selected for this study. Blood samples collected before and after administration of the H1N1 / H3N2 and B vaccines (strains: A / California / 7/2009, A / Victoria / 361/2011 B / Brisbane / 60/2008). Specific memory T cell response was evaluated pre and post vaccination with influenza (1 month, 3 months and 6 months). Besides characterization of lymphocyte subpopulations in PBMCs, cell culture with an influenza hemagglutinin (HA) and viral lysate were also realized. T lymphocytes subpopulations characterized by CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ and CCR7⁺ were identified by flow cytometry. These antibodies permitted to identify four lymphocyte subtypes: naïve T cells (CD45RA⁺CCR7⁺); effective memory T cells (TEM, CD45RA⁺CCR7⁻); Central memory (TCM, CD45RA⁻CCR7⁺) and terminally differentiated memory T (TEMRA, CD45RA⁺CCR7⁻). Functional evaluation of lymphocytes was performed through intracellular labelling of IFN- γ and IL-2. **Results:** This study showed the reductions of naïve CD4⁺ T cells, CD4⁺TCM and CD8⁺TCM cells in CVID patients and healthy controls after influenza vaccine. We observed an increased frequency of CD4⁺TEM and CD8⁺TEM lymphocytes in healthy controls, and increased frequency of CD8⁺TEMRA lymphocytes in CVID patients and healthy controls. Influenza vaccine was able to induce the proliferation of T lymphocyte subpopulations that can characterize the linear cell differentiation suggested by the authors (Naïve - TCM - TEM / TEMRA). Regarding cytokine production, there was an increase in IL-2⁺ production by CD4⁺T and CD8⁺T cells and an increase of IFN- γ ⁺ by CD8⁺T cells in CVID and control patients, indicating a polyfunctional cytokine response. **Conclusions:** To our knowledge, this is the first study that evaluated memory T lymphocyte subpopulations of CVID patients vaccinated against Influenza A (H3N2) / B and Influenza A H1N1. We show changes in the pattern of T lymphocyte subpopulations: naïve, TCM, TEM and TEMRA and IL-2 and IFN- γ production after influenza vaccination that may suggest and possibly explain the protective cellular and clinical response observed in CVID patients.

Descriptors: common variable immunodeficiency; vaccines; influenza, human; influenza A virus, H1N1 subtype; vaccination; antibody production; T-lymphocytes.

1. Introdução

Imunodeficiência Comum Variável

A Imunodeficiência Comum Variável (ICV) faz parte de um grupo heterogêneo de imunodeficiências primárias na qual os indivíduos apresentam defeitos na maturação e diferenciação dos linfócitos B (LB) resultando em redução de dois ou mais isotipos de imunoglobulinas (redução de IgG, IgA e/ou IgM, < 2 desvios padrões para a média de idade), ausência de resposta aos antígenos específicos e maior susceptibilidade a infecções bacterianas. As diversas alterações imunológicas observadas na ICV têm um papel importante nas condições clínicas associadas, como autoimunidade, linfoproliferação benigna e neoplasias (1,2).

A ICV acomete indivíduos de qualquer idade, porém há maior incidência nas faixas etárias de 6 a 10 anos e 18 a 35 anos de idade, em igual proporção em relação aos gêneros masculino e feminino (3). Diversos estudos demonstraram que a ICV é a principal imunodeficiência primária com repercussão clínica e acomete cerca de 1 para cada 25.000 a 50.000 nascidos vivos (4–6). Por se tratar de doença rara, o diagnóstico, tratamento e acompanhamento destes pacientes acarretam custos elevados para o sistema de saúde e grande impacto socioeconômico (1,7).

As manifestações clínicas mais frequentes na ICV são: infecções bacterianas recorrentes, principalmente do trato respiratório dentre as quais as sinusites, otites, amigdalites e pneumonias, causadas principalmente por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (2,8). Alguns pacientes podem apresentar infecções oportunistas envolvendo microorganismos pouco comuns como: *Mycoplasma* e fungos (*Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jirovecii*) e infecções por protozoários, *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium* spp (3). Infecções virais são comuns e herpes

simples, *Epstein-Barr* e Citomegalovírus e mais recentemente o norovírus, estão entre os reportados (3,9).

Diarreia crônica de causa não definida, doença celíaca *like*, gastrite atrófica, doença intestinal inflamatória e câncer de intestino são usualmente encontrados nos pacientes com ICV. A diarreia crônica pode ser decorrente de infecções por microorganismos como *Giardia lamblia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*, além do *norovirus*, e em alguns casos pode levar à síndrome de má-absorção (10).

Estudos apontam que cerca de 20 a 50% dos pacientes com ICV desenvolvem doenças autoimunes, incluindo anemia hemolítica, púrpura trombocitopênica, hepatite autoimune, tireoidite, entre outras (11–13). Cunningham-Rundles observou em sua coorte cerca de 25% dos pacientes com ICV e autoimunidade, enquanto Kokron e col. observaram uma prevalência de 15% de autoimunidade em pacientes com ICV (8,11). Alguns autores observaram a presença de citopenias autoimunes variando entre 4% e 20% dos pacientes com ICV (14).

Muitos estudos reportam maior incidência de neoplasias nos pacientes com ICV. A incidência de malignidade varia entre 1,5 a 20,7% mais frequentemente durante a quarta e sexta décadas de vida. Os linfomas não-Hodgkin e tumores gástricos são as neoplasias mais descritas. Alguns mecanismos fisiopatológicos contribuem para maior susceptibilidade a neoplasias como alterações genéticas, desregulação imunológica, comprometimento da eliminação de vírus oncogênicos (exemplo: *Helicobacter pylori* associado ao câncer gástrico) e infecções bacterianas de repetição (15,16).

Além dos achados clínicos, os pacientes com ICV apresentam características peculiares em diversos órgãos, como granulomas semelhantes à sarcoidose acometendo pulmões e pele, hiperplasia nodular linfoide de intestino, atrofia de vilos intestinais

(semelhantes à doença celíaca), hiperplasia nodular regenerativa de fígado e pneumonite linfocítica intersticial (10,17).

O objetivo do tratamento da ICV é reduzir a morbimortalidade e o número de infecções. O tratamento baseia-se na reposição de imunoglobulina humana endovenosa (IGIV) ou subcutânea (IGSC) na dose de 400 a 600 mg/Kg/mês. Por se tratar de doença rara, o diagnóstico muitas vezes é dado em estágios avançados em que as complicações já fazem parte do quadro clínico. As bronquiectasias são complicações encontradas frequentemente devido às infecções pulmonares recorrentes. O tratamento e acompanhamento destes pacientes é multiprofissional a despeito de todos os fenótipos clínicos e complicações descritas. Como adjuvante devem-se considerar antibioticoterapia profilática em alguns casos (18,19).

Mais recentemente, Bonilla e col., propõem enquadrar os pacientes com ICV em dois fenótipos distintos: aqueles que apresentam apenas infecções e aqueles que, além das infecções, podem desenvolver outras comorbidades (2). Segundo Resnick e col., o risco de morte é 11 vezes maior quando há uma ou mais complicações não infecciosas, comparado à presença de complicações apenas infecciosas, sendo linfoma, má absorção intestinal, doenças hepáticas, gastrointestinais e pulmonares crônicas com prejuízo da função pulmonar as condições mais associadas à mortalidade (7).

Alterações Imunológicas na Imunodeficiência Comum Variável

A heterogeneidade clínica reflete as múltiplas alterações imunológicas já observadas em pacientes com ICV e que resultam na hipogamaglobulinemia. A ICV é classificada em dois subgrupos principais: um com disfunção predominantemente de anticorpos e outro com disfunção celular associada (6,20).

Em relação aos linfócitos B, a maioria dos pacientes com ICV possuem número normal ou pouco reduzido, porém estas células têm um fenótipo característico de células B imaturas e não são capazes de se diferenciar em células efetoras produtoras de anticorpos e de memória, fenômeno associado a defeito da cascata de transdução de sinal intracelular via fosforilação de proteínas tirosinadas (21,22).

Em 2008, Wehr e col., realizaram um estudo com 303 pacientes com ICV a fim de estabelecer um consenso entre as duas classificações existentes com base na fenotipagem de células B através da citometria de fluxo (classificação de Freiburg e Paris), propondo a classificação EUROclass, sendo as células B caracterizadas pela expressão de CD19, IgD/IgM, CD27, CD21 e CD38, onde os pacientes com mais de 1% de células B circulantes (B^+ , cerca de 90% dos pacientes) foram diferenciados daqueles com menos de 1% de células B circulantes (B^- , menos de 10% dos pacientes) (23).

As células B circulantes foram divididas em até seis subpopulações diferentes para análise e a distribuição dessas subpopulações reflete a diferenciação das células B antígeno-dependente e antígeno-independente, sendo possível diferenciar células B *naive* ($IgM^+IgD^+CD27^-$) de células B de zona marginal (MZB - $IgM^+IgD^+CD27^+$) e de células B de memória com troca de isotipo (IgD^-CD27^+), células B transitórias ($CD38^{hi}IgM^{hi}$) de células B ativadas ($CD21^{low}CD38^{low}$) e de plasmoblastos com troca de isotipo ($CD38^{+++}IgM^-$) (23).

O ensaio da EUROclass confirmou as associações clínicas de esplenomegalia e doença granulomatosa com a redução de células B de memória e expansão de células B $CD21^{low}$ e ainda revelou, pela primeira vez, a expansão de células B transitórias em pacientes com linfadenopatia (24,25). Pedreschi e col., em 2011, também observaram redução das células de memória comutadas, entretanto, não observou alteração de frequência das MZBs (26). Ainda neste mesmo estudo, observou a redução do número

de plasmoblastos, mas sem correlação com a presença de autoimunidade, e também constatou um aumento da população de células CD21^{low} em pacientes com ICV, mas apenas no sexo feminino (26).

Vários estudos têm demonstrado as alterações imunológicas no compartimento de célula T em pacientes com ICV. O fenótipo clínico observado em alguns pacientes está relacionado ao repertório e função dessas células. Inúmeros pacientes apresentam linfopenia relativa e absoluta de células T CD4⁺, com número normal ou aumentado de células T CD8⁺ o que leva à redução da relação CD4⁺/CD8⁺ (24). Kokron e col., avaliaram características clínicas e laboratoriais de 71 pacientes com ICV e observaram que 56% (40/71) apresentam inversão da relação CD4/CD8 (<1,0) (8). Em pacientes com número aumentado de células CD8⁺, a infecção crônica por citomegalovírus (CMV) tem sido proposta por desempenhar um papel na patogênese da doença inflamatória, como granulomas e enteropatia (27).

Publicações recentes têm sugerido que indivíduos com quadro clínico sugestivo de ICV e níveis muito reduzidos de linfócitos de T (contagem de linfócitos T < 200x10⁶ células/ L) sejam caracterizados como Imunodeficiência Combinada Tardia (*Late Onset Combined Immune Deficiency* - LOCID). Este grupo de pacientes pode ter uma evolução clínica mais desfavorável quando comparado aos ICV sem linfopenia expressiva e deve ser considerada como um grupo distinto que necessita de cuidados específicos (28). Os mecanismos envolvidos no LOCID não são claros, embora uma variedade de defeitos na expressão de moléculas de superfície, atividade enzimática intracelular, falha na expressão de ligantes de superfície após ativação *in vitro* e aumento espontâneo da apoptose tenham sido descritos.

Células T ativadas expressam a molécula CD40L que interage com CD40, expresso na superfície das células B. A interação CD40L/CD40 é capaz de promover a

ativação de células B, troca de isotipo de imunoglobulinas e surgimento de centros germinativos em órgãos linfoides secundários (29). Em alguns pacientes foi observada menor expressão de mRNA para CD40L, e esse defeito esteve associado à deficiência na síntese de várias citocinas, enquanto que em outros houve diminuição seletiva da síntese de IL-2 (30).

Paquin-Proulx e col., afirmam a hipótese de que os defeitos da resposta imune humoral nos pacientes com ICV podem resultar em alterações significativas nas células T. O estudo avaliou células T CD8⁺, T CD4⁺ e iNKT (células NK T invariantes) em pacientes com ICV antes e 6 -12 meses após o início da terapia com imunoglobulina intravenosa (IVIg). Pacientes com ICV antes do início do tratamento com IVIg exibiram redução das células T CD4⁺ e níveis de células dendríticas mielóides (mDC), bem como níveis elevados de marcadores de ativação imune em células T CD8⁺, células T CD4⁺ e iNKT. A expressão de receptores co-estimuladores CD80 e CD83 foi elevada em mDCs e correlacionada com a ativação de células T. Os níveis de ambas as células reguladoras FoxP3⁺ T (Treg) e células iNKT foram baixos, enquanto o CD14 solúvel (sCD14), indicativo da ativação dos monócitos, foi elevado. Interessantemente, o tratamento com IVIg restaurou parcialmente os compartimentos de células T CD4⁺ e mDC, reduziu os níveis de ativação de células T CD8⁺ e mDC. Os autores demonstraram a importância da reposição de IVIg em auxiliar no controle da desregulação imune celular (31).

Dados recentes indicam que pacientes com ICV apresentam baixa frequência de células NK e NKT, resultando em falhas que envolvem o sistema imune humoral e inato resultando em maior suscetibilidade a infecções oportunistas (32,33).

O subtipo de linfócitos T CD4⁺, Th17, produtores de IL-17 tem um papel importante na resposta imune contra bactérias e fungos e, recentemente tem sido associada a algumas doenças autoimunes como artrite reumatoide e psoríase. Barbosa e

col. descreveram menor frequência de linfócitos Th17 em pacientes com ICV sugerindo um maior comprometimento na diferenciação de LB e manutenção de LT foliculares nestes pacientes (34). No entanto, Alcala-Neves e col., não observaram diferenças entre as frequências de células T $CD4^{+}IL-17^{+}$ e produção de citocinas Th17 ao comparar pacientes com ICV com e sem autoimunidade, logo sem mudanças no perfil de resposta Th17 no grupo estudado (35).

Os linfócitos T reguladores (Treg) são linfócitos $TCD4^{+}$ com importante função na manutenção da tolerância periférica auxiliando na homeostasia do sistema imune (36). Em 2009, Genre e col. mostraram um comprometimento na expressão e diminuição na frequência de FOXP3 em células T ($CD4^{+}CD25^{+}FOXP3^{+}$) em pacientes com ICV que apresentavam autoimunidade (12).

Barsotti e col. avaliaram a frequência de células B reguladoras (Breg ou B10) em pacientes com ICV. As células B10 desempenham um papel importante no desenvolvimento de células Treg e no controle da ativação de células T e autoimunidade. Os autores observaram que os pacientes com ICV apresentaram uma diminuição da frequência de células B $CD24^{hi}CD38^{hi}$ produtoras de IL-10 em diferentes condições de cultura de células e diminuição da frequência de células $CD24^{hi}CD27^{+}$ produtoras de IL-10 estimuladas. Além disso, verificou-se que os pacientes com ICV apresentaram menor secreção de IL-10 por células B purificadas classificadas quando comparadas com controles saudáveis. O trabalho sugere que os pacientes com ICV possuem um compartimento comprometido de células B reguladoras que não está correlacionado com as características clínicas e imunológicas apresentadas por esses indivíduos (37).

Por fim, alterações em monócitos de pacientes com ICV são descritas e alguns pacientes apresentam monócitos com baixa capacidade de produção das citocinas TNF e

IFN- γ determinando uma falha na diferenciação de LT *naive* em LT efetores. Clinicamente, estes defeitos foram associados à presença de granulomas e autoimunidade (2,38).

Unger e col. avaliaram 67 pacientes com ICV quanto à produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ de memória em sangue periférico e linfonodos e observaram aumento considerável na produção de IFN- γ associado ao aumento linfócitos B CD21^{low} na periferia. Esses achados sugerem que haja um *link* entre a disfunção imune associada ao IFN- γ e a expansão periférica da população de LB CD21^{low} (39).

Um resumo das alterações imunológicas relevantes encontradas, pode ser visto na tabela 1.

Tabela 1. Anormalidades imunológicas descritas em pacientes com ICV

Tipo Celular	Alteração	Referência
Células Dendríticas	<ul style="list-style-type: none"> · CD40-CD40L; · Sinalização defeituosa de TLR9; · Maturação diminuída; · Produção de citocinas alterada. 	Banchereau e Steinman, 1998 Bayry et al., 2005 (40) Scott-Taylor e col., 2004 (41) Viillard e col., 2005 (42) Bonilla e Geha, 2009 (38)
Monócitos	<ul style="list-style-type: none"> · Produção de TNF, IL-2 e IFN-γ; · Elevado estresse oxidativo. 	Aukrust et al.; 1994 (43) Aukrust et al.; 1996 (44)
Células NKT	<ul style="list-style-type: none"> · Baixa frequência. 	Carvalho e col., 2010 (32)
Células NK	<ul style="list-style-type: none"> · Baixa frequência. · Persistente estado de ativação; · Aumento na expressão de HLA-DR; · Diminuição de L-Selectina; · CD40-CD40L; 	Trujillo et al., 2011 (33) Webster, 2001 (9) Pinchuk e col., 1996 (29) Kokron e col., 2004 (8) Bonilla e Geha, 2009.(38) Unger S e col, 2018 (39)
Linfócitos T	<ul style="list-style-type: none"> · Inversão da relação CD4⁺/CD8⁺; · Aumento de apoptose; · Diminuição da proliferação; · Produção de citocinas alterada. 	Unger S et al, 2018 (39)
Linfócitos Th17	<ul style="list-style-type: none"> · Baixa frequência. 	Barbosa e col., 2011 (34)
Linfócitos Treg	<ul style="list-style-type: none"> · Baixa frequência. 	Bonilla & Geha, 2009 (38) Genre e col., 2009 (12)
Linfócitos Tfh	<ul style="list-style-type: none"> · Alta frequência. · Diminuição da proliferação; · Maturação diminuída; · Frequência aumentada de LB <i>naive</i>; · Frequência aumentada de LB transitório; · Frequência diminuída/ aumentada de MZB; 	Coraglia et al., 2016 (45) Schwartz, 1999 (46) Muramatso et al., 2000 (47) Sánchez-Ramón et al., 2008 (48) Mouillot et al., 2010 (49) Vlková e col., 2010 (50) Castigli e col., 2007(51)
Linfócitos B	<ul style="list-style-type: none"> · Frequência diminuída de SMB; · Frequência diminuída de PBL; · Frequência aumentada de LB CD21^{low}. · Frequência diminuída de células B10 	Wehr et al., 2008 (23). Pedreschi e col., 2014 (52) Barsotti e col., 2016 (37)

Adaptado de: Pedreschi e col., 2014 (52).

Alterações genéticas na Imunodeficiência Comum Variável

A despeito do grande desconhecimento sobre as bases moleculares que regem a ICV, algumas descobertas (ICOS, TACI, CD19, CD20, BAFF, APRIL, CD21, CD27, CD81, LRBA, CTLA-4, PKC delta, NFKB2, PRKCD, PIK3CD, PIK3R1, IKZF1, NFKB1) apontaram os primeiros modelos monogênicos e alguns bialélicos associados ao fenótipo ICV. O sequenciamento do exoma mostrou-se uma ferramenta útil para o estudo dos defeitos genéticos nestes pacientes. Porém, em um recente estudo, a avaliação do exoma foi realizada em 50 pacientes com diagnóstico de ICV e em 30% foi observado algum defeito genético (53).

Alguns defeitos genéticos já descritos estão associados a características clínicas predominantes, como por exemplo, pacientes com deleção do ICOS ou do TACI têm o fenótipo clínico de infecções recorrentes, fenômenos autoimunes, esplenomegalia, linfadenopatia e neoplasias, e a resposta específica ao pneumococo está prejudicada. Já em pacientes com defeito no CD19 o que prevalece são as infecções sinopulmonares recorrentes e do trato gastrointestinal e a resposta específica aos antígenos é desconhecida (2).

Logo, a ICV parece resultar de vários defeitos genéticos, que podem ser de herança recessiva ou autossômica dominante com penetração variável, porém menos de 20% dos pacientes temos a descrição dos defeitos. Os defeitos genéticos mais recentemente reportados e suas características estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2. Seletas alterações genéticas descritas na ICV

Gene	Clínica	Laboratório	Referências
CD19	Infecções respiratórias	Redução de IgG e IgA, falha resposta vacina PS, LB normal, LB memória reduzida	Van Zelm MC et. al, 2006; Kanegane et. al, 2007 (54,55)
CD20	Infecções respiratórias	Redução de IgG, falha resposta vacina PV23, LB normal, LB memória reduzida	Kuijpers Tw e col, 2010 (56)
CD21	Infecções respiratórias, diarreia	Redução de IgG, resposta normal a vacinas, LB normal, LB memória reduzida	Thiel J e col, 2012 (57)
CD27	EBV, linfomas, sinusites	Redução de IgG ou IgA, falha na resposta a vacinas, disfunção de LT, LB normal, ausência de memória B	Salzer e col, 2013, van Montfrans JM e col, 2012 (58,59)
CD81	Infecções respiratórias, Púrpura Henoch-Scholein, glomerulonefrite, AI ++	Redução de IgA, falha na resposta a vacinas, LB normal, LB memória reduzida	Van Zelm MC et. Al, 2010 (60)
CTLA4	AD, Infecções respiratórias, diarreia, infiltrado em órgãos linfóides, AI+	Redução de IgG e/ou IgA, falha resposta vacina PS, LB reduzido, LB memória reduzida	Kuehn HS e col, 2014; Schubert D e col, 2014 (61,62)
ICOS	Infecções respiratórias, Infecções GI, AI +	Redução de IgG ou IgA, falha na resposta a vacinas, disfunção de LT, LB reduzido, LB memória reduzida	Grimbacher B e col, 2003; Takahashi N e col, 2009 (63,64)
IL21	Infecções respiratórias, <i>cryptosporidium</i> , infecções virais e bacterianas graves	Redução de IgG, aumento de IgE, falha na resposta a vacinas, falha na produção de citocinas por LT, LB reduzido, LB memória reduzida, redução citotoxicidade	Kotlarz D e col, 2014; Kotlarz D e col, 2013 (65,66)
IL21R	Infecções respiratórias, DII	Redução de IgG, aumento de IgE, falha na resposta a vacinas, LB reduzido, LB memória reduzida, falha na resposta T	Kotlarz D e col, 2014; Salzer E e col, 2013 (58,65)
LRBA	Infecções respiratórias, enteropatias, AI (ITP, AHAI)	Redução de IgG, IgA e IgM, falha na resposta vacinas, LB normal ou reduzido, LB memória reduzida	Alangari A e col, 2012, Burns SO e col, 2012, Lopez-Herrera G e col, 2012 (67–69)
NFKB2	AD, infecções respiratórias, meningite meningocócica, insuficiência adrenal, ITP	Redução de IgG e/ou IgA/IgM, falha na resposta vacinas, LB normal ou reduzido, LB memória reduzida	Chen K e col, 2013; Liu Y e col, 2014 (70,71)
PIK3CD	AD, infecções respiratórias, bronquiectasias, herpes, linfomas	Redução de IgG, IgG2, falha na resposta vacina PS, LB e LT variáveis, LB troca de isotipo reduzido	Angulo I e col, 2013; Crank MC e col, 2014; Lucas CL e col, 2014 (72–74)
RAC 2	Infecções respiratórias, GN pós-estreptocócica, AI (tireóide)	Redução de IgG, IgA e IgM, falha na resposta vacina PS, LB normal ou reduzido, redução de LT naive	Alkhairy OK e col, 2015 (75)
TWEAK	AD, infecções respiratórias, meningite pneumocócica, verrugas	Redução de IgG (IgG2/4), IgA e IgM, falha na resposta vacina PS, LB normal ou reduzido, LB memória reduzida	Wang Hy e col, 2013 (76)
IKAROS	AD, infecções sinopulmonares recorrentes	LB reduzidos ou normais	Picard C e col, 2015 (77)

Linfócitos T de Memória e ICV

Os linfócitos de memória são células de vida longa que aparecem na resposta imune após o encontro com o antígeno, durante a expansão clonal e diferenciação dos linfócitos em resposta a um estímulo antigênico. Estas células de memória conferem proteção imediata em casos de reencontros com o antígeno gerando uma resposta qualitativa e quantitativamente aumentada comparada àquela oriunda das células *naive* (78). Os linfócitos T podem ser classificados de acordo com o estágio de diferenciação em LT *naive* (CD45RA⁺CCR7⁺), memória central (TCM), memória efetora (TEM, CD45RA⁻CCR7⁺), e memória efetora terminalmente diferenciados (TEMRA, CD45RA⁺CCR7⁻). Células de memória efetora TEM e TEMRA desempenham uma função protetora imediata enquanto as células de memória TCM, presentes em tecidos linfóides, nas barreiras mucosas e na circulação, são responsáveis pela imunidade prolongada sendo atribuído a elas a capacidade de auto renovação, proliferação e diferenciação em células efetoras. As TCM têm chamado atenção, devido à associação com a proteção após a eliminação de antígenos virais e imunizações. Além do fenótipo, os linfócitos T de memória podem ser caracterizados funcionalmente da seguinte maneira: TCM possuem pouca função efetora, capacidade de renovação e secretam principalmente IL-2; TEM, possuem função efetora imediata e secretam IL-2 e IFN- γ ; TEMRA possuem potente função efetora e pouca capacidade de proliferação e secretam principalmente IFN- γ (78,79).

No que diz respeito à origem dos linfócitos T de memória, Sallusto e col., defendem a hipótese de essas células constituam subtipos celulares distintos e ocorre uma diferenciação linear das TCM em TEM e destas em TEMRA. A proposta é que as subpopulações T de memória representariam estágios de um processo contínuo de diferenciação cujos principais fatores envolvidos seriam a força do sinal de ativação via

receptor de célula T (TCR), a concentração do antígeno, moléculas co-estimulatórias e duração da interação entre linfócitos e APCs (78,79) (Figura 1).

Figura 1. Modelo de diferenciação de Linfócitos T em Linfócitos T de memória. A diferenciação celular depende da duração e da intensidade da estimulação antigênica. Abreviaturas: CD- células dendríticas, TEM- memória efetora, TEMRA- memória efetora terminalmente diferenciadas, TCM- memória central, AICD- *activation-induced cell death*. Adaptado de Sallusto F et al. 2004 (78).

Harari e col. identificaram três populações de células T de memória caracterizadas como $CD45RA^+CCR7^-$. Os fenótipos de células T foram identificados de acordo com a persistência da resposta a diferentes antígenos testados. Indivíduos que apresentaram o fenótipo $CD45RA^-CCR7^+$ ou $CD45RA^-CCR7^-$ tiveram a resposta associada a condições de eliminação do antígeno (avaliada a resposta ao toxóide tetânico) ou persistência do antígeno e alta carga viral (infecção crônica por HIV e primária por CMV), respectivamente. Indivíduos que apresentaram fenótipos múltiplos, $CD45RA^-CCR7^+$, $CD45RA^-CCR7^-$ e $CD45RA^+CCR7^-$ tiveram respostas associadas à

proteção e baixa carga viral após exposição aos antígenos (infecções crônicas por CMV, EBV, herpes vírus e HIV) (80).

Donna L. Farber, Naomi A. Yudanin & Nicholas P. Restifo . *Nature Reviews Immunology* . 2014

Figura 2. Diferenciação de linfócitos T de acordo com a exposição antigênica e função efetora. Abreviaturas: APC- células apresentadoras de antígenos, TEM- memória efetora, TEMRA- memória efetora terminalmente diferenciadas, TCM- memória central. Adaptado de *Donna L. Farber, Naomi A. Yudanin & Nicholas P. Restifo. Nature Reviews Immunology. 2014*

Na ICV, Giovannetti e col. avaliaram parâmetros funcionais e fenotípicos da imunidade mediada por células T e demonstraram que a maioria dos pacientes apresentaram menor frequência de linfócitos T CD4⁺ e sua redução estava associada à maior gravidade da doença. A avaliação de marcadores de ativação celular e produção de citocinas mostraram uma forte ativação de células T que estava relacionado ao aumento do *turnover* de LT e apoptose (81). Mouillot e col. observaram associações entre complicações clínicas em 331 pacientes com ICV e os fenótipos distintos de células B e T *naive* e memórias central, altamente diferenciados e efetores. Observaram redução na frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ *naive* nos pacientes com ICV que tinham como principal manifestação as infecções de repetição comparados aos ICV com fenótipos de autoimunidade e linfoproliferação policlonal. Neste subgrupo de pacientes as principais anormalidades de células B e T foram o defeito no *switch* de memória de células B e redução das células T *naive* (49). Os valores de referência citadas por Mouillot e col. encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Subpopulações de Linfócitos em pacientes com ICV

		Unidades	Controles (n=50)	Pacientes ICV (n=313)			
				Infecções (n=98)	Linfoproliferação (n=147)	Autoimunidade (n=55)	Enteropatias (n=76)
Linfócitos		$\times 10^6 L^{-1}$	1,836 [1,529– 2,350]	1,531 [1,144– 1,869]	1,212 [836– 1,708]	1,445 [936–2,362]	1,124 [718– 1,558]
Linfócitos T	CD3+	$\times 10^6 L^{-1}$	1,419 [1,122– 1,774]	1,237 [938– 1,574]	978 [701– 1,426]	1,255 [904– 1,892]	979 [639– 1,355]
		%	74 [70–77]	77 [73–83]	79 [70–87]	81 [70–88]	79 [71–85]
	CD4+	$\times 10^6 L^{-1}$	912 [682– 1,153]	690 [487–851]	524 [342–760]	650 [395–911]	520 [313–719]
		%	45 [41–51]	42 [34–50]	40 [33–48]	39 [34–49]	42 [33–50]
	CD8+	$\times 10^6 L^{-1}$	474 [356–616]	493 [344–683]	447 [278–612]	520 [340–847]	370 [209–583]
		%	25 [21–29]	32 [24–38]	35 [25–45]	36 [22–44]	32 [22–44]
Linfócitos B	CD19+	$\times 10^6 L^{-1}$	202 [126–301]	103 [46–171]	91 [41–171]	102 [20–221]	83 [34–150]
		%	11 [9–14]	7 [3–12]	8 [3–12]	7 [3–13]	7 [3–12]
Células NK	CD3–CD16+CD56+	$\times 10^6 L^{-1}$	185 [115–270]	131 [84–227]	94 [43–155]	101 [49–192]	85 [41–126]
		%	11 [7–14]	8 [6–15]	6 [4–10]		7 [4–10]
T CD4+ Naive	CD45RA+CCR7+	%	45 [40–53]	37 [23–48]	14 [4–28]	11 [5–29]	19 [7–33]
T CD4+ TCM	CD45RA–CCR7+	%	31 [26–38]	34 [25–42]	37 [26–52]	40 [26–56]	37 [31–48]
T CD4+ TEM	CD45RA–CCR7–	%	19 [14–24]	23 [17–29]	36 [21–54]	35 [20–45]	32 [21–52]
T CD4+ TEMRA	CD45RA+CCR7–	%	1.5 [0.9–2.2]	2 [1–3]	2 [1–5]	2 [1–6]	2 [1–4]
T CD8+ Naive	CD45RA+CCR7+	%	41 [25–51]	26 [15–43]	10 [4–23]	16 [6–30]	14 [6–34]
T CD8+ TCM	CD45RA–CCR7+	%	6 [4–9]	6 [4–11]	5 [3–9]	5 [3–6]	5 [4–9]
T CD8+ TEM	CD45RA–CCR7–	%	30 [25–35]	31 [21–41]	37 [26–52]	32 [22–44]	37 [25–53]
T CD8+ TEMRA	CD45RA+CCR7–	%	19 [15–31]	29 [18–42]	37 [24–49]	39 [24–52]	33 [20–45]

Legenda: Modificado de Mouillot e col. 2010 (49). Os valores medianos são apresentados para 50 pacientes com HC e 313 ICV de acordo com complicações clínicas; os pacientes podem ter mais de uma complicação. Autoimunidade = considerar citopenias autoimunes. TCM=Linfócitos T Memória Central, TEM=Linfócitos T Memória Efetora, TEMRA=Linfócitos T Memória Efetora terminalmente diferenciados

Estes resultados demonstram a heterogeneidade de resposta de linfócitos T aos diferentes antígenos. Conhecer o perfil fenotípico dessas células de memória em pacientes com ICV é de fundamental importância para o entendimento das características clínicas.

Influenza e Vacinação

A influenza é uma doença respiratória aguda causada pelos vírus influenza A, B e C. O vírus da influenza A é classificado em 18 subtipos HA (H1-H18) e 11 NA (N1 – N11) com base nas glicoproteínas HA e NA (3, 9, 12). Baseado nas propriedades antigênicas e características estruturais, os subtipos de vírus HA podem ser ainda classificados nos grupos 1 (H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 e H18) e 2 (H3, H4, H7, H10, H14 e H15). Apenas um único subtipo do vírus da influenza B foi identificado, e este subtipo compreende duas linhagens antigênicas distintas (B / Victoria e B / Yamagata) que divergiram há mais de 40 anos e co-circulam em níveis variáveis em humanos (82).

A infecção pelo vírus Influenza ocorre em epidemias quase todos os anos, principalmente durante o inverno em climas temperados. Os vírus influenza alteram frequentemente suas características antigênicas, e sua disseminação subsequente depende da suscetibilidade da população aos vírus com novos antígenos (83).

Os vírus da Influenza A podem sofrer mutações nas características antigênicas de suas glicoproteínas do envelope, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA). Entre os vírus influenza A que infectam humanos foram descritos três subtipos principais de hemaglutininas (H1, H2 e H3) e dois subtipos de neuraminidasas (N1 e N2). Outras variantes como H5N1 e H7N9 estão associadas em menor proporção aos surtos de influenza (84).

Os vírus influenza B têm uma menor propensão para mudanças antigênicas. O vírus influenza C tem sido relatado como causador de doenças respiratórias agudas em crianças e, mais raramente, em adultos (84).

Mudanças importantes nas glicoproteínas do envelope, na hemaglutinina e na neuraminidase são chamadas de *shifts* antigênicos, e pequenas alterações são chamadas *drifts* antigênicos. Os *shifts* antigênicos estão associados a epidemias e pandemias de influenza A, enquanto os desvios antigênicos estão associados a surtos mais localizados (84).

Os vírus da influenza têm um genoma segmentado que pode resultar em altas taxas de rearranjo entre os vírus que co-infectam a mesma célula. O rearranjo entre vírus humanos e animais pode resultar no surgimento de cepas pandêmicas. Tais eventos de reorganização levaram ao surgimento dos vírus que causaram as pandemias de 1957, 1968 e 2009 (84).

Estudos de modelagem em que foram utilizados dados de vigilância para estimar a mortalidade respiratória global associada à influenza em 33 países entre 1999 e 2015 reportou uma média estimada de mortalidade respiratória associada à influenza anual variando de 0,1 a 6,4 por 100.000 indivíduos com idade inferior a 65 anos de idade, 2,9 a 44,0 por 100.000 entre 65 e 74 anos e de 17,9 a 223,5 por 100.000 naqueles com idade maior ou igual a 75 anos de idade. As maiores taxas de mortalidade foram estimadas na África subsaariana (2,8 a 16,5 por 100.000), sudeste da Ásia (3,5 a 9,2 por 100.000) e entre aquelas com idade ≥ 75 anos (51,3 a 99,4 por 100.000). Estimou-se que 291.243 a 645.832 mortes respiratórias associadas à influenza sazonal ocorrem anualmente em todo o mundo (4,0 a 8,8 por 100.000) (85).

Zhou e col, demonstraram que as epidemias de influenza afetam principalmente os idosos, com as maiores taxas de morbidade e mortalidade nesse grupo (86).

As taxas de hospitalização por eventos cardiopulmonares agudos e mortalidade foram maiores durante a temporada de influenza, e a presença de outras comorbidades aumentou o risco de hospitalização e morte. A diminuição da complacência pulmonar, diminuição da força muscular respiratória, diminuição da imunidade celular e diminuição da resposta das células B a novos antígenos são fatores que contribuem para infecções mais graves da influenza em pacientes adultos mais velhos (87).

Em março de 2009, um surto de infecção pelo vírus influenza A H1N1 foi detectado no México, com casos subsequentes observados em muitos outros países do mundo. Em junho de 2009, a Organização Mundial de Saúde (OMS) elevou seu nível de alerta pandêmico para o nível mais alto, fase 6, indicando transmissão comunitária disseminada em pelo menos dois continentes. A pandemia foi declarada em agosto de 2010 (88).

A vacinação anual é uma importante medida de saúde pública para prevenir a infecção por influenza (89). A proteção fornecida pelas vacinas contra influenza é baseada na indução de anticorpos neutralizantes de vírus, principalmente contra a hemaglutinina viral. As vacinas influenza utilizadas em nosso país até o ano de 2015 eram trivalentes, contendo uma cepa A/H1N1, uma cepa A/H3N2 e uma cepa B (linhagem Yamagata ou Victoria). As novas vacinas quadrivalentes licenciadas em 2015 contemplam, além dessas três, uma segunda cepa B e assim, nas vacinas quadrivalentes existem as duas linhagens B: Yamagata e Victoria. Como as trivalentes utilizadas no Brasil, as vacinas quadrivalentes são inativadas e não possuem adjuvantes em sua composição (90).

A vacinação contra influenza foi associada a uma diminuição nas hospitalizações por doença cardíaca e doença cerebrovascular em uma grande coorte de

pacientes com 65 anos ou mais quando comparados aos membros que não foram vacinados (91).

O controle da infecção por influenza ocorre através da resposta imune adaptativa específica ao vírus. As células T CD4⁺ auxiliam na ativação das células B e T CD8⁺ que são essenciais na produção de anticorpos específicos e eliminação de células infectadas pelo vírus, respectivamente. HA e NA são os principais alvos de anticorpos neutralizantes. Essas proteínas são locais frequentes de mutações, o que pode levar ao aparecimento de novas epidemias e não controle por vacinas ao longo do tempo. As células T CD8⁺ tem como alvo regiões conservadas de proteínas internas do vírus influenza menos propensas a mutações e perda de função efetora e de memória imunológica. Em casos de subtipos antigenicamente distintos, que são comuns no vírus influenza podendo levar a pandemias, o direcionamento da resposta imune a proteínas internas conservadas do vírus pelas células T CD8⁺ pode levar ao controle rápido e eficaz da infecção pelo vírus da influenza. Souquette e colaboradores, demonstraram os efeitos da infecção repetida ou crônica no recrutamento da resposta das células T CD8⁺ e geração e manutenção da memória durante a infecção pelo vírus da influenza (92).

Zens e Farber em 2015, revisou o papel das células T CD4⁺ na resposta imune celular contra o vírus influenza. Os autores discutem que as células T CD4⁺ de memória são importantíssimas no reconhecimento de proteínas virais conservadas conferindo imunidade cruzada contra outras cepas do vírus influenza. Em modelos animais, as células T CD4 de memória conseguiram gerar uma resposta protetora à infecção por influenza, independentemente das células B ou T CD8⁺, e ainda influenciando resposta da imunidade inatas. É importante ressaltar que o conceito da geração de células T de memória em resposta as vacinas contra influenza, pode implicar no desenvolvimento de vacinas mais eficazes (93).

Devido ao surgimento de variantes antigênicas do vírus da gripe sazonal e a inevitável aparecimento de surtos pelo vírus da influenza, existe um interesse considerável no desenvolvimento de vacinas contra influenza que induzam uma imunidade protetora mais ampla. Altenburg e col., também revisaram a indução de respostas de células T específicas pela infecção pelo vírus influenza e o papel das células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas na eliminação do vírus. A indução de resposta imune ao vírus influenza por estas vias pode conferir proteção contra infecções subsequentes, promovendo uma proteção cruzada.

O objetivo da maioria das estratégias de vacinação é induzir respostas robustas de anticorpos neutralizantes específicos contra vírus. No entanto, a resposta de anticorpos gerada por diversas infecções respiratórias, incluindo influenza, diminui ao longo do tempo. Logo, estratégias de vacinação incluindo a indução de respostas de células T CD8 específicas contra o vírus influenza, isoladamente ou em combinação com a imunidade humoral, podem ser benéficas na geração de memória imunológica potente e duradoura (94).

As mudanças anuais nas glicoproteínas do vírus influenza representam um grande desafio à vacinação devido à rápida capacidade de mutação viral para escapar da resposta imune. Infecções por influenza geram diversas respostas de células T CD4⁺ efectoras que geram uma proteção altamente duradoura. Devarajan e col. revisaram os avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos na geração de respostas de células T CD4⁺ contra o vírus influenza (IAV), com foco em LT auxiliares foliculares especializados (TFH) e LT CD4 citotóxicos (ThCTL) e células T CD4⁺ de memória. Observaram que as células T auxiliares são ativadas a partir das APC secretando níveis elevados de IL-6, além dos sinais gerados a partir da IL-2. Os autores sugerem que a geração de memória LT CD4⁺ pode ser melhorada através de reforços de vacinação,

importante especialmente na proteção de idosos e imunocomprometidos (95). Porém, estes estudos não apresentaram dados que sugiram correlatos de proteção à vacina influenza alternativos ou complementares à produção de anticorpos específicos.

A figura 3 abaixo demonstra possíveis mecanismos imunológicos desencadeados pela infecção pelo vírus influenza.

Figura 3. As funções das células T de memória na infecção pelo vírus influenza

Legenda: (A) Memória Células T CD4⁺ e a produção de IFN- γ . (B-D) As células T CD4⁺ de memória atuam através de várias vias para mediar a proteção contra vírus influenza. As células T CD4⁺ aumentam a produção de anticorpos via células B independentemente das células TFH.

(C) Citotoxicidade dependente de perforinas e (D) Respostas de células T CD8⁺. Modificado de Kobporn Boonnak e col., 2012 (96).

Imunização em pacientes com ICV

A influenza pode levar à infecção grave do trato respiratório em pacientes com imunodeficiências primárias incluindo a ICV. Devido à alta taxa anual de mutação do vírus, a terapia de reposição com imunoglobulina humana protege apenas parcialmente o paciente da influenza sazonal. A vacina Influenza é um meio eficaz de prevenção e controle da influenza em indivíduos imunocompetentes e também recomendada para pacientes imunocomprometidos, mesmo naqueles com falha na resposta imune humoral. Além do desenvolvimento de anticorpos protetores após a vacinação, a indução da imunidade mediada por células é considerada de importância crítica no desenvolvimento de reposta imune contra o vírus influenza (97).

No entanto, a experiência com administração de vacinas nos imunocomprometidos é limitada diante da diversidade de condições clínicas associadas à imunossupressão. Vacinas inativadas devem ser recomendadas a esta população especial, porém a eficácia dos imunizantes pode ser variável e reduzida ou até ausente dependendo da doença ou estado de imunossupressão. De um modo geral, as vacinas com patógenos vivos devem ser evitadas em pacientes gravemente imunocomprometidos (98).

A grande discussão com relação à indicação de vacinação com patógenos inativados de pacientes com imunodeficiência comum variável está na capacidade destes pacientes em responder a antígenos específicos e, portanto, na eficácia da vacinação e não somente aos riscos que poderiam decorrer da vacinação. Devido à heterogeneidade da etiologia e mecanismos imunológicos da doença, alguns pacientes teriam a capacidade de resposta a tais antígenos. Sousa F e col. avaliaram a capacidade

de proliferação de linfócitos de pacientes com ICV estimulados com o antígeno Toxóide Tetânico, antes e após a imunização com vacina antitetânica. Os autores observaram que apenas 14% dos pacientes testados não responderam à estimulação com toxóide tetânico após a vacinação e 66% tiveram resposta satisfatória. A maior parte dos pacientes ICV foi capaz de reconhecer e responder à estimulação com toxóide tetânico após a vacinação específica (99).

A capacidade de resposta aos antígenos específicos está relacionada à classificação desses pacientes de acordo com dados clínicos e laboratoriais incluindo função e produção de anticorpos e defeitos genéticos. Esta classificação poderá servir para definir subgrupos mais homogêneos a partir de análises genéticas e funcionais (23). Porém, existe uma lacuna no conhecimento em relação à avaliação de resposta clínica e laboratorial após exposição a antígenos específicos com o objetivo de definir correlatos de proteção mais adequados.

Rezaei e col. sugeriram classificar os pacientes com ICV com base na resposta a vacina polissacarídica contra o meningococo. Os autores avaliaram 25 pacientes com ICV que foram vacinados. Dezesesseis pacientes desenvolveram títulos protetores de anticorpos contra o meningococo após três semanas da vacinação. Entre os pacientes não respondedores, houve maior frequência nos achados de bronquiectasias, doenças autoimunes e esplenomegalia comparados ao outro grupo. Os mesmos autores avaliaram os níveis séricos de anticorpos contra o meningococo C um ano após a vacinação. Dos 23 pacientes vacinados o autor concluiu que a maioria foram respondedores da vacina e mantiveram a resposta após um ano. Talvez, esse fato esteja relacionado a um melhor prognóstico dos pacientes do ICV e pouco ou nenhum comprometimento do compartimento de células T (100). No entanto, os autores não correlacionaram os achados sorológicos às características imunológicas de células T e B

de memória dos pacientes avaliados e permanece obscuro os mecanismos da resposta imunológica que justifiquem a resposta sorológica encontrada, haja vista a falha na resposta imune aos antígenos polissacarídeos característicos da ICV (101).

Junker e col. sugeriram em uma carta editorial que pacientes com ICV não responderiam a vacina contra influenza, considerando-se a pobre resposta antígeno específica característica da doença (102). Porém, Park e col. 2008 recomendam a administração da vacina contra a influenza em pacientes com ICV que fazem reposição mensal de imunoglobulina humana, justificando que a presença de antígenos da *Influenza* na IgIV não seria suficiente para proteção dos indivíduos (103). Bonilla FA, em 2018, publicou uma revisão atualizada sobre as indicações e contraindicações de vacinas em pacientes com imunodeficiências primárias e sugere que a vacina influenza deve ser recomendada aos pacientes com ICV (104).

O foco da vacinação tem sido a produção de anticorpos, mas também geração de resposta T potente e duradoura (105). Seder e col., discutem que a caracterização destas respostas, por exemplo, Th1 x Th2, memória central *versus* memória efetora podem se tornar importantes na compreensão da variedade das respostas. Observando dados da literatura, há uma grande necessidade de classificar e diagnosticar com maior precisão defeitos da função e produção de linfócitos T e B que levam à redução na produção de anticorpos e suas consequências. A administração de vacinas nestes pacientes seria útil no diagnóstico e possivelmente na prevenção de doenças, tendo em vista os mecanismos imunológicos da ICV.

Pedersen e col. estudaram a resposta contra a vacina H1N1 de quatro pacientes com hipogamaglobulinemia, três com ICV e um com agamaglobulinemia ligada ao X e observaram que dois pacientes com ICV foram capazes de produzir anticorpos específicos. Ainda, observaram que a vacinação induziu resposta específica para

influenza mediada por linfócitos TCD4⁺ TH1 tanto nos pacientes com ICV como no paciente com agamaglobulinemia. Porém o número reduzido de pacientes avaliados com doenças diferentes (agamaglobulinemia e ICV) limita o estudo. Ainda, os autores não avaliaram as subpopulações de linfócitos T de memória após estímulo específico (106).

Hanitscha e col. avaliaram a resposta humoral e celular de oito pacientes com ICV e oito pacientes com deficiência de anticorpos não classificados, três semanas após a vacinação contra influenza (2013-2014- A / California / 7/2009, A / Texas / 50/2012 e B / Massachusetts / 02/2012). Observaram que apenas 1/8 pacientes com ICV e 4/8 com deficiência de anticorpo não classificada apresentaram produção de anticorpos neutralizantes após a vacinação. No entanto, 7/8 da ICV e 6/8 dos pacientes com deficiência de anticorpos não classificados tiveram frequências semelhantes de IFN- γ , TNF- α , células T CD40L produtoras de IL-2 quando comparadas com o grupo controle, concluindo que os pacientes com ICV tiveram resposta celular T ao antígeno HA e poderiam se beneficiar com a vacinação contra influenza sazonal (97). Entretanto, não foi descrito pelos autores se a resposta de produção de citocinas observada após a vacina influenza estava relacionada ou não às subpopulações T de memória.

Em um estudo anterior, desenvolvido pelo grupo, através de um score clínico, 47 pacientes com ICV que receberam a vacina contra o H1N1 e influenza (107). Os dados do estudo mostraram que a vacinação contra o vírus influenza A (H2N3 e H1N1) /B reduziram o número de infecções respiratórias nos pacientes com ICV, apesar de não haver produção de anticorpos específicos (52). Ainda neste estudo a vacinação se mostrou segura e eficaz clinicamente, permitindo a sua indicação nos pacientes com ICV. A resposta clínica observada após a vacinação poderia ser explicada por outros mecanismos imunológicos diferentes da resposta humoral. Sabe-se que a vacina contra

influenza induz resposta imunológica específica para linfócitos T de memória efetora em indivíduos saudáveis. Tal fato poderia ser reproduzido em pacientes com ICV que apresentam a imunidade celular relativamente preservada.

Baldassin e col., avaliaram os linfócitos B de memória do mesmo grupo de pacientes que receberam as vacinas contra influenza avaliados por Marinho e col. Os autores observaram que a frequência da maioria dos subtipos de linfócitos B não foi duradoura após a vacinação. Houve um aumento na população de plasmoblastos em pacientes com ICV, porém sem manutenção da resposta de memória. Desse modo, a avaliação dos subtipos de linfócitos T de memória poderiam complementar a compreensão da resposta imune à vacina Influenza em pacientes ICV.

Com base nos estudos anteriores apresentados no grupo, observou-se que os pacientes com ICV que receberam a vacina Influenza tiveram melhora clínica em relação às infecções sinopulmonares, IVAS e uso de antibioticoterapia. Continuando a investigação em busca de dados que poderiam correlacionar imunologicamente a melhora clínica observada nos pacientes, Baldassin e col avaliaram a produção de anticorpos específicos contra Influenza A (H3/N2 e H1N1) / B e resposta de Linfócitos B de memória. Os autores não observaram produção de anticorpos específicos nos ICV vacinados, mas foi possível demonstrar aumento na frequência de plasmoblastos e após a vacinação. Diante do exposto, a identificação das subpopulações de linfócitos T de memória neste grupo de indivíduos após a vacinação Influenza poderia esclarecer um dos prováveis mecanismos de reposta a vacina Influenza em ICV confirmando o efeito benéfico da vacinação. Além disso, o melhor entendimento da resposta de LT de memória efetora poderá ser útil para identificar correlatos de proteção mais adequados a vacinas em condições especiais, como idosos e imunossuprimidos.

2. Objetivos

Geral

Investigar a frequência das subpopulações de linfócitos T *naive* e de memória, CD4⁺ e CD8⁺, em pacientes com ICV após a vacinação contra Influenza

Específicos

- I. Caracterizar fenotipicamente as subpopulações de linfócitos T *naive* e de memória antes e após a vacinação contra o vírus *Influenza* A (H3N2 e H1N1) e B em pacientes com ICV;
- II. Avaliar a capacidade de diferenciação dos linfócitos T diante de estímulos específicos (hemaglutinina de Influenza e lisado viral *Influenza*) após a vacinação contra o vírus *Influenza* A (H3N2 e H1N1) e B;
- III. Avaliar a capacidade de produção das citocinas - Interleucina 2 (IL-2) e Interferon-gama (IFN- γ) nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ após os estímulos específicos.

3. Materiais e métodos

Casuística

Foram selecionados 16 pacientes com diagnóstico de ICV acompanhados no ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP. Os critérios diagnósticos para ICV utilizados estão de acordo com a Sociedade de Européia de Imunodeficiências (ESID, *European Society for Immunodeficiencies* <http://esid.org/WorkingParties/Registry/Diagnosis-criteria>) e Grupo Panamericano de Imunodeficiências (PAGID- *Pan-American Group for Immunodeficiency*) (2,6).

Foram selecionados 16 indivíduos saudáveis pareados por idade no grupo controle para análises laboratoriais. Os pacientes foram vacinados no centro de vacinação do Hospital das Clínicas de São Paulo, 15 dias após a infusão da IgIV. Foram colhidas amostras de sangue dos pacientes pré e pós-administração (0-1-3-6 meses) das vacinas contra Influenza A H1N1/H3N2 e B e avaliada a resposta celular específica *in vitro*.

Critérios de exclusão:

- Gestantes;
- Doenças malignas em tratamento;
- Imunossupressão grave (uso de imunossupressores e/ou corticosteroides em doses altas)
- Menores de 18 anos;
- Anafilaxia prévia aos componentes a vacina influenza e/ou ovo de galinha;

- Infecção aguda resultando em febre acima de 38 ° C no momento da vacinação;
- Diagnóstico prévio de síndrome de *Guillain-Barré* ou síndromes desmielinizantes;
- Pacientes hospitalizados com doenças agudas.

O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética do HC-FMUSP (nº 0460/06). Os procedimentos para coleta das amostras seguiram as normas do Comitê de Ética do HC-FMUSP. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. (anexo 1).

Desenho Experimental

3.2 Desenho Experimental

Vacinação e coleta das amostras de Sangue

Após a coleta da primeira amostra de sangue, efetuada no dia em que seria administrada a gamaglobulina endovenosa, os pacientes foram orientados a procurar em quinze dias o Centro de Imunizações do Hospital das Clínicas de São Paulo, para administração das vacinas Influenza A H1N1/H3N2 e B (cepas: A/Califórnia/7/2009, A/Victoria/361/2011, B/Brisbane 60/2008) por via intramuscular (dose de 0,5ml), simultaneamente. Os lotes das vacinas utilizadas foram: *Influenza* - Lote: VA349400 e H1N1 - Lotes: A80CA184-A; 107.058P1.

A segunda coleta de sangue foi realizada quatro semanas após a vacinação. As outras amostras foram colhidas no período de 3 e 6 meses após a administração da vacina.

Foram colhidos 40ml de sangue periférico em cada amostra, de cada paciente de ICV e de cada controle, sendo 10ml em tubo seco (sem aditivos) e 30ml em tubo heparinizado. Todos os experimentos foram realizados com sangue a fresco.

Obtenção de células mononucleares de sangue periférico

A separação de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foi realizada em cabine de segurança biológica nível 2, o qual foi esterilizada por 15 minutos através da radiação da luz ultravioleta.

Após este procedimento inicial seguiram-se as etapas de separação abaixo:

- a) A amostra do tubo de coleta foi transferida para um tubo tipo Falcon de 50ml, vertendo o tubo delicadamente;
- b) O mesmo volume de solução salina estéril foi acrescentada ao tubo de 50ml. Logo em seguida, a solução foi homogeneizada;
- c) Em outro tubo Falcon foram adicionados 15ml de Ficoll-Paque TM;

- d) As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 300 g, temperatura em torno de 18-20°C;
- e) Após a centrifugação, verificou-se a formação de uma nuvem de células mononucleares, localizadas na interface do Ficcol- Paque. Com o auxílio de uma pipeta, coletou-se a nuvem que foi transferida para outro tubo tipo Falcon de 50 ml;
- f) No tubo contendo a nuvem coletada, foi acrescentada a solução salina estéril até a marca de 50 ml;
- g) As amostras foram centrifugadas a 250 g por 10 minutos em temperatura de 18-20°C;
- h) Após a centrifugação, verificou-se a formação do botão celular. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular homogeneizado até se desprender do fundo do tubo tipo Falcon;
- i) O volume do tubo tipo Falcon foi completado com 50 ml de solução salina novamente e centrifugado a 250 g por 10 minutos em temperatura de 18-20°C;
- j) Verificou-se novamente a formação do botão celular. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular homogeneizado até se desprender do fundo do tubo tipo Falcon;
- k) O volume do tubo foi completado com 10ml de meio de cultura RPMI e soro fetal bovino;
- l) Em um Eppendorf na diluição de 1:1, foi pipetado 10µl do corante azul de Tripán (0,1%) e 10µl da suspensão de células;

- m) Foi retirado 10 μ l da solução de células e corante e transferido o seu conteúdo para a câmara de Neubauer coberta com uma lamínula;
- n) A contagem das células em microscópio óptico foi realizada sob o aumento de 400X, contando-se dois quadrantes laterais e desconsiderando-se as células mortas, as quais estavam coradas de azul;
- o) Cálculos: média da contagem de células nos dois quadrantes (somar o valor dos dois quadrantes e dividir por dois) x 10 (valor da diluição do azul de Tripán) x 10 (volume ressuspendido em meio RPMI) x 10⁻⁴ (valor da correção da câmara de Neubauer), o resultado totaliza o número de células existentes no volume de suspensão celular;
- p) A concentração celular foi ajustada para 1x10⁶ células por poço.

Cultura de Linfócitos

As células mononucleares dos 16 pacientes ICV vacinados e controles saudáveis vacinados foram semeadas em placas estéreis de 96 poços com fundo em “U” para verificação da capacidade de proliferação dos linfócitos após incubação com estímulos específicos e mitógenos (Figura 4).

Posteriormente à preparação das células, foi adicionado em cada poço, um volume de 100 μ L da suspensão de células diluídas em meio de cultura e soro autólogo (2x10⁵ células por poço) e igual volume do meio de cultura, para proliferação basal, 100 μ L do mitógeno concanavalina (ConA) na concentração de 4 μ g/ml para as culturas de 6 dias. A ConA foi utilizada como controle positivo. Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Para avaliação da proliferação de linfócitos T de memória com os estímulos específicos, as células foram incubadas com o lisado viral (etapa 16 da produção da

vacina influenza) na concentração de 20µg/ml fornecido pelo Instituto Butantã e hemaglutinina (HA-peptídeo) do vírus influenza na concentração de 10µg/ml. As células foram mantidas em cultura por 6 dias, em estufa a 5% de CO₂, a 37C°. Após a incubação, os sobrenadantes foram coletados e foi realizada a marcação por citometria de fluxo para verificação a frequência das subpopulações de linfócitos T.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	Basal	Basal		ConA 4 ug/mL	ConA 4 ug/mL		Lisado 20 ng/mL	Lisado 20 ng/mL		Influenza 10 ug/mL	Influenza 10 ug/mL	
B	Basal	Basal		ConA 4 ug/mL	ConA 4 ug/mL		Lisado 20 ng/mL	Lisado 20 ng/mL		Influenza 10 ug/mL	Influenza 10 ug/mL	
C	Basal	Basal		ConA 4 ug/mL	ConA 4 ug/mL		Lisado 20 ng/mL	Lisado 20 ng/mL		Influenza 10 ug/mL	Influenza 10 ug/mL	
D	Basal	Basal		ConA 4 ug/mL	ConA 4 ug/mL		Lisado 20 ng/mL	Lisado 20 ng/mL		Influenza 10 ug/mL	Influenza 10 ug/mL	
E	Basal	Basal		ConA 4 ug/mL	ConA 4 ug/mL		Lisado 20 ng/mL	Lisado 20 ng/mL		Influenza 10 ug/mL	Influenza 10 ug/mL	
F	Basal	Basal		ConA 4 ug/mL	ConA 4 ug/mL		Lisado 20 ng/mL	Lisado 20 ng/mL		Influenza 10 ug/mL	Influenza 10 ug/mL	
G	Não Marcado									FMO CD45RA	FMO CCR7	

Figura 2. Demonstração da placa para realização da cultura de linfócitos de 6 dias em duplicata com os seguintes estímulos

Legenda: Concanavalina A (ConA, 4 µg /ml) – controle positivo; Lisado viral (20 µg /ml); HA Influenza (10 µg /ml).

Imunofenotipagem para identificação das subpopulações de linfócitos T

Após seis dias em cultura, as placas foram retiradas da incubadora e foram centrifugadas a 250 g por 10 minutos em temperatura de 20°C para a coleta dos sobrenadantes. Na sequência, as células foram ressuspensas em 100µL de PBS e a placa foi centrifugada novamente a 250 g por 10 minutos em temperatura de 20°C para lavagem celular, o sobrenadante foi desprezado e o botão celular de cada poço foi ressuspendido em 100µL de PBS.

Para a marcação de superfície foram preparadas soluções de anticorpos monoclonais: solução 1- marcação de superfície; Solução 2 – FMO CD45RA; Solução 3 – FMO CCR7. Esta marcação nos permitiu a identificação de quatro subtipos de linfócitos: LT *naive* (CD45⁺RA⁺CCR7⁺); LT de memória efetora (TEM, CD45⁺RA⁻

CCR7⁺); LT de memória central (TCM, CD45⁺RA⁻CCR7⁺) e LT de memória terminalmente diferenciado (TEMRA, CD45⁺RA⁺CCR7⁻). Para a marcação das células foi selecionado o seguinte painel de marcação (tabela 4):

Tabela 4. Anticorpos para marcação Painel de marcação de superfície celular e citocinas intracitoplasmáticas

	Anticorpo	Fluorocromo	Volume
Marcação de superfície	Anti-CD3	ALEXA 700	0,5 uL
	Anti-CD4	APC-Cy7	0,25 uL
	Anti-CD8	PERCP	0,25 uL
	Anti-CD45RA	PE	2,5 uL
	Anti-CCR7	PE - Cy7	2,5 uL
FMO CD45RA	Anti-CD3	ALEXA 700	0,5 uL
	Anti-CD4	APC-Cy7	0,25 uL
	Anti-CD8	PERCP	0,25 uL
	Anti-CCR7	PE - Cy7	2,5 uL
FMO CCR7	Anti-CD3	ALEXA 700	0,5 uL
	Anti-CD4	APC-Cy7	0,25 uL
	Anti-CD8	PERCP	0,25 uL
	Anti-CD45RA	PE	2,5 uL
Citocinas	IFN- γ	FITC	0,2 uL
	IL-2	APC	0,2uL
Viabilidade	Live/Dead	TEXAS - RED	0,6 uL

Legenda: *APC – Cy7: alofococianina; Cy-chrome 7; PE – Cy7: ficoeritrina; Cy-chrome 7; APC: alofococianina ; PerCP: peridinin chlorophyll protein ; PE: ficoeritrina ; FITC: Isotiocianato de fluoresceína ; BD: BD Biosciences, San Diego, CA, EUA.

Após a adição dos anticorpos monoclonais, as células permaneceram sob incubação por 30 minutos no escuro e na sequência ao término da incubação, as placas foram centrifugadas a 250 xg por 10 minutos em temperatura de 20°C, o sobrenadante

foi desprezado e o volume de cada poço foi completado com 100 μ L de PBS, sendo este procedimento de lavagem repetido 2 vezes.

Finalizando a técnica de imunofenotipagem de superfície, em cada poço das placas foram pipetados 500 μ L de Paraformaldeído a 1% (PFA 1%), o qual foi composto por 9 ml de PBS (1x) e 1 ml de Paraformaldeído (10x) (Sigma®), visando promover a fixação dos anticorpos monoclonais às células.

A partir desta etapa foi realizada a marcação intracitoplasmática para a identificação das citocinas: IL-2 em APC e IFN- γ em FITC. Em seguida as células foram transferidas, respectivamente para microtubos (Fisherbrand®, Houston, TX) previamente identificados e permaneceram armazenadas sob refrigeração até o momento da leitura no citômetro de fluxo, modelo Canto (Bioscience®) capaz de adquirir e analisar eventos em 8 cores.

A aquisição das amostras foi feita adquirindo-se 300.000 eventos na região de linfócitos e os resultados foram analisados no programa FLOWJO versão 8.7.1.

As subpopulações de linfócitos T foram identificadas a partir da seguinte estratégia (Figura 5):

(A) **(B)**

(C)

(D)

Figura 3. Estratégia de análise para caracterização fenotípica de Linfócitos T

Legenda: (A) Analisando FSC-A (tamanho em área) e FSC-H (tamanho em altura) é possível identificar as células que foram adquiridas no citômetro de fluxo. No último *dotplot* foi possível identificar linfócitos CD3⁺. (B) Identificação de Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. (C e D) Identificação de Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória CCR7⁺ e CD45RA⁺ e linfócitos T de memória com produção de IL2 e IFN- γ .

Na figura 6, observamos a estratégia de análise para identificação das subpopulações de linfócitos T de memória de maneira simplificada:

Figura 4. Análise por citometria de fluxo dos subtipos de linfócitos T em indivíduo saudável

Legenda: No gráfico à direita foi feito um *gate* para $CD8^+$ utilizando a fluorescência PerCp-Cy5. Em seguida, utilizando-se as fluorescências PE-Cy7 e PE foi possível identificar os linfócitos T de memória central ($CD45^+RA^-CCR7^+$) (1), linfócitos T *naive* ($CD45^+RA^+CCR7^+$) (2), linfócitos T de memória altamente diferenciada ($CD45^+RA^+CCR7^-$) (3) e linfócitos T de memória efetora ($CD45^+RA^-CCR7^-$) (4). À esquerda foi feito um *gate* para $CD4^+$ utilizando a fluorescência APC-Cy7. A seguir, utilizando-se as fluorescências PE-Cy7 e PE identificou-se linfócitos T de memória central ($CD45^+RA^-CCR7^+$) (1), linfócitos T *naive* ($CD45^+RA^+CCR7^+$) (2), linfócitos T de memória altamente diferenciada ($CD45^+RA^+CCR7^-$) (3) e linfócitos T de memória efetora ($CD45^+RA^-CCR7^-$) (4). A análise da citometria de fluxo foi feita no FACSCanto™ utilizando o Diva software (BD Biosciences).

Determinação da dosagem sérica de Imunoglobulinas

O nível sérico de imunoglobulinas G, A e M nos pacientes com ICV vacinados foi mensurado antes de administração da IVIG, pelo método de nefelometria de acordo com instruções do fabricante, no Laboratório Central do HC-FMUSP. Os valores foram apresentados em mediana.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism* 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Para a análise das características clínicas, inicialmente o teste Skweness-kurtosis foi realizado para verificar a normalidade dos resultados. A partir deste teste preliminar, os resultados que apresentarem $p > 0,05$ foram considerados normais.

Os resultados que apresentarem $p < 0,05$ no teste Skweness-kurtosis foram considerados não normais e para eles, quando se apresentaram não pareados foi aplicado o teste *Mann-Whitney*. Para os resultados pareados, o teste Wilcoxon bicaudal ou o teste de Friedman foram utilizados. Estes resultados foram apresentados por meio de mediana e intervalo interquartil.

A avaliação da frequência das subpopulações de linfócitos T para todos os períodos estudados, foi feita através do 2-WAY ANOVA *test* e os resultados foram apresentados em média e desvio padrão.

Valores estatisticamente significantes foram considerados quando: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***)

4. Resultados

Casuística

Para este estudo, foram descritas as características clínicas e demográficas dos 16 pacientes com ICV vacinados contra influenza.

A mediana da idade dos pacientes vacinados foi de 39,50 (29-58) anos, sem preferência de sexo. A mediana de idade do início dos sintomas foi de 18,5 (16,5-24,2) anos e a mediana de idade no diagnóstico foi de 29 (22,8-45,5) anos. Portanto, a mediana do atraso no diagnóstico para esse grupo de pacientes foi de 7,50 (4-21,5) anos. Entre os controles, a mediana de idade foi de 32,5 (27-39,5) anos e tivemos 5 indivíduos do sexo masculino e 11 do sexo feminino. Não houve diferença significativa em relação à idade e gênero entre os pacientes e controles.

Dos 16 pacientes avaliados, todos eram sintomáticos e as manifestações mais frequentes foram as infecções respiratórias de repetição, acometendo 94% dos indivíduos. As manifestações infecciosas mais comuns no período que corresponde o diagnóstico e a administração das vacinas foram: pneumonia, seguido de sinusite e IVAS. Em relação às bronquiectasias, 31% dos pacientes apresentavam imagens radiológicas sugestivas e compatíveis com o quadro clínico. Esplenomegalia foi confirmada por exame de USG (ultrassom) abdominal em 44% dos pacientes. Linfadenopatia foi encontrada em 19% dos pacientes. Apenas um paciente teve o diagnóstico de neoplasia tratada anteriormente ao estudo.

Doenças autoimunes foram observadas em 31% dos pacientes, dentre elas tireoidite, retocolite ulcerativa, pancitopenia autoimune, PTI (púrpura trombocitopênica), gastrite atrófica e vitiligo. Dois pacientes tiveram diagnóstico de citopenia autoimune. Os pacientes que apresentavam autoimunidade apresentavam-se

fora de atividade da doença e não estavam usando imunossupressores ou corticoide sistêmico. Em nenhum paciente notou-se a presença de granulomas.

Dois pacientes ICV apresentavam sinais e sintomas de uma ou mais doenças atópicas como rinite, asma e/ou rinoconjuntivite.

Tabela 5. Características clínicas e demográficas dos pacientes ICV

Características	ICV vacinados (n=16)	Controles saudáveis vacinados (n=16)
Idade (anos, mediana) **	39,5(29-58)	32,5 (27-39,5)
M/F	8/8	5/11
Início dos sintomas	18,5(16,5-24,25)	-
Idade do diagnóstico	29 (22,75-45,5)	-
Retardo no diagnóstico	7,5(4-21,5)	-
Duração da doença	18,5(10,5-37,5)	-
Infecções respiratórias	15(94%)	-
Esplenomegalia	7(44%)	-
Linfadenopatia	3(19%)	-
Bronquiectasias	5(31%)	-
Citopenias	2(13%)	-
Autoimunidade	5(31%)	-
Neoplasia (Intestino)	1(6%)	-
Manifestações Gastrointestinais	11(69%)	-
Atopia (Asma, Rinite, rinoconjuntivite)	2(13%)	-
Hospitalizações	9 (56%)	-
Vacinação prévia Influenza (H3N2)	4 (25%)	-
Antibiótico profilático	12 (75%)	-

Legenda: Não houve diferença entre pacientes ICV e controles saudáveis em relação à idade e sexo. **Mediana - IQR p50 (p25 - p75), IC 95%

Segurança

É importante enfatizar que a vacinação foi segura em todos os pacientes e controles. Os eventos adversos foram classificados leves autolimitados. Dor, nódulo discreto, calor e hiperemia no local da aplicação da vacina sem necessidade de

tratamento específico foram os eventos reportados em 4 pacientes e dois indivíduos saudáveis.

Não foi observado nenhum evento grave e nem exacerbação de doenças associadas. Doenças neurológicas autoimunes após vacinação contra influenza, como a síndrome de Guillain-Barré, encefalomielite aguda ou mielite transversa não foram observados no grupo estudado.

Dosagem sérica de Imunoglobulinas

Os níveis séricos de imunoglobulinas foram avaliados antes da vacinação. A mediana do nível sérico de IgG durante o estudo foi de 749 mg / dl (674-840), IgA 4 mg / dl (4-4) e IgM 4 mg / dl (4-15). A mediana dos níveis basais de IgG antes do início do tratamento (reposição da IgIV) foi de 220 mg / dl. As contagens de células sanguíneas estavam dentro da faixa normal em todos os pacientes (Tabela 6).

Tabela 6. Dosagens de Imunoglobulinas e linfócitos T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺

	Valores normais	Média	DP	Mediana	25th	75th
IgG (mg/dl)	739-1390	749,5	140,11	749	674	840,75
IgA (mg/dl)	84-354	5,4	3,49	4	4	4
IgM (mg/dl)	81-167	18,1	34,42	4	4	14,5
Linfócitos T		2165	1319,0	2000	1600	2905
CD3%	60-80	74,1	16,03	66	64	91
CD3 total/mm ³	844-1943	2052	1094,48	1969	1300,5	2430
CD4%	60-70	27,9	13,38	26,4	18,5	36
CD4 total/mm ³	476-813	591	337,02	575,5	288,5	763,5
CD8%	30-40	42,3	18,06	42	31	55,5
CD8 total/mm ³	248-724	968	396,40	1006	608	1238,25

Subpopulações de Linfócitos T *naive* e de memória

Foram estudadas quatro subpopulações de LT em amostras de CMSP (células mononucleares de sangue periférico) e controles estimulados com lisado viral e o peptídeo hemaglutinina (HA) de *Influenza* nos tempos pré, 30 dias, 60 dias e 180 dias

após a vacinação. Devemos considerar em relação a coleta das amostras: nos períodos pré e 1 mês após a vacinação foram coletadas amostras dos 16 pacientes e dos 16 controles. No terceiro mês do estudo, foram coletadas amostras 13 pacientes e 12 dos controles, e no sexto mês, amostras de oito pacientes e 11 controles.

Os resultados apresentados referem-se às frequências (%) de células T *naive* (CCR7⁺ CD45RA⁺), células T de memória central (TCM, CCR7⁺ CD45RA⁻), células T de memória efetora (TEM, CCR7⁻CD45RA⁻) e células T de memória efetoras terminalmente diferenciadas CD45RA (TEMRA, CCR7⁻CD45RA⁺) em CMSP de pacientes com ICV e controles saudáveis após a vacinação influenza.

A figura 7, representa uma análise comparativa entre subpopulações de linfócitos T CD4⁺ *naive*, TCM, TEM e TEMRA em pacientes ICV e controles. A análise percentual das subpopulações de linfócitos T dos pacientes ICV foi realizada com base no grupo de indivíduos saudáveis. Para esta análise, consideramos a condição não estimulada (controle negativo, RPMI). Em pacientes com ICV, há uma menor frequência de células T CD4⁺ *naive* em relação aos controles no período pré vacinal e uma maior frequência de células T CD4⁺ TEM em condições basais tanto nos períodos pré e pós vacinação. Em T CD4⁺ TCM e TEMRA não observamos diferenças significativas entre controles e pacientes, exceto pela maior frequência de TCM em controles após 6 meses da vacinação.

Figura 5. Frequência das subpopulações de Linfócitos T CD4⁺ *naive*, TCM, TEM e TEMRA pré e pós vacinação contra influenza na condição basal (não estimulada). Comparação entre pacientes e controles. Os resultados foram expressos como média da porcentagem da frequência para as subpopulações de LT CD4⁺ de controles saudáveis e pacientes ICV. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***).

A comparação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ *naive*, TCM, TEM e TEMRA pré e pós vacinação contra influenza após cultura celular de 6 dias utilizando o estímulo lisado viral de influenza, revelou uma frequência reduzida de células T *naive* em controles pacientes e níveis elevados de TEM em todos os períodos estimulados sem diferença estatística entre controles e pacientes. No entanto, ao observamos o gráfico que representa os linfócitos CD4⁺ TEMRA estimulados com o lisado viral, notamos que

os pacientes ICV tem uma maior frequência de células nos períodos de 1 mês e 3 meses após a vacinação quando comparados aos controles, como observado na figura 8.

Figura 6. Frequência das subpopulações de Linfócitos T CD4⁺ naive, TCM, TEM e TEMRA pré e pós vacinação contra influenza após cultura de 6 dias com o lisado viral de influenza.

Comparação entre pacientes e controles. Os resultados foram expressos como média da porcentagem da frequência para as subpopulações de LT CD4⁺ de controles saudáveis e pacientes ICV. Valores estatisticamente significantes foram representados por p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), P < 0,001 (***)

A análise das subpopulações de Linfócitos T CD4⁺ naive, TCM, TEM e TEMRA após cultura com o estímulo hemaglutinina (HA) (figura 9), demonstrou uma frequência muito reduzido de células naive em todos os períodos avaliados sem diferença entre controles e pacientes. As TEM quando estimuladas apresentaram uma

frequência elevada nos dois grupos (pacientes e controles) em todos os períodos. Em relação as TCM verificamos maior frequência dessa subpopulação linfocitária em controles saudáveis comparados aos pacientes ICV, 30 dias após a vacinação. Os linfócitos TEMRA apresentaram maior frequência nos pacientes ICV do que os controles após um mês da vacinação com valores estatisticamente significativos.

Figura 7. Frequência das subpopulações de Linfócitos T CD4⁺ *naive*, TCM, TEM e TEMRA pré e pós vacinação contra influenza após cultura de 6 dias com o estímulo peptídeo hemaglutinina.

Comparação entre pacientes e controles. Os resultados foram expressos como média da porcentagem da frequência para as subpopulações de LT CD4⁺ de indivíduos controles e pacientes ICV. Valores estatisticamente significantes foram representados por p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***)

Ao analisarmos a frequência das subpopulações de linfócitos T CD8⁺ *naive*, TCM, TEM e TEMRA pré e pós vacinação contra influenza na condição basal (não estimulada), observamos que os indivíduos controles apresentaram maior frequência de células T *naive* em comparação com os pacientes ICV nos períodos pré e após um mês da vacinação. Comparação entre pacientes e controles. O mesmo ocorre com a subpopulação CD8 TCM, os controles apresentam maior frequência que os pacientes ICV, porém nos períodos 1 mês e 3 meses após a vacinação. Ao analisarmos as células T efectoras, TEM e TEMRA, notamos que estas subpopulações estão expressas em maior frequência em pacientes ICV em todos os períodos analisados e nos terceiro e sexto meses, respectivamente. (Figura 10).

Figura 8. Frequência das subpopulações de Linfócitos T CD8⁺ *naive*, TCM, TEM e TEMRA pré e pós vacinação contra Influenza na condição basal (não estimulada).

Comparação entre pacientes e controles. Os resultados foram expressos como média da porcentagem da frequência para as subpopulações de LT CD8⁺ de indivíduos controles e pacientes ICV. Valores estatisticamente significantes foram representados por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Na figura 11 a comparação das subpopulações de linfócitos T CD8⁺ *naive*, TCM, TEM e TEMRA pré e pós vacinação contra influenza após a cultura celular de 6 dias utilizando o estímulo lisado viral, nos mostrou uma frequência reduzida de células T *naive* em controles pacientes e níveis elevados de TEM em todos os períodos estimulados sem diferença estatística entre controles e pacientes. No entanto, ao observarmos o gráfico que representa os linfócitos CD8⁺ TEMRA estimulados com o

lisado viral, notamos que os pacientes ICV tem uma maior frequência de células nos períodos de 1 mês e 6 meses após a vacinação quando comparados aos controles. Linfócitos T CD8 TCM, apresentavam frequência aumentada nos controles saudáveis em comparação com pacientes ICV no período de um mês após a vacinação quando colocados em cultura com o lisado viral de influenza.

Figura 9. Frequência das subpopulações de Linfócitos T CD8⁺ *naive*, TCM, TEM e TEMRA pré e pós vacinação contra influenza após estímulo com lisado viral de influenza (cultura de 6 dias).

Comparação entre pacientes e controles. Os resultados foram expressos como média da porcentagem da frequência para as subpopulações de LT CD8⁺ de indivíduos controles e pacientes ICV. Valores estatisticamente significantes foram representados por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***)

A figura 12, representa a frequência das subpopulações de Linfócitos T CD8⁺ *naive*, TCM, TEM e TEMRA pré e pós vacinação contra influenza após cultura com o peptídeo hemaglutinina em pacientes ICV e controles. Os resultados foram expressos como média da porcentagem da frequência para as subpopulações de LT CD8⁺ de indivíduos controles e pacientes ICV. Como observado na condição estimulada com o lisado viral, não há diferenças estatisticamente significantes entre pacientes ICV e controles saudáveis em relação aos linfócitos T CD8 *naive* e TEM. Em TCM, observamos maior frequência de células em controles saudáveis comparados aos

pacientes ICV no período pós um mês da vacinação. ($p < 0,01$). O oposto pode ser observado em TEMRA, em que observamos maior frequência de células em pacientes ICV. ($p < 0,05$)

Figura 10. Frequência das subpopulações de Linfócitos T CD8⁺ naive, TCM, TEM e TEMRA pré e pós vacinação contra Influenza após cultura com o peptídeo hemagglutina.

Comparação entre pacientes e controles. Os resultados foram expressos como média da porcentagem da frequência para as subpopulações de LT CD8⁺ de indivíduos controles e pacientes ICV. Valores estatisticamente significantes foram representados por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***)

Nas tabelas abaixo (7 e 8) segue o resumo das frequências das subpopulações celulares encontradas em pacientes ICV comparados com o grupo controle.

Tabela7. Frequência das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ em pacientes ICV e controles saudáveis

	Controles	ICV		Referências
LT CD4 ⁺ <i>naive</i>		<	<ul style="list-style-type: none"> Aumento do <i>turnover</i> celular Aumento apoptose em ICV 	Giovannetti A et al, J Immunol. 2007 Mouloit F et al. J Clin Immunol. 2010 Wong GK, Huissoon AP. J Clin Pathol. 2016
LT CD4 ⁺ TEM		>	<ul style="list-style-type: none"> Ativação imune persistente na ICV 	Mouloit F et al. J Clin Immunol. 2010 Wong GK, Huissoon AP. J Clin Pathol. 2016
LT CD4 ⁺ TCM	>		<ul style="list-style-type: none"> Maior frequência em controles > Apoptose TCM em HHV-6. > apoptose em ICV? 	Gupta et al. J. Virol. 2009
LT CD4 ⁺ TEMRA		>	<ul style="list-style-type: none"> Heterogeneidade na frequência de TEMRA Ativação imune persistente 	Tian Y et al. Nat Commun. 2017 Wong GK, Huissoon AP. J Clin Pathol. 2016

Tabela8. Frequência das subpopulações de linfócitos T CD8⁺ em pacientes ICV e controles saudáveis

	Controles	ICV		Referências
LT CD8 ⁺ <i>naive</i>		<	Aumento do <i>turnover</i> celular Aumento apoptose	Giovannetti A et al, J Immunol. 2007 Mouloit F et al. J Clin Immunol. 2010 Wong GK, Huissoon AP. J Clin Pathol. 2016
LT CD8 ⁺ TEM		>	Ativação persistente na ICV	Mouloit F et al. J Clin Immunol. 2010 Wong GK, Huissoon AP. J Clin Pathol. 2016
LT CD8 ⁺ TCM	>		Maior frequência em controles > Apoptose TCM em HHV-6. > Apoptose em ICV?	Gupta et al. J. Virol. 2009
LT CD8 ⁺ TEMRA		>	Aumento TEMRA observado em ICV com AI e Linfoproliferação	Bateman EAL et al. Clinical and Experimental Immunology. 2012

A figura 13 apresenta uma análise comparativa das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ *naive* em pacientes ICV e controles. A análise percentual das subpopulações de linfócitos T dos pacientes ICV foi realizada com base no grupo de indivíduos saudáveis. Para esta análise, consideramos a condição não estimulada (controle negativo, RPMI). Podemos observar uma redução na frequência de células T CD4⁺ *naive* em pacientes e controles saudáveis 30 dias após a vacinação contra influenza ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente). Em pacientes com ICV, há uma menor frequência de células T CD4⁺ *naive* em relação aos controles e em contrapartida, há maior frequência de células T CD4⁺ TEM, mesmo antes da estimulação. O padrão de resposta observado na condição basal se repete nas condições estimuladas com lisado e HA.

Figura 11. A Frequência da subpopulação de células T CD4⁺ *naive* Pré e Pós Vacinação contra influenza.

Legenda: Diferenciação de células T CD4⁺ em CMSP de controles saudáveis e pacientes ICV realizada por citometria de fluxo. CD45RA e CCR7 foram usados para definir células efectoras naive (N: CD45RA⁺ CCR7⁺). Os resultados são expressos em média de porcentagem dos valores obtidos para os dois grupos de indivíduos em três condições (Basal, Lisado e HA) nos períodos pré, 1, 3 e 6 meses pós vacina influenza. Valores estatisticamente significantes foram representados por p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), P < 0,001 (***).

Na figura 14, apresentamos os dados da subpopulação de linfócitos T CD4⁺TCM em pacientes ICV e controles. Observamos uma redução significativa na frequência da TCM em ambos os grupos pré e pós-vacinação (p < 0,001 e p < 0,001, respectivamente). Porém, notamos maior frequência de TCM em ICV quando comparados com os controles, na condição sem estímulo (Basal).

Figura 12. A Frequência da subpopulação de células T CD4⁺ TCM Pré e Pós Vacinação contra influenza.

Legenda: Diferenciação de células T CD4⁺ em CMSP de controles saudáveis e pacientes ICV realizada por citometria de fluxo. CD45RA e CCR7 foram usados para definir células memória central (TCM: CD45RA-CCR7⁺). Os resultados são expressos em **média de porcentagem** dos valores obtidos para os dois grupos de indivíduos em três condições (Basal, Lisado e HA) nos períodos pré, 1, 3 e 6 meses pós-vacina influenza. Valores estatisticamente significantes foram representados por p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), P < 0,001 (***).

Em relação aos linfócitos T CD4 TEM, em controles saudáveis, observamos um aumento na frequência dessas células após a estimulação com a vacina influenza (p < 0,001) (figura 15). Nos pacientes com ICV, observamos um aumento na frequência de TEM, porém não houve diferença estatística. Os pacientes ICV apresentavam uma frequência aumentada de TEM em relação aos controles em condições basais. A frequência de TEM mantém-se elevada em todos os períodos analisados sugerindo que

os linfócitos T efetores estejam constantemente ativados na ICV. Não observamos diferenças entre as TEM entre as condições basal e estimuladas com lisado viral e hemaglutinina (HA).

Figura 13. A Frequência da subpopulação de células T CD4⁺ TEM pré e pós vacinação contra influenza.

Legenda: diferenciação de células T CD4⁺ em CMSP de controles saudáveis e pacientes ICV realizada por citometria de fluxo. CD45RA e CCR7 foram usados para definir células memória central (TEM: CD45RA⁺CCR7⁻). Os resultados são expressos em média de porcentagem dos valores obtidos para os dois grupos de indivíduos em três condições (Basal, Lisado e HA) nos períodos pré, 1, 3 e 6 meses pós vacina Influenza. Valores estatisticamente significantes foram representados por p <0,05 (*), p <0,01 (**), P <0,001 (***)

No compartimento CD4 TEMRA, observamos frequências divergentes entre controles e pacientes ICV, principalmente em condições basais. Enquanto existe um aumento na frequência de TEMRA após a vacinação em pacientes ICV, notamos uma

redução dessa subpopulação nos controles saudáveis (não foram estatisticamente significativos). Em condições estimuladas (lisado viral e HA), observamos aumento da frequência em TEMRA em controles e pacientes ICV após 3 meses da vacinação. Observamos que a frequência de TEMRA em pacientes ICV é superior aos controles saudáveis. (figura 16)

Figura 14. A Frequência da subpopulação de células T CD4⁺ TEMRA pré e pós vacinação contra influenza.

Legenda: diferenciação de células T CD4⁺ em CMSP de controles saudáveis e pacientes ICV realizada por citometria de fluxo. CD45RA e CCR7 foram usados para definir células memória efetora terminalmente diferenciadas (TEMRA: CD45RA⁺CCR7⁻). Os resultados são expressos em **média de porcentagem** dos valores obtidos para os dois grupos de indivíduos em três condições (Basal, Lisado e HA) nos períodos pré, 1, 3 e 6 meses pós-vacina Influenza. Valores estatisticamente significantes foram representados por p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), P < 0,001 (***)

Tabela 9. Frequência das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ em pacientes ICV e controles saudáveis antes e após estímulos

	Controles	ICV	Observações	Referências
LT CD4⁺ <i>naive</i>	↓	↓	<ul style="list-style-type: none"> Diferenciação em TCM e TEM após estímulo vacinal 	Mouloit F et al. J Clin Immunol. 2010 Wong GK, Huissoon AP. J Clin Pathol. 2016 Sallusto F. Annu Rev. Immunol. 2004
LT CD4⁺ TEM	↑	↔	<ul style="list-style-type: none"> Diferenciação em TEM após vacina em controles Ativação persistente na ICV 	Mouloit F et al. J Clin Immunol. 2010 Wong GK, Huissoon AP. J Clin Pathol. 2016
LT CD4⁺ TCM	↓	↓	<ul style="list-style-type: none"> Diferenciação TCM em TEM Migração TCM órgãos linfóides e tecidos 	Sallusto F. Annu Rev. Immunol. 2004
LT CD4⁺ TEMRA	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> Heterogeneidade na frequência de TEMRA. Dados conflitantes Ativação imune persistente ICV 	Tian Y et al. Nat Commun. 2017 Wong GK, Huissoon AP. J Clin Pathol. 2016

Na Figura 17, em relação à subpopulação de T CD8⁺ *naive*, não observamos diferenças entre as frequências celulares de pacientes ICV em relação aos períodos pré e pós vacinais; exceto, pela redução na frequência de *naive* quando analisamos as células em cultura com o lisado viral entre os períodos pré e um mês após a vacina. Observamos uma maior frequência entre as células T CD8⁺ *naive* dos controles saudáveis em comparação com os pacientes ICV em condições basais entre os períodos pré e pós vacina. (p = 0,0025).

Figura 15. A Frequência da subpopulação de células T CD8⁺ *naive* pré e pós vacinação contra influenza.

Legenda: diferenciação de células T CD8⁺ em CMSP de controles saudáveis e pacientes ICV realizada por citometria de fluxo. CD45RA e CCR7 foram usados para definir células *naive* (*naive*: CD45RA⁺CCR7⁺). Os resultados são expressos em média de porcentagem dos valores obtidos para os dois grupos de indivíduos em três condições (Basal, Lisado e HA) nos períodos pré, 1, 3 e 6 meses pós vacina influenza. Valores estatisticamente significantes foram representados por p <0,05 (*), p <0,01 (**), p <0,001 (***)

Ao avaliarmos os linfócitos T CD8⁺ TCM, verificamos que há uma redução em sua frequência em pacientes ICV após a vacinação contra influenza, enquanto nos

controles observamos um aumento desta subpopulação em condições basais no terceiro mês após a vacinação. Em relação à frequência de células estimuladas com antígenos específicos, notamos uma redução na frequência em todos os tempos e estímulos (Lisado e HA). Ao final do sexto mês pós vacina Influenza, as TCM atingiram a sua menor frequência (Figura 18).

Figura 16. A Frequência da subpopulação de células T CD8⁺ TCM pré e pós vacinação contra influenza.

Legenda: diferenciação de células T CD8⁺ em CMSP de controles saudáveis e pacientes ICV realizada por citometria de fluxo. CD45RA e CCR7 foram usados para definir células TCM (TCM: CD45RA⁺CCR7⁺). Os resultados são expressos em média de porcentagem dos valores obtidos para os dois grupos de indivíduos em três condições (Basal, Lisado e HA) nos períodos pré, 1, 3 e 6 meses pós vacina Influenza. Valores estatisticamente significantes foram representados por p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***)

Ao analisar células T CD8⁺ TEM, notamos que as células de memória efectoras em indivíduos saudáveis respondem intensamente aos estímulos específicos quando colocadas em cultura e mantêm-se em níveis elevados até o sexto mês após vacinação. Interessantemente, os pacientes ICV tem uma frequência elevada de TEM desde a condição pré vacinal, observação que corrobora com os dados de outros estudos que mostraram que a frequência celular elevada neste grupo de pacientes acontece em decorrência de mecanismos de ativação e exaustão celular por infecções crônicas e/ou recorrentes na ICV ($p < 0,001$). (Figura 11) Vale a pena ressaltar que os indivíduos ICV também mantêm frequências elevadas de TEM CD8 antígeno-específicas ao longo do tempo especialmente quando estimuladas com a HA nos 3 e 6 meses após a vacinação. Em condições basais, observamos uma redução da frequência de TEM no sexto após a vacinação, sugerindo que nos primeiros três meses após a vacinação as TEM se expandiram atuando efetivamente na resposta imune esperada. Após este período, as TCM responsáveis pela manutenção da memória, retornariam ao seu estado anterior de maior frequência (Figura 19).

Figura 17. A Frequência da subpopulação de células T CD8⁺ TEM pré e pós vacinação contra influenza.

Legenda: diferenciação de células T CD8⁺ em CMSP de controles saudáveis e pacientes ICV foi realizada por citometria de fluxo. CD45RA e CCR7 foram usados para definir células TEM (TEM: CD45RA⁺CCR7⁻). Os resultados são expressos em média de porcentagem dos valores obtidos para os dois grupos de indivíduos em três condições (Basal, Lisado e HA) nos períodos pré, 1, 3 e 6 meses pós vacina influenza. Valores estatisticamente significantes foram representados por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

E por fim, no compartimento CD8 TEMRA, houve um aumento na frequência de células dos pacientes ICV em todas as condições, estimulado e não estimulado ($p =$

0,0030) atingindo o pico após 30 dias da vacinação, seguidos de uma redução na frequência de TEMRA a partir do terceiro mês. Os dados apresentados demonstraram que houve resposta celular inespecífica, mas principalmente uma potente resposta efetora antígeno-específica nos pacientes ICV. Essa observação pode ser feita nos controles saudáveis após a cultura celular com estímulos específicos (lisado e HA). Nota-se que a frequência de TEMRA em todas as condições após um mês da vacinação em pacientes ICV é proporcionalmente superior à frequência encontrada nos controles saudáveis (figura 20).

Figura 18. A Frequência da subpopulação de células T CD8⁺ TEMRA pré e pós vacinação contra influenza.

Legenda: diferenciação de células T CD8⁺ em CMSP de controles saudáveis e pacientes ICV foi realizada por citometria de fluxo. CD45RA e CCR7 foram usados para definir células TEMRA (TEMRA: CD45RA⁺CCR7⁻). Os resultados são expressos em média de porcentagem dos valores obtidos para os dois grupos de indivíduos em três condições (Basal, Lisado e HA) nos períodos pré, 1, 3 e 6 meses pós vacina influenza. Valores estatisticamente significantes foram representados por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Tabela 10. Frequência das subpopulações de linfócitos T CD8⁺ em pacientes ICV e controles saudáveis antes e após estímulos

	Controles	ICV	Observações	Referências
LT CD8⁺ naive	↓	↔	<ul style="list-style-type: none"> Diferenciação em TCM e TEM 	Giovannetti A et al, J Immunol. 2007 Moulloit F et al. J Clin Immunol. 2010 Wong GK, Huissoon AP. J Clin Pathol. 2016
LT CD8⁺ TEM	↑	↔	<ul style="list-style-type: none"> Diferenciação em TEM após vacina em controles Ativação persistente na ICV 	Moulloit F et al. J Clin Immunol. 2010 Wong GK, Huissoon AP. J Clin Pathol. 2016
LT CD8⁺ TCM	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> Redução em ICV – diferenciação? Apoptose? Controles:comportamento diferente do CD4⁺ 	Sallusto F. Annu Rev. Immunol. 2004
LT CD8⁺ TEMRA	↑	↑	<ul style="list-style-type: none"> Diferenciação em TEMRA após vacina 	Tian Y et al. Nat Commun. 2017 Wong GK, Huissoon AP. J Clin Pathol. 2016 Sallusto F. Annu Rev. Immunol. 2004

Na figura abaixo (figura 21 e 22) demonstramos a cinética dos linfócitos T *naive* e de memória ao longo dos períodos pré e pós vacinal (um, três e 6 meses). Os gráficos resumem o que foi apresentado até o momento em relação à diferenciação dos subtipos de células T frente aos estímulos específicos. Nota-se que os pacientes ICV apresentam frequências de linfócitos T *naive* geralmente reduzidos em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e que as células efectoras TEM estão persistentemente aumentadas em frequência.

Figura 19. Representação da cinética das subpopulações de Linfócitos T CD4⁺ em pacientes ICV e controles saudáveis.

Legenda: Representação da cinética das subpopulações de Linfócitos T CD4⁺ em pacientes ICV e controles saudáveis. Os resultados são expressos em média de porcentagem dos valores obtidos para os dois grupos de indivíduos nos períodos pré, 1, 3 e 6 meses pós vacina influenza. Valores estatisticamente significantes foram representados por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Figura 20. Representação da cinética das subpopulações de Linfócitos T CD8⁺ em pacientes ICV e controles saudáveis.

Legenda: Representação da cinética das subpopulações de Linfócitos T CD8⁺ em pacientes ICV e controles saudáveis. Os resultados são expressos em média de porcentagem dos valores obtidos para os dois grupos de indivíduos nos períodos pré, 1, 3 e 6 meses pós-vacina influenza. Valores estatisticamente significantes foram representados por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Análise funcional dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno-específicos

A capacidade funcional dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em produzir citocinas em resposta a vacina influenza, foi avaliada nos períodos pré e um mês após a vacinação em pacientes ICV e controles saudáveis. A Figura 23 mostra a frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IL-2⁺ e IFN- γ ⁺ antes e depois da vacinação.

Em relação aos linfócitos T CD4⁺IL-2⁺, observamos um aumento significativo da frequência celular após a vacinação contra influenza em ambos os grupos (controles saudáveis, $p = 0,0346$ e pacientes ICV, $p = 0,0416$). Não houve diferença nas frequências celulares entre os pacientes ICV e controles saudáveis. Ainda no compartimento T CD4⁺, não observamos mudanças na frequência das células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ ⁺ em ambos os grupos. No entanto, observamos que no período pré-vacinal, controles saudáveis apresentaram maior frequência de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ quando comparadas aos pacientes ICV vacinados ($p = 0,0032$). Nos chama atenção, o prejuízo na produção de citocinas observado nos pacientes ICV.

Dentro do compartimento de células T CD8⁺, observamos um aumento estatisticamente significativo na frequência de células T CD8⁺ IL-2⁺ após a vacinação contra influenza em pacientes com ICV e controles saudáveis ($p = 0,0088$ e $p < 0,0024$, respectivamente).

Em relação à frequência de linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺, observamos aumento na frequência dessas células um mês após a vacinação em controles e pacientes ICV ($p = 0,0021$ e $p = 0,034$, respectivamente). Mais uma vez, observamos uma maior frequência de células produtoras de IFN- γ ⁺ em controles saudáveis quando comparados aos pacientes ICV em condições basais e após vacinação ($p < 0,0001$). Este resultado

demonstra que há um comprometimento na produção de citocinas em indivíduos ICV já descrito em outros estudos.

Figura 21. A, B, C e D. Frequência de Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de citocinas IL-2⁺ e IFN-γ⁺ em pacientes ICV e controles saudáveis.

Legenda: Os resultados são expressos em média de porcentagem dos valores obtidos para os dois grupos de indivíduos nos períodos pré e um mês após a vacina influenza. Valores estatisticamente significantes foram representados por $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***)

5. Discussão

As complicações infecciosas bacterianas e virais estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com imunodeficiências. A vacinação é uma medida eficaz e importante neste grupo de pacientes. No entanto, a resposta às vacinas depende do grau de imunossupressão e do compartimento imunológico envolvido (98).

Em março de 2009, um surto de infecção pelo vírus influenza A H1N1 foi detectado (88). Nesse contexto, a vacinação de pacientes imunossuprimidos é de suma importância, dada a maior suscetibilidade a infecções, incluindo a influenza.

A imunodeficiência comum variável é a imunodeficiência clinicamente relevante mais prevalente. É caracterizada principalmente por infecções recorrentes, como sinusites, pneumonias e infecções das vias aéreas superiores (2,8,103).

Neste estudo, as características epidemiológicas dos pacientes ICV vacinados contra influenza foram semelhantes aos dados encontrados na literatura (2,103,108). Observamos um atraso no diagnóstico de 7,5 anos, um fator preocupante principalmente pelas potenciais complicações que esses pacientes podem apresentar devido às infecções recorrentes. Cunningham-Rundles e col. observaram um atraso no diagnóstico de 6 a 8 anos em um grupo de pacientes com ICV, entretanto, em uma revisão recente, Bonilla 2016 e col., sugerem que nos últimos anos há o reconhecimento mais rápido dessa doença (2,108).

Considerando as manifestações clínicas, as infecções respiratórias foram as mais frequentes, afetando cerca de 94% dos pacientes. As bronquiectasias foram observadas em 31% dos pacientes vacinados e, como esperado, essas alterações pulmonares foram mais comuns em indivíduos que tinham antecedentes de pneumonias recorrentes. Os

dados apresentados mostram a importância do diagnóstico precoce e tratamento da ICV, a fim de reduzir o risco de desenvolvimento de sequelas graves e incapacitantes.

Em relação à atopia, apenas dois pacientes apresentavam manifestações compatíveis com rinite, asma e/ou rinoconjuntivite. Em nossa coorte, Agondi e col., avaliaram 72 pacientes com ICV associados a sintomas de rinite. Devemos considerar que a rinite persistente está associada ao aumento do risco de rinosinusite infecciosa, e tal fato pode ser agravado em pacientes com imunodeficiências (109). Neste contexto, a vacinação contra influenza está indicada por dois motivos, a própria imunodeficiência e a presença de doenças alérgicas respiratórias.

A frequência de autoimunidade, esplenomegalia e linfadenopatia entre os pacientes ICV deste estudo foi semelhante ao reportado em outros grupos. Esses achados poderiam estar correlacionados com as infecções recorrentes ou talvez o resultado da desregulação imunológica característica da ICV (2,108).

Antes da reposição da imunoglobulina humana, todos os pacientes apresentavam níveis muito reduzidos de IgG, o que foi corrigido com a reposição regular de IgIV. Os níveis de IgG permaneceram estáveis durante o período do estudo. Está bem estabelecido que a reposição de IgIV tem um grande impacto na prevenção de infecções, no entanto, em alguns pacientes, como aqueles que apresentam doença pulmonar crônica, a necessidade de ajustes de doses, intervalo e via de administração de IgIV com o objetivo de manter níveis séricos de IgG mais elevados devem ser consideradas concomitantemente ao uso de antibióticos profiláticos (108).

Em estudo anterior, o nosso grupo observou uma redução no número de infecções respiratórias em pacientes ICV após vacinação contra influenza, porém não possível correlacionar esta observação clínica com a produção de anticorpos específicos para influenza. A maioria dos pacientes ICV participantes do estudo apresentavam

níveis de IgG específicos detectáveis para a influenza no período pré-vacinação, embora não apresentassem soroproteção. Após a vacinação, observamos um aumento não significativo nos títulos de anticorpos. Esta hipótese foi confirmada através da dosagem de anticorpos anti-influenza no lote de imunoglobulina humana (IgIV) que seria administrada aos pacientes com ICV. Os pacientes também não tiveram resposta de anticorpos específicos contra o H1N1 após a imunização (107). Diante da melhora clínica observada e ausência de correlação sorológica, Pedreschi e col., analisaram a frequência de subpopulações de linfócitos B antes e após a vacinação. Não foi possível detectar alterações significativas nas subpopulações de células B após a vacinação contra influenza. No entanto, embora a frequência de plasmoblastos em pacientes com ICV mostrou-se significativamente menor do que em controles saudáveis no início do estudo, plasmoblastos de pacientes com ICV aumentaram consideravelmente 30 dias após a vacinação, alcançando frequência semelhante àquela observada em controles saudáveis (52).

A presença de IgG específica para influenza em pacientes antes da vacinação pode ser explicada pela exposição prévia ao antígeno da influenza, uma vez que esses pacientes apresentam um grande número de infecções de vias aéreas, ou pela transmissão passiva de imunoglobulina humana (110). Gardulf e col. avaliaram 40 pacientes com ICV vacinados contra Influenza H1N1 (Pandemrix). Os autores avaliaram o fenótipo clínico, produção de anticorpos, subtipos de linfócitos B e características genéticas. Eles observaram que apenas 16% dos pacientes apresentavam anticorpos específicos para influenza após a vacinação, e a resposta estava correlacionada com fenótipos de linfócitos B específicos (111). No entanto, neste estudo, os autores não avaliaram a eficácia clínica e a resposta imune celular a vacina.

Embora Junker e col., reportem que os pacientes com ICV não responderiam a vacina influenza, os autores se limitaram a discutir a não recomendação da vacina baseados no principal mecanismo fisiopatológico da ICV, que é a resposta inadequada a produção de anticorpos. Com base nos dados da literatura e nos mecanismos conhecidos de resposta imune, possivelmente outros mecanismos imunológicos estão envolvidos na proteção após a vacinação com antígenos proteicos que podem explicar a resposta clínica observada em nosso estudo anterior (107). Um desses mecanismos poderia ser a modulação de células T a uma resposta imune independente de linfócitos B e da produção de anticorpos (97,106,112).

Graham & Braciale avaliaram a resposta celular de linfócitos T efetores CD4 e CD8 em camundongos deficientes de linfócitos B após desafio com doses subletais do vírus influenza A. Os autores observaram que os animais com deficiência de células B inoculados com doses de influenza A apresentaram uma resistência aumentada à infecção pelo vírus influenza. Os resultados sugerem que linfócitos T de memória podem atuar independentemente da produção de anticorpos, conferindo resistência à infecção por influenza em indivíduos vacinados. Esta observação nos dirige à discussão de que a vacina influenza é capaz de gerar uma resposta celular antígeno-específica em pacientes com imunodeficiências predominantemente de anticorpos, como a ICV (93).

No presente estudo, a redução na frequência de células T *naive* observada nos controles saudáveis e pacientes ICV após a vacinação, reflete a hipótese da diferenciação de células T *naive* em células T de memória efetora após estímulos antigênicos observada em outros estudos. No entanto, a frequência de células T *naive* em pacientes ICV foi menor que a frequência de células T encontrada nos controles saudáveis em condições basais. Segundo Wong e cols., os pacientes com ICV têm uma frequência menor de células T CD4⁺ e CD8⁺ *naive* em comparação com indivíduos

saudáveis. As outras subpopulações de linfócitos T estão ligeiramente aumentadas ou normais em frequência, demonstrando que a linfopenia de células T observada em pacientes com ICV é principalmente devido à menor frequência de células T CD4 *naive* (113). A redução da frequência de células T CD4 *naive* observada em nosso estudo sugere que esse subtipo celular se diferencie em linfócitos T efetores após a vacinação, caracterizando uma resposta celular dinâmica mesmo em pacientes com imunodeficiências.

Jürchott e col. avaliaram a resposta imune celular de 37 indivíduos que receberam a vacina influenza A (H1N1) pdm2009, A (H3N2) Perth, B. A resposta sorológica foi avaliada e correlacionada com os linfócitos T CD4. Os autores concluíram que tanto as células T CD4 quanto as T CD4 *naive* foram consideradas como bons correlatos de proteção para a vacina Influenza A (H1N1), mas não para A (H3N2) Perth ou a influenza B (114).

Em relação à subpopulação CD4 TCM, observamos uma redução significativa na frequência celular em controles saudáveis e ICV após a vacinação. Os linfócitos TCM tem um potencial de auto-renovação, proliferação e diferenciação em células T efectoras. Com base neste princípio, assumimos que a redução na frequência de linfócitos TCM após a estimulação antigênica pela vacina contra influenza é um importante indicador de diferenciação celular em subtipos de células T efectoras (78).

Em relação ao CD4 TEM, como esperado nos controles saudáveis, observamos um aumento em sua frequência após a vacina influenza (78). Interessantemente, os pacientes com ICV já apresentavam uma frequência aumentada de TEM no período pré-vacina. Talvez por este motivo, embora tenhamos observado o aumento na frequência de TEM um mês após a vacinação, este não foi estatisticamente significativo. Tal fato pode ser explicado pela constante ativação celular e pelos mecanismos de exaustão

observados na ICV em decorrência de infecções recorrentes e desregulação imunológica. Dentre as alterações celulares observadas em pacientes com ICV, destacam-se as alterações nos mecanismos de apoptose que podem contribuir para o acúmulo de células T efectoras (49,113). A menor frequência de LT naive e maior frequência de TEM nos pacientes ICV deste estudo comparados aos indivíduos saudáveis são semelhantes aos resultados encontrados na literatura e confirmam a hipótese de que as infecções crônicas podem induzir exaustão celular e comprometimento nos mecanismos de apoptose de linfócitos na ICV.

O aumento na frequência de CD4 TEMRA após a vacina influenza nos pacientes ICV em contraste com a redução da frequência desta subpopulação em controles saudáveis (sem significância estatística) na cultura sem estímulo, demonstram a heterogeneidade na distribuição deste subtipo celular entre indivíduos saudáveis relatados em outros estudos (entre 0,3% e 18 %) (115). Esses achados refletem a carência de dados na literatura sobre a frequência e as funções do TEMRA na resposta imune celular, especialmente na resposta aos vírus. No que se refere à cultura celular, observamos um aumento na frequência de TEMRA na cultura com os estímulos HA e lisado viral em ambos os grupos no terceiro mês após a vacinação. Este dado demonstra que, em pacientes ICV e controles saudáveis, os estímulos antigênicos foram capazes de induzir uma resposta celular antígeno específica. Acreditamos que os linfócitos TEMRA possam desempenhar um papel significativo resposta imune protetora à vacina influenza.

Neste estudo, observamos um aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺ IL-2⁺ após a vacinação contra influenza em pacientes ICV e controles. Sun J e col., descreveram o papel das células T CD4 produtoras de IL-2 no controle da infecção pelo

vírus influenza através da ativação de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) produtores de IL-10. Os autores sugerem que a indução de CTLs produtores de IL-10 durante a infecção por influenza é dependente da presença de IL-27 e células reguladoras, mas é independente de IL-12, IL-21, IL-35 e IFN- γ (116). No presente estudo, não observamos aumento da frequência de CD4⁺ IFN- γ ⁺ após a vacinação dos controles e pacientes ICV. Em contraste, Gianchecchi e col., em artigo de revisão, descreveram o papel da resposta imune celular à vacina influenza enfatizando o importante envolvimento do IFN- γ e a correlação com a produção de anticorpos e expressão gênica (117). Sendo assim, devemos considerar que os linfócitos T CD4⁺ são capazes de produzir IL-2 e/ou IFN- γ após vacinação contra influenza e o perfil de citocinas apresentado é dependente do subtipo de linfócitos T de memória predominante na resposta gerada. Salientamos que Sallusto e col. descreveram o perfil funcional destas células, reforçando que os linfócitos TEM, possuem função efetora imediata e secretam IL-2 e IFN- γ e TEMRA, possuem potente função efetora e secretam principalmente IFN- γ (78).

Observamos uma frequência maior frequência de células T CD8 *naive* em controles saudáveis em comparação com pacientes com ICV em condições basais e estimuladas, conforme descrito Wong e col. Não houve diferença na frequência de células T CD8⁺ entre os períodos pré e 30 dias após a vacinação contra influenza em ambos os grupos. A cultura de células utilizando o estímulo lisado viral se correlacionou com uma redução significativa na frequência de T CD8⁺ *naive* em pacientes ICV, dado que nos leva a refletir sobre a importância dos estímulos antigênicos em induzir mudanças na resposta imune celular.

A redução na frequência CD8 TCM pós-vacina influenza encontrada em pacientes com ICV deste estudo, está de acordo com os dados da literatura que sugerem

a diferenciação de TCM em células T efetoras após o estímulo antigênico. O fenótipo CCR7⁺, marcador de TCM, é perdido após estimulação antigênica, caracterizando a diferenciação de TCM em células efetoras (TEM / TEMRA) (78). Não observamos diferenças em TCM em controles saudáveis.

Ao analisarmos linfócitos T CD8 TEM, observamos um resultado interessante: o aumento na frequência de TEM após estimulação com a vacina influenza em controles saudáveis, demonstra a capacidade das células T CD8⁺ em se diferenciar em outros subtipos celulares colaborando com a resposta imune após a vacinação. Os pacientes ICV apresentaram aumento na frequência de TEM nos pré e 30 dias após a vacinação. Os linfócitos T de pacientes ICV, principalmente T CD8⁺, exibem considerável ativação e marcadores de memória, incluindo CD29, CD38, CD95, CD45RO e antígeno leucocitário humano (HLA) -DR. O aumento da frequência de LT de memória pode ser observado naturalmente em idosos e, curiosamente, este padrão de imunossenescência é observado em pacientes ICV. A presença de uma resposta imune persistente e desregulada que leva à exaustão de células T é descrita em infecções virais crônicas e podemos comparar estas características imunológicas à ICV. As alterações imunológicas descritas na doença são comumente observadas em pacientes com complicações inflamatórias, como proliferação policlonal, enteropatia crônica, doença pulmonar intersticial e autoimunidade. (113).

Observamos que o CD8 TEMRA está aumentado em frequência quando comparamos os períodos antes e depois da vacina influenza em pacientes ICV. A frequência de CD8 TEMRA em indivíduos saudáveis é variável dependendo da exposição antigênica. Verma e col. demonstraram a diferenciação do CD8 TEMRA em dois subtipos distintos: CD57 + TEMRA, considerados células senescentes, com alta capacidade de produção de IFN- γ quando estimulados e maior tendência a apoptose, e

TEMRA CD57-, células com alta capacidade de proliferação e diferenciação (118). Wong e col. descreveram alguns estudos que demonstram o aumento desproporcional da frequência de CD8 TEMRA que expressam CD57 e PD-1 em pacientes com ICV, reforçando que a ativação imune celular persistente e a desregulação imune observadas nestes indivíduos, colaboram para as características imunológicas e fenotípicas da doença (113).

Neste trabalho, o aumento da frequência de TEMRA observado em pacientes ICV após a vacinação contra influenza demonstrou a importância em estudarmos correlatos de proteção mais adequados à vacinação em populações especiais. Além do exposto, pacientes ICV em sua maioria, já entraram em contato anteriormente com o vírus influenza, porém não produzem uma memória imunológica duradoura e eficiente. Considerando que as TEMRA estão presentes na circulação destes indivíduos, mesmo em frequência reduzida como observado no período pré vacinal, doses de reforço da vacina influenza ou vacinas formuladas com maior concentração do antígeno viral podem ser capazes de estimular fortemente a proliferação de TEMRA e induzir uma resposta imune celular.

Na avaliação do CD8⁺IFN- γ ⁺, observamos um aumento na frequência de células produtoras de IFN- γ após a vacina influenza. Tal resultado foi observado em controles e pacientes ICV. Embora os dados sobre a produção intracelular de IFN- γ demonstrem menor magnitude de resposta em ICV, podemos considerar a resposta encontrada como satisfatória em relação à imunidade celular. Devemos avaliar se, nesse grupo de indivíduos imunossuprimidos, doses de reforço com a vacina influenza podem influenciar ou aperfeiçoar a resposta celular / IFN- γ encontrada. Bonilla e col., em artigo de revisão sobre imunizações nas imunodeficiências primárias abordam a

recomendação de administração de duas doses da vacina influenza em imunodeprimidos (104).

Skibinski e colaboradores avaliaram a resposta imune celular após a vacinação contra influenza em 10 indivíduos saudáveis a partir dos seguintes estímulos: vacina trivalente (já licenciada), nova vacina (NPV) com o adjuvante gH1-QBeta e nova vacina sem o adjuvante. Os resultados mostram que ambas as formulações (com e sem adjuvante gH1-Qbeta) induziram respostas de células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para influenza associadas à produção de citocinas (IFN- γ , IL-17A, IL-17F, IL-5, IL-13, IL-9, IL-10 e IL-21), especialmente IFN- γ (119).

O objetivo do presente estudo foi caracterizar fenotipicamente as subpopulações de linfócitos T *naive* e de memória central (TCM), memória efetora (TEM) e efetora terminalmente diferenciada (TEMRA), antes e após a administração da vacina *Influenza* A (H3N2 e H1N1) e B em pacientes ICV. Os peptídeos HA e lisado viral foram capazes de estimular subpopulações de linfócitos T de memória específicos em pacientes ICV e controles saudáveis dependendo do período e condições de estímulos. Os resultados mostraram que em linfócitos T CD4⁺, a vacinação induziu uma resposta predominantemente de IL-2⁺, enquanto no compartimento T CD8⁺ observamos uma resposta de natureza polifuncional com produção de IL-2⁺ e IFN- γ ⁺.

Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que tentar justificar a melhora clínica observada em estudo anterior do grupo, em pacientes com ICV vacinados contra a influenza. Foi possível demonstrar que a imunidade específica de células T de memória foi modificada após a vacinação contra influenza em pacientes ICV. Estudos complementares são necessários para entender outros mecanismos imunológicos e a relação com resposta imune à vacina influenza em imunossuprimidos,

a fim de estabelecermos correlatos de proteção mais eficazes ou complementares em grupos especiais.

6. Conclusões

- No presente trabalho, a caracterização fenotípica de linfócitos T em pacientes ICV e controles saudáveis mostrou que as subpopulações *naive*, TCM, TEM e TEMRA estão presentes nos pacientes ICV em frequências diferentes em relação ao grupo controle em condições basais e após os estímulos específicos.
- A caracterização funcional dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ revelou que a vacina influenza foi capaz de induzir produção de citocinas (IL-2 e IFN- γ) em padrões distintos: em linfócitos T CD4⁺, a vacinação induziu uma resposta predominantemente de IL-2⁺, enquanto no compartimento T CD8⁺ observamos uma resposta de natureza polifuncional com produção de IL-2⁺ e IFN- γ ⁺.
- Em conjunto, os achados deste trabalho sugerem que a vacina influenza é potencialmente capaz de induzir resposta de linfócitos T de memória em pacientes ICV, uma vez que os resultados demonstraram mudanças no padrão de células T *naive* e de memória específicos após a vacinação. Com isso, a redução do número de infecções respiratórias observadas em outro estudo do nosso grupo, pode ser justificada em parte pela atuação dos linfócitos T de memória específicos.

7. Referências Bibliográficas

1. Park MA, Li JT, Hagan JB, Maddox DE, Abraham RS. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *The Lancet*. 2008.
2. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract* [Internet]. janeiro de 2016 [citado 13 de fevereiro de 2019];4(1):38–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26563668>
3. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: Clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol*. 1999;
4. Hong R. Update on the immunodeficiency diseases. *Am J Dis Child* [Internet]. setembro de 1990 [citado 15 de fevereiro de 2019];144(9):983–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2204268>
5. Buckley RH. Immunodeficiency diseases. *JAMA* [Internet]. 25 de novembro de 1992 [citado 15 de fevereiro de 2019];268(20):2797–806. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1433695>
6. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. *Clin Immunol*. 1999;
7. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. 2012;
8. Kokron CM, Errante PR, Barros MT, Baracho G V., Camargo MM, Kalil J, et al. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. *An Acad Bras Cienc*. 2004;
9. Webster ADB. Common variable immunodeficiency. *Immunol Allergy Clin*

- North Am [Internet]. 1 de fevereiro de 2001 [citado 15 de fevereiro de 2019];21(1):1–22. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889856105701909>
10. Kobrynski LJ, Mayer L. Diagnosis and treatment of primary immunodeficiency disease in patients with gastrointestinal symptoms. Clin Immunol [Internet]. junho de 2011 [citado 15 de fevereiro de 2019];139(3):238–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21489888>
 11. Cunningham-Rundles C. How I treat common variable immune deficiency. Blood. 2010.
 12. Genre J, Errante PR, Kokron CM, Toledo-Barros M, Câmara NOS, Rizzo L V. Reduced frequency of CD4+CD25HIGHFOXP3+ cells and diminished FOXP3 expression in patients with Common Variable Immunodeficiency: A link to autoimmunity? Clin Immunol. 2009;
 13. Lopes-da-Silva S, Rizzo LV. Autoimmunity in Common Variable Immunodeficiency. J Clin Immunol [Internet]. 29 de maio de 2008 [citado 17 de fevereiro de 2019];28(S1):46–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443901>
 14. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common Variable immunodeficiency disorders: Division into distinct clinical phenotypes. Blood. 2008;
 15. Tak Manesh A, Azizi G, Heydari A, Kiaee F, Shaghaghi M, Hossein-Khannazer N, et al. Epidemiology and pathophysiology of malignancy in common variable immunodeficiency? Allergologia et Immunopathologia. 2017.
 16. Leone P, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. Common variable immunodeficiency and gastric malignancies. International Journal of Molecular

- Sciences. 2018.
17. Shah JL, Amin SB, Verma N, Mohammed TL. Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease in a Patient With Common Variable Immunodeficiency. *Curr Probl Diagn Radiol*. 2018;
 18. Kestra RW. [House calls to patients with an immunodeficiency disorder]. *Tijdschr Kindergeneesk* [Internet]. outubro de 1988 [citado 15 de fevereiro de 2019];56(5):218–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3206519>
 19. Muscaritoli M, Fanfarillo F, Luzi G, Sirianni MC, Iebba F, Laviano A, et al. Impaired nutritional status in common variable immunodeficiency patients correlates with reduced levels of serum IgA and of circulating CD4+ T lymphocytes. *Eur J Clin Invest*. 2001;
 20. Ameratunga R, Lehnert K, Woon ST, Gillis D, Bryant VL, Slade CA, et al. Review: Diagnosing Common Variable Immunodeficiency Disorder in the Era of Genome Sequencing. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2018.
 21. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: A new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*. 2002;
 22. Cunningham-Rundles C. Human B cell defects in perspective. *Immunologic Research*. 2012.
 23. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: Defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008;
 24. Duarte AJ, Vasconcelos DM, Sato MN, Sales JM, Yamaguchi NH, Brígido LF, et al. [Common variable immunodeficiency (hypogammaglobulinemia of late

- onset or acquired hypogammaglobulinemia): initial follow-up of 11 cases]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* [Internet]. [citado 15 de fevereiro de 2019];45(3):95–104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1726373>
25. Farrant J, Bryant A, Almandoz F, Spickett G, Evans SW, Webster ADB. B cell function in acquired “common-variable” hypogammaglobulinemia: Proliferative responses to lymphokines. *Clin Immunol Immunopathol* [Internet]. 1 de maio de 1989 [citado 15 de fevereiro de 2019];51(2):196–204. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0090122989900196>
 26. Baldassin MPM. Classificação de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável através da identificação de subtipos de linfócitos B [Internet]. Sao Paulo; 2011 [citado 15 de fevereiro de 2019]. Available at: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5146/tde-07102011-142727/publico/MairaPedreschi.pdf>
 27. Marashi SM, Raeiszadeh M, Workman S, Rahbar A, Soderberg-Naucle C, Klenerman P, et al. Inflammation in common variable immunodeficiency is associated with a distinct CD8+ response to cytomegalovirus. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. junho de 2011 [citado 15 de fevereiro de 2019];127(6):1385–1393.e4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21536322>
 28. Bertinchamp R, Gérard L, Boutboul D, Malphettes M, Fieschi C, Oksenhendler E, et al. Exclusion of Patients with a Severe T-Cell Defect Improves the Definition of Common Variable Immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016;
 29. Pinchuk LM, Klaus SJ, Magaletti DM, Pinchuk G V, Norsen JP, Clark EA. Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated

- by CD40 ligation. *J Immunol*. 1996;
30. Farrington M, Grosmaire LS, Nonoyama S, Fischer SH, Hollenbaugh D, Ledbetter JA, et al. CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci*. 1994;
 31. Paquin-Proulx D, Santos BAN, Carvalho KI, Toledo-Barros M, Barreto de Oliveira AK, Kokron CM, et al. IVIg Immune Reconstitution Treatment Alleviates the State of Persistent Immune Activation and Suppressed CD4 T Cell Counts in CVID. *PLoS One*. 2013;
 32. Carvalho KI, Melo KM, Bruno FR, Snyder-Cappione JE, Nixon DF, Costa-Carvalho BT, et al. Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). *PLoS One*. 2010;
 33. Trujillo CM, Muskus C, Arango J, Patiño PJ, Montoya CJ. Quantitative and functional evaluation of innate immune responses in patients with common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol* [Internet]. 2011 [citado 17 de fevereiro de 2019];21(3):207–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21548449>
 34. Barbosa RR, Silva SP, Silva SL, Melo AC, Pedro E, Barbosa MP, et al. Primary B-cell deficiencies reveal a link between human IL-17-producing CD4 T-cell homeostasis and B-cell differentiation. *PLoS One*. 2011;
 35. Alcalá-Neves MA. Avaliação do perfil TH17 em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) com ou sem autoimunidade. FMUSP; 2014.
 36. Fevang B, Yndestad A, Sandberg WJ, Holm AM, Müller F, Aukrust P, et al. Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: Association with chronic inflammation in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2007;

37. Barsotti NS, Almeida RR, Costa PR, Barros MT, Kalil J, Kokron CM. IL-10-Producing regulatory B cells are decreased in patients with common variable immunodeficiency. *PLoS One*. 2016;
38. Bonilla FA, Geha RS. Common Variable Immunodeficiency. *Pediatr Res* [Internet]. maio de 2009 [citado 17 de fevereiro de 2019];65(5 Part 2):13R–19R. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190529>
39. Unger S, Seidl M, van Schouwenburg P, Rakhmanov M, Bulashevskaya A, Frede N, et al. The TH1 phenotype of follicular helper T cells indicates an IFN- γ -associated immune dysregulation in patients with CD21low common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;
40. Bayry J, Hermine O, Webster DA, Lévy Y, Kaveri S V. Common variable immunodeficiency: The immune system in chaos. *Trends in Molecular Medicine*. 2005.
41. Scott-Taylor TH, Green MRJ, Eren E, Webster ADB. Monocyte derived dendritic cell responses in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 2004;
42. Viallard JF, Camou F, Andre M, Liferman F, Moreau JF, Pellegrin JL, et al. Altered dendritic cell distribution in patients with common variable immunodeficiency. *Arthritis Res Ther*. 2005;
43. Aukrust P, Müller F, Frøland SS. Elevated serum levels of interleukin-4 and interleukin-6 in patients with common variable immunodeficiency (CVI) are associated with chronic immune activation and low numbers of CD4+ lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* [Internet]. março de 1994 [citado 17 de fevereiro de 2019];70(3):217–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7906214>

44. Aukrust P, Lien E, Kristoffersen AK, Müller F, Haug CJ, Espevik T, et al. Persistent activation of the tumor necrosis factor system in a subgroup of patients with common variable immunodeficiency--possible immunologic and clinical consequences. *Blood* [Internet]. 15 de janeiro de 1996 [citado 17 de fevereiro de 2019];87(2):674–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8555490>
45. Coraglia A, Galassi N, Fernández Romero DS, Juri MC, Felippo M, Malbrán A, et al. Common Variable Immunodeficiency and Circulating TFH. *J Immunol Res*. 2016;
46. Schwartz R, Porat YB, Handzel Z, Stoege Z, Garty BZ, Confino-Cohen R, et al. Identification of a subset of common variable immunodeficiency patients with impaired B-cell protein tyrosine phosphorylation. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. novembro de 1999 [citado 15 de fevereiro de 2019];6(6):856–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10548576>
47. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000;
48. Sánchez-Ramón S, Radigan L, Yu JE, Bard S, Cunningham-Rundles C. Memory B cells in common variable immunodeficiency: Clinical associations and sex differences. *Clin Immunol*. 2008;
49. Mouillot G, Carmagnat M, Gérard L, Garnier JL, Fieschi C, Vince N, et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *J Clin Immunol*. 2010;
50. Vlkova M, Fronkova E, Kanderova V, Janda A, Ruzickova S, Litzman J, et al. Characterization of Lymphocyte Subsets in Patients with Common Variable

- Immunodeficiency Reveals Subsets of Naive Human B Cells Marked by CD24 Expression. *J Immunol*. 2010;
51. Castigli E, Wilson SA, Elkhail A, Ozcan E, Garibyan L, Geha RS. Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor enhances CD40-driven plasma cell differentiation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;
 52. Baldassin MPM. Avaliação do perfil dos linfócitos B de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável antes e após administração de antígenos protéicos e polissacarídicos [Internet]. [São Paulo]: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2014 [citado 14 de fevereiro de 2019]. Available at: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5146/tde-13012015-122742/>
 53. Maffucci P, Fillion CA, Boisson B, Itan Y, Shang L, Casanova J-L, et al. Genetic Diagnosis Using Whole Exome Sequencing in Common Variable Immunodeficiency. *Front Immunol* [Internet]. 2016 [citado 15 de fevereiro de 2019];7:220. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27379089>
 54. van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castaño D, van Noesel CJM, van Tol MJD, et al. An Antibody-Deficiency Syndrome Due to Mutations in the CD19 Gene. *N Engl J Med* [Internet]. 4 de maio de 2006 [citado 15 de fevereiro de 2019];354(18):1901–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672701>
 55. Kanegane H, Agematsu K, Futatani T, Sira MM, Suga K, Sekiguchi T, et al. Novel mutations in a Japanese patient with CD19 deficiency. *Genes Immun*. 2007;
 56. Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IAM, Dolman KM, et al.

- CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest.* 2010;
57. Thiel J, Kimmig L, Salzer U, Grudzien M, Lebrecht D, Hagen T, et al. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;
 58. Salzer E, Daschkey S, Choo S, Gombert M, Santos-Valente E, Ginzel S, et al. Combined immunodeficiency with life-threatening EBV-associated lymphoproliferative disorder in patients lacking functional CD27. *Haematologica.* 2013;
 59. Van Montfrans JM, Hoepelman AIM, Otto S, Van Gijn M, Van De Corput L, De Weger RA, et al. CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;
 60. Van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandené L, Janssen F, et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest.* 2010;
 61. Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* (80-). 2014;
 62. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med.* 2014;
 63. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol.* 2003;

64. Takahashi N, Matsumoto K, Saito H, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, et al. Impaired CD4 and CD8 Effector Function and Decreased Memory T Cell Populations in ICOS-Deficient Patients. *J Immunol.* 2009;
65. Kotlarz D, Zięta N, Milner JD, Klein C. Human IL-21 and IL-21R deficiencies: Two novel entities of primary immunodeficiency. *Current Opinion in Pediatrics.* 2014.
66. Kotlarz D, Zięta N, Uzel G, Weidemann T, Braun CJ, Diestelhorst J, et al. Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome. *J Exp Med.* 2013;
67. Alangari A, Alsultan A, Adly N, Massaad MJ, Kiani IS, Aljebreen A, et al. LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) gene mutation in a family with inflammatory bowel disease and combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;
68. Burns SO, Zenner HL, Plagnol V, Curtis J, Mok K, Eisenhut M, et al. LRBA gene deletion in a patient presenting with autoimmunity without hypogammaglobulinemia. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2012.
69. Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarström Q, Herholz P, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet.* 2012;
70. Chen K, Coonrod EM, Kumánovics A, Franks ZF, Durtschi JD, Margraf RL, et al. Germline Mutations in NFKB2 Implicate the Noncanonical NF-κB Pathway in the Pathogenesis of Common Variable Immunodeficiency. *Am J Hum Genet.* 2013;
71. Liu Y, Hanson S, Gurugama P, Jones A, Clark B, Ibrahim MAA. Novel NFKB2 Mutation in Early-Onset CVID. *J Clin Immunol.* 2014;

72. Angulo I, Vadas O, Garçon F, Banham-Hall E, Plagnol V, Leahy TR, et al. Phosphoinositide 3-kinase δ gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. *Science* (80-). 2013;
73. Crank MC, Grossman JK, Moir S, Pittaluga S, Buckner CM, Kardava L, et al. Mutations in PIK3CD can cause hyper IgM syndrome (HIGM) associated with increased cancer susceptibility. *J Clin Immunol*. 2014;
74. Lucas CL, Kuehn HS, Zhao F, Niemela JE, Deenick EK, Palendira U, et al. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110 δ result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nat Immunol*. 2014;
75. Alkhairy OK, Rezaei N, Graham RR, Abolhassani H, Borte S, Hultenby K, et al. RAC2 loss-of-function mutation in 2 siblings with characteristics of common variable immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015.
76. Wang H-Y, Ma CA, Zhao Y, Fan X, Zhou Q, Edmonds P, et al. Antibody deficiency associated with an inherited autosomal dominant mutation in TWEAK. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;
77. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol*. 2015;
78. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;
79. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory and effector memory CD4⁺T cells. In: *Pathologie Biologie*. 2003.

80. Harari A, Vallelian F, Pantaleo G. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur J Immunol*. 2004;
81. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, et al. Unravelling the Complexity of T Cell Abnormalities in Common Variable Immunodeficiency. *J Immunol*. 2007;
82. Kumar A, Meldgaard TS, Bertholet S. Novel platforms for the development of a universal influenza vaccine. *Frontiers in Immunology*. 2018.
83. Grohskopf LA, Sokolow LZ, Broder KR, Walter EB, Fry AM, Jernigan DB. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices—United States, 2018–19 Influenza Season. *MMWR Recomm Reports*. 2018;
84. Nesmith N, Williams J V., Johnson M, Zhu Y, Griffin M, Talbot HK. Sensitive diagnostics confirm that influenza C is an uncommon cause of medically attended respiratory illness in adults. *Clin Infect Dis*. 2017;
85. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 2018;
86. Zhou H, Thompson WW, Viboud CG, Ringholz CM, Cheng PY, Steiner C, et al. Hospitalizations associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States, 1993-2008. *Clin Infect Dis*. 2012;
87. Falsey AR, Walsh EE. Viral Pneumonia in Older Adults. *Clin Infect Dis*. 2006;
88. Fineberg H V. Pandemic Preparedness and Response — Lessons from the H1N1 Influenza of 2009. *N Engl J Med*. 2014;
89. Saúde M da. Protocolo de Tratamento de Influenza [Internet]. Brasília; 2017

- [citado 17 de fevereiro de 2019]. 49 p. Available at: http://bvsms.saude.gov.br/publicacoes/protocolo_tratamento_
90. WHO, Influenza [Internet]. WHO. World Health Organization; 2018 [citado 15 de fevereiro de 2019]. Available at: <https://www.who.int/influenza/en/>
 91. Nichol KL, Nordin J, Mullooly J, Lask R, Fillbrandt K, Iwane M. Influenza Vaccination and Reduction in Hospitalizations for Cardiac Disease and Stroke among the Elderly. *N Engl J Med* [Internet]. 3 de abril de 2003 [citado 15 de fevereiro de 2019];348(14):1322–32. Available at: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa025028>
 92. Souquette A, Thomas PG. Past life and future effects-how heterologous infections alter immunity to influenza viruses. *Frontiers in Immunology*. 2018.
 93. Graham MB, Braciale TJ. Resistance to and recovery from lethal influenza virus infection in B lymphocyte-deficient mice. *J Exp Med*. 1997;
 94. Schmidt ME, Varga SM. The CD8 T cell response to respiratory virus infections. *Frontiers in Immunology*. 2018.
 95. Devarajan P, Bautista B, Vong AM, McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL. New insights into the generation of CD4 memory may shape future vaccine strategies for influenza. *Frontiers in Immunology*. 2016.
 96. Boonnak K, Subbarao K. Memory CD4+ T cells: beyond “helper” functions. *J Clin Invest* [Internet]. 1 de agosto de 2012 [citado 17 de fevereiro de 2019];122(8):2768–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22820285>
 97. Hanitsch LG, Löbel M, Mieves JF, Bauer S, Babel N, Schweiger B, et al. Cellular and humoral influenza-specific immune response upon vaccination in patients with common variable immunodeficiency and unclassified antibody

- deficiency. *Vaccine*. 2016;
98. Martire B, Azzari C, Badolato R, Canessa C, Cirillo E, Gallo V, et al. Vaccination in immunocompromised host: Recommendations of Italian Primary Immunodeficiency Network Centers (IPINET). *Vaccine*. 2018;
 99. Souza FA., Barros M., Rizzo L., Kalil JE., Kokron C. Lymphocyte Proliferation with Tetanus Toxoid After Immunization in Patients with Common Variable Immunodeficiency. In San Diego: Primary Immunodeficiency Diseases Consortium Conference; 2007.
 100. Rezaei N, Siadat SD, Aghamohammadi A, Moin M, Pourpak Z, Norouzian D, et al. Serum bactericidal antibody response 1 year after meningococcal polysaccharide vaccination of patients with common variable immunodeficiency. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;
 101. Rezaei N, Aghamohammadi A, Siadat SD, Moin M, Pourpak Z, Nejati M, et al. Serum bactericidal antibody responses to meningococcal polysaccharide vaccination as a basis for clinical classification of common variable immunodeficiency. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;
 102. Junker AK, Bonilla FA, Sullivan KE. How to flee the flu. *Clin Immunol* [Internet]. setembro de 2004 [citado 17 de fevereiro de 2019];112(3):219–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308112>
 103. Park MA, Li JT, Hagan JB, Maddox DE, Abraham RS. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *Lancet* [Internet]. 9 de agosto de 2008 [citado 15 de fevereiro de 2019];372(9637):489–502. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692715>
 104. Bonilla FA. Update: Vaccines in primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;

105. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: Implications for vaccine design. *Nature Reviews Immunology*. 2008.
106. Pedersen G, Halstensen A, Sjursen H, Næss A, Kristoffersen EK, Cox RJ. Pandemic Influenza Vaccination Elicits Influenza-Specific CD4 + Th1-cell Responses in Hypogammaglobulinaemic Patients: Four case reports. *Scand J Immunol*. 2011;
107. Marinho AKB. Avaliação da resposta clínica e humoral dos pacientes portadores de ICV submetidos à vacinação com antígenos protéicos e polissacarídicos [Internet]. [São Paulo]: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2013 [citado 17 de fevereiro de 2019]. Available at: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5146/tde-20052013-163006/>
108. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *British Journal of Haematology*. 2009.
109. Agondi RC, Barros MT, Kokron CM, Cohon A, Oliveira AKB, Kalil J, et al. Can patients with common variable immunodeficiency have allergic rhinitis? *Am J Rhinol Allergy*. 2013;
110. Jegaskanda S, Vandenberg K, Laurie KL, Loh L, Kramski M, Winnall WR, et al. Cross-reactive influenza-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity in intravenous immunoglobulin as a potential therapeutic against emerging influenza viruses. *J Infect Dis*. 2014;
111. Gardulf A, Abolhassani H, Gustafson R, Eriksson LE, Hammarström L. Predictive markers for humoral influenza vaccine response in patients with common variable immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical*

- Immunology. 2018;
112. van Assen S, Holvast A, Telgt DSC, Benne CA, de Haan A, Westra J, et al. Patients with humoral primary immunodeficiency do not develop protective anti-influenza antibody titers after vaccination with trivalent subunit influenza vaccine. Clin Immunol. 2010;
 113. Wong GK, Huissoon AP. T-cell abnormalities in common variable immunodeficiency: The hidden defect. Journal of Clinical Pathology. 2016.
 114. Jürchott K, Schulz AR, Bozzetti C, Pohlmann D, Stervbo U, Warth S, et al. Highly predictive model for a protective immune response to the A(H1N1)pdm2009 influenza strain after seasonal vaccination. PLoS One. 2016;
 115. Tian Y, Babor M, Lane J, Schulten V, Patil VS, Seumois G, et al. Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA. Nat Commun. 2017;
 116. Sun J, Dodd H, Moser EK, Sharma R, Braciale TJ. CD4⁺ T cell help and innate-derived IL-27 induce Blimp-1-dependent IL-10 production by antiviral CTLs. Nat Immunol. 2011;
 117. Giancchetti E, Torelli A, Montomoli E. The use of cell-mediated immunity for the evaluation of influenza vaccines: an upcoming necessity. Hum Vaccin Immunother [Internet]. 7 de janeiro de 2019 [citado 13 de fevereiro de 2019];21645515.2019.1565269. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30614754>
 118. Verma K, Ogonek J, Varanasi PR, Luther S, Bünting I, Thomay K, et al. Human CD8⁺ CD57⁻ TEMRA cells: Too young to be called “old”. PLoS One. 2017;
 119. Skibinski DAG, Jones LA, Zhu YO, Xue LW, Au B, Lee B, et al. Induction of Human T-cell and Cytokine Responses Following Vaccination with a Novel

Influenza Vaccine. Sci Rep [Internet]. 20 de dezembro de 2018 [citado 13 de fevereiro de 2019];8(1):18007. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30573748>

Anexos

Anexo 1: TCLE do presente estudo

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação da resposta celular à imunização anti-infecciosa de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável
2. PESQUISADOR: Cristina Maria Kokron
CARGO/FUNÇÃO: Médica assistente. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 49888
UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Alergia e Imunologia Clínica
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

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

1 – **Desenho do estudo e objetivo (s)** essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. O senhor (a) tem imunodeficiência comum variável que é uma doença proveniente do defeito na produção de anticorpos. Alguns trabalhos têm mostrado que além da produção defeituosa de anticorpos outras alterações nas células do sangue que também participam da defesa imunológica podem estar alteradas. Devidos estas alterações, os pacientes têm muitas infecções de repetição, como sinusites e pneumonias. Dessa forma, seria interessante encontrar uma maneira de melhorar a imunidade e com isso diminuir a quantidade de infecções. As vacinas poderiam contribuir para a redução do número de infecções. Não há nenhum estudo no Brasil relacionando vacinas em imunodeficiências primárias. Estamos

convidando você para participar deste estudo inovador no nosso meio. Se concordar, você receberá vacina contra a gripe e contra pneumonia. Vamos colher 30 ml de sangue para completar a pesquisa analisando se há produção de anticorpos após a administração das vacinas.

2– Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros;

As vacinas contra a gripe e pneumonia serão aplicadas no mesmo dia em cada braço, intramuscular conforme as orientações do Ministério da Saúde. Colheremos também 30 ml de sangue para fazer a pesquisa dos anticorpos antes e depois da administração das vacinas.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – os mesmos procedimentos do item anterior.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Dor no local da aplicação das vacinas. Dor no local do braço em que o sangue será coletado.

5 – Benefícios para o participante: Entendendo melhor a doença e seus mecanismos, podemos tentar encontrar um tratamento mais eficiente para reduzir o número de infecções.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Não há.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o *Dra. Cristina Kokron* com auxílio da *Dra Ana Karolina Barreto de Oliveira* que podem ser encontrada no endereço *Av Dr Eneas de Carvalho Aguiar, 155, 5º andar bloco 4B* Telefone (s) *.3069-6098*. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo”. Avaliação da resposta celular à imunização anti-infecciosa de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável

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

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

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Anexo 2: Aprovação ética do estudo

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

Nº Protocolo: 0460/06

Título: "Avaliação do perfil de linfócitos T de memória dos pacientes portadores de ICV submetidos à vacinação contra Influenza".

Pesquisador Responsável: Dra. Cristina Maria Kokron

Pesquisador Executante: Ana Karolina Barreto Berselli Marinho

Departamento: Clínica Médica

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 18/05/2016, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

Carta datada de 10/05/2016 – Solicitação de mudança de título para "Avaliação do perfil de linfócitos T de memória dos pacientes portadores de ICV submetidos à vacinação contra Influenza" e relatório de andamento do estudo.

CAPPesq, 18 de Maio de 2016

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo 3: Tabela de valores de referência de linfócitos/mm³ em população brasileira saudável

Valores de referência de linfócitos/mm³ em população brasileira saudável Referência: Moraes-Pinto MI et al, 2005

		cordão	0-3m	3-6m	6-12m	1-2a	2-6a	6-12a	12-18a	19-44a
CD3	p10	798	2438	1919	2156	1969	1515	1280	1161	844
	p50	1532	3352	3404	3413	3209	2180	1845	1505	1331
	p90	2994	5247	5368	5004	4392	3701	2413	2077	1943
CD4	p10	485	1686	1358	1360	957	780	618	630	476
	p50	1115	2282	2248	2064	1620	1178	907	837	813
	p90	2263	3417	3375	3066	2727	2086	1348	1182	1136
CD8	p10	264	486	523	560	563	453	390	332	248
	p50	421	877	881	1108	1030	730	612	449	418
	p90	982	1615	1798	1803	1753	1700	1024	776	724
CD19	p10	278	395	955	811	711	631	471	460	138
	p50	548	1053	1795	1278	1184	962	728	690	234
	p90	1228	1697	2596	1792	1553	1283	1031	1143	544
CD 16/56	p10	279	239	199	164	153	135	127	114	134
	p50	674	499	379	416	318	269	236	228	235
	p90	2151	1020	731	801	703	601	515	446	545

Anexo 4: Características laboratoriais dos pacientes do estudo

ICV vacinados	IgA (mg/dL)	IgM (mg/dL)	Linfócitos T	CD3%	CD3 total/mm³	CD4%	CD4 total/mm³	CD8%	CD8 total/mm³	Relação CD4/8	CD19	CD19 total/mm³	NK (CD56) %	NK total/mm³
	179	124	1500 a 5000	60-87	605-2460	32-61	493-1666	14-43	224-1112	0,8	5-20%	72-520	4-28	73-654
CVID06	4	10	6130	88,1	5300	15,2	795	30,0	1590	0,50	14	164	6	Caca73
CIVD11	4	4	2710	44,4	3231	20,9	646	49,5	1583	0,41	<1%	*	6	143
CIVD17	4	4	3600	70,5	2520	9,6	240	37,5	932	0,46	16	496	6	189
CIVD05	4	4	1100	61,0	736	19,0	230	42,0	504	0,46	4%	44	34%	410
CIVD03	4	4	1400	65,0	861	18,0	240	47,0	624	0,38	5%	67	0,30	30%
CIVD14	4	14	1600	51,3	1969	38,6	749	25,6	1086	0,69		381	*	154
CIVD12	15	15	3600	66,0	2400	40,9	1440	29,1	1080	1,33	12	172	7	105
CIVD10	4	4	1800	66,0	1188	25,5	297	55,4	653	0,45	3	82	13	324
CIVD08	4	4	1600	56,0	1083	35,0	680	16,0	318	2,14	38%	731	5%	95
CIVD04	12	4	3100	61,0	1276	23,0	487	37,0	773	0,63	8	178	28	597
CIVD07	4	4	1000	95,0	2254	37,0	879	64,0	1525	0,58	0	0	5%	112
CIVD01	4	28	1700	92,9	1564	32,0	280	55,5	860	0,33	6	132	8	173
CIVD15	4	4,9	2000	90,0	1531	56,0	953	32,0	540	1,76	3%	47	7%	119
CIVD13	0.2	1.7	2500	94,0	1765	25,0	464	65,0	1223	0,38	2%	41	3%	59
CIVD19	0.9	139	2000	70,5	1338	39,0	753	29,1	560	1,34	11%	217	19%	355
CIVD02	4	15	2600	81,9	2106	24,8	505	61,6	1284	0,39	11	191	7	113

Anexo 5: Pré Vacinação CVID

Basal						LISADO VIRAL 20 ng/mL					Hemaglutinina 2,5 ug/mL				
Identificação	CD4	Naive (%)	TCM(%)	TEM (%)	TEMRA (%)	CD4	Naive (%)	TCM(%)	TEM (%)	TEMRA (%)	CD4	Naive (%)	TCM(%)	TEM (%)	TEMRA (%)
CVID01	9,64	1,99	14,6	81,1	2,3	8,37	1	24,9	67,8	6,29	7,07	8	10,3	89,7	0
CVID02	8,59	0,0478	13,2	86,7	0,0287	6,44	0,0179	20,8	79,2	0,0269	6,52	5	18,7	81,3	0
CVID03	25,5	7,24	69,7	23	0,0132	22,3	2,58	67,9	29,5	0,0198	22,5	13,2	65,8	20,9	0,0133
CVID04	20,9	24,6	69,9	5,5	0,0139	21,9	22,4	66,2	11,4	0,0124	23,2	26	69	5,01	0,013
CVID05	40,9	40,6	57,2	2,16	0,0287	52,8	32,1	63,8	3,69	0,386	45	31,8	65,5	2,58	0,134
CVID06	27,8	2,9	85,1	11,9	0,103	27,3	9,05	71,1	19,7	0,122	29,6	3,69	73,4	22,5	0,489
CVID07	38,6	7,21	71,3	21,1	0,386	41,7	0,575	5,33	88,9	5,2	38,3	0,156	8,72	90,7	0,466
CVID08	9,29	1,62	46,2	52,2	0,0447	8,88	1,54	41,8	56,6	0,057	9,11	1,3	50	48,6	0,0415
CVID10	8,48	2,33	25	72,7	0	8,63	2,77	32,4	64,8	0,019	35,4	2,44	24,9	71,9	0,732
CVID11	16,1	0	0,461	96,2	3,37	5,63	0,114	8,47	90,7	0,684	9,19	0,686	21,7	77,5	0,137
CVID12	8,21	0,0131	0,3	98,1	1,59	9,9	0	31,8	98,6	0,682	9,15	7	27,3	72,7	0
CVID13	11,8	0,0478	1,27	97,2	1,52	10,3	0,315	1,17	93,4	5,09	12,7	0,481	1	88,8	9,67
CVID14	10,5	0,146	2,93	95,9	1,02	11,7	0,0197	0,403	94,2	5,39	19,9	8,89E-03	0,284	93,3	6,37
CVID15	15,2	0,152	0,598	96,6	2,65	10,1	0,0101	0,875	97,7	1,39	9,89	0	1,2	98,8	0,0297
CVID17	4,08	0,12	0,92	95,9	3,08	9,87	0,01	1,64	98,2	0,14	10,5	9,81E-03	1,83	98,1	0,085
CVID19	0,17	0,0929	0,464	0,98	3,85	0,0379	0,657	3,68	96,3	0,0191	9,97	0	8,45	91,5	0

Anexo 6: Pré vacinação CTRL

Basal						LISADO VIRAL 20 ng/mL					Hemaglutinina 2,5 ug/mL				
Identificação	CD4	Naive (%)	TCM(%)	TEM (%)	TEMRA (%)	CD4	Naive (%)	TCM(%)	TEM (%)	TEMRA (%)	CD4	Naive (%)	TCM(%)	TEM (%)	TEMRA (%)
CTRL01	31,6	47,5	0,0228	0,0354	3,37	30,1	3,19	67,9	28,9	0,0133	30,7	6,35	36,2	57,5	0,0351
CTRL02	30,1	48	0,05	0,0907	12,4	31,5	36,5	24,1	39,1	0,286	32,3	0,429	29,6	70	5,33E-03
CTRL03	30,1	49,1	0,0916	0,0167	0,308	29,2	0,343	61,9	37,7	0,0276	31,2	0,252	84,5	15,2	0,0265
CTRL04	32,8	17,3	3,25	3,27	0,639	45,8	6,43	88,6	4,92	0,021	13,3	0	1,11	98,5	0,407
CTRL05	58,7	71,3	24,1	0,0245	23	48	21,8	75,1	3,05	0,0489					
CTRL06	58,2	71,3	15,8	0,0861	21,5	13,5	0,765	25,2	74	0,0132	44,5	20,4	76,6	2,99	0,011
CTRL07	58,2	19,4	0,02	0,024	0,513	11,5	1,36	66,8	31,8	0,0147	39,8	38,9	56,7	4,3	0,125
CTRL08	65,7	60,3	0,0119	0	1,47	11,2	3,08	26,3	70,6	0,0171	12,1	1,69	15,6	82,6	0,0384
CTRL09	52,1	29,6	7,8	0,0134	2,67	15,5	0,587	45	54,3	0,0184	11,1	2,06	51,5	46,4	0,0364
CTRL10	73,3	42,9	0,0113	5,65E-03	0,404	12,6	2,45	34,7	62,9	0,0236	11,3	0,856	19,3	79,8	0,0258
CTRL11	79,2	29,4	0,0635	0,0227	2,22	8,95	1,71	44,4	53,9	0,0292	15	0,866	34,6	64,5	0,011
CTRL12	58,4	49,5	0,0466	4,66E-03	1,71	13,5	0,765	25,2	74	0,0132	12,2	1,29	24,6	74,1	0,0432
CTRL13	75,8	0,705	1,78	1,57	0,0268	13,8	2,44E-03	0,743	99	0,288	9,4	1,69	34,1	64,2	0,0291
CTRL14	82	10,2	0,841	0,725	0,0725	15,3	0,0624	5,52	93,4	1,05	13,6	0,0102	0,666	98,8	0,485
CTRL15	70,5	3,31	1,65	1,48	0,0307	17,5	0,0472	3,59	95,4	0,922	12	0,0153	3,88	95,9	0,219
CTRL16	92,3	1,18	0,189	0,116	0	13,4	0	1,16	98,7	0,174	18,8	0,0428	3,24	94,6	2,1

Anexo 7: Pós 1 mês da vacinação CVID

[illegible]

Anexo 8: Pós 1 mês de vacinação CTRL

[illegible]

Anexo 9: Pós 3 meses de vacinação CVID

[illegible]

Anexo 10: Pós 3 meses de vacinação CTRL

Basal						LISADO VIRAL 20 ng/mL					Hemaglutinina 2,5 ug/mL				
Identificação	CD 4	Naive (%)	TCM(%)	TEM (%)	TEMRA (%)	CD4	Naive (%)	TCM(%)	TEM (%)	TEMRA (%)	CD 4	Naive (%)	TCM(%)	TEM (%)	TEMRA (%)
CTRL01	64,4	0,074	0,0247	0,0247	0,014	11,2	0,0224	0,0448	99,8	0,0896	10,5	0	0,0926	99,9	0,0185
CTRL02	40,8	0,126	0,014	0,168	0,0877	31,8	0	0,224	99,7	0,0299	21,7	5,24E-03	0,0262	100	0,0157
CTRL03	56,4	0,183	0,0239	0,406	0,0123	11,4	0	0,0836	99,9	0,0167	34,2	3,23E-03	0,197	99,8	3,23E-03
CTRL04	64,9	0,172	0,0245	0,0214	0	0,517	0	0	100	0	21,1	8,62E-03	0,0259	100	5,75E-03
CTRL05	11,7	0,351	0	0,117	0,115	1,76	0	0	100	0	3,03	0	0,184	99,8	0
CTRL06	27	0,802	0,306	0,42	6,47E-03	62,2	1,91E-03	0,116	99,9	0,0191	4,75	0	0,658	99,2	0,132
CTRL07	39,2	0,109	0,93	1,2	0,0176	62	8,2	3,27	77,1	11,5	66,3	8,34E-04	0,0851	99,9	0,0551
CTRL08	52,4	1,48	0,5	0,0402	1,31	43,2	0,212	0,852	90,5	8,48	59,5	8,44	3,33	76,7	11,5
CTRL09	71,2	1,56	13,4	13,5	16,2	54,8	2,32	2,17	76,2	19,3	46,1	0,194	0,419	88,9	10,5
CTRL10	***	4,14	25,9	24,8	4,15	3,91	6,87	0,312	35,9	56,9	53,7	6,19	3,12	73,1	17,6
CTRL11	***	5,32	30,5	30,2	0,874	53,4	0,167	1,31	96,2	2,29	6,18	6,29	1,16	67,7	24,8
CTRL12	77,7	1,62	1,93	8,91	0,069	57,7	3,55	1,25	81,3	13,9	53,9	0,0682	5,16	94,5	0,294
CTRL13	45,7	0,656	1,25	1,18	0,0375	36,7	9,22E-03	0,357	97,9	1,7	56,8	2,24	1,1	84,7	12
CTRL14	66,4	0,396	3,81	3,77	3,45	48,9	1,08	1,19	74,1	23,7	45,7	1,48	1,22	77,7	19,6
CTRL15	55,8	1,45	24,9	24,7	0,0714	24,7	0,248	2,2	92,7	4,83	32,9	3,18	0,908	12,9	83
CTRL16	***	***	***	***	***	50	0,105	1,6	96,2	2,11	53,1	0,0317	1,79	97,9	0,243

Anexo 11: Pós 6 meses de vacinação CVID

[illegible]

Anexo 12: Pós 6 meses de vacinação CTRL

[illegible]