Maíra Pedreschi

Classificação de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável através da identificação de subtipos de linfócitos B

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

Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientador (a): Dra. Cristina Maria Kokron

São Paulo

2011

Maíra Pedreschi

Classificação de pacientes com imunodeficiência comum variável através da identificação de subtipos de linfócitos B

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

Área de Concentração: Alergia e Imunopatologia.
Orientador (a): Dra. Cristina Maria Kokron

(Versão Corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pedreschi, Maíra
Classificação de pacientes com imunodeficiência comum variável através da identificação de subtipos de linfócitos / Maíra Pedreschi. -- São Paulo, 2011.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Cristina Maria Kokron.

Descritores: 1.Imunodeficiência de variável comum 2.Linfócitos B 3.Fenótipo

USP/FM/DBD-161/11

DEDICATÓRIA

À ***Deus***

Por ter me guiado na escolha do melhor caminho a seguir e ter estado ao meu lado me inspirando e dando forças para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, ***Teresinha*** e ***Osni***

Que me ensinaram e me incentivaram a ir atrás dos meus sonhos e jamais desistir deles, por maior que fosse a dificuldade em alcançá-los. Vocês que sempre acreditaram em mim, torceram, choraram e vibraram comigo em cada momento durante a realização deste trabalho, enfim agradeço por todo gesto de amor, atenção e compreensão a mim depositados.

Ao meu noivo, ***Paulo***

Você que com seu amor sincero e incondicional esteve sempre ao meu lado nas horas mais importantes. Você que me apoiou em cada escolha que tive que tomar e esteve sempre dispondo de muita paciência e carinho. Enfim, você que deu um novo sentido para minha vida e que é minha razão de viver e de ter garra para batalhar e vencer todos os obstáculos. Sei que ainda teremos muitos obstáculos em nosso caminho, mas tenho certeza que venceremos todos eles. Meu sentimento por você é o mais puro e forte que existe, obrigada por tudo !!!

Ao meu irmão, ***André***

Que é meu grande amigo, que agüenta meu mau humor de manhã, tenta me animar com toda a sua calma e bom humor e me dá conselhos muito valiosos. Obrigada !!!

Aos meus ***familiares***

Aos meus tios ***Carlos*** e ***Josy*** e aos meus primos ***Ricardo*** e ***Roberta***, pela preocupação, carinho e por toda a torcida e vibração com as minhas vitórias.

Ao ***Sidney***, ***Valquíria***, ***Gabriela***, ***César*** e ***Evandro*** que estão sempre dispondo do seu tempo, já tão corrido, para ajudar no que quer que seja preciso. Vocês são meus segundos pais e irmãos, só tenho a agradecer todo esse carinho !!!

E aos meus avós ***Vicente*** e ***Santa*** que são meu maior exemplo de luta e superação de obstáculos. Vocês que sempre lutaram em busca de uma vida melhor, que muitas vezes se privaram de coisas em prol da família e que no meio de tanta simplicidade são um exemplo de vitória e sucesso. Vocês me ensinaram lições preciosas que vou levar para o resto da minha vida, muito obrigada !

AGRADECIMENTOS

À ***Dra. Cristina Maria Kokron***, minha orientadora, por me receber no laboratório, pela confiança depositada nestes 4 anos em que estou no laboratório, por me orientar e ter me proporcionado um rico crescimento e aprendizado científico, profissional e pessoal.

Ao ***Dr. Edécio Cunha Neto*** pela ajuda inicial para que pudéssemos começar o trabalho e pelas sugestões valiosas que foram dadas.

Ao ***Prof. Dr. Jorge Kalil*** pelas sugestões e críticas, enfim, por todo o aprendizado riquíssimo que pude vivenciar durante estes 2 anos de mestrado.

À ***Dra. Ana Karolina Barreto Oliveira*** que me ajudou desde a seleção dos pacientes, nos ensinamentos das avaliações clínicas, na escrita dos resumos dos congressos até nos treinos das aulas em inglês e nas viagens para que eu não me sentisse um peixe fora da água. Você foi uma grande amiga e só tenho a agradecer por tudo.

À banca examinadora da qualificação: ***Dra. Myrthes Toledo-Barros, Dr. Dewton Moraes Vasconcelos, Dra. Cristina Miuki Jacob,*** pela revisão minuciosa e sugestões dadas;

Ao laboratório ***LIM-60*** que me acolheu durante estes 4 anos e que me proporcionaram preciosos ensinamentos profissionais e pessoais.

Aos queridos Dr. ***Esper Kallas***, ***Dra. Karina Carvalho***, ***Dra. Daniela Rosa*** e ***Dra. Teresa Maidana*** que sempre foram solícitos quando precisei nas discussões, sugestões e críticas construtivas que enriqueceram este trabalho. Sou imensamente grata por toda a ajuda que me foi dada.

Ao Ambulatório de Imunodeficiências Primárias, principalmente à ***Dra. Myrthes Toledo Barros*** e à ***Dra. Andrea Cohon*** pela ajuda e paciência na revisão dos prontuários e nos dados clínicos dos pacientes, além das sugestões.

Aos amigos ***Bianca, Thais, Andréia, Juliana, Denise, Maria Angélica, Lidiane*** e ***Carla*** pelas palavras de incentivo, pelo apoio, pela convivência sempre prazerosa e principalmente pela amizade sincera.

À grande amiga ***Santa Poppe*** por toda a ajuda e paciência em todos os ensinamentos depositados. Você foi uma pessoa com quem pude contar de forma muito especial durante todas as etapas do mestrado e só tenho a agradecer por tudo que fez.

Ao ***Serafim, Maurício*** e ***Rosana*** por toda a ajuda no período das coletas.

À ***FAPESP*** pelo suporte financeiro deste trabalho.

E por fim, aos ***pacientes com Imunodeficiência Comum Variável*** que com a esperança de que novos conhecimentos sobre esta doença possam ajudar o seu tratamento, contribuíram através da doação de sangue.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
Abstract
Sumário

1. INTRODUÇÃO.....01
1.1 Imunodeficiências Primárias.....02
1.2 Imunodeficiência Comum Variável.....03
1.3 Ontogenia dos Linfócitos B.....05
1.3.1 Alterações Imunológicas e Moleculares.....06
1.3.2 Classificação.....09
1.4 Justificativa.....12

2. OBJETIVOS.....14
2.1 Objetivo geral.....15
2.2 Objetivos específicos.....15

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....16
3.1 Casuística.....17
3.2 Métodos.....18
3.2.1 Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico.....18
3.2.2 Imunofenotipagem para Identificação das Subpopulações de Linfócitos B.....20
3.2.3 Análise das Manifestações Clínicas.....25
3.2.4 Concentração Sérica de Imunoglobulinas.....26
3.2.5 Classificações.....26
3.2.6 Análise Estatística.....27
4. RESULTADOS.....29

4.1 Imunofenotipagem para Identificação de Linfócitos B 30
4.2 Concentração Sérica de Imunoglobulinas 36
4.3 Correlação entre LB de Memória e Concentrações Séricas de Imunoglobulinas 38
4.4 Análise das Manifestações Clínicas 39
4.5 Correlação entre Manifestações Clínicas e Subtipos de LB 41
4.6 Classificações 44

5. DISCUSSÃO 55
5.1 Identificação de Subtipos de Linfócitos B 56
5.2 Concentrações Séricas de Imunoglobulinas e Correlações com Linfócitos B de Memória 60
5.3 Análise das Manifestações Clínicas 61
5.4 Correlação entre Manifestações Clínicas e Subtipos de LB 63
5.5 Classificações 64

6. CONCLUSÕES 70

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 72

8. ANEXOS 86
8.1 ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 87
8.2 ANEXO 2: Aprovação da CAPPesq 91
8.3 ANEXO 3: Dados Epidemiológicos dos 70 pacientes da coorte de Pacientes com Imunodeficiência Comum Variável do Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP 92
8.4 ANEXO 4: Distribuição dos Subtipos de Linfócitos B nesta coorte de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável.....93
8.5 ANEXO 5: Distribuição dos Subtipos de Linfócitos B em indivíduos controles.....95
8.6 ANEXO 6: Comparação entre os valores de referência encontrados nesta coorte e a coorte européia.....96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Fluorescência *aloficocianina*.
BAFF	Fator de sobrevivência dos linfócitos B.
Btk	Tirosina-quinase da família Src que age na maturação dos Linfócitos B.
CCR7	Molécula expressa em linfócitos T e B ativados.
CD19	Molécula expressa em células dendríticas e linfócitos B.
CD20	Molécula expressa nos linfócitos B.
CD21	Receptor de C3d do sistema complemento, participante do complexo CD19/CD81.
CD22	Molécula expressa nos linfócitos B.
CD23	Molécula expressa nos linfócitos B ativados, monócitos e macrófagos.
CD27	Molécula associada à memória celular.
CD38	molécula expressa em linfócitos B e T ativados.
CD40	Molécula coestimuladora, associada à apresentação de antígenos.
CD40L	Receptor de alta afinidade ligante da molécula CD40.

CD138	Molécula expressa na superfície de plasmócitos.
CXCR5	Molécula expressa nos linfócitos B e células dendríticas.
DCs	Células dendríticas.
dL	decilitro.
ESID	*European Society for Immunodeficiencies*.
FITC	Fluorescência *isotiocianato de fluoresceína*.
FMO	*Fluorescence minus one*, todas as fluorescências menos uma.
FSC–A	*Forward Scatter*, parâmetro de tamanho em área.
FSC-H	*Forward Scatter*, parâmetro de tamanho em altura.
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
ICV	Imunodeficiência Comum Variável.
ICOS	Molécula expressa nos linfócitos B.
IDP	Imunodeficiência Primária.
Ig	Imunoglobulina.
IgA	Imunoglobulina A.
IgD	Imunoglobulina D.

IgG	Imunoglobulina G.
IgM	Imunoglobulina M.
IgE	Imunoglobulina E.
IL-2	Interleucina 2.
IFN-γ	Interferon-gama.
Kg	Kilograma
LB	Linfócito B.
LB $CD21^{low}$	Linfócito B $CD21^{low}$. Caracterizado por ser $CD19^{+}CD21^{low}CD38^{low}$.
LB *naive*	Linfócito B imaturo. Caracterizado por ser $CD19^{+}IgD^{+}CD27^{-}$.
LB Trans	Linfócito B Transitório. Caracterizado por ser $CD19^{+}IgM^{+}CD38^{+}$.
LT	Linfócito T.
LT $CD4^{+}$	Linfócito T do tipo $CD4^{+}$ou T auxiliador.
LT $CD8^{+}$	Linfócito T do tipo $CD8^{+}$ ou T citotóxico.
Linfócito Th1	Linfócito T helper (auxiliares) tipo 1.
mg	Miligrama.

mL	Mililitro.
MZB	*Marginal zone B cell* ou linfócitos B de zona marginal. Caracterizado por ser $CD19^{+}IgD^{+}CD27^{+}$.
NK	*Natural Killer cells* (células citotóxicas naturais).
Pbl	*Plasmablast* ou plasmoblastos. Caracterizado por ser $CD19^{+}$ $IgM^{-}CD38^{+}$.
PAGID	*Pan American Group for Immunodeficiency*.
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico.
PE	Fluorescência *ficoeritrina*.
PERCP	Fluorescência *peridinin chlorophyll protein*.
RPM	Rotações por minuto.
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute.
SMB	*Switched Memory B cell* ou linfócitos B de memória com troca de isotipo. Caracterizado por ser $CD19^{+}IgD^{-}CD27^{+}$.
SSC	*Side scatter*, parâmetro de granularidade.
TACI	*Transmembrane activator and calcium modulating cyclophilin ligand interaction.*
TCR	*T cell receptor* ou Receptor de Célula T.

TNF	Fator de Necrose Tumoral.
µL	Microlitro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Casuística das Imunodeficiências Primárias no Complexo HC-FMUSP, 2010.....03

Figura 2 Ontogenia dos Linfócitos B 06

Figura 3 Classificação de Freiburgo 10

Figura 4 Classificação de Paris 11

Figura 5 Classificação EUROclass 12

Figura 6 Estratégia de análise para identificação fenotípica dos LB.....22

Figura 7 Estratégia de análise através do FMO.....23

Figura 8 Identificação das subpopulações de LB 24

Figura 9 Identificação das subpopulações de LB 24

Figura 10 Identificação da subpopulação de LB $CD21^{low}$ 25

Figura 11 Frequência de LB totais de indivíduos controles e pacientes com ICV 30

Figura 12 Frequência de LB *naive* de indivíduos controles e pacientes com ICV 31

Figura 13 Frequência de LB de zona marginal de indivíduos controles e pacientes com ICV 32

Figura 14 Frequência de LB de memória com troca de isotipo de indivíduos controles e pacientes com ICV 33

Figura 15 Frequência de LB transitório de indivíduos controles e pacientes com ICV 34

Figura 16 Frequência de plasmoblastos de indivíduos controles e pacientes com ICV.....35

Figura 17 Frequência de LB $CD21^{low}$ de indivíduos controles e pacientes com ICV 36

Figura 18 Concentração sérica de IgG 37

Figura 19 Concentração sérica de IgA 37

Figura 20 Concentração sérica de IgM 38

Figura 21 Correlação entre LB de memória com troca de isotipo e concentração sérica de IgG 38

Figura 22 Correlação entre LB de memória com troca de isotipo e concentração sérica de IgA 39

Figura 23 Correlação entre LB de zona marginal e concentração sérica de IgM 39

Figura 24 Manifestações clínicas observadas nesta coorte.....40

Figura 25 Manifestações clínicas – subdivisão quanto ao gênero.....40

Figura 26 Linfadenopatia e subtipos de LB.....41

Figura 27 Esplenomegalia e subtipo de LB $CD21^{low}$.....42

Figura 28 Autoimunidade e subtipos de LB.....43

Figura 29 Bronquiectasias e MZB.....44

Figura 30 Classificação de Freiburgo.....44

Figura 31 Classificação de Freiburgo – subdivisão quanto ao gênero.....45

Figura 32 Classificação de Paris.....46

Figura 33 Classificação de Paris – subdivisão quanto ao gênero.....47

Figura 34 Classificação EUROclass 49

Figura 35 Classificação EUROclass – subdivisão quanto ao gênero 50

Figura 36 EUROclass – Prevalência de infecções 51

Figura 37 EUROclass – Prevalência de linfadenopatia 52

Figura 38 EUROclass – Prevalência de autoimunidade 52

Figura 39 EUROclass – Prevalência de esplenomegalia 53

Figura 40 EUROclass – Prevalência de bronquiectasias 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Prevalência de Imunodeficiência Comum Variável no mundo 03

Tabela 2 Anticorpos utilizados para marcação de superfície celular dos subtipos de LB 20

Tabela 3 Classificação de Freiburgo – manifestações clínicas.....46

Tabela 4 Classificação de Paris – manifestações clínicas.....47

Tabela 5 Classificação EUROclass – níveis séricos de imunoglobulinas.....54

RESUMO

Pedreschi. M. *Classificação de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável através da identificação de subtipos de Linfócitos B* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Introdução: A Imunodeficiência Comum Variável (ICV) é a imunodeficiência primária mais prevalente na prática clínica. Suas manifestações vão desde infecções de repetição (que são as mais prevalentes) à neoplasias e doenças autoimunes. Admite-se que o quadro clínico da ICV esteja associado a alterações na diferenciação de linfócitos B (LB), mas também em linfócitos T, monócitos e células dendríticas, além de mutações em genes relacionados a interações entre linfócitos T e B ou homeostasia de linfócitos B. Isto determina uma grande complexidade na classificação destes pacientes, sendo a correlação entre características clínicas e fenotípicas essencial para o melhor entendimento da doença e acompanhamento dos pacientes. **Objetivo:** Descrever o fenótipo clínico e das subpopulações de LB da coorte de pacientes com ICV acompanhados no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Hospital das Clínicas e verificar o modelo de classificação que melhor se adequa a estes pacientes. **Materiais e Métodos:** Após a separação de PBMC e imunofenotipagem dos subtipos de LB de amostras de 70 pacientes, estes foram classificados segundo os critérios das classificações de Freiburgo, Paris e EUROclass. Também foram realizadas a análise das manifestações clínicas; a correlação entre as células de memória e as concentrações séricas das imunoglobulinas e a correlação entre os subtipos de LB e as principais manifestações clínicas desta coorte. **Resultados:** Esta coorte apresentou um grande distúrbio na distribuição das subpopulações de LB, sendo que todos os pacientes apresentaram redução na frequência de LB de memória com troca de isotipo, mas apenas as pacientes mulheres apresentaram aumento estatisticamente significante nas frequências de LB *naive* e LB $CD21^{low}$ e redução na frequência de plasmoblastos. Os subtipos de LB transitório e LB de zona marginal não apresentaram diferenças significativas entre pacientes e controles. Não observamos correlação entre as células B de memória e os níveis séricos de imunoglobulinas. A análise clínica revelou diferenças na prevalência de algumas complicações clínicas, entretanto, a correlação

entre os subtipos de LB e estas manifestações mostrou associação apenas entre linfadenopatia e redução de plasmoblastos. Por fim, a classificação quanto aos três modelos propostos, revelou que nenhum deles se adequou para esta coorte de pacientes brasileiros. **Conclusão:** verificamos uma diversidade tanto nas subpopulações de LB quanto na prevalência de algumas manifestações clínicas e por conta destas alterações, até o momento nenhuma classificação se mostrou apropriada para esta coorte. Estes achados reforçam o conceito de heterogeneidade da doença e confirmam a necessidade de um novo modelo de classificação que compreenda outros marcadores.

Descritores: Imunodeficiência Comum Variável; linfócitos B; fenótipo, classificação.

ABSTRACT

PEDRESCHI, M. *Classification of patients with Common Variable Immunodeficiency based onthe distribution of B cell phenotypes* [Dissertation]. São Paulo: Hospital das Clínicas, University of São Paulo, 2010. p

Introduction: Common Variable Immunodeficiency (CVID) is the primary antibody deficiency most often seen in clinical practice. Patients present different clinical features ranging from recurrent infections (most prevalent) to malignancies and autoimmune disorders. It is accepted that this clinical picture is associated with alterations in the differentiation of B cells but also in T cells, monocytes and dendritic cells, besides mutations in genes related to interactions between T and B cells or in B cell homeostasis. This makes the classification of CVID patients very difficult, on the other hand the association between clinical and immunological phenotype is essential for better understanding of the disease and follow-up of patients. **Objective**: To describe the clinical and immunological phenotype of a Brazilian cohort of CVID patients followed at the Division of Clinical Immunology and Allergy of University of São Paulo Medical School and to classify them and analyze which is the most appropriated classification for this cohort. **Methods and Results**: Seventy patients were studied and flow cytometric B cell phenotyping was performed in PBMCs, using a mixture of monoclonal antibodies. The samples were classified according to the Freiburg, Paris and EUROclass classifications. We also analyzed the major clinical manifestations and correlated them to B cell phenotypes, besides correlating memory B cell frequency and serum IgA, IgG and IgM levels. Comparing patients and controls, we found a disturbed frequency of B cell subtypes in this cohort. Both male and female patients presented a reduction on switched memory B cells. However, only female patients had a significant increase on naïve B cells, $CD21^{low}$ B cells and reduction of plasmablasts. Marginal zone and transitory B cells showed no statistical differences between groups. There was no correlation between memory B cell frequency and serum immunoglobulin levels. Clinical analysis revealed a disturbed prevalence in some features but the correlation between B cell subtypes and clinical manifestations revealed only an association between lymphadenopathy and plasmablast reduction. Finally, the classification of this cohort

according to the three proposed models revealed that none of them were appropriated to this Brazilian cohort. **Conclusion:** We observed a diversity in B cell subtypes frequency and the profile of some clinical complications. Because of these findings in both clinical and B cell subtypes, until now no proposed classification is appropriated for this cohort. These findings reinforce the concept of CVID heterogeneity and confirm the necessity of a new classification model that involves other markers.

Descriptors: Common Variable Immunodeficiency, B cell phenotype, classification

1. INTRODUÇÃO

Os defeitos em um ou mais componentes do sistema imune resultam em doenças potencialmente graves, denominadas imunodeficiências (Abbas, 2007).

As imunodeficiências podem ser divididas em primárias, quando defeitos genéticos resultam na falha do sistema imune ou secundárias, ocorrendo quando o sistema imune é suprimido devido uma variedade de fatores, que incluem estados patológicos, traumas e tratamentos (Abbas, 2007).

As principais características das imunodeficiências são o aumento na susceptibilidade a infecções; predisposição a certos tipos de câncer e autoimunidade (Abbas, 2007).

1.1 Imunodeficiências Primárias

As imunodeficiências primárias (IDPs) são um grupo de doenças que apresentam expressão heterogênea, geralmente sendo produto de defeitos genéticos da formação e desenvolvimento do sistema imunológico (Guzman et al., 2007).

A primeira IDP descrita foi a Agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X por Bruton em 1952 e desde então já foram descritas mais de 150 doenças com mais de 120 genes identificados (Geha et al., 2007).

Didaticamente, as IDPs foram subdivididas em grandes grupos, de acordo com a parte da resposta imunológica mais comprometida: 1) Deficiências Predominantes de Anticorpos; 2) Deficiências Celulares/ Combinadas; 3) Deficiências de Fagócitos; 4) Deficiências de Sistema Complemento; 5) Síndromes bem definidas associadas à IDPs; 6) Síndromes de Imunodesregulação; 7) Deficiências da Imunidade Inata e 8) Síndromes Auto-inflamatórias. A **figura 1** demonstra as prevalências dos diferentes grupos de IDPs no complexo HC-FMUSP (Vasconcelos et al., 2010). Esta distribuição é compatível com as observações relatadas em outras casuísticas (Leiva et al., 2007; Eades-Perner, 2007; Knerr, 2007).

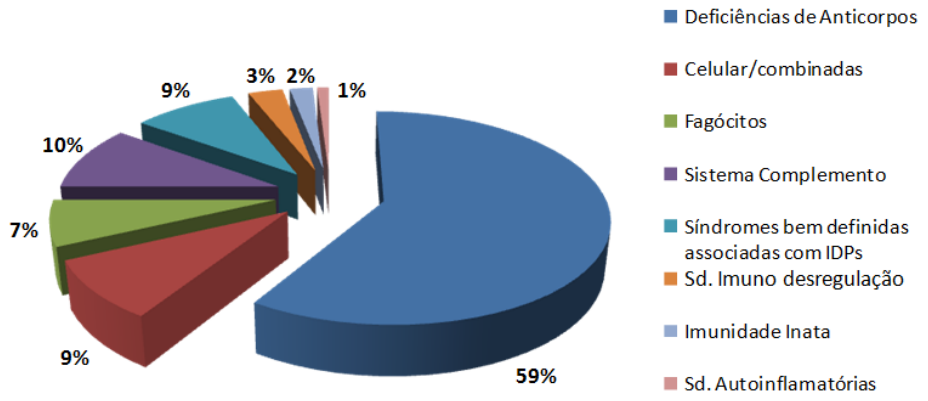


Figura 1: Casuística das Imunodeficiências Primárias no Complexo HC-FMUSP, 2010 (n=910). As Imunodeficiências Primárias foram subdivididas em 8 grupos: 1: Deficiências Predominantes de Anticorpos; 2: Deficiências Celulares/ Combinadas; 3: Deficiências de Fagócitos; 4: Deficiências de Sistema Complemento; 5: Síndromes bem definidas associadas a IDPs; 6: Síndromes de Imunodesregulação; 7: Deficiências da Imunidade Inata e 8: Síndromes Autoinflamatórias.

Assim como observado em nosso serviço, dentre todos os grupos de IDPs, as imunodeficiências humorais são as mais prevalentes (Bonilla et al., 2006).

1.2 Imunodeficiência Comum Variável

Dentro do grupo das imunodeficiências primárias humorais já descritas, a Imunodeficiência Comum Variável (ICV) merece destaque, pois é a IDP clinicamente sintomática mais relevante (Hong,1990; Buckley, 1992; Iseki e Heineir, 1993; Conley et al., 1999; Park et al., 2008). Na **tabela 2** encontram-se os dados de prevalência de ICV em diversos países.

País	Autores	Número de Pacientes *	População em 2000 [x10^6]	Prevalência
São Paulo, Brasil	Grumach et al.(1997)**	101	157	1:79 000
Espanha	MatamorosFlorí et al. (1997)	300 (213)	35	1: 117 000
Noruega	Stray- Pedersen et al. (2000)	303 (150)	4,45	1: 15 000
Irã	Rezai et al. (2006)	242 (195)	22	1: 91 000
Austrália e Nova Zelândia	Kirkpatrick and Riminton (2007)	930	23	1: 25 000

Tabela 1: **Prevalência de Imunodeficiência Comum Variável no mundo**. ***** Números de pacientes com ICV. ** Pacientes pediátricos. Fonte: Chapel e Cunningham-Rundles, 2009.

A ICV foi descrita pela primeira vez em 1953 por Janeway et al. e compreende um grupo de distúrbios heterogêneos que resultam em baixa produção de anticorpos e infecções de repetição (Chapel e Cunningham-Rundles, 2009).

Esta IDP afeta ambos os sexos de forma equivalente e pode apresentar-se em qualquer faixa etária, porém tem uma distribuição bimodal, com picos na infância, em torno dos 10 anos ou na fase adulta, na 2ª-3ª décadas de vida (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999).

Clinicamente o paciente com ICV apresenta-se com infecções de repetição, sobretudo do trato respiratório e gastrointestinal (Esolen et al., 1992; Macura et al., 2003; Kokron et al., 2004). Alguns pacientes também podem apresentar infecções oportunistas e virais (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999; Webster, 2001).

A autoimunidade pode ser a primeira manifestação clínica da ICV (Michel et al., 2004; Carbone et al., 2004), sendo que aproximadamente 1/3 dos pacientes desenvolvem algum fenômeno autoimune no decorrer da doença. As manifestações mais comuns são as citopenias autoimunes e artrite reumatóide (Heeney et al., 2003; Cunningham-Rundles, 2002; Quinti et al., 2007).

Processos malignos também têm incidência aumentada nestes pacientes, sendo que eles apresentam risco 300 vezes maior de desenvolver linfoma e 50 vezes maior de câncer gástrico devido à alta frequência de acloridria, presença de *H. pylori* na gastrite crônica e predisposição genética (Gompels et al., 2003; Park, 2008). Dhala et al. em uma revisão recente (2011), observou que o risco de câncer gástrico em pacientes com ICV é 10 vezes maior do que na população geral em pacientes sem anemia perniciosa ou presença de *H. pylori*.

O tratamento da ICV baseia-se na reposição de gamaglobulina humana que no Brasil geralmente é feito por via endovenosa, em intervalos de 3 a 4 semanas, na dose de 300 a 600mg/Kg, com objetivo de manter níveis séricos acima de 600 mg/dL. Além disso, é necessário instituir tratamentos específicos para cada uma das complicações clínicas apresentadas (Eijkhout et al., 2001; Park, 2008).

1.3 Ontogenia dos Linfócitos B

Os primeiros estágios no desenvolvimento dos linfócitos B (LB) são antígeno-independentes, ocorrem na medula óssea e apresentam uma variação progressiva e diversificada da recombinação das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas (Igs). A célula tronco passa a ser considerada Pró-B, quando a molécula CD22 começa a ser expressa e Pré-B com o aparecimento de CD19 (Abbas, 2007).

Com o aparecimento de IgM e CD20 na superfície celular, o LB passa a ser considerado imaturo e migra da medula óssea para a corrente sanguínea (Abbas, 2007).

O LB imaturo transpõe um novo estágio de desenvolvimento, onde passa a expressar IgD de membrana, além das moléculas CD21 e CD38, sendo este último, um marcador de ativação celular. Nesse estágio do seu desenvolvimento, passa a ser usada a denominação de LB Transitório e esta célula migra da corrente sanguínea para o órgão linfóide secundário (Mackay et al., 2003).

Dando sequência na diferenciação dos LB, o LB Transitório no órgão linfóide secundário, pode se diferenciar em 3 tipos celulares: 1) LB de zona marginal (MZB): também pode ser chamado de LB de memória que não sofreu troca de isotipo, pois é caracterizado por expressar em sua superfície celular a molécula CD27, conhecida como marcador de memória celular, assim como as imunoglobulinas IgM e IgD. A expressão de CD38 é ausente neste tipo de LB (Weller et al., 2004); 2) LB de memória com troca de isotipo (SMB): também expressa CD27 em sua superfície, porém deixa de expressar IgM e IgD de membrana e passa a expressar outras imunoglobulinas (IgG/IgA/IgE) (Ahn e Cunningham-Rundles, 2009); 3) plasmoblasto (Pbl): esta célula é caracterizada pela alta expressão de CD38 e pela ausência de imunoglobulinas na membrana celular (Warnatz e Schlesier, 2008).

Assim como o MZB e o SMB, os plasmoblastos caem na corrente sanguínea, porém com a finalidade de voltarem para a medula óssea, onde sofrem um último estágio de diferenciação, tornando-se plasmócitos, as células B efetoras, que são caracterizadas pela alta expressão da molécula CD38 e CD138 (este sendo marcador celular específico de plasmócitos), e também pela secreção de grande quantidade de imunoglobulinas (Warnatz e Schlesier, 2008).

Recentemente, em análises por citometria de fluxo, foi identificado um novo subtipo de LB, caracterizado pela baixa expressão de CD21, CD38, CXCR5, CCR7 e CD23, e pela alta expressão de CD19, assim como IgM de membrana. Esta célula foi denominada de LB CD21^{low} e apresenta características muito semelhantes a células imaturas (Moir et al., 2001; Warnatz et al., 2002). A frequência do LB CD21^{low} geralmente está aumentada em pacientes com ICV que apresentam esplenomegalia e granulomatose (Wehr et al., 2004). A **figura 2** demonstra os estágios de desenvolvimento dos LB.

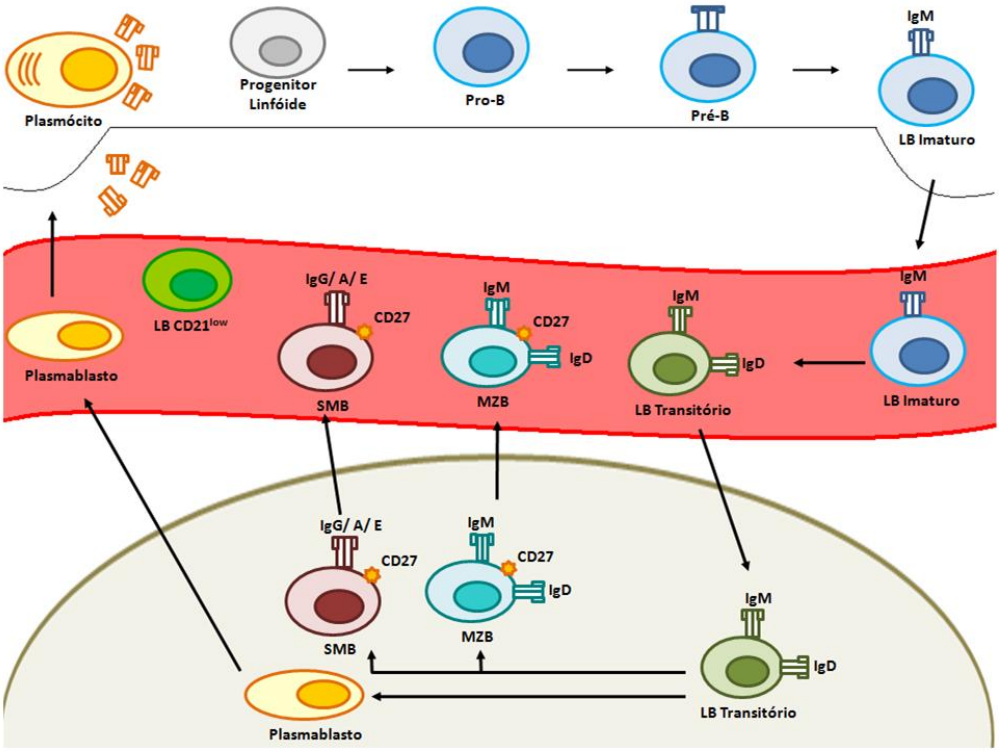


Figura 2: Ontogenia dos Linfócitos B. SMB: LB de memória com troca de isotipo; MZB: LB de zona marginal. **Fonte:** própria.

1.3.1 Alterações Imunológicas e Moleculares

Por se tratar de uma doença heterogênea, vários defeitos em diferentes tipos celulares já foram descritos.

Alguns autores observaram defeitos em células dendríticas (DCs), monócitos, linfócitos T (LT) e linfócitos B (LB). A ausência ou falha na interação destas células com os LB resulta na sua ativação ineficiente e insuficiente produção de anticorpos específicos (Bonilla e Geha, 2009).

As células dendríticas apresentam um papel crucial na ativação direta dos LB, através da interação das moléculas CD40-CD40L (Banchereau e Steinman, 1998). A partir desta interação, ocorre a regulação da maturação e diferenciação dos LB *naive* em plasmócitos e, consequentemente, secreção de imunoglobulinas. Pacientes com ICV apresentam diferenciação, maturação e função das células dendríticas alteradas, resultando na falha da ativação dos LB (Bayry et al., 2004; Scott-Taylor et al., 2005; Viallard et al., 2005).

Anormalidades quanto à produção de TNF, IL-2 e IFN-γ foram também descritas em relação aos monócitos. Estas irregularidades determinam uma falha na diferenciação dos LT *naive* para o perfil Th1. Alguns pacientes apresentam monócitos com alto estresse oxidativo e a consequência imunológica verificada é a deficiente proliferação dos LT e produção de IL-2. Clinicamente, estes defeitos estão sendo associados à autoimunidade e granulomatose (Aukrust et al.; 1994; Aukrust et al.; 1996).

Quanto à imunidade celular, alguns pacientes apresentam linfopenia relativa e absoluta de linfócitos T $CD4^+$, com número normal ou aumentado de linfócitos T $CD8^+$ o que leva à inversão da relação $CD4^+/CD8^+$ (Vasconcelos e Duarte,1989). Nesta coorte, 56% dos pacientes apresentam esta inversão (Kokron et al., 2004).

Vários defeitos já foram descritos em relação aos LT, como proliferação defeituosa dos linfócitos T *naive*, reduzida ativação celular, aumento de apoptose, produção anormal de citocinas do perfil Th1 e expressão reduzida de CD40L, resultando na falha da ativação dos LB e conseqüentemente na troca de isotipo (Pinchuk et al., 1996; Bayry, 2005).

Em relação aos LB, vários defeitos celulares e moleculares já foram descritos. Geralmente, pacientes com ICV apresentam quantidade normal de LB, sendo que estas células têm um fenótipo característico de células imaturas, apresentando dificuldade na diferenciação em célula efetora e de memória, caracterizando defeitos funcionais nestes LB (Braun et al., 1992; Warnatz et al., 2002; Ko et al., 2005).

Schwartz (1999) verificou que os pacientes com ICV apresentavam células B incapazes de proliferar e/ou diferenciar-se, fenômeno associado a defeito da cascata de transdução de sinal intracelular via fosforilação de proteínas tirosinadas.

Como dito anteriormente, pacientes com ICV geralmente apresentam frequência normal de LB, e, entre alguns dos que apresentam número reduzido, defeitos genéticos na molécula CD19 foram verificados, resultando em poucos LB maduros e consequentemente, hipogamaglobulinemia (Schaffer et al., 2007).

Em relação às células de memória, foi verificado que o subtipo MZB está associado à resposta a antígenos polissacarídicos, pois os pacientes que apresentam diminuição deste subtipo são mais susceptíveis à infecções por *Streptococcus pneumoniae*, apresentam resposta deficiente à imunização contra pneumococos e dano pulmonar progressivo (Carsetti et al., 2004; Haymore et al., 2007).

A expressão dos LB de memória com troca de isotipo (SMB) aumenta de acordo com a idade, representando 40% dos linfócitos B encontrados na circulação sanguínea de adultos (Agematsu et al., 2000). Anormalidades quanto ao SMB foram verificadas primeiramente em pacientes com Síndrome da HiperIgM, nos quais foi observada redução na frequência deste subtipo (Sneller, 2001).

Em 2004, Carsetti et al. verificaram que pacientes com ICV apresentavam baixa expressão de SMB, e em 2006, Alachkar et al. observaram que havia uma correlação entre a diminuição destas células e o aumento da prevalência de bronquiectasias e autoimunidade, quando comparados a pacientes com frequências maiores. Salzer et al. (2004) verificaram que pacientes com ICV com redução de SMB apresentavam mutações na molécula ICOS com maior frequência.

Em 2001, Thompson et al. verificaram que camundongos que apresentavam aumento de LB Transitório (Trans) apresentavam mutações em BAFF, molécula associada à sobrevida dos LB. Posteriormente, em 2008, Wehr et al. também verificaram um aumento neste subtipo de LB em pacientes com ICV e que este aumento estava relacionado à presença de linfadenopatia. Estes dados também foram observados por Mouilot et al. (2010).

Outra subpopulação cujas anormalidades foram associadas a certas manifestações clínicas foi a de plasmoblastos (Pbl). Wehr et al. (2008) verificaram uma correlação inversa entre autoimunidade e a frequência de Pbl, pois os pacientes com redução deste subtipo de LB apresentam maior prevalência de doenças autoimunes. Em 2007, Castigli et al. verificaram que pacientes com mutações na molécula TACI apresentavam defeitos na diferenciação de Pbl para plasmócitos, assim como na produção de IgG, IgM e IgA.

Por fim, em relação aos LB $CD21^{low}$, foi observado que pacientes com ICV apresentam uma frequência maior deste subtipo celular que indivíduos saudáveis, e este aumento está relacionado a maior prevalência de esplenomegalia (Wehr et al., 2008).

1.4 Classificação

Devido à grande heterogeneidade da ICV, tem-se tentado definir grupos de acordo com a presença de anormalidades na distribuição de subtipos celulares e sua eventual correlação com algumas manifestações clínicas, desta forma agrupando pacientes com características semelhantes para melhor acompanhamento e eventual descoberta de genes desencadeantes.

Diferentes estudos propuseram modelos de subdivisão dos pacientes em grupos mais homogêneos, inicialmente através de ensaios de produção de imunoglobulinas (Ig) *in vitro*, porém estas técnicas, além de serem caras e demoradas, eram de difícil padronização e execução (Bryant et al., 1990).

Nos últimos nove anos, foram propostos 3 modelos de classificação, baseados nas subpopulações de LB, as classificações de Freiburgo, Paris e EUROclass, a partir da caracterização dos LB por citometria de fluxo.

A primeira, denominada classificação de Freiburgo, considerou as populações de LB de memória com troca de isotipo e LB $CD21^{low}$, dividindo os pacientes em 3 grupos: Ia, Ib e II. A **figura 3** descreve os grupos formados pela classificação de Freiburgo (Warnatz et al., 2002).

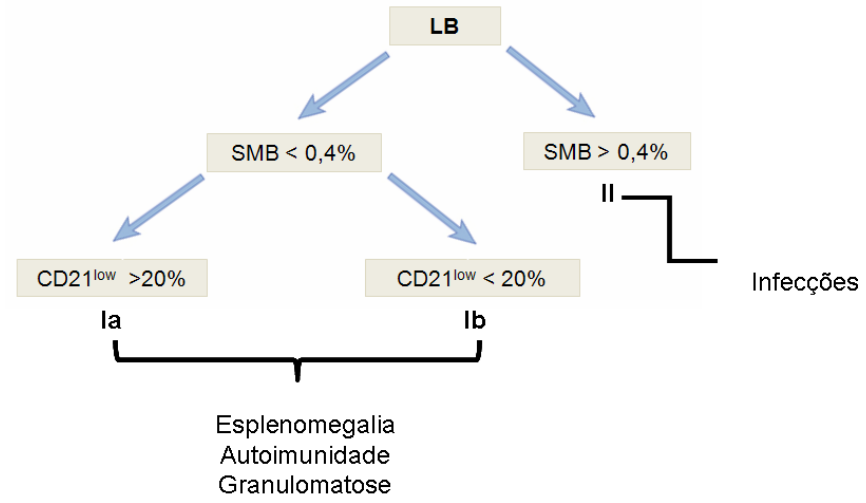


Figura 3: Classificação de Freiburgo. Classificação baseada na avaliação dos linfócitos B de memória com troca de isotipo nos pacientes com ICV. Fonte: adaptado de: www.medscape.com
LB: Linfócitos B.
SMB: Linfócito B de memória com troca de isotipo.
$CD21^{low}$: Linfócito B $CD21^{low}$.

Pacientes classificados no grupo I tendem a apresentar esplenomegalia, autoimunidade e granulomatose com maior frequência do que os pacientes classificados no grupo II (Ko et al., 2005).

Posteriormente, foi formulada a classificação de Paris, onde Piqueras et al. (2003) avaliaram a população total de LB de memória e a população de memória com troca de isotipo, classificando os pacientes em 3 grupos. A **figura 4** descreve os grupos formados pela classificação de Paris.

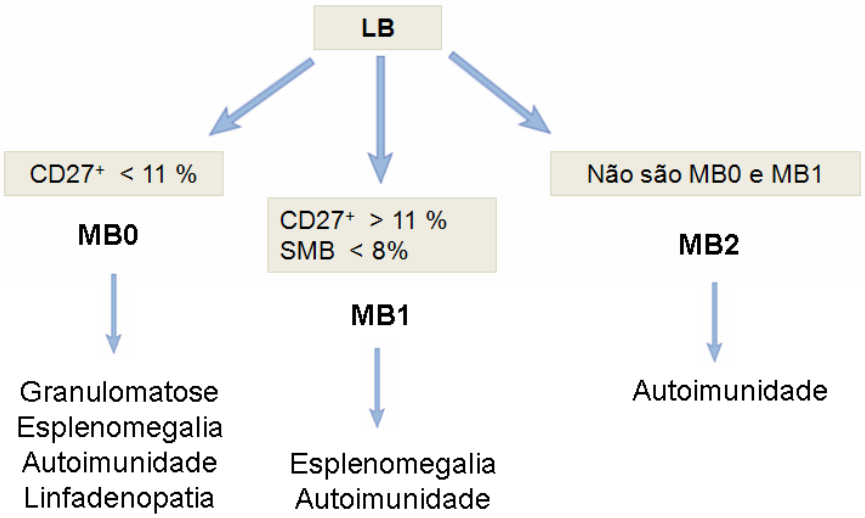


Figura 4: Classificação de Paris. Classificação baseada na avaliação dos linfócitos B de memória.
Fonte: adaptado de: www.medscape.com.
LB: Linfócito B.
$CD27^{+}$: Total de LB de memória.
SMB: LB de memória com troca de isotipo.

Com esta classificação foi possível correlacionar algumas manifestações clínicas, como presença de esplenomegalia e granulomatose com o grupo MB0 (Piqueras et al., 2003).

Mais recentemente, Wehr et al. (2008) fizeram uma compilação das 2 classificações, baseando-se no fenótipo das subpopulações de LB de memória com troca de isotipo, LB Transitório e LB $CD21^{low}$, sendo denominada classificação EUROclass.

Esta classificação dividiu os pacientes nos seguintes grupos: aqueles com linfócitos B praticamente ausentes (<1%), contendo todos os pacientes com defeitos graves de diferenciação precoce de linfócitos B e os que têm LB em número normal. Este último grupo pode ser dividido em um grupo que apresenta memória com troca de isotipo normal (>2%) e um grupo com frequência muito reduzida (≤ 2%), indicando distúrbios na função do centro germinativo (Wehr et al., 2008).

Duas divisões a mais foram feitas, baseadas na quantificação de LB Transitório, de acordo com a frequência menor ou maior que 9% e outra com base na presença de LB $CD21^{low}$, com frequência menor ou maior que 10%. A **figura 5** descreve cada um dos grupos da classificação EUROclass (Wehr et al., 2008).

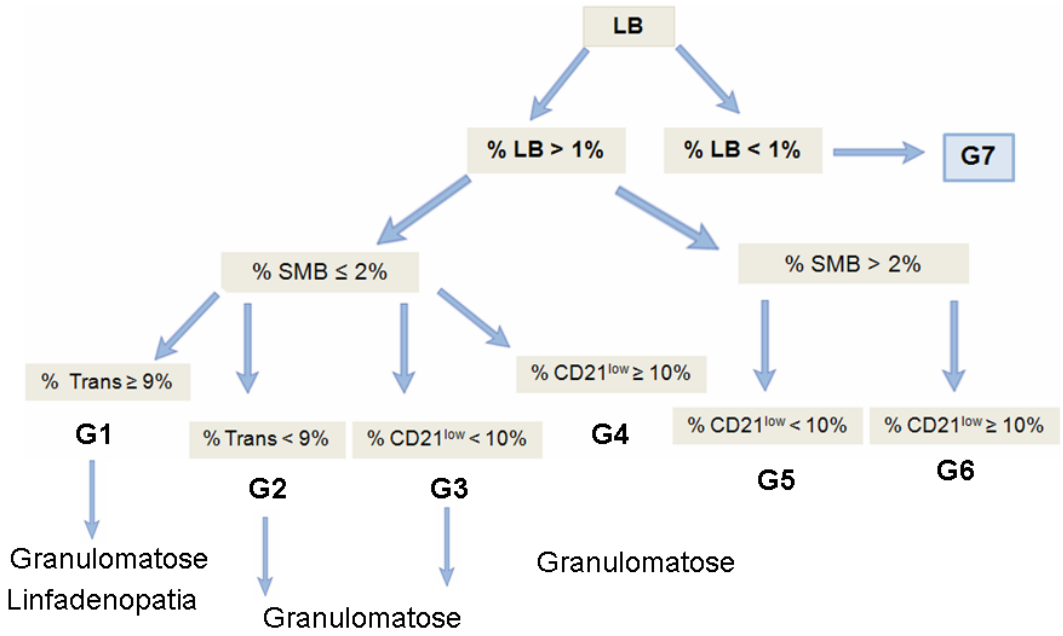


Figura 5: Classificação EUROclass. Somente os pacientes com frequência de LB maior que 1% são subdivididos de acordo com as frequências de LB de memória com troca de isotipo, LB Transitório e LB CD21^{low}. Os pacientes que apresentam frequência de LB menor que 1% compõem o grupo 7. Fonte: adaptado de: www.medscape.com.

Essa classificação foi aplicada em uma coorte multicêntrica, contendo 303 pacientes e observou-se uma correlação entre o baixo número de LB de memória e as manifestações de granulomatose, esplenomegalia e citopenias autoimunes. O aumento das subpopulações de LB Transitório e LB CD21^{low} foram associados a linfadenopatia e esplenomegalia, respectivamente. Ainda nesse estudo, a redução de LB de memória com troca de isotipo foi associada à alta incidência de bronquiectasias (Wehr et al., 2008).

1.5 Justificativa

A heterogeneidade observada em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável sugere que se trata de um grupo de distúrbios diferentes com algumas características clínicas comuns. A caracterização imunológica destes pacientes tem se mostrado necessária para subdividi-los, possibilitando um acompanhamento mais adequado e talvez até um tratamento específico mais direcionado.

Dados recentes da literatura acrescidos da experiência de acompanhamento clínico desta coorte brasileira de pacientes com ICV sugerem que a classificação destes pacientes é fundamental, entretanto, a melhor forma de fazê-lo ainda é indefinida. Neste trabalho, estudamos a distribuição dos subtipos de linfócitos B desta coorte de pacientes brasileiros portadores de ICV e posteriormente os subdividimos de acordo com as classificações descritas nos últimos 9 anos para verificar qual delas se adequaria melhor a esta população.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Descrever o fenótipo clínico e as subpopulações de Linfócitos B da coorte de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável acompanhados no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP e verificar o melhor método para classificação para estes pacientes.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar as características fenotípicas das subpopulações de Linfócitos B.
- Verificar se há correlação entre a concentração sérica de imunoglobulinas dosadas no período do diagnóstico e a frequência de LB de memória.
- Descrever as características clínicas da coorte de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável.
- Verificar se há correlação entre esplenomegalia, linfadenopatia, autoimunidade e bronquiectasias e a freqüência dos diferentes subtipos de LB.
- Classificar os pacientes segundo os critérios das classificações de Freiburgo, Paris e EUROclass e verificar qual destes modelos melhor se adequa a esta coorte brasileira.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Os pacientes portadores de Imunodeficiência Comum Variável participantes deste estudo fazem parte de uma coorte de pacientes acompanhada no ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP.

Os pacientes foram diagnosticados como ICV segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997); Grupo Panamericano de Imunodeficiências Primárias (PAGID) e Sociedade Européia de Imunodeficiências (ESID) (Conley et al.,1999).

O critério de inclusão utilizado para o estudo foi o paciente ter diagnóstico compatível com ICV.

Os critérios de exclusão utilizados foram: pacientes com doença maligna em tratamento e pacientes com infecções no dia da coleta.

Os procedimentos para coleta das amostras seguiram as normas do Comitê de Ética do HC-FMUSP. Todos os pacientes que aceitaram participar do estudo foram esclarecidos quanto à natureza e a finalidade do trabalho e convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (anexos 1 e 2).

Foram incluídos no estudo 70 pacientes com idade entre 18 e 60 anos, sendo 37 mulheres (53%) e 33 homens (47%). Dentre as pacientes do gênero feminino, a mediana de idade foi de 32 anos e para os do gênero masculino, 32,5 anos. A mediana da idade ao diagnóstico foi de 27 e 26 anos, para pacientes mulheres e homens, respectivamente.

Em relação ao tempo de retardo do diagnóstico a mediana foi de 8 e 6,5 anos respectivamente para mulheres e homens (anexo 3).

Também foram utilizadas amostras provenientes de 30 controles saudáveis, 24 mulheres (mediana: 26 anos) e 6 homens (mediana: 24 anos).

3.2. Métodos

Para a identificação das subpopulações de linfócitos B foram colhidos 20 mL de sangue em tubo heparinizado com posterior separação de células mononucleares de sangue periférico e marcação de superfície com anticorpos monoclonais.

A coleta foi realizada imediatamente antes da reposição mensal de gamaglobulinas.

3.2.1 Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico

A separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foi realizada através do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque, no qual as células com maior densidade depositam-se abaixo do Ficoll-Hypaque e as células com baixa densidade formam uma camada logo acima deste reagente. As etapas da separação seguem abaixo:

1) A amostra do tubo de coleta foi transferida para um tubo tipo falcon de 50 mL após verter o tubo delicadamente;
2) Foi acrescentado o mesmo volume de solução salina estéril ao tubo de 50 mL. Logo em seguida esta solução foi homogeneizada;
3) Em outro tubo tipo falcon foram adicionados 15 mL da solução de Ficoll-Hypaque;
4) Cada 35 mL da solução contendo o sangue e a salina foram delicadamente dispensados no tubo contendo os 15 mL de Ficoll-Hypaque. Nesta etapa é essencial adicionar a solução lentamente, para que a amostra permaneça por cima do Ficoll e não o perfure;
5) As amostras foram centrifugadas por 40 minutos a 1041 x g – RCF (2.300 rpm), temperatura em torno de 18 – 20 °C;
6) Após a centrifugação, foi verificada a formação da nuvem de células mononucleares, localizadas na interface do Ficoll-Hypaque. Com o auxílio de uma pipeta, as células mononucleares foram coletadas e transferidas para outro tubo tipo falcon de 50 mL;

7) Neste tubo contendo a nuvem coletada, foi acrescentada salina estéril até a marca de 50 mL;

8) As amostras foram centrifugadas a 17,6 x g - RCF (1.700 rpm) por 10 minutos, em temperatura em torno de 18 – 20 °C;

9) Após a centrifugação, foi verificada a formação do botão celular. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular homogeneizado até se desprender do fundo do tubo falcon;

10) O volume do tubo falcon foi completado com 50 mL de salina novamente e centrifugado a 17,6 x g - RCF (1.700 rpm), por 10 minutos em temperaturade 18–20°C;

11) Foi verificada novamente a formação do botão celular, desprezado o sobrenadante e homogeneizado até o botão celular se desprender do fundo do tubo falcon;

12) O volume do tubo foi completado com 10 mL de meio de cultura RPMI;

13) Em um eppendorf foram dispensados 10 µL do corante azul de tripan (0,1%) e 10 µL da suspensão de células;

14) Foram retirados 10 µL da solução de células e corante e transferidos para câmara de Neubauer coberta com uma lamínula;

15) A contagem celular foi realizada em microscópio óptico em aumento de 400X. A contagem foi realizada em 2 quadrantes laterais onde foram desconsideradas as células mortas, as quais apareceram coradas de azul;

16) Cálculos: média da contagem de células nos dois quadrantes (somar o valor dos dois quadrantes e dividir por dois) x valor da diluição do corante azul de tripan x volume ressuspendido em meio RPMI x 10^4 (valor de correção da câmara de neubauer). O resultado totaliza o número de células existentes no volume de suspensão celular;

17) A concentração celular foi acertada para $1x10^6$ células por poço.

3.2.2 Imunofenotipagem para Identificação das Subpopulações de Linfócitos B

Esta marcação nos permite a identificação dos seguintes subtipos de LB: LB *naive*; LB de zona marginal (MZB); LB de memória com troca de isotipo (SMB); LB Transitório (Trans); plasmoblastos (Pbl) e LB $CD38^{low}CD21^{low}$ ($CD21^{low}$).

1) Após a separação de PBMC, foram transferidos 100 µL de células na concentração de $1x10^6$ células por poço em placa de fundo U;

2) A marcação para cada paciente e controle foi realizada seguindo o esquema abaixo:

Poço 1 - (não marcado): 100 µL de células.

Poço 2 - (marcação de memória): 100 µL de células + CD19/ CD27/ IgD.

Poço 3 - (marcação de ativação): 100 µL de células + CD19/CD38/CD21/IgM.

Poço 4 - (FMO IgD): 100 µL de células + CD19/CD27.

Poço 5 - (FMO IgM): 100 µL de células + CD19/ CD38.

Anticorpo	Fluorocromo	Titulação
CD19	APC	1/40
CD27	FITC	1/20
IgD	PE	1/10
CD21	PE	1/60
CD38	FITC	1/10
IgM	PerCP	1/40

Tabela 2: Anticorpos utilizados para marcação de superfície celular dos subtipos de LB. APC: *aloficocianina*; FITC: *isotiocianato de fluoresceína*; PE: *ficoeritrina*; PerCP: *peridinin chlorophyll protein.*

3) A placa foi incubada por 30 minutos no escuro;

4) Após a incubação, o volume de cada poço foi completado com 100 µL de PBS e realizada a lavagem, centrifugando a placa por 10 minutos a 17,6 x g - RCF (1.700 rpm), temperatura em torno de 18 – 20 °C;

5) O sobrenadante foi desprezado e o volume de cada poço foi completado com 100 µL de PBS.

6) O procedimento de lavagem foi realizado novamente, centrifugando a placa a 17,6 x g - RCF (1.700 rpm) por 10 minutos;

7) Novamente o sobrenadante foi desprezado e cada poço foi ressuspendido com 200 µL de Paraformaldeído a 1% (esta solução é utilizada com a finalidade de manter os anticorpos fixados às células para leitura em citômetro de fluxo por até 1 semana);

8) A suspensão de células foi transferida de cada poço para seu respectivo tubo de citometria;

9) A leitura foi realizada por citometria de fluxo.

Aquisição e Análise por Citometria de Fluxo

A aquisição das amostras de pacientes e controles foi feita através do citômetro de fluxo FACSCANTO e os dados obtidos foram analisados no programa FLOWJO versão 8.7.1.

Primeiramente, em cada amostra analisada foi definido em um *dotplot* para os parâmetros de FSC-A (tamanho em área) *versus* FSC-H (tamanho em altura) a população de leucócitos que apresenta tamanho e área homogênea, denominada de *singlets*.

Após a identificação das populações celulares homogêneas foi possível a identificação da população de linfócitos totais. Desta primeira seleção, a população de linfócitos B foi determinada através da expressão da molécula CD19, sendo definida em um novo *dotplot* como $CD19^+$. A **figura 6** demonstra os *dotplots* para *singlets*, linfócitos totais e linfócitos B.

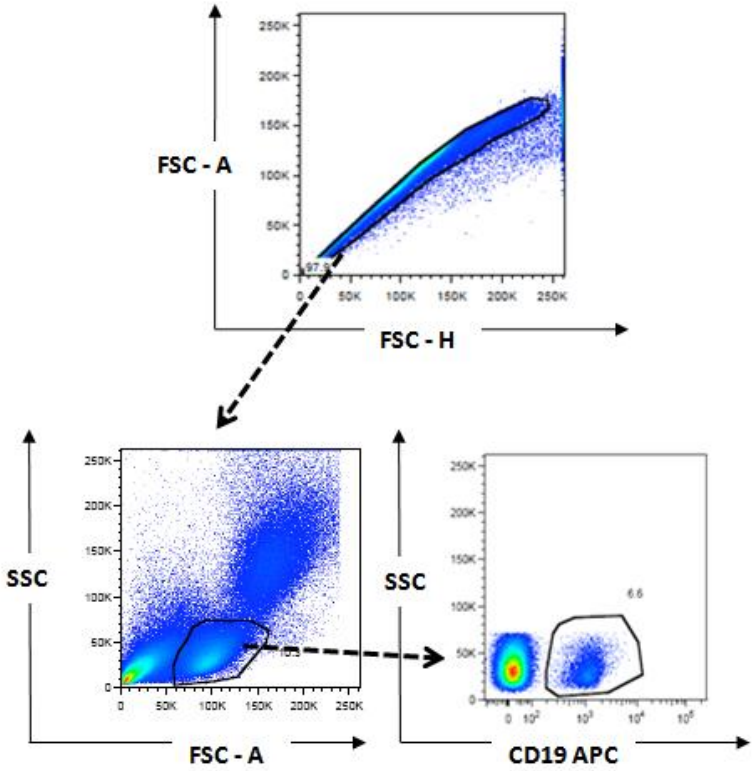


Figura 6: Estratégia de análise para caracterização fenotípica dos LB. No primeiro *dotplot* foi feito um *gate* nas populações celulares homogêneas. Analisando FSC-A (tamanho em área) e FSC-H (tamanho em altura) é possível identificar as células que foram adquiridas uma a uma pela célula de fluxo do citômetro. No segundo *dotplot* foi feito um *gate* na região de linfócitos e no terceiro *dotplot*, dentre a população de linfócitos totais foi identificado a população de linfócitos B, definida por serem $CD19^{+}$.

Primeiramente foram analisados os tubos denominados por *FMO* (do inglês "*fluorescence minus one*"). Para estas marcações, foram utilizadas amostras controles, oriundas de indivíduos saudáveis, onde, através do emprego de todos os anticorpos monoclonais menos um, é possível a identificação com precisão da população celular de interesse.

Em nosso caso, foram utilizados *FMO* para os marcadores fenotípicos IgD e IgM respectivamente, os quais permitiram a identificação correta das subpopulações de LB *naive*, LB de zona marginal, LB Transitório e LB plasmoblasto. A **figura 7** descreve a estratégia de análise através do *FMO*.

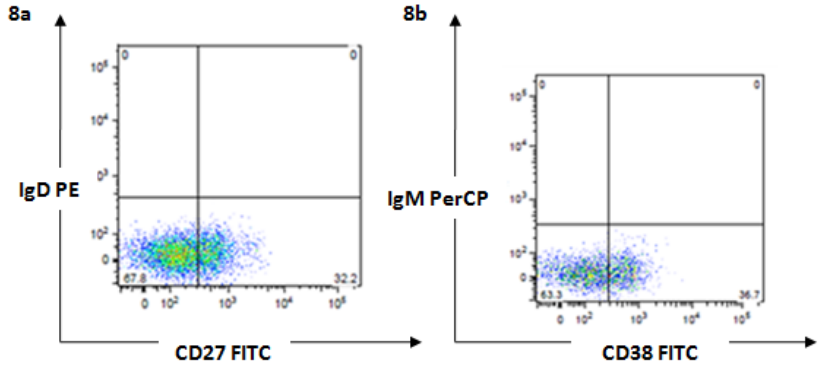


Figura 7: Estratégia de análise através do *FMO*. Após a identificação da população de LB foi feita a análise dos *dotplots* dos FMOs para IgD (8a) e IgM (8b), onde as células foram marcadas com CD19 (APC), CD27 (FITC) e CD38 (FITC), distinguindo assim a linha de corte para IgD e IgM respectivamente.

Após a análise dos *FMO*s e, portanto, definindo as linhas de corte para IgD e IgM foram feitas as análises das amostras de pacientes e controles. Na **figura 8**, é possível identificar três subpopulações de linfócitos B. Representado pelo número 1, encontra-se a população de LB *naive*, ou células B imaturas, que são definidas por serem $CD19^{+}IgD^{+}CD27^{-}$; no número 2, encontra-se a população de linfócitos B de zona marginal ou linfócitos B de memória sem troca de isotipo, definida por serem $CD19^{+}IgD^{+}CD27^{+}$; e por último a população 3, representando os linfócitos B de memória com troca de isotipo, sendo caracterizados como $CD19^{+}IgD^{-}CD27^{+}$. A **figura 8** representa uma análise para um controle e um paciente.

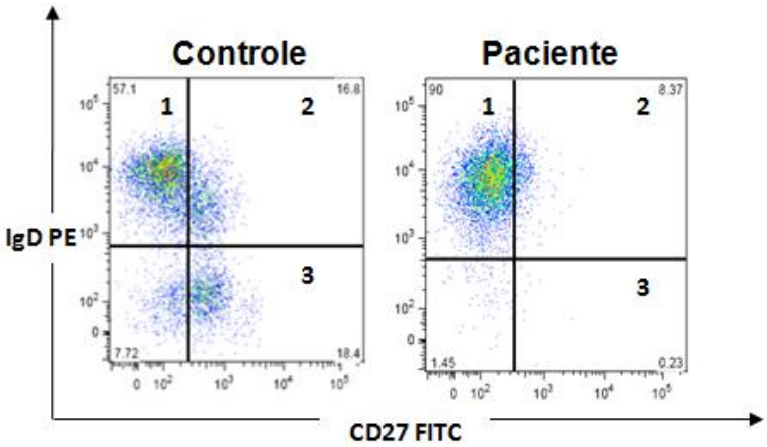


Figura 8: Identificação das subpopulações de linfócitos B. Utilizando os parâmetros IgD (PE) *versus* CD27 (FITC) foi realizada a identificação de três subtipos de LB, enumerados de 1 a 3 no *dotplot*: 1= LB *naive*; 2= LB de zona marginal; 3= LB com troca de isotipo. As análises foram feitas comparando a frequência encontrada para um indivíduo controle e paciente.

Na **figura 9** é possível identificar as subpopulações de LB Transitório (4) e plasmoblastos (5). O LB Transitório é definido por ser $CD19^{+}CD38^{+}IgM^{+}$, já os plasmoblastos caracterizam-se por serem $CD19^{+}CD38^{+}IgM^{-}$. Os *dotplots* representam uma análise de um controle e um paciente.

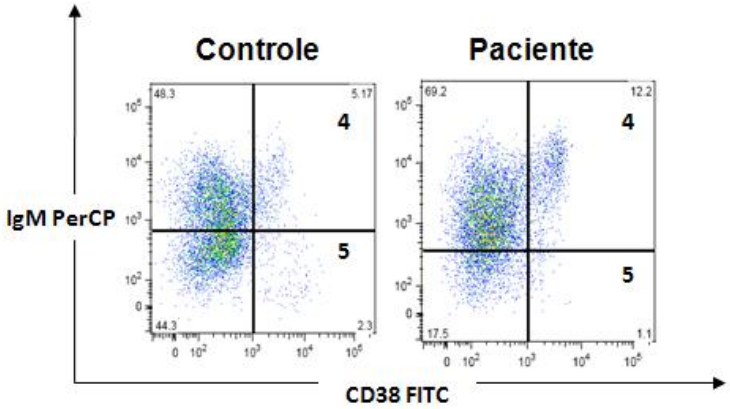


Figura 9: Identificação das subpopulações de LB: Utilizando os parâmetros IgM (PerCP) *versus* CD38 (FITC) foi feita a identificação de 2 subtipos de LB, enumerados de 4 e 5 no *dotplot*: 4 = LB Transitório; 5 = plasmoblasto. As análises foram feitas comparando a frequência encontrada para um indivíduo controle e paciente.

Por último, foi realizada a identificação da população de LB $CD21^{low}$, definida por ser $CD19^{+}CD21^{low}CD38^{low}$. Os *dotplots* da **figura 10** representam uma análise de um controle e um paciente.

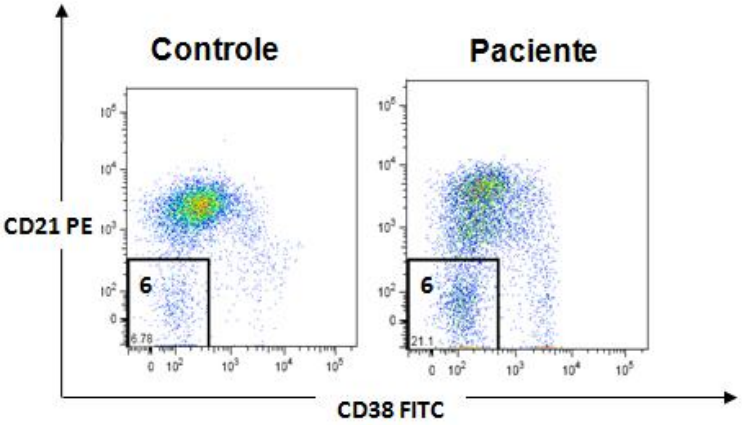


Figura 10: Identificação da subpopulação de LB CD21^{low}: Utilizando os parâmetros CD21 (PE) versus CD38 (FITC) foi identificada a população de LB CD21^{low}, enumerada no dotplot como 6. As análises foram feitas comparando a frequência encontrada para um indivíduo controle e paciente.

3.2.3 Análise das Manifestações Clínicas

A análise clínica contemplou algumas das manifestações mais comumente observadas nos pacientes com ICV. Foram consideradas 7 manifestações: infecções de repetição; esplenomegalia; linfadenopatia; bronquiectasias; granulomatose; autoimunidade e doenças malignas.

A avaliação das infecções de repetição foi feita através do acompanhamento clínico, onde foram avaliadas as infecções apresentadas pelos pacientes, com identificação do agente causador sempre que possível.

O diagnóstico de esplenomegalia e linfadenopatia foi feito primeiramente através de exame clínico e posteriormente confirmado através de ultrassonografia e/ou tomografia computadorizada.

Bronquiectasias foram diagnosticadas através de tomografia computadorizada de tórax, já a confirmação do diagnóstico de granulomatose, foi obtida através de biópsia da lesão sugestiva.

A autoimunidade pode-se apresentar como diferentes doenças, por conta disso, anualmente é realizado o rastreamento e o diagnóstico segundo os critérios das sociedades específicas. Foi possível a identificação dos seguintes quadros: citopenias

autoimunes; tireoidites; vitiligo; artrite reumatóide; doença celíaca; síndrome de Sjögren; psoríase; alopécia e enteropatias autoimunes.

Pacientes com ICV tendem a apresentar linfomas como principal doença maligna, mas apresentam também outros tipos de neoplasias. Nos pacientes que participaram do estudo, foram observadas as seguintes neoplasias já tratadas: linfomas e neoplasia de tireóide, vesícula e cólon.

3.2.4 Concentração Sérica de Imunoglobulinas

A determinação das concentrações séricas de IgG, IgA e IgM foi realizada no mesmo período em que foi feita a citometria de fluxo para a identificação dos subtipos de LB.

Os níveis séricos de imunoglobulinas foram determinados por nefelometria e foi realizado no Laboratório Central do Hospital das Clínicas de São Paulo.

3.2.5 Classificações

Com os dados de imunofenotipagem associados aos dados clínicos, foram realizados 3 modelos classificatórios: Classificação de Freiburgo, proposta por Warnatz et al., (2002), Classificação de Paris, proposta por Piqueras et al., (2003) e Classificação EUROclass, proposta por Wehr et al., em 2008, a fim de determinar qual destes modelos melhor se adapta para a coorte deste estudo.

Classificação de Freiburgo

Esta classificação analisou duas subpopulações distintas de linfócitos B: LB de memória com troca de isotipo e LB $CD21^{low}$. Os pacientes foram divididos em 3 grupos: Ia, Ib e II, como descrito acima, na **figura 3**.

Classificação de Paris

A classificação de Paris subdivide os pacientes em 3 grupos de acordo com as características dos LB de memória total e LB de memória com troca de isotipo. Pacientes foram classificados em MB0, MB1 e MB2, como descrito acima, na **figura 4**.

Classificação EUROclass

Esta última classificação subdivide os pacientes em 7 grupos, segundo as características fenotípicas do LB de memória com troca de isotipo, LB Transitório e LB $CD21^{low}$(figura 5). Apenas os pacientes que apresentaram frequência de LB ($CD19^{+}$) maior que 1% estão incluídos nesta classificação.

No grupo 1 encontram-se os indivíduos com LB de memória com troca de isotipo ($CD19^{+}CD27^{+}IgD^{-}$) $\leq$ 2% e LB Transitório ($CD19^{+}CD38^{+}IgM^{+}$) $\geq$ 9%.

Os pacientes que apresentam frequência de LB de memória com troca de isotipo $\leq$ 2% e LB Transitório < 9% são classificados como grupo 2.

No grupo 3 foram reunidos os pacientes com frequência de LB de memória com troca de isotipo $\leq$ 2% e LB $CD21^{low}$ ($CD19^{+}CD38^{-}CD21^{low}$) < 10% e no grupo 4, os que apresentaram frequência $\geq$ 10%.

Nos grupos 5 e 6 foram adicionados os pacientes que apresentaram frequência de LB de memória com troca de isotipo > 2%, diferenciando apenas em relação a frequência de LB $CD21^{low}$. No grupo 5 foram adicionados os pacientes com frequência < 10% e no grupo 6, os que apresentam frequência $\geq$ 10%.

Os pacientes que apresentaram frequência de LB ($CD19^{+}$) menor que 1% compõem o grupo 7.

3.2.6 Análise Estatística

Os testes estatísticos utilizados foram obtidos através do programa GraphPad Prism 5.

Para comparação da frequência entre pacientes e controles, comparação entre os grupos de cada classificação, assim como as prevalências para cada manifestação clínica e níveis séricos de imunoglobulinas em cada grupo foi realizada o teste de Kruskal-Wallis e a identificação de qual grupo apresentou diferença estatística através do teste Dunn`s Multiple Comparison.

Para análise das características clínicas foi realizado o teste 2Way ANOVA e para identificação de qual grupo que apresentou diferença estatística foi realizado o teste de Bonferroni.

A comparação entre os subtipos de LB e as complicações clínicas assim como as concentrações séricas das imunoglobulinas foi feita através do teste de Mann-Whitney.

A correlação entre a concentração sérica de imunoglobulinas e as células de memória foi feita através do teste de Spearman. Foram considerados os valores significantes a partir de $P<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Imunofenotipagem para Identificação de Linfócitos B

Inicialmente analisamos a frequência de LB dos pacientes, sendo definidos pela expressão da molécula de superfície CD19. A mediana da frequência dos pacientes homens foi de 7,9% de LB totais, (variando de 0,11% a 38%) e controles homens, 10,6% (variando de 8,6% a 15%). Quanto ao gênero feminino, a mediana da frequência de LB totais foi de 8,8% nas pacientes (variando de 0,5% a 28,1%) e 8,6% nos controles (variando de 3% a 12,6%). Não observamos diferença estatística na frequência de LB tanto em relação ao gênero como quanto aos grupos de pacientes e controles. A **figura 11** demonstra as frequências de LB obtidas para cada grupo.

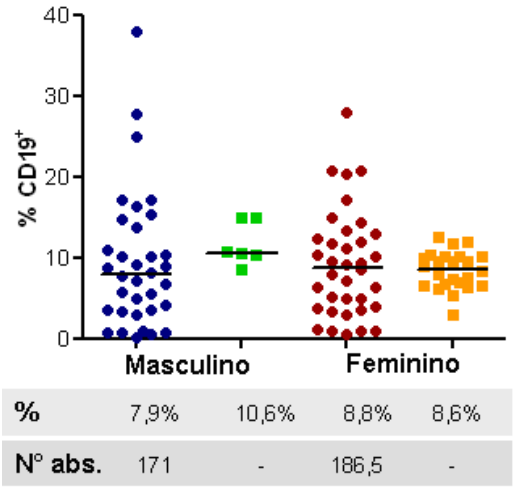
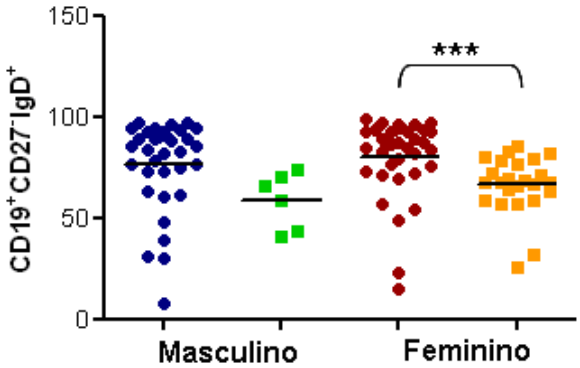


Figura 11: Frequência de LB totais de indivíduos controles e pacientes com ICV. Linfócitos B identificados com base na expressão da molécula de superfície CD19. Azul - pacientes homens; Verde - controles homens; Vermelho – pacientes mulheres e Laranja – controle mulheres. As linhas abaixo do gráfico correspondem às medianas da porcentagem e número absoluto obtidos para cada grupo. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P<0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P<0,001.

A partir da determinação da frequência de LB totais, foram avaliados 6 subpopulações de LB presentes na corrente sanguínea: LB *naive*, LB de zona marginal, LB de memória com troca de isotipo, LB Transitório, plasmoblasto e LB $CD21^{low}$.

Quanto aos LB *naive*, foi verificado que apenas pacientes do sexo feminino (86,6%) apresentou frequência estatisticamente maior que controles do mesmo gênero (68%).

A **figura 12** mostra a distribuição das frequências de LB *naive* encontrada em pacientes e controles.



%	84,5%	63%	86,5%	68%
N° abs.	73,4	-	102	-

Figura 12: Frequência de LB *naive* de indivíduos controles e pacientes com ICV. Linfócitos B *naive* foram identificados com base na expressão das moléculas de superfície CD27 e IgD. Os resultados foram expressos como porcentagem dos LB totais obtidos para cada um dos grupos avaliados: Azul - pacientes homens; Verde - controles homens; Vermelho – pacientes mulheres e Laranja – controle mulheres. As linhas abaixo do gráfico correspondem às medianas da porcentagem e número absoluto obtidos para cada grupo.. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P<0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P<0,001.

Em relação às células de memória, foi observado que os pacientes apresentaram uma grande variação nas frequências tanto de LB de zona marginal quanto LB de memória com troca de isotipo quando comparados aos controles.

Quanto a frequência de LB de zona marginal, não houve diferença significativa quando comparado pacientes e controles, como podemos observar na **figura 13**.

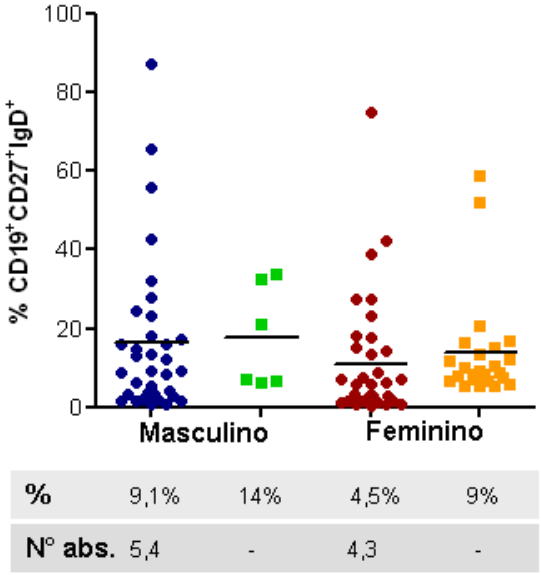


Figura 13: Frequência de LB de zona marginal de indivíduos controles e pacientes com ICV. Linfócitos B de zona marginal foram identificados com base na expressão das moléculas de superfície CD27 e IgD. Os resultados foram expressos como porcentagem dos LB totais obtidos para cada um dos grupos avaliados: Azul - pacientes homens; Verde - controles homens; Vermelho – pacientes mulheres e Laranja – controle mulheres. As linhas abaixo do gráfico correspondem às medianas da porcentagem e número absoluto obtidos para cada grupo. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P<0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P<0,001.

Foi observado que no grupo de pacientes, a frequência de LB de memória com troca de isotipo tanto em homens quanto em mulheres, foi muito menor que a encontrada em seus respectivos controles. Dos 70 pacientes, 45 (64%) apresentaram frequência de SMB[1] menor do que 2% e 3 pacientes (4%) apresentaram níveis indetectáveis.

A mediana da frequência de SMB no grupo dos pacientes homens foi de 2%, enquanto que no grupo de controles homens foi de 18,6%. Quanto às pacientes mulheres, foi constatada mediana de 0,9% de LB de memória com troca de isotipo e em seus controles, de 13,4%. A **figura 14** mostra a frequência de SMB obtida para cada grupo.

[1] SMB: Linfócito B de memória com troca de isotipo.

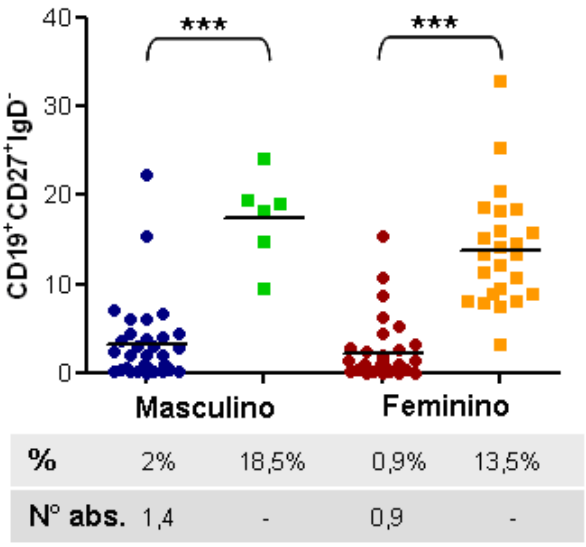


Figura 14: **Frequência de LB de memória com troca de isotipo de indivíduos controles e pacientes com ICV**. Linfócitos B de memória com troca de isotipo foram identificados com base na expressão das moléculas de superfície CD27 e IgD. Os resultados foram expressos como porcentagem dos LB totais obtidos para cada um dos grupos avaliados: Azul - pacientes homens; Verde - controles homens; Vermelho – pacientes mulheres e Laranja – controle mulheres. As linhas abaixo do gráfico correspondem às medianas da porcentagem e número absoluto obtidos para cada grupo. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P<0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P<0,001.

A população de LB Transitório apresentou as seguintes frequências: 4,2% para pacientes homens e 4,4% para pacientes mulheres. Estes resultados não apresentaram diferença significante quando comparados ao grupo controle, sendo encontrada mediana de 5,4% para controles homens e 5,2% para controles mulheres. A **figura 15** mostra as frequências encontradas.

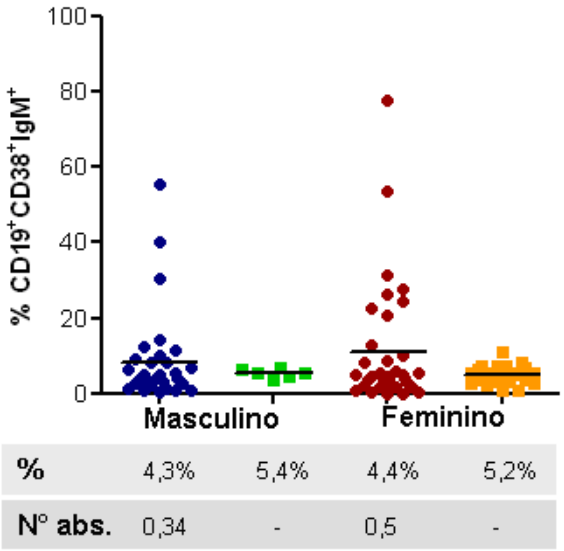


Figura 15: Frequência de LB Transitório de indivíduos controles e pacientes com ICV. Linfócitos B Transitórios foram identificados com base na expressão das moléculas de superfície CD38 e IgM. Os resultados foram expressos como porcentagem dos LB totais obtidos para cada um dos grupos avaliados: Azul - pacientes homens; Verde - controles homens; Vermelho – pacientes mulheres e Laranja – controle mulheres. As linhas abaixo do gráfico correspondem às medianas da porcentagem e número absoluto obtidos para cada grupo. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P<0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P<0,001.

Em relação à frequência de plasmoblastos, foi verificado que os pacientes apresentaram porcentagens menores em relação aos controles, sendo que dos 70 pacientes, 6 (8,57%) apresentaram níveis indetectáveis de Pbl.

Os pacientes homens apresentaram 0,16% de plasmoblastos, não sendo estatisticamente diferente dos controles homens (0,32%). Em relação às mulheres, foi observado que as pacientes apresentaram frequência de 0,12% e controles 0,7%, sendo estes resultados estatisticamente significantes. A **figura 16** mostra as frequências de plasmoblastos em cada um dos grupos.

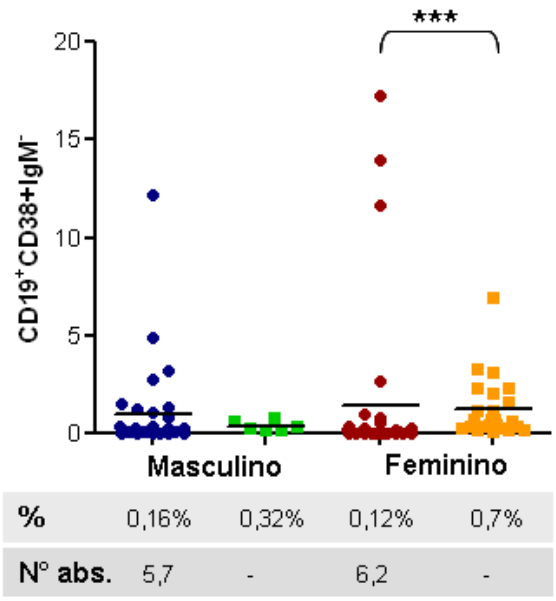
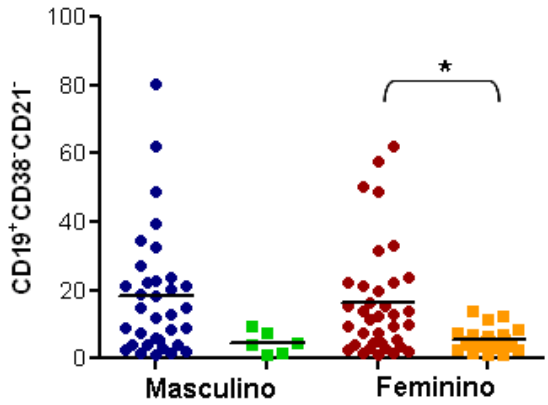


Figura 16: Frequência de plasmoblastos em indivíduos controles e pacientes. A população de plasmoblastos foi identificada com base na expressão das moléculas de superfície CD38 e IgM. Os resultados foram expressos como porcentagem dos LB totais obtidos para cada um dos grupos avaliados: Azul - pacientes homens; Verde - controles homens; Vermelho – pacientes mulheres e Laranja – controle mulheres. As linhas abaixo do gráfico correspondem às medianas da porcentagem e número absoluto obtidos para cada grupo. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P<0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P<0,001.

E por último, em relação à frequência de LB $CD21^{low}CD38^{low}$, foi observado um aumento de frequência nos pacientes quando comparados aos controles do mesmo gênero. Porém apenas as pacientes mulheres (11,8%) apresentaram diferença estatística quando comparadas a seus controles (4,9%). A **figura 17** mostra as frequências obtidas para os grupos de pacientes e controles.



%	14%	4,3%	12%	5%
Nº abs.	5,5	-	7,7	-

Figura 17: **Frequência de LB CD21^{low} de indivíduos controles e pacientes com ICV**. Linfócitos B CD21^{low} foram identificados com base na ausência da expressão das moléculas de superfície CD38 e CD21. Os resultados foram expressos como porcentagem dos LB totais obtidos para cada um dos grupos avaliados: Azul - pacientes homens; Verde - controles homens; Vermelho – pacientes mulheres e Laranja – controle mulheres. As linhas abaixo do gráfico correspondem às medianas da porcentagem e número absoluto obtidos para cada grupo. As linhas horizontais dentro que representam cada grupo correspondem às medianas obtidas. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P<0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P<0,001.

Os resultados individuais para cada uma das subpopulações dos 70 pacientes e 30 controles encontram-se nos anexos 4 e 5.

4.2 Concentrações Séricas de Imunoglobulinas

Foi realizada a comparação entre os níveis séricos de imunoglobulinas dosados ao diagnóstico e os níveis séricos atuais, dosados no mês em que foi realizada a citometria de fluxo.

Quanto às concentrações séricas de IgG, foi verificado que ao diagnóstico, a média foi de 199,7 mg/dL e atualmente, com a reposição de gamaglobulina endovenosa a média obtida foi de 614,5 mg/dL, sendo este aumento estatisticamente significante. O mesmo foi observado em relação às concentrações séricas de IgA, que ao diagnóstico a média foi de 10,2 mg/dL e atualmente está em torno de 11,8 mg/dL. Estes resultados também foram estatisticamente significantes.

Em relação à concentração sérica de IgM foi verificado que a concentração sérica se manteve mesmo após a reposição de imunoglobulinas, pois na época do diagnóstico a média foi de 15,9 mg/dL e atualmente encontra-se em torno de 15,8 mg/dL. As **figuras 18, 19** e **20** mostram as médias das concentrações séricas para IgG, IgA e IgM dos pacientes respectivamente nos períodos do diagnóstico e atual.

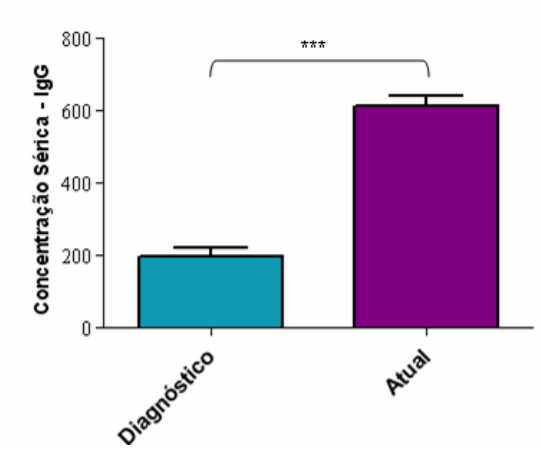


Figura 18: Concentração sérica de IgG. A concentração sérica de IgG foi dosada ao diagnóstico dos pacientes e na época do presente estudo. As colunas mostram as médias com desvio padrão das dosagens de IgG dos 70 pacientes nos dois períodos. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

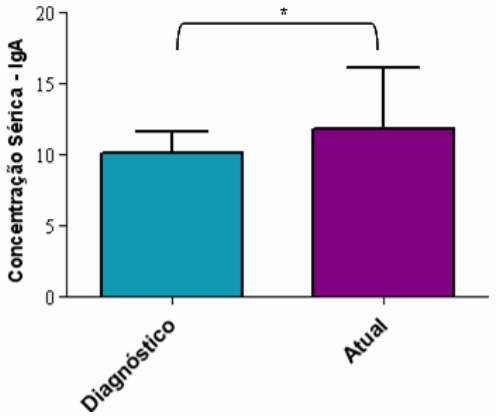


Figura 19: Concentração sérica de IgA. A concentração sérica de IgA foi dosada ao diagnóstico dos pacientes e na época do presente estudo. As colunas mostram as médias com desvio padrão das dosagens de IgA dos 70 pacientes nos dois períodos.Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

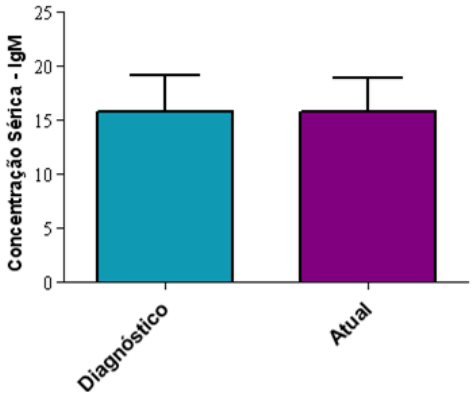


Figura 20: Concentração sérica de IgM. A concentração sérica de IgM foi dosada ao diagnóstico dos pacientes e na época do presente estudo. As colunas mostram as médias das dosagens de IgM dos 70 pacientes nos dois períodos. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

4.3 Correlação entre LB de Memória e Concentrações Séricas de Imunoglobulinas

Foi realizada a correlação entre as concentrações séricas de IgG, IgA e IgM que os pacientes apresentaram ao diagnóstico e as freqüências atuais de linfócitos B de zona marginal (MZB) e linfócitos B de memória com troca de isotipo (SMB). Os resultados da correlação entre IgG e IgA com SMB e IgM com MZB estão demonstradas respectivamente nas **figuras 21, 22 e 23** abaixo.

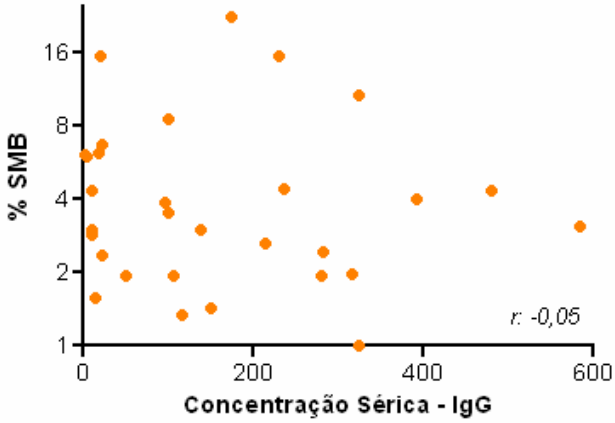


Figura 21: Correlação entre LB de memória com troca de isotipo e concentração sérica de IgG. As concentrações séricas de IgG foram obtidas na data do diagnóstico dos pacientes. SMB: linfócito B de memória com troca de isotipo.

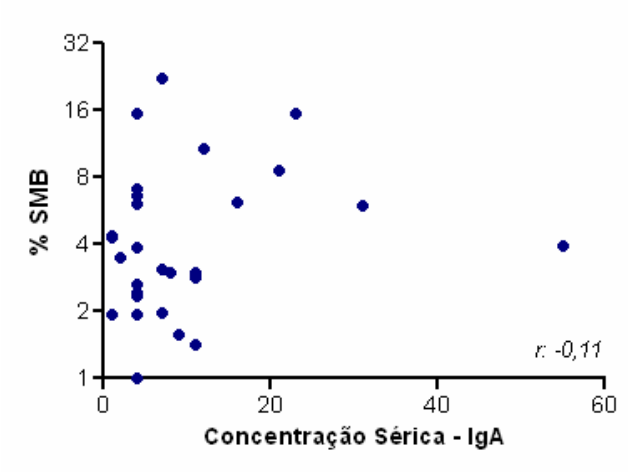


Figura 22: Correlação entre LB de memória com troca de isotipo e concentração sérica de IgA. As concentrações séricas de IgA foram obtidas na data do diagnóstico dos pacientes. SMB: linfócito B de memória com troca de isotipo.

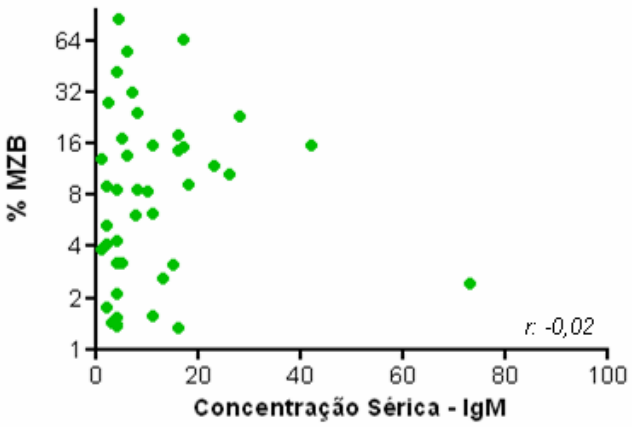


Figura 23: Correlação entre LB de zona marginal e concentração sérica de IgM. As concentrações séricas de IgM foram obtidas na data do diagnóstico dos pacientes. MZB: linfócito B de zona marginal.

Não constatamos correlação entre os níveis séricos de IgG e IgA e a frequência de linfócito B de memória com troca de isotipo (SMB). Também não foi possível correlacionar IgM e a freqüência de LB de zona marginal (MZB).

4.4 Análise das Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes foram avaliadas na época das coletas. Para as análises foram consideradas 7 manifestações clínicas: infecções de repetição, esplenomegalia, linfadenopatia, granulomatose, bronquiectasias, autoimunidade e malignidade. Na **figura 24** temos a descrição da prevalência de

cada uma destas manifestações nesta coorte e a **figura 25** mostra a prevalência destas manifestações nos gêneros masculino e feminino.

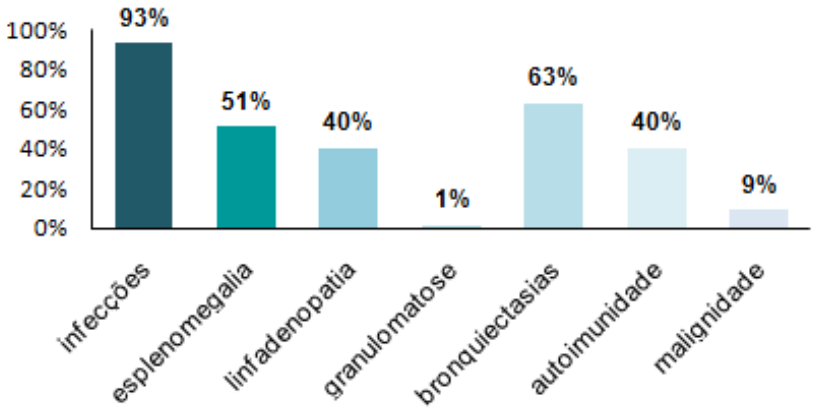


Figura 24: Manifestações clínicas observadas nesta coorte. Foram consideradas 7 manifestações clínicas: infecções de repetição, esplenomegalia, linfadenopatia, granulomatose, bronquiectasias, autoimunidade e malignidade. Os resultados foram expressos como porcentagem dos pacientes da coorte com a manifestação avaliada.

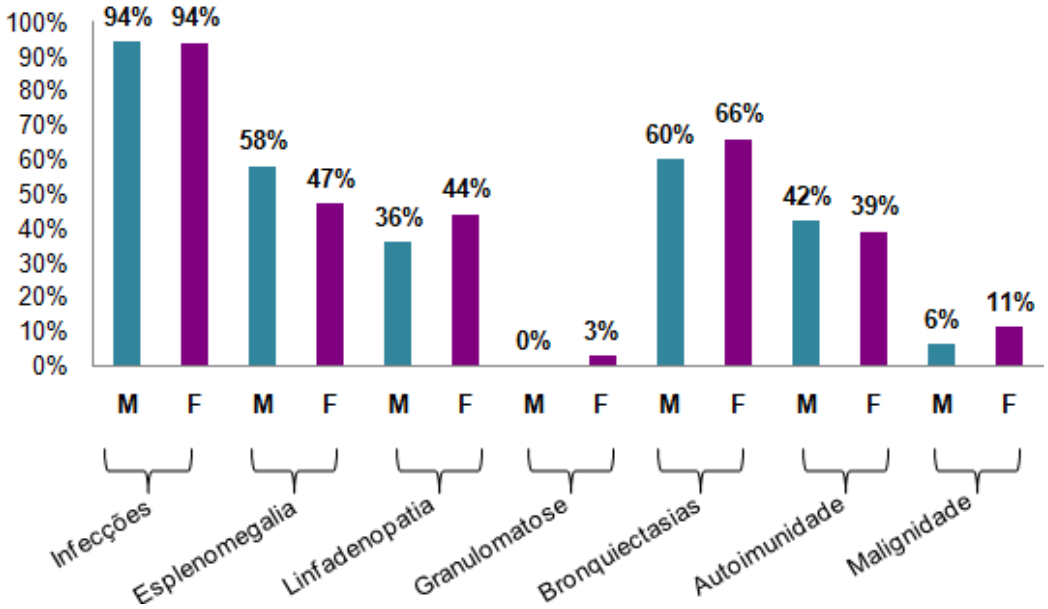


Figura 25: Manifestações Clínicas - subdivisão quanto ao gênero. Os resultados foram expressos como porcentagem dos pacientes da coorte com a manifestação avaliada: M - pacientes homens; F - pacientes mulheres.

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os gêneros em cada uma das manifestações clínicas avaliadas.

4.5 Correlação entre Manifestações Clínicas e Subtipos de LB

Depois das infecções de repetição, as manifestações clínicas mais prevalentes nesta coorte foram linfadenopatia, esplenomegalia, autoimunidade e bronquiectasias. Assim, foi considerado de extrema importância verificar a associação das complicações clínicas com os subtipos de LB, para identificar possíveis marcadores para estas diferentes manifestações. Para tanto, buscamos o subtipo de LB com maior alteração de frequência em cada grupo de pacientes com determinada complicação clínica e comparamos com a frequência daquele subtipo no grupo de pacientes sem a determinada manifestação.

Desta forma, linfadenopatia foi associada à diminuição de plasmoblastos (0,05% pacientes com linfadenopatia e 0,13% pacientes sem linfadenopatia). Estes resultados foram estatisticamente significantes. A **figura 26** mostra os resultados da correlação entre linfadenopatia e os subtipos de LB.

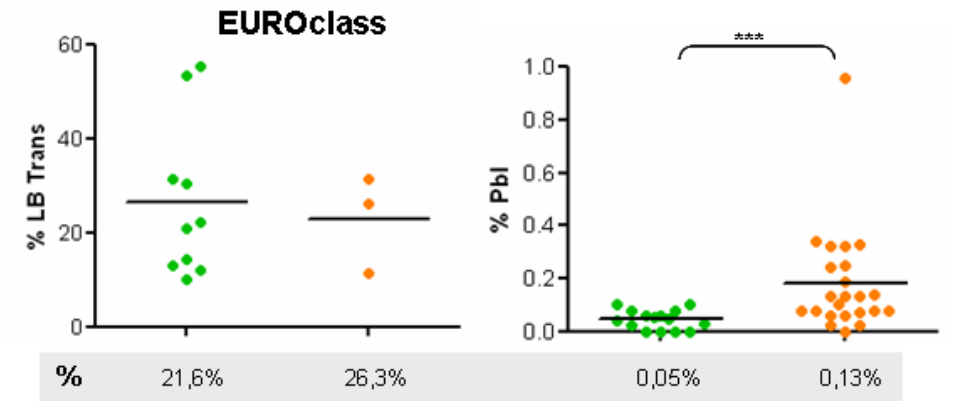


Figura 26: Linfadenopatia e subtipos de LB. Os resultados foram expressos como porcentagem de LB obtidos. A linha horizontal no centro de cada grupo corresponde à mediana obtida. LB Trans = Linfócito B Transitório; Pbl = plasmoblasto; Verde = paciente com linfadenopatia; Laranja = paciente sem linfadenopatia. EUROclass = associação feita seguindo a classificação EUROclass. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

Os pacientes que desenvolveram esplenomegalia, em geral, tiveram um aumento de LB CD21^{low}, porém as análises comparativas da frequência deste subtipo de LB entre pacientes com e sem esplenomegalia não foram estatisticamente significantes. A **figura 27** mostra os resultados da correlação entre esplenomegalia e o subtipo de LB CD21^{low}.

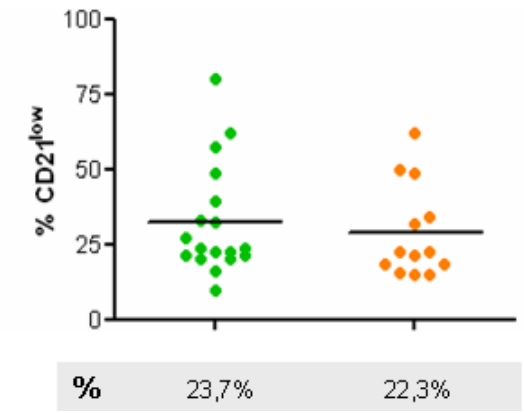


Figura 27: Esplenomegalia e subtipo de LB CD21^{low}. Os resultados foram expressos como porcentagem de LB obtidos. A linha horizontal no centro de cada grupo corresponde à mediana obtida. LB CD21^{low} = Linfócito B CD21^{low}; Verde = paciente com esplenomegalia; Laranja = pacientes sem esplenomegalia. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

Os pacientes com autoimunidade tenderam a um aumento dos subtipos de LB *naive* e LB CD21^{low}, porém não houve diferença estatisticamente significante entre este grupo de pacientes com o grupo sem autoimunidade. A **figura 28** mostra os resultados da correlação entre autoimunidade e os subtipos de LB.

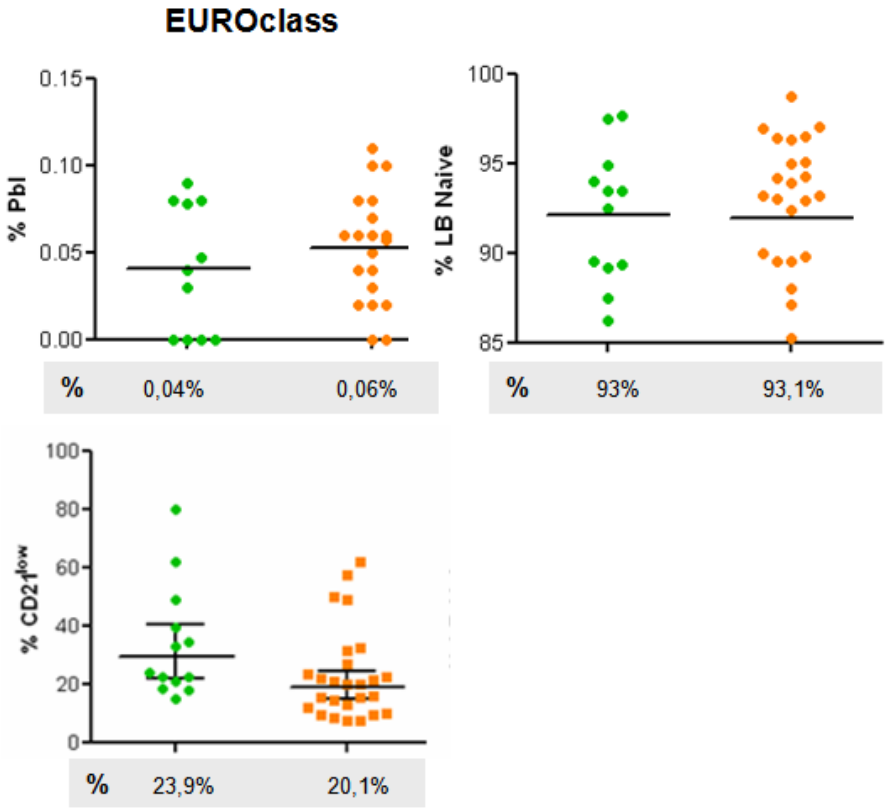


Figura 28: Autoimunidade e subtipos de LB. Os resultados foram expressos como porcentagem de LB obtidos. A linha horizontal no centro de cada grupo corresponde à mediana obtida. Pbl = Plasmoblasto; $CD21^{low}$ = LB $CD21^{low}$; Verde = paciente com autoimunidade; Laranja = pacientes sem autoimunidade. EUROclass = associação seguindo a classificação EUROclass. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

Por fim, os pacientes com bronquiectasias tenderam a apresentar uma redução do subtipo MZB[2], porém, mais uma vez ao comparar estes pacientes com os sem bronquiectasias não foi observado diferenças significantes. A **figura 29** mostra os resultados da correlação entre bronquiectasias e este subtipo de LB.

[2] MZB: LB de zona marginal.

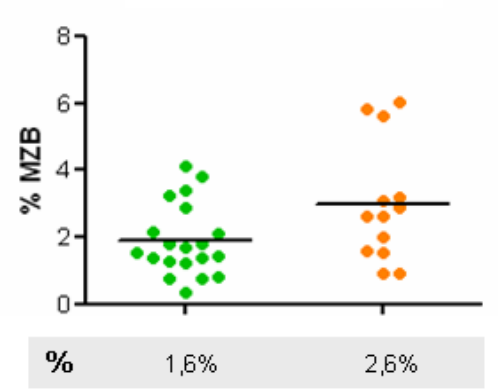


Figura 29: Bronquiectasias e MZB. Os resultados foram expressos como porcentagem de LB obtidos. A linha horizontal no centro de cada grupo corresponde à mediana obtida. MZB = Linfócito B de zona marginal; Verde = paciente com bronquiectasias; Laranja = pacientes sem bronquiectasias. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

4.6 Classificações

Classificação de Freiburgo

Quanto a classificação de Freiburgo, foi observado que 7 pacientes (10%) fazem parte do grupo Ia (% SMB < 0,4% e % $CD21^{low}$>20%), o grupo de pior prognóstico. No grupo Ib (% SMB < 0,4% e % $CD21^{low}$< 20%), foram classificados 14 pacientes (19%) e 49 (70%) pacientes foram classificados como grupo II (% SMB > 0,4%), o grupo de pacientes que apresenta frequência de linfócito B de memória com troca de isotipo normal. A **figura 30** mostra a frequência de cada um dos grupos de acordo com a classificação de Freiburgo.

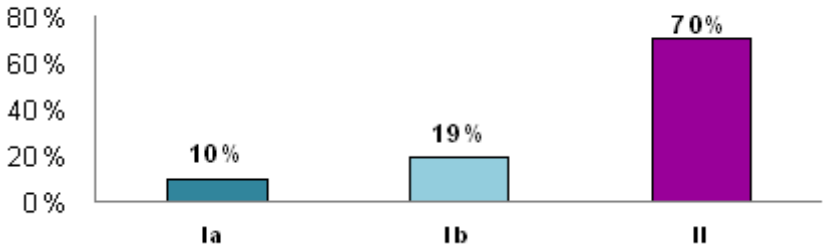


Figura 30: Classificação de Freiburgo. Ia: % SMB < 0,4% e % $CD21^{low}$>20%; Ib: % SMB < 0,4% e % $CD21^{low}$< 20%; II: % SMB > 0,4%.

Subdividindo os pacientes em homens e mulheres, foi verificado que o grupo Ia foi formado em sua grande maioria por pacientes mulheres (71%), já no grupo Ib, foi

observado o oposto, sendo 64% dos pacientes deste grupo, homens. Por fim, no grupo II, houve distribuição mais homogênea entre homens e mulheres, porém a análise destes resultados não mostrou diferença estatisticamente significante entre os genêros para cada um dos grupos. A **figura 31** mostra a distribuição quanto ao gênero de cada um dos grupos da classificação de Freiburgo.

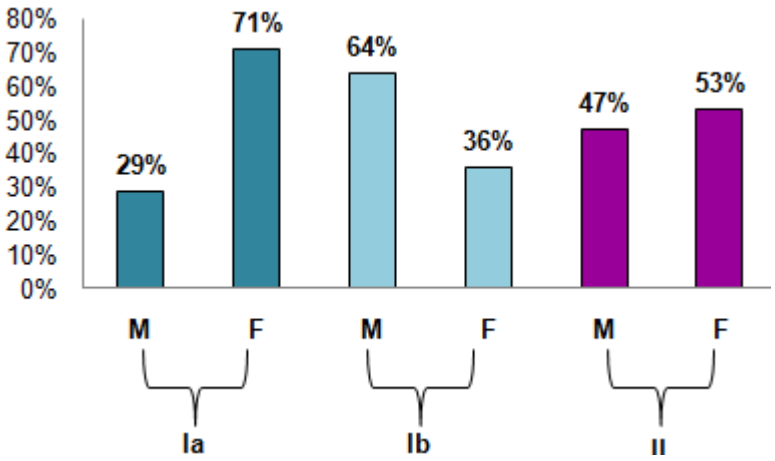


Figura 31: Classificação de Freiburgo- subdivisão quanto ao gênero. M: pacientes homens; F: pacientes mulheres. Ia: % SMB < 0,4% e % $CD21^{low}$>20%; Ib: % SMB < 0,4% e % $CD21^{low}$< 20%; II: % SMB > 0,4%. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

Ao analisar a prevalência das complicações clínicas em cada um dos grupos, foi verificado que o grupo que apresentou maior frequência de infecções, linfadenopatia, bronquiectasias e granulomatose foi o grupo Ia. Porém foi verificado que o grupo Ib apresentou maior freqüência de autoimunidade e o grupo II de esplenomegalia. Ao realizar a análise estatística da prevalência de cada uma das manifestações clínicas nos diferentes grupos da classificação de Freiburgo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre eles.

Quanto aos níveis séricos de imunoglobulinas à época da fenotipagem dos subtipos de LB, constatamos que o grupo II apresentou os menores níveis de IgG, porém o mesmo não foi observado quanto à IgM e IgA. Os menores níveis destas imunoglobulinas foram encontrados no grupo Ib. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos em relação aos níveis séricos das imunoglobulinas. A tabela abaixo descreve a frequência das manifestações clínicas e a média dos níveis séricos das imunoglobulinas em cada grupo.

	Ia	Ib	II
Infecções	7 (100%)	12 (85,7%)	48 (94,1%)
Esplenomegalia	3 (43%)	6 (42,8%)	27 (53%)
Linfadenopatia	4 (57%)	5 (35,7%)	20 (39,2%)
Autoimunidade	2 (28,6%)	6 (42,8%)	20 (39,2%)
Bronquiectasias	6 (85,7%)	9 (64,3%)	31 (60,8%)
Granulomatose	1 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)
IgG	671,33	641,2	602
IgM	22,5	3,52	17,06
IgA	24,12	3,66	10,82

Tabela 3: Classificação de Freiburgo – manifestações clínicas. Correlação entre as manifestações clínicas: número de infecções, esplenomegalia, linfadenopatia, autoimunidade, bronquiectasias e granulomatose; média dos níveis séricos de imunoglobulinas dosados no período que foi realizado a imunofenotipagem e os grupos da classificação de Freiburgo. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos em relação às manifestações clínicas e os níves séricos das imunoglobulinas. Ia: % SMB < 0,4% e % $CD21^{low}$>20%; Ib: % SMB < 0,4% e % $CD21^{low}$< 20%; II: % SMB > 0,4%.

Classificação de Paris

Com este modelo de classificação observamos que 40 pacientes (57%) foram classificados no grupo MB0 (% $CD27^{+}$< 11%), 25 pacientes (36%) no grupo MB1 (% $CD27^{+}$>11% e SMB < 8%) e apenas 5 (7%) no grupo MB2 (não são nem MB0 nem MB1). A **figura 32** descreve as frequências de cada um dos grupos.

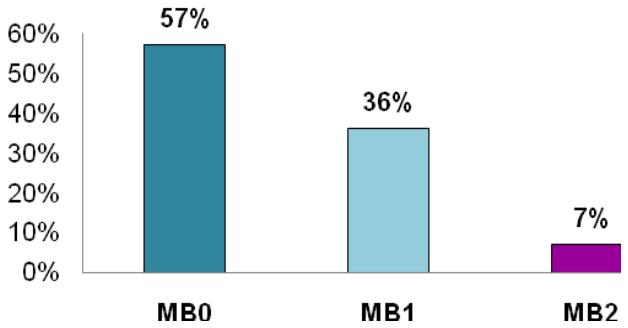


Figura 32: Classificação de Paris. MB0: % $CD27^{+}$< 11%; MB1: % $CD27^{+}$>11% e % SMB < 8%; MB2: indivíduos que não são nem MB0 nem MB1.

A figura abaixo mostra distribuição dos pacientes quanto ao gênero em cada um dos grupos da classificação de Paris.

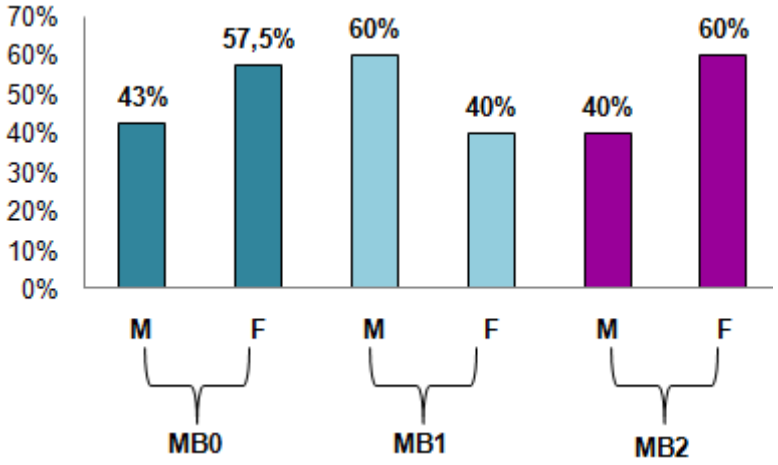


Figura 33: Classificação de Paris– subdivisão quanto ao gênero. M: paciente homem. F: paciente mulher. MB0: % $CD27^{+}$< 11%; MB1: % $CD27^{+}$>11% e % SMB < 8%; MB2: indivíduos que não são nem MB0 nem MB1. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

Foi observada uma maior prevalência de pacientes mulheres no grupo MB0 (57,5%) e MB2 (60%). Em relação ao grupo MB1, foi verificado o oposto, sendo encontrado maior frequência de pacientes homens (60%), porém sem diferença estatisticamente significante.

A frequência do número de infecções, esplenomegalia, linfadenopatia, autoimunidade, bronquiectasias e granulomatose também foi analisada em cada um dos grupos, assim como os níveis séricos de imunoglobulinas, dosados no mesmo período da imunofenotipagem. Os resultados se encontram na tabela abaixo.

	MB0	MB1	MB2
Infecções	36 (90%)	24 (100%)	5 (100%)
Esplenomegalia	19 (47,5%)	14 (56%)	3 (60%)
Linfadenopatia	15 (37,5%)	11 (44%)	2 (40%)
Autoimunidade	12 (30%)	12 (48%)	4 (80%)
Bronquiectasias	27 (67,5%)	12 (48%)	5 (100%)
Granulomatose	1 (2,5%)	0 (0%)	0 (0%)
IgG	664,1	585,3	399,6
IgM	20,98	12,35	11,24
IgA	16,6	9,1	2,42

Tabela 4: Classificação de Paris – manifestações clínicas. Correlação entre as manifestações clínicas: número de infecções, esplenomegalia, linfadenopatia, autoimunidade, bronquiectasia e granulomatose; média dos níveis séricos de imunoglobulinas dosados no período que foi realizado a imunofenotipagem e os grupos da classificação de Paris. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos em relação às manifestações clínicas e os níves séricos das imunoglobulinas. MB0: % $CD27^{+}$< 11%; MB1: % $CD27^{+}$>11% e % SMB < 8%; MB2: indivíduos que não são nem MB0 nem MB1.

Os grupos MB1 e MB2 apresentaram maior frequência de infecções. Esplenomegalia, autoimunidade e bronquiectasias foram mais prevalentes no grupo MB2, especialmente as duas últimas, já linfadenopatia foi mais frequente no grupo MB1. A presença de granulomatose foi observada em apenas um paciente, que estava classificado como grupo MB0. A análise estatística para cada uma das complicações clínicas nos grupos da Classificação de Paris revelou não haver diferença estatisticamente significativa entre eles.

Em relação aos níveis séricos de imunoglobulinas, foi observado que o grupo MB2 apresentou os menores níveis de IgG, IgM e IgA, porém não houve diferença estatisticamente significante.

Classificação EUROclass

Ao classificarmos esta coorte segundo a classificação EUROclass, foi observada maior homogeneidade na distribuição dos grupos, como pode ser observado na **figura 34**.

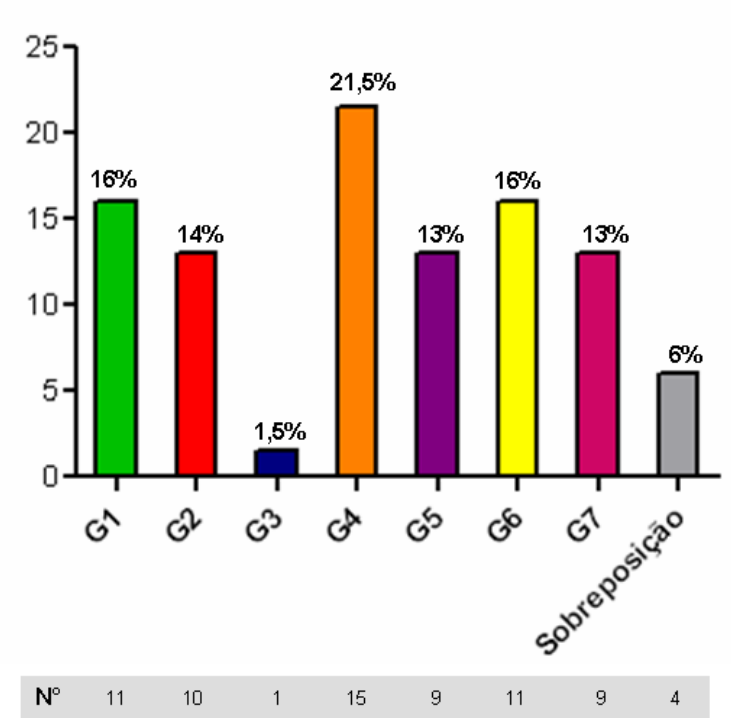


Figura 34: Classificação EUROclass. Os pacientes foram classificados em 8 grupos distintos, levando-se em consideração as frequências de LB; LB Transitório; LB de memória com troca de isotipo e LB $CD21^{low}$. G1: % SMB ≤ 2% e % Trans ≥ 9%; G2: % SMB ≤ 2% e % Trans < 9%; G3: % SMB ≤ 2% e% $CD21^{low}$< 10%; G4: % SMB ≤ 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G5: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$< 10%;G6: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G7: $CD19^{+}$< 1% e Sobreposição: pacientes que podem ser classificados nos grupos G2 e G3.

Foi verificado que dentre todos os grupos, apenas o grupo 3 apresentou baixo número de pacientes em relação aos outros grupos. Também foi observado que 13% dos pacientes apresentaram freqüência de LB menor que 1% (grupo 7).

Por fim, alguns pacientes puderam ser classificados tanto no grupo 2 quanto no grupo 3, sendo denominados de grupo sobreposição, em nossa coorte 4 pacientes (6%)apresentaram esta sobreposição.

Ainda dentro de cada grupo, analisamos a distribuição quanto ao gênero, como pode ser observado na **tabela 5** e **figura 35**.

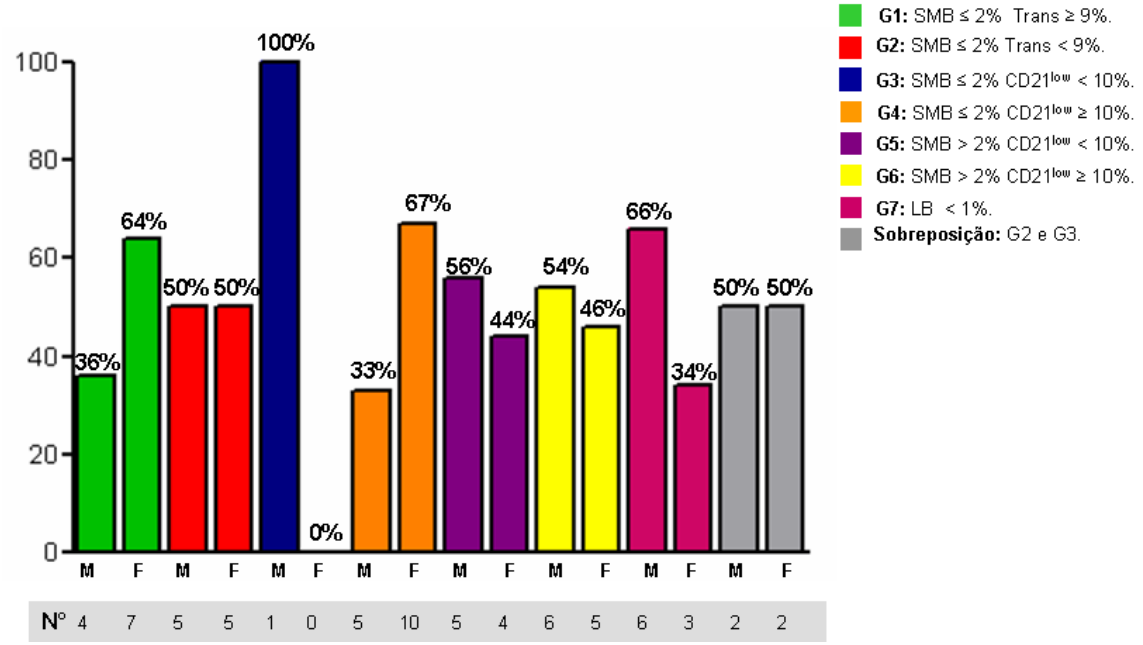


Figura 35: Classificação EUROclass – subdivisão quanto gênero. M: pacientes homens; F: pacientes mulheres. G1: % SMB ≤ 2% e % Trans ≥ 9%; G2: % SMB ≤ 2% e % Trans < 9%; G3: % SMB ≤ 2% e % $CD21^{low}$< 10%; G4: % SMB ≤ 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G5: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$< 10%; G6: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G7: $CD19^{+}$< 1% e Sobreposição: pacientes que podem ser classificados nos grupos G2 e G3. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

O grupo 3 é formado apenas por um paciente do gênero masculino. No grupo 7 há um predomínio de pacientes homens em relação as pacientes mulheres, em contrapartida, os grupos 1 e 4 apresentaram maior prevalência de pacientes mulheres. Os grupos 2 e sobreposição apresentaram distribuição homogênea quanto ao gênero. Porém, a análise estatística mostrou que não houve diferença significante entre os grupos quanto ao parâmetro gênero.

Para a análise da prevalência das diferentes manifestações clínicas em cada um dos grupos, foram excluídos o grupo sobreposição e o grupo 3, este último devido ao fato de apresentar apenas um paciente. O grupo 7 foi mantido nestas análises, tendo em vista a grande quantidade de pacientes com ICV que contemplam este grupo.

Com relação às infecções de repetição, foi observado que apesar de haver diferenças entre os vários grupos, estas diferenças não foram suficientes para determinar diferença estatisticamente significante, como pode ser observado na **figura 36**.

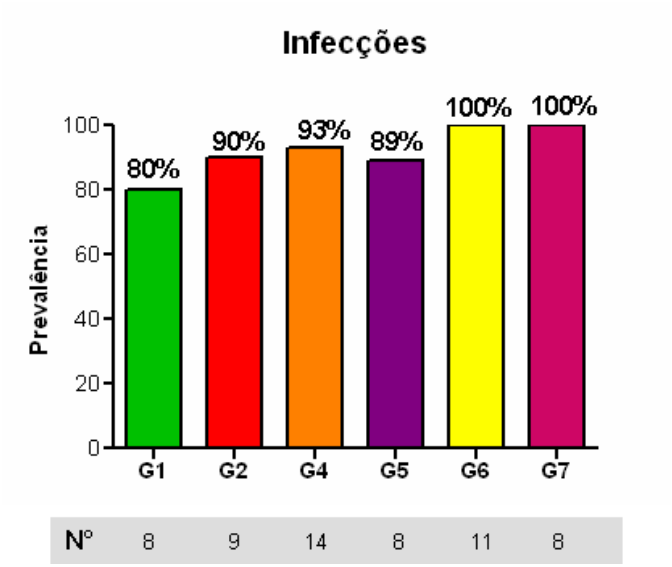


Figura 36: EUROclass – Prevalência de infecções. G1: % SMB ≤ 2% e % Trans ≥ 9% ; G2: % SMB ≤ 2% e % Trans < 9%; G4: % SMB ≤ 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G5: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$< 10%; G6: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G7: $CD19^{+}$< 1%.Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

Em relação à linfadenopatia, foi verificado que o grupo 1 apresentou maior prevalência (60%), seguido do grupo 6 (54,5%). A **figura 37** expõe a prevalência de linfadenopatia em cada um dos grupos. O único caso de granulomatose desta coorte estava classificado como grupo 1. Não houve diferença estatística significativa entre eles.

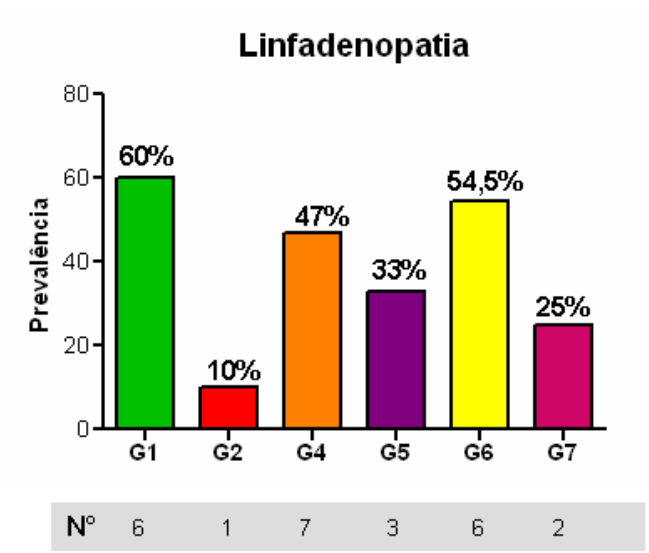


Figura 37: EUROclass – Prevalência de linfadenopatia. G1: % SMB ≤ 2% e % Trans ≥ 9%; G2: % SMB ≤ 2% e % Trans < 9%; G4: % SMB ≤ 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G5: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$< 10%; G6: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G7: $CD19^{+}$< 1%. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

A presença de autoimunidade mostrou-se bem variada nos diversos subgrupos da classificação EUROclass, como podemos observar na **figura 38**, o grupo 6 (64%) apresentou maior prevalência, seguido simultaneamente pelos grupos 2 e 7 (50%). Já os pacientes do grupo 5 não apresentaram autoimunidade. Estas diferenças não foram estatisticamente significantes.

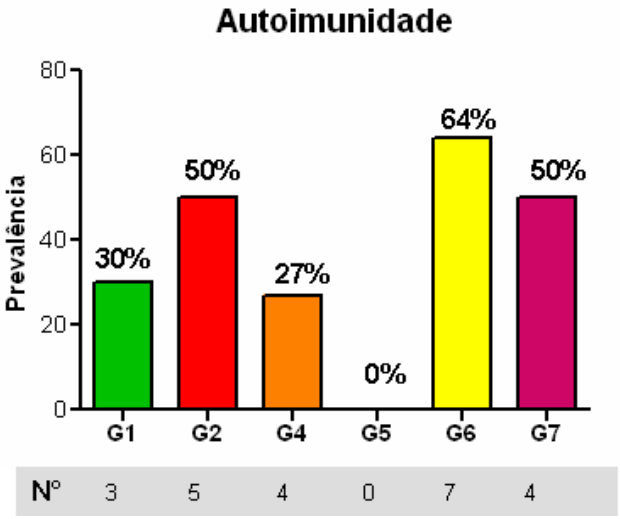


Figura 38: EUROclass – Prevalência de autoimunidade. G1: % SMB ≤ 2% e % Trans ≥ 9%; G2: % SMB ≤ 2% e % Trans < 9%; G4: % SMB ≤ 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G5: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$< 10%; G6: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G7: $CD19^{+}$< 1%.Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

E por fim, em relação à esplenomegalia, o grupo 5 (67%), seguido do grupo 1 (60%) apresentaram as maiores prevalências. As bronquiectasias foram mais frequentes no grupo 7 (75%) seguido pelo grupo 1 (70%). Porém, mais uma vez a análise estatística revelou não haver diferenças entre os grupos. As **figuras 39** e **40** demonstram a prevalência de esplenomegalia e bronquiectasias para cada um dos grupos da EUROclass respectivamente.

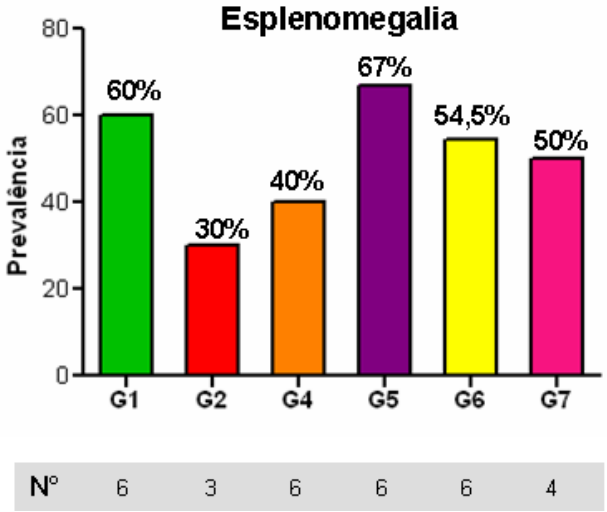


Figura 39: EUROclass – Prevalência de esplenomegalia. G1: % SMB ≤ 2% e % Trans ≥ 9%; G2: % SMB ≤ 2% e % Trans < 9%; G4: % SMB ≤ 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G5: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$< 10%; G6: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G7: $CD19^{+}$< 1%. Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

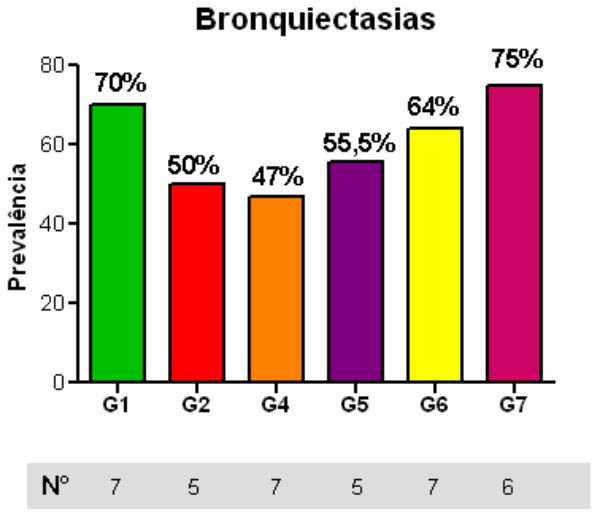


Figura 40: EUROclass – Prevalência de bronquiectasias. G1: % SMB ≤ 2% e % Trans ≥ 9%; G2: % SMB ≤ 2% e % Trans < 9%; G4: % SMB ≤ 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G5: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$< 10%; G6: % SMB> 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%; G7: $CD19^{+}$< 1%.Valores estatisticamente significantes foram representados por (*) para P< 0,05; (**) para P< 0,01; (***) para P< 0,001.

Em relação à concentração sérica de imunoglobulinas foi verificado que o grupo 7 apresentou as menores concentrações de IgG e IgM, porém em relação a concentração de IgA, o grupo da sobreposição entre G2 e G3 apresentou os menores resultados, como pode ser observado na tabela abaixo. A análise estatística não mostrou diferença significante.

Grupos	IgG	IgA	IgM
G1	582	6,66	20,4
G2	787	31,2	19
G3	não tem	não tem	não tem
G4	546,7	11,5	10
G5	724,7	6	22
G6	481	10,3	15,5
G7	417,6	4,6	8
Sobreposição	627	4,4	9

Tabela 5: Classificação EUROclass – níveis séricos de imunoglobulinas. Média dos níveis séricos de imunoglobulinas dosados no período que foi realizada a imunofenotipagem e os grupos da classificação EUROclass. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos em relação os níves séricos das imunoglobulinas

5. DISCUSSÃO

5.1 Identificação de Subtipos de Linfócitos B

Assim como em todos os componentes do sistema imune, o equilíbrio entre as subpopulações de LB[3] é importante para que tenhamos uma resposta humoral efetiva, uma vez que a falha neste balanço ou sua ausência resulta em imunodeficiências humorais (Abbas, 2007). O estudo dos diferentes subtipos de LB em pacientes com ICV tem grande importância, pois, por se tratar de uma doença heterogênea, a identificação de semelhanças entre os pacientes pode auxiliar e aprimorar o acompanhamento dos mesmos.

Nosso primeiro objetivo foi verificar a distribuição dos subtipos de LB nesta coorte de pacientes brasileiros, e para isso foi avaliada a frequência de linfócitos B totais nos mesmos. Apesar de 9 pacientes (13%) apresentarem menos de 1% de LB, foi possível observar que a grande maioria apresentou frequência normal quando comparado aos controles. Este dado é semelhante ao observado por Ahn e Cunningham-Rundles (2009), onde cerca de 90% dos pacientes com ICV apresentaram números normais de linfócitos B.

Após esta análise inicial foi realizada a identificação de 6 subtipos de LB: LB *naive*, LB de zona marginal (MZB), LB de memória com troca de isotipo (SMB), LB Transitório (Trans), plasmoblasto (Pbl) e LB $CD21^{low}$.

Os valores de referência utilizados para as análises neste estudo foram obtidos a partir do grupo controle, pois estes apresentaram uma faixa de distribuição mais ampla quando comparados a referências de outras coortes (Warnatz e Schlesier, 2008; Morbach et al., 2010).

A partir desta análise no grupo controle, foram determinados os seguintes parâmetros: LB *naive* (25,4% - 85,4%); MZB[4] (5,19% - 58,8%); SMB[5](3,11% - 32,9%); $CD21^{low}$ (0,96% - 14%); Pbl[6] (0,13% - 6,93%) e Trans[7](0,69% - 10,9%), conforme demonstrado no anexo 6.

---

[3] LB: refere-se a linfócitos B.
[4] MZB: LB de zona marginal.
[5] SMB: LB de memória com troca de isotipo.
[6] Pbl: plasmoblasto.
[7] Trans: LB transitório.

Para nossa surpresa, estes valores foram muito diferentes do observado em 2008 por Warnatz e Schlesier. Este estudo alemão que descreveu as características de cada um destes 6 subtipos de LB propuseram valores de referência para cada subpopulação e posteriormente, estes valores foram utilizados em um estudo multicêntrico europeu. A comparação dos nossos resultados aos do trabalho alemão mostrou que os subtipos de LB na população brasileira apresentam uma faixa de distribuição maior (anexo 6).

Morbach et al. (2010), estudaram a variação das frequências dos subtipos de LB de acordo com diferentes faixas etáriase verificaram que a frequência de LB *naive* e LB Transitório diminuíam consideravelmente no decorrer dos anos contrastando com as frequências de MZB[8] e SMB[9] que aumentavam gradativamente. A frequência de LB $CD21^{low}$ aumentava com o passar dos anos, estabilizando a partir dos 6 anos. Diante disso, verificamos se as frequências encontradas nos controles eram compatíveis ao relatado para a mesma faixa etária (Morbach et al., 2010). Mais uma vez, os valores encontrados nos controles brasileiros também foram bastante discordantes do verificado por Morbach et al. (2010).

Acreditamos que as diferenças observadas nas frequências dos subtipos de LB nos controles possam ser explicadas pelo fato da população brasileira ser uma população geneticamente heterogênea, quando comparada à população européia. Assim, consideramos de extrema importância a obtenção de valores de referência para cada população a ser estudada, justificando também os valores de referência utilizados neste estudo.

Em relação aos LB *naive*, estudos em outras coortes demonstraram que pacientes com ICV apresentam um aumento em sua frequência (Lawrence, 2009; Mouilot et al., 2010; Vlková et al., 2010). Porém quando subdividimos os pacientes quanto ao sexo, verificamos que apenas as pacientes mulheres quando comparadas a controles do mesmo gênero, apresentaram um aumento estatisticamente significante de LB *naive*, sendo estes dados descritos pela primeira vez.

Muramatso et al. (2000) e Brouet et al. (2000) ao analisarem o compartimento de células B de memória de pacientes com ICV, verificaram que tanto o MZB quanto SMB encontravam-se diminuídos nestes pacientes. Wehr et al. (2008) também

[8]MZB: LB de zona marginal.
[9]SMB: LB de memória com troca de isotipo.

encontrou esta redução, sendo que de 303 pacientes, 176 (58%) apresentaram frequência de SMB menor que 2% e 10 (3,3%) apresentaram níveis indetectáveis. Já em relação ao MZB, Sánchez-Ramón et al. (2008), verificaram um aumento em sua frequência quando comparado a indivíduos controles.

Nesta coorte verificamos que, apesar de tanto controles homens como mulheres apresentarem maior frequência de MZB que os pacientes, estes resultados não foram estatisticamente significantes. Resultados semelhantes aos nossos foram verificados por Mouilot et al. (2010).

Ao analisar a frequência de SMB, foi observado que dos 70 pacientes, 45 (64%) apresentaram frequência menor que 2% e em 3 pacientes (4%), os níveis deste subtipo celular foram indetectáveis, resultados estes semelhantes ao observado por Wehr et al. (2008) e Lawrence (2009), sendo este último estudo também em pacientes brasileiros. Estudos recentes têm apontado que pacientes com ICV com redução de SMB apresentam risco de pior prognóstico (Hart et al., 2007; Yong et al., 2010).

Grimbacher et al. (2003), estudando os LB de memória, verificaram uma correlação entre SMB e a molécula coestimulatória ICOS. Esta molécula, presente nos linfócitos T, atua na ativação e diferenciação dos LB *naive* em células de memória e plasmócitos, após o contato com seu ligante presente nos linfócitos B. O autor verificou ainda que os pacientes com ICV que apresentavam defeitos na expressão de ICOS apresentavam considerável redução de SMB, o que nos sugere que os pacientes desta coorte com SMB menor que 2% poderiam apresentar este defeito genético. Esta avaliação deverá ser realizada em um futuro próximo.

Verificamos que os pacientes homens deste estudo tenderam a apresentar maior frequência de SMB que as pacientes mulheres, apesar de não haver diferença estatística entre eles.

Contrastando com os nossos resultados, Sánchez-Ramón et al. (2008), comparando pacientes de gêneros diferentes, identificaram que pacientes mulheres apresentavam maior frequência de SMB e que estas diferenças eram independentes da idade, contrastando coma variação da freqüência observada em controles.

Quando comparamos pacientes e controles do mesmo gênero quanto à frequência de SMB, verificamos que em ambos os gêneros, a frequência nos pacientes mostrou-

se muito abaixo da observada em controles, sendo estes resultados estatisticamente significantes.

Em relação aos LB Trans[10], não foi possível observar um aumento da sua frequência em pacientes quando comparados aos controles, independente do gênero. Outros estudos demonstraram que pacientes com ICV apresentam uma alta frequência de LB Trans (Wehr et al., 2008) e que em camundongos o aumento desta subpopulação está associado ao defeito genético na molécula BAFF (Thompson et al., 2001). Os resultados para esta coorte se mostraram divergentes do trabalho descrito por Wehr et al. (2008), porém corroboram os resultados verificados por Mouillot et al. (2010).

A frequência de plasmoblastos encontrou-se bastante reduzida nesta coorte, sendo que dos 70 pacientes, 6 (8,57%) apresentaram níveis indetectáveis de Pbl[11]. Dados de literatura confirmam estes nossos achados. Wehr et al. (2008) verificaram também a redução na frequência de plasmoblasto na coorte estudada, sendo esta observação compartilhada por Mouillot et al. (2010). Este último autor também observou que alguns pacientes apresentaram níveis indetectáveis de Pbl.

Ao subdividir os pacientes quanto ao sexo observamos frequências menores de Pbl tanto em pacientes homens quanto mulheres quando comparados aos controles do mesmo gênero, porém apenas no gênero feminino estes resultados apresentaram diferença estatisticamente significante, sendo estes dados observados pela primeira vez na literatura.

Por fim, ao analisar a frequência da subpopulação de LB $CD21^{low}$, verificamos nesta coorte um aumento na frequência deste subtipo celular, assim como observado por Lawrence (2009), porém ao subdividir os grupos quanto ao gênero verificamos que apenas nas mulheres este aumento foi estatisticamente significante.

Wehr et al. (2008) e Mouillot et al. (2010) já haviam constatado este aumento na frequência de LB $CD21^{low}$ quando comparados pacientes com ICV e controles, porém nossos resultados mostram que este aumento está presente apenas em pacientes mulheres, o que nos chamou a atenção, pois ainda não há na literatura dados que apontem para este aumento apenas no gênero feminino.

---

[10]Trans: LB transitório.
[11] Pbl: plasmoblasto.

5.2 Concentrações Séricas de Imunoglobulinas e Correlações com LB de memória

Uma das características principais que ajudam a definir a Imunodeficiência Comum Variável é a redução da concentração sérica de IgG e este achado deve estar associado à redução de outra classe de imunoglobulinas, sendo observada em 50% dos pacientes a redução de IgA e em alguns pacientes a redução de IgM (Hausser et al., 1983; Hermaszewski et al., 1993).

A causa desta falha na produção de imunoglobulinas é provavelmente decorrente de diversos defeitos na diferenciação dos LB e quando o paciente apresenta concentrações séricas de IgG menores que 200 mg/dL e infecções recorrentes com concentração sérica de IgG específica de 200 a 500 mg/dL, faz-se necessário a reposição de imunoglobulinas (Spickett et al., 1990; Berger, 2008).

Conforme esperado, observamos nesta coorte um aumento significante dos níveis de IgG após o início da reposição de imunoglobulinas por via endovenosa. Apesar deste produto não oferecer quantidades significativas de IgA, e portanto, não fazermos reposição de IgA, observamos um aumento discreto mas significante em relação à concentração sérica de IgA. Estes resultados confirmam o observado em trabalhos anteriores (Chapel et al., 2000; Busse et al., 2002; De Gracia et al., 2004;). Porém em relação à IgM, não observamos alterações. Bayri et al (2011) demonstrou que a reposição endovenosa de imunoglobulinas induz a proliferação e produção de imunoglobulinas (especialmente IgG e IgM) pelos linfócitos B de pacientes com ICV, considerando a modulação da função dos LB mais uma função benéfica deste tratamento. Procuramos correlacionar a frequência de SMB[12] e as concentrações séricas de IgG e IgA da época do diagnóstico, assim como a frequência de MZB[13] e a concentração sérica de IgM também da época do diagnóstico. Não houve correlação entre a frequência de MZB com os níveis séricos de IgM, sendo estes dados semelhantes a outros trabalhos da literatura (Wehr et al., 2008).

Contudo, o que mais chamou a atenção foi não ter sido observada correlação entre a frequência de SMB e as concentrações séricas de IgG e IgA, pois trabalhos

[12]SMB: LB de memória com troca de isotipo.
[13] MZB: LB de zona marginal.

anteriores mostraram uma correlação entre este subtipo de LB e as concentrações destas classes de imunoglobulinas (Wehr et al., 2008; Sánchez-Ramón et al., 2008).

5.3 Análise das Manifestações Clínicas

O aparecimento das complicações clínicas associadas à ICV pode surgir em qualquer faixa etária, sendo que algumas complicações podem aparecer já ao diagnóstico da doença.

Dentre todas as manifestações clínicas da ICV, as infecções recorrentes são consideradas as mais prevalentes, ocorrendo em 98% dos pacientes (Cunningham-Rundles, 1999; Kokron et al., 2004). Geralmente o trato respiratório é o mais afetado, ocasionando bronquites, sinusites, otites e pneumonias; mas o comprometimento do sistema gastrointestinal também é bastante prevalente.

Em relação às infecções, verificamos que dos 70 pacientes do estudo, 93% apresentaram esta manifestação clínica. Confirmando esta observação, em 2010, Cunningham-Rundles verificou que em sua coorte de 416 pacientes com ICV, 90% apresentaram infecções do sistema respiratório, entretanto ressaltou que sua incidência poderia variar em diferentes países.

Outra manifestação clínica muito comum em pacientes com ICV são as bronquiectasias. A prevalência de bronquiectasias nesta coorte foi de 63%, o que nos chamou a atenção, pois pode ser explicada pelo grande número de infecções do trato respiratório. Em 2010, Touw et al. em uma revisão de 26 trabalhos encontrou uma prevalência de bronquiectasias em pacientes com ICV entre 29% a 79%, este dado mostra que apesar de elevada, a prevalência de bronquiectasias nesta coorte está de acordo com a relatada na literatura.

Autoimunidade é outra manifestação muito comum em pacientes com ICV, sendo encontrada em 20% a 50% dos pacientes. Dentre todos os tipos de autoimunidade, as citopenias são as mais prevalentes, mas também podemos encontrar vitiligo, artrite reumatóide, alopécia, tireoidites, síndrome de Sjögren e doença celíaca (Kokron et al., 2004; Cunningham-Rundles et al., 2006; Quinti et al., 2007; Lopes-da-Silva e Rizzo, 2008; Cunningham-Rundles, 2010). Nesta coorte, autoimunidade esteve

presente em 40% dos pacientes, sendo que além da alta frequência das citopenias autoimunes há uma grande frequência de tireoidites e doença celíaca.

A presença de esplenomegalia é comum em pacientes com ICV, podendo ter diferentes causas. Nesta coorte foi observado que 51% dos pacientes apresentaram esta manifestação clínica. Estes resultados também chamam a atenção devido a sua alta prevalência, tendo em vista que em 2008, Chapel et al. verificaram que 30% da coorte de pacientes ICV estudada apresentaram esplenomegalia.

Quanto à linfadenopatia, observamos uma prevalência de 40% nos pacientes desta coorte. Este resultado diverge do observado por Chapel et al., (2008) que em uma coorte composta por 334 pacientes, constatou prevalência de 15% de linfadenopatia.

Estes dados mostram que os pacientes com ICV deste estudo apresentam maior prevalência de uma linfoproliferação benigna do que a observada em outras coortes. Novos estudos serão necessários para investigar a causa deste achado, já que, as infecções de repetição, manifestação que poderia justificar esta observação, têm prevalência similar à de outras coortes.

Existe um risco significante de pacientes com ICV desenvolverem doenças malignas durante o curso da doença. Em torno de 15% dos pacientes desenvolvem algum tipo de câncer, sendo os mais comuns os linfomas não Hodgkin e os carcinomas gástricos (Cunningham-Rundles, 2010). Nesta coorte foi observado que os pacientes que participaram do estudo apresentaram prevalência de doenças malignas de 9%, sendo em sua maioria os carcinomas gástricos. Este número reduzido quando comparado a outras coortes deve-se ao fato de havermos excluído do estudo os pacientes com neoplasias em tratamento.

A granulomatose é uma manifestação observada em torno de 8% a 22% dos pacientes com ICV, podendo manifestar-se em diferentes órgãos, mas principalmente em pulmão e linfonodos e geralmente é mais comum nos pacientes adultos (Park et al., 2008). Para nossa surpresa, nesta coorte observamos uma frequência bastante reduzida, em torno de 3%, representando apenas uma paciente do sexo feminino com granulomatose confirmada por biópsia. Estes dados são interessantes, tendo em vista que Chapel et al. (2008) verificaram que a frequência de granulomatose estava em torno de 8% em uma coorte de 334 pacientes europeus e em 2010, Cunningham-Rundles verificaram nos pacientes americanos frequências similares.

Não observamos diferenças estatisticamente significantes quando subdividirmos os pacientes quanto ao gênero em cada uma das manifestações clínicas estudadas.

5.4 Correlação entre Manifestações Clínicas e Subtipos de LB

Um dos objetivos do presente trabalho foi identificar subtipos de LB que pudessem estar correlacionados com as complicações clínicas mais prevalentes nesta coorte, a saber: esplenomegalia, linfadenopatia, autoimunidade e bronquiectasias. Os resultados foram analisados sempre comparando a frequência do subtipo de LB entre os grupos de pacientes que apresentaram a manifestação clínica em questão com o grupo de pacientes que não desenvolveu.

Observamos que os pacientes que desenvolveram esplenomegalia apresentavam maior frequência de LB $CD21^{low}$, porém, apesar da tendência, não constatamos diferença significante. Estes resultados nos chamaram a atenção, tendo em vista que trabalhos anteriores, como o descrito por Wehr et al (2008) destacaram este subtipo de LB sendo o marcador mais característico para esplenomegalia nos pacientes com ICV. Assim, analisando apenas os subtipos de LB, não foi possível identificar um marcador específico para esplenomegalia nesta coorte.

Em relação à linfadenopatia foi possível observar que os pacientes apresentaram uma considerável redução de Pbl[14], diferença esta estatisticamente significativa. Em 2008, Wehr et al. descreveram que o aumento de LB Trans[15] era o marcador característico para linfadenopatia, sendo considerado ideal para identificação destes pacientes. Entretanto, ao analisarmos nesta coorte a correlação entre linfadenopatia e o aumento de LB Trans não observamos diferenças entre os grupos. Por conta destes resultados consideramos que o melhor marcador para linfadenopatia nesta coorte de pacientes brasileiros foi a redução de plasmoblastos, considerando os resultados fortemente significantes.

Outro resultado que nos chamou a atenção foi em relação à autoimunidade, onde observamos que os pacientes que desenvolveram esta manifestação clínica apresentaram um aumento tanto de LB *naive* quanto de LB $CD21^{low}$.

---

[14] Pbl: plasmoblasto.
[15] Trans: LB transitório.

Em 2008, Wehr et al. descreveram que a redução de plasmoblastos estava associada a manifestações autoimunes em pacientes com ICV. Em 2011, Boileau et al. também verificaram que o aumento de LB $CD21^{low}$ estava associado a manifestações autoimunes, já em relação ao aumento de LB *naive* não foi encontrado nenhum dado na literatura que o associasse a autoimunidade. Porém, a análise estatística não comprovou haver diferença entre os grupos quanto a redução de plasmoblastos, aumento de LB *naive* e LB $CD21^{low}$. Portanto, para esta coorte, avaliando apenas os subtipos de LB, não foi possível identificar um marcador específico para autoimunidade.

Por fim, considerando que a prevalência de bronquiectasias foi bastante elevada, procuramos identificar um possível marcador para associar esta complicação clínica e algum subtipo de LB. Observamos uma redução na frequência de MZB[16] no grupo de pacientes com bronquiectasias, entretanto, não constatamos diferença estatisticamente significante. Por conseguinte, avaliando apenas os subtipos de LB também não foi possível identificar um marcador para bronquiectasias.

5.5 Classificações

Vários esquemas de classificação foram desenvolvidos na tentativa de subdividir os pacientes com ICV em grupos mais homogêneos, possibilitando a correlação com as manifestações clínicas mais prevalentes e possivelmente etiopatogenia.

Neste contexto, optamos por classificar esta coorte segundo os 3 modelos de classificação utilizados atualmente: Classificação de Freiburgo, Classificação de Paris e a Classificação EUROclass e assim verificar qual destes modelos melhor se adequaria nesta coorte.

Dentre estes 3 modelos, o primeiro a ser descrito foi a Classificação de Freiburgo (**figura 3**), onde Warnatz et al. (2002) subdividiram os pacientes em 2 grupos (I e II) e posteriormente foi feita uma nova subdivisão no grupo I (Ia e Ib).

Dos 70 pacientes estudados neste trabalho, 10% foram classificados no grupo Ia e 19% no grupo Ib. Porém, a grande maioria foi classificada no grupo II (71%), não sendo observada diferença em relação ao gênero para os grupos desta classificação.

[16] MZB: LB de zona marginal.

Este resultado foi diferente do observado por Cunningham-Rundles et al. (2005), que verificaram que 62% dos pacientes foram classificados no grupo I e 38% no grupo II, sendo que para ambos os grupos, havia uma maior frequência de pacientes mulheres.

Com relação à prevalência dos diferentes parâmetros clínicos nos grupos da classificação de Freiburgo verificamos que os pacientes classificados no grupo Ia apresentaram maior frequência de infecções, linfadenopatia, bronquiectasias e granulomatose. O grupo Ib apresentou maior frequência de autoimunidade e no grupo II, esplenomegalia foi mais prevalente. Porém a análise estatística não apontou diferenças significantes entre os grupos para cada uma das manifestações clínicas avaliadas.

Estes resultados diferem do que já foi descrito, pois Brouet et al. (2000) verificou que pacientes do grupo I apresentavam mais esplenomegalia que os do grupo II. Warnatz et al. (2002) constataram que os pacientes do grupo Ia seguidos pelo grupo Ib, apresentavam maior frequência de esplenomegalia. Este trabalho também identificou que autoimunidade foi mais prevalente no grupo I.

Em 2005, Cunnigham-Rundles et al. constataram que o grupo I também apresentava maior frequência de granulomatose. Já quanto ao número de infecções, eles observaram maior prevalência no grupo II.

De uma maneira geral, a classificação de Freiburgo não se mostrou adequada para esta coorte, pois além de a grande maioria dos pacientes terem sido reunidos em apenas um grupo (grupo II), não foi possível a associação entre as complicações clínicas e os grupos deste modelo de classificação. Estes resultados são semelhantes aos de Collanieri (2010), também em coorte de pacientes brasileiros, que observou que alguns pacientes não se adequavam em algumas condições sugeridas pela Classificação de Freiburgo.

Assim sendo foi realizada a classificação dos pacientes segundo os critérios da classificação de Paris (**figura 4**), na qual Piqueras et al. (2003) analisaram a frequência de LB de memória ($CD19^{+}CD27^{+}$) e dentre as células B de memória, a frequência das que já tinham sofrido troca de isotipo.

Nesta coorte foi observado uma baixa frequência de pacientes que não se encaixavam em nenhum grupo (MB2), em torno de 7%. A grande maioria foi classificada no grupo MB0 (57%), este grupo é sugerido como o de pior prognóstico,

pois estes pacientes apresentam frequência de LB de memória total menor que 11%, e por fim, 36% dos pacientes foram classificados no grupo MB1.

Estes resultados foram semelhantes ao observado por Piqueras et al. (2003) que analisando uma coorte de 57 pacientes observou que 47% foram classificados no grupo MB0, 33% no grupo MB1 e 19% que não se encaixavam em nenhum grupo, sendo classificados como grupo MB2. Em 2009, Lawrence também descreveu resultados semelhantes, sendo observado que 48% dos pacientes foram classificados no grupo MB0, 43% em MB1 e apenas 9% no grupo MB2.

Ao subdividir cada um dos grupos quanto à variável gênero, observamos que os grupos MBO e MB2 são compostos em sua maioria por pacientes mulheres (57,5% e 60% respectivamente), já o grupo MB1 é composto principalmente por homens (60%). Estes resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

Após a classificação fenotípica, foi realizada a identificação da prevalência das principais manifestações clínicas em cada um dos 3 grupos. O grupo MB0 apresentou maior frequência apenas de granulomatose, pois o único paciente com esta manifestação clínica desta coorte estava neste grupo. No grupo MB1 verificamos maior prevalência de linfadenopatia e quanto a infecções, tanto os grupos MB1 quanto MB2 apresentaram maiores prevalências, já as manifestações de esplenomegalia, autoimunidade e bronquiectasias foram mais prevalentes apenas no grupo MB2. Porém, mais uma vez, não constatamos diferença significante.

Estes resultados foram muito discordantes do descrito no artigo que propôs esta classificação, onde foi possível verificar que esplenomegalia e linfadenopatia eram mais prevalentes no grupo MB0 (Piqueras et al., 2003).

Considerando estes resultados, a classificação de Paris também não se mostrou adequada para esta coorte.

Por fim, classificamos esta coorte segundo os critérios da EUROclass (**figura 5**). Esta classificação surgiu na tentativa de unificar as outras classificações descritas anteriormente.

A classificação EUROclass subdivide os pacientes em 7 grupos, de acordo com as características dos LB totais, LB de memória com troca de isotipo (smb), LB Transitório (Tr) e LB $CD21^{low}$(21^{lo}). Para fins mais didáticos renomeamos cada

grupo com uma seqüência numérica: $smb^{-}Tr^{hi}$: G1; $smb^{-}Tr^{norm}$: G2; $smb^{-}21^{norm}$: G3; $smb^{-}21^{lo}$: G4; $smb^{+}21^{norm}$: G5; $smb^{+}21^{lo}$: G6 e B^{-}: G7.

Em 2008, Wehr et al. verificaram que alguns pacientes poderiam ser classificados nos grupos G2 e G3 respectivamente, estes pacientes foram reunidos no grupo denominado como sobreposição e excluídos das análises posteriores. Também foram excluídos os pacientes do grupo 7 (G7), por apresentarem frequência menor que 1% de LB, pois além das análises se tornarem difíceis, esta condição poderia sugerir um diagnóstico dúbio à ICV.

A pesquisa da proteína Btk foi realizada nos pacientes do grupo 7 e afastou o diagnóstico de Agamaglobulinemia ligada ao X, pois todos apresentaram expressão de Btk em monócitos.

Para a análise de cada uma das principais manifestações clínicas nos 7 grupos formados, foram excluídos os grupos G3, devido ao fato deste ser composto por apenas um paciente e os pacientes que apresentaram sobreposição entre os grupos G2 e G3.

Os resultados revelaram que nesta coorte, 16% dos pacientes foram classificados no grupo 1 (G1)[17] e 14% foram classificados no grupo 2 (G2)[18]. Os pacientes do G1 apresentaram uma maior tendência a desenvolver linfadenopatia, sendo que 60% apresentaram esta manifestação clínica. O mesmo não foi observado para G2, onde apenas 10% dos pacientes apresentaram linfadenopatia. Entretanto, não constatamos diferença estatística entre os grupos em relação à linfadenopatia.

Estes resultados contrastam com o observado por Wehr et al. (2008), que constatou que os pacientes com linfadenopatia apresentam aumento de LB Transitório, sendo característico do G1.

Ao analisarmos o grupo G3[19] foi verificado que o paciente classificado (correspondendo a 1,4% do total), ao longo do curso da doença, apresentou episódios de infecções recorrentes do trato respiratório, bronquiectasias, linfadenopatia e doença celíaca como manifestação de autoimunidade. Em relação ao grupo 4 (G4)[20],

---

[17] G1: % SMB$\leq$ 2% e % Trans $\geq$ 9%.
[18] G2: % SMB$\leq$ 2% e % Trans < 9%.
[19] G3: % SMB$\leq$ 2% e % $CD21^{low}$< 10%.
[20] G4: % SMB$\leq$ 2% e % $CD21^{low}$ $\geq$ 10%.

22% dos pacientes foram classificados neste grupo, sem associação com as manifestações clínicas.

Wehr et al. (2008) verificou que esplenomegalia foi associada a vários distúrbios dos LB, mas principalmente ao aumento na frequência de LB $CD21^{low}$. Considerando isto, verificamos se nesta coorte, os pacientes do G4 apresentaram maior frequência de esplenomegalia. Para nossa surpresa, o grupo 5 (G5)[21], que apresenta níveis normais de LB $CD21^{low}$ foi o que apresentou maior freqüência, pois dos pacientes classificados neste grupo, 67% apresentaram esplenomegalia. Ainda assim, não observamos diferença estatística entre os grupos.

Os pacientes classificados no grupo 6 (G6)[22] apresentaram uma tendência maior de desenvolver doenças autoimunes, tendo em vista que esta manifestação clínica está presente em 64% deste grupo, porém mais uma vez a análise estatística revelou não haver diferenças entre os grupos.

Nesta coorte, 13% dos pacientes foram classificados no grupo 7 (G7)[23]. Clinicamente, os pacientes deste grupo apresentam uma tendência maior de desenvolverem bronquiectasias (75%), entretanto, não foi possível observar diferença estatística.

Observamos nesta coorte, que com o modelo de classificação EUROclass obtivemos grupos mais homogêneos, exceto para o grupo 3, porém para nossa surpresa este modelo de classificação também não conseguiu correlacionar os grupos formados com as manifestações clínicas mais prevalentes desta coorte.

Os achados aqui apresentados demonstram que os pacientes com ICV apresentam grande variação na distribuição dos subtipos de linfócitos B, sendo que algumas destas divergências estão relacionadas ao gênero. Alguns achados, mais especificamente, aumento na frequência de LB *naive* e LB $CD21^{low}$ e redução de plasmoblastos no gênero feminino não foram descritos anteriormente.

Também foi possível observar que esta coorte apresenta alterações no perfil clínico e que por conta destas peculiaridades na distribuição dos subtipos de

[21] G5: % SMB > 2% e % $CD21^{low}$< 10%.
[22] G6: % SMB > 2% e % $CD21^{low}$ ≥ 10%.
[23] G7: % $CD19^{+}$< 1%.

linfócitos B e prevalência das complicações clínicas, nenhuma das classificações utilizadas neste trabalho se mostrou apta para a classificação desta coorte.

Este trabalho ainda aponta a necessidade da inclusão de novos parâmetros imunológicos para que seja formulada uma classificação que contemple pacientes brasileiros.

6. CONCLUSÕES

1- Observamos um grande distúrbio na distribuição dos subtipos de Linfócitos B nesta coorte de pacientes com ICV, principalmente quanto às células de memória e plasmoblastos, e algumas destas alterações estão relacionadas ao gênero feminino (LB *naive*, plasmoblasto e $CD21^{low}$).

2- Nesta coorte não há correlação entre LB de memória com troca de isotipo (SMB) e as concentrações séricas de IgG e IgA, assim como entre LB de zona marginal e concentrações séricas de IgM.

3- O perfil das complicações clínicas: bronquiectasias, linfadenopatia, esplenomegalia, autoimunidade e malignidade, apresentou divergências na comparação com outras coortes.

4- Nesta coorte, a associação de manifestações clínicas e subtipos de linfócitos B revelou apenas a correlação entre linfadenopatia e a redução de plasmoblastos.

5- Concluímos que as classificações de Freiburgo, Paris e EUROclass não foram adequadas para esta coorte de pacientes brasileiros, sendo necessária a inclusão de outros parâmetros imunológicos para a formulação de uma nova classificação que contemple pacientes brasileiros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H; POBER, J.S. Lymphocyte Development and Rearrangement and Expression of Antigen Receptor Genes. In: **Cellular e Molecular Immunology.** Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p 169– 175.

2. ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H; POBER, J.S. Congenital and Adquired Immunodeficiencies. In: **Cellular e Molecular Immunology.** Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p.419-446.

3. AGEMATSU, K; HOKIBARA, S; NAGUMO, H; KOMIYAMA, A. CD27: A Memory B Cell Marker. **J Clin Immunol**. 21:204-206, 2000.

4. AHN, S; CUNNINGHAM-RUNDELS, C. Role of B Cell in Common Variable Immune Deficiency. **J. Clin Immunol**. 5(5): 557-564, 2009.

5. ALACHKAR, H; TAUBENHEIM, N; HAENEY, M.R; DURANDY, A; ARKWRIGHT, P.D. Memory Switched B Cell Percentage And Not Serum Immunoglobulin Concentration is Associated With Clinical Complications in Children And Adults With Specific Antibody Deficiency And Common Variable Immunodeficiency. **J Clin Immunol**. 120: 310-318, 2006.

6. AUKRUST, P.F; MULLER, S.S. Elevated Serum Levels on Interleukin – 4 and Interleukin - 6 in Patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID) are Associated With Chronic Immune Activation and Low Numbers of $CD4^+$ Lymphocytes. **Clin Immunol Immunopathol.** 70:217-224, 1994.

7. AUKRUST, P.F; LIEN, E; KRISTOFFERSEN, A.K; MULLER, F; HAUG, C.J; ESPEVIK, T. Persistent Activation of the Tumor Necrosis Factor System in a Subgroup of Patients with Common Variable Immunodeficiency – Possible Immunologic and Clinical Consequences. **Blood.** 87: 674 -681, 1996.

8. BANCHEREAU, J; STEINMAN, R.M. Dendritic Cells and Control of Immunity. **Nature.** 392: 245-252, 1998.

9. BAYRY, J; LACROIX-DESMAZES, S; KAZATCHKINE, M.D; GALICIER, L; LEBOTÃO CELULARIER, Y; WEBSTER, D, et al. Common Variable Immunodeficiency is Associated with Defective Functions of Dendritic Cells. **Blood.** 104(8): 2441-2443, 2004.

10. BAYRY, J; HERMINE, O; WEBSTER, D.A; LEVY, Y; KAVERI, S.V. Common Variable Immunodeficiency: The Immune System in Chaos. **Trends in Molec Medicine.** 11(8): 370-376, 2005.

11. BAYRY, J;FOURNIER, E.M;MADDUR, M.S;VANI, J;WOOTLA, B;SIBÉRIL, S;DIMITROV, J.D;LACROIX-DESMAZES, S;BERDAH, M;CRABOL, Y;OKSENHENDLER, E;LÉVY, Y;MOUTHON, L;SAUTÈS-FRIDMAN, C;HERMINE, O;KAVERI, S,V. Intravenous immunoglobulin induces proliferation and immunoglobulin synthesis from B cells of patients with common variable immunodeficiency: a mechanism underlying the beneficial effect of IVIg in primary immunodeficiencies. **J Autoimmun.**36(1):9-15, 2011.

12. BERGER, M. Principles of and advances in immunoglobulin replacement therapy for primary immunodeficiency. **Immunol Allergy Clin North Am**. 28:413-437, 2008.

13. BONILLA, F.A; BERNSTEIN, I.L; KHAN, D.A; BALLAS, Z.K; CHINEN, J, FRANK, M.M, et al. Practice Parameter for the Diagnosis And Management of Primary Immunodeficiency. **Ann Allergy Asthma Immunol**. 96(3): 504, 2006.

14. BONILLA, F.A; GEHA, R. Common Variable Immunodeficiency. **Pediatr Res.** 65(5): 13-19, 2009.

15. BONILLA, F.A; GEHA, R.S. Primary Immunodeficiency Diseases. **J Allergy Clin Immunol.** 111:571-581, 2003.

16. BONILLA, F.A; GEHA, R.S. Update in Primary Immunodeficiency Diseases. **J Allergy Clin Immunol.** 117(2): 435-441, 2006.

17. BRAUN, J; BERBERIAN, L; KING, L; SANZ, I; GOVAN, H.I. Restricted Use of Fetal VH3 Immunoglobulin Genes by Unselected B Cells in the Adult: Predominance of 56p 1-like VH Genes in Common Variable Immunodeficiency. **J Clin Invest.** 89: 1395-1402, 1992.

18. BROUET, T.C; CHEDEVILLE, A; FERMAND, J.P; ROYER, B. Study of the B cell Memory Compartment in Common Variable Immunodeficiency. **Eur J Immunol**. 30(9): 2516-2520, 2000.

19. BRYANT, A; CALVER, N.C, TOUBI, E; WEBSTER, A.D; FARRANT, J. Classification of Patients with Common Variable Immunodeficiency by B Cell Secretion of IgM and IgG in Response to anti-IgM and Interleukin-2. **J Clin Immunol Immunopathol**. 56:239-248, 1990.

20. BUCKLEY R.H. Immunodeficiency Diseases. **JAMA.** 268: 2797-2806, 1992.

21. BUSSE, P.J; RAZVI, S.F, CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia in patients with Common Variable Immunodeficiency. **J Allergy ClinImmunol.** 109(6):101-104, 2002.

22. CARBONE, J; SARMIENTO, E; RODRIGUEZ-MOLINA, J.J; FERNANDEZ-CRUZ, E. Atypical Presentation of Common Variable Immunodeficiency Without Infections. **J Allergol Immunopathol**. 32:218-222, 2004.

23. CARSETTI, R; ROSADO, M.M; WARDEMANN, H. Peripheral Development of B Cells in Mouse and Man**. Immunol Rev.** 197:179-191, 2004.

24. CASTIGLI, E; WILSON, S.A; ELKHAL, A; OZCAN, E; GARIBYAN, L; GEHA, R.S. Transmembrane Activator and Calcium Modulator And Cyclophilin Ligand Interactor Enhances CD40-Driven Plasma Cell Differentiation. **J. Allergy Clin Immunol**. 120(4): 885-891, 2007.

25. CHAPEL, H; CUNINGHAM-RUNDLES, C. Update in Understanding Common Variable Immunodeficiency Disorders (CVIDS) and the Management of Patients with These Conditions. **Br J Haematol.** 45(6): 709-727, 2009.

26. CHAPEL, H; LUCAS, M; LEE, M; BJORKANDER, J; WEBSTER, D;GRIMBACHER, B, et al. Common Variable Immunodeficiency Disorders: Division Into Distinct Clinical Phenotypes. **Blood.** 112(2): 277-286, 2008.

27. CHAPEL, H.M; SPICKEET, G.P; ERICSON, D; ENGL, W; EIBL, M.M; BJORKANDER, J. The Comparison of the efficacy and safety of intravenous versus subcutaneous immunoglobulin replacement therapy. **J Clin Immunol.** 20(2): 94-100, 2000.

28. COLLANIERI A.C. Imunodeficiência Comum Variável: Distúrbio de diferenciação dos linfócitos B ou distúrbio de ativação dos linfócitos T? [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

29. CONLEY M.E; NOTARANGELO L.D; ETZONI A. Diagnostic Criteria for the Primary Immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). **Clin Immunol**. 93(3): 190-197, 1999.

30. CUNNINGHAM-RUNDLES, C. How I Treat Common Variable Immune Deficiency. **Blood**. 116:7-15, 2010.

31. CUNNINGHAM-RUNDLES C.; ALTSCHUL A .Chronic Urticaria Angioedema as the First Presentations of Common Variable Immunodeficiency. **J Allergy Clin Immunol.** 110: 664-5, 2002.

32. CUNNINGHAM-RUNDLES C; BODIAN C. Common Variable Immunodeficiency: Clinical and Immunological Features of 248 Patients. **J Clin Immunol.** 92:34-48, 1999.

33. CUNNINGHAM-RUNDLES, C; RADIGAN, L.Deficient IL-12 and Dendritic Cell Function in Common Variable Immune Deficiency. **Clin Immunol**. 115(2): 147-153, 2005.

34. CUNNINGHAM-RUNDLES, C; RADIGAN, L; KNIGHT, A.K; ZHANG, L; BAUER, L; NAKAZAWA, A. TLR9 Activation is Defective in Common Variable Immune Deficiency. **J Immunol**. 176:1978-1987, 2006.

35. DE GRACIA, J; VENDRELL, M; ALVAREZ, A, PALLISA, E; RODRIGO, M.J; DE LA ROSA, D, et al. Immunoglobulin therapy to control lung damage in patients with Common Variable Immunodeficiency. **Int Immunopharmacol.** 4(6): 745-753, 2004.

36. DHALLA, F;DA SILVA, S.P; LUCAS, M;TRAVIS, S;CHAPEL, H. Review of gastric cancer risk factors in patients with common variable immunodeficiency disorders, resulting in a proposal for a surveillance programme. **Clin Exp Immunol.**164: doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04384.x., 2011.

37. EADES-PERNER, A.M;GATHMANN, B;KNERR, V;GUZMAN, D;VEIT, D;KINDLE, G;GRIMBACHER, B.ESID Registry Working Party. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2004-06. **Clin Exp Immunol.**147(2):306-12, 2007.

38. EIJKHOUT, H.W; VAN DER MEER, J.W.M; KALLENBERG, G.G;WEENING, R.S; VAN DISSEL, J.T; SANDERS, L.A.M, et al. The Effect of Two Different Dosages of Intravenous Immunoglobulin on the Incidence of Recurrent Infections In patients With Primary Hypogammaglobulinemia. A Randomized, Double-Blind, Multicenter Crossover Trial. **Ann Intern Med.** 135: 165-174, 2001.

39. ESOLEN L.M, FASANO M.B, FLYNN J, BURTON A, LEDERMAN H.M. *Pneumocystis carini* ostemyelitis in a Patient with Common Variable Immunodeficiency. **N Engl J Med**. 326: 999-1001, 1992.

40. GEHA, R.S; NOTARANGELO, L.D; CASANOVA, J.L; CHAPEL, H; CONLEY, M.E; FISCHER, A, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: An Update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. **J Allergy Clin Immunol**. 120(4): 776-794, 2007.

41. GOMPELS M.M.; HODGES E; LOCK R.J; ANGUS B; WRITE H; LARKIN, A, et al. Lymphoproliferative Disease in Antibody Deficiency: a Multi-Centre Study. **Clin ExpImmunol**.134: 314-320, 2003.

42. GRIMBACHER, B; WARNATZ, K; PETER, H.H. The Immunological Synapse for B Cell Memory: The Role of the ICOS And its Ligand for the Longevity of Humoral Immunity. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** 3(6): 409-419, 2003.

43. GRUMACH, A.S; SILVA DUARTE, A.J. Imunodeficiências Primárias – Noções Gerais. In: **Alergia e Imunologia na infância e na adolescência**. São Paulo: Atheneu; 2009. 519-532.

44. GUZMAN, D; VEIT, D; KNERR, V; KINDLE, G; GATHMANN, B; PERNER,A.M, et al. The ESID Online Database Network. **Bioinformatics**. 23(5): 654-655, 2007.

45. HART, M; STEEL, A; CLARK, S.A; MOYLE, G; NELSON, M; DON C HENDERSON, R. W, et al. Loss of Discrete Memory B Cell Subset is Associated With Impaired Immunization Responses in HIV-1 Infection and May be a Risk Factor for Invasive Pneumococcal Disease. **J Immunol.** 178: 8212-8220, 2007.

46. HAUSSER, C; VIRELIZIER, J.L; BURIOT, D; GRISCELLI, C. Common variable hypogammaglobulinemia in children. Clinical and immunologic observations in 30 patients. **Am J Dis Child.** 137:833–837, 1983.

47. HAYMORE, B.R; MIKITA, C.P; TSOKOS, G.C. Memory B Cells in Common Variable Immune Deficiency Presenting as Autoimmune Disease. **Autoimmunity Rev.** 7(4): 309-312, 2007.

48. HEENEY M.M.; ZIMMERMAN S.A.; WARE R.E. Childhood Autoimmune Cytopenia Secondary to Unsuspected Common Variable Immunodeficiency. **J Pediatr.** 143: 662-665, 2003.

49. HERMASZEWSKI, R.A; WEBSTER, A.D. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. **Q J Med.** 86:31–42, 1993.

50. HONG, R. Update on the Immunodeficiency Diseases. **Am J Dis Child.** 144: 983-992, 1990.

51. ISEKI, M; HEINER, D.C. Immunodeficiency Disorders**. Pediatr Rev**. 14: 226-236, 1993.

52. KNERR V, GRIMBACHER B.Primary immunodeficiency registries. **Curr Opin Allergy ClinImmunol.**7(6):475-480, 2007.

53. KIRKPATRICK, P; RIMINTON, S. Primary Immunodeficiency Diseases in Australia and New Zealand. **J Clin Immunol.** 27: 517 -524, 2007.

54. KO, J; RADIGAN, L; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Immune Competence and Switched Memory B Cells in Common Variable Immunodeficiency. **J Clin Immunol**. 116:37-41, 2005.

55. KOKRON, C.M; ERRANTE, P.R; BARROS, M.T; BARACHO, G.V; CAMARGO, M.M; KALIL, J, et al. Clinical and Laboratory Aspects of Common Variable Immunodeficiency. **An Acad Bras Cienc**. 76(4): 707-726, 2004.

56. LAWRENCE T.C. Avaliação das subpopulações de linfócitos B em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2009.

57. LEIVA, L.E; ZELAZCO, M; OLEASTRO, M; CARNEIRO-SAMPAIO, M; CONDINO-NETO, A; COSTA-CARVALHO, B.T, et al. Primary Immunodeficiency Diseases in Latin America: The Second Report of the LAGID[1] Registry**. J Clin Immunol.** 27(1): 101-108, 2007.

58. LOPES-DA-SILVA, S; RIZZO, L.V. Autoimmunity in Common Variable Immunodeficiency. **J Clin Immunol.** 28(1):546-555, 2008.

59. MACKAY, F; SCHNEIDER, P; RENNERT, P; BROWNING, J. BAFF; APRIL: A Tutorial on B Cell Survival. **Ann Rev Immunol**. 21: 231–264, 2003.

60. MACURA, A.B; MACURA–BIEGUN,A; PAWLIK, B. Susceptibility to Fungal Infections of Nails in Patients with Primary Antibody Deficiency. **Obesit Surg.** 26: 223-232, 2003.

61. MATAMOROS, F.N; MILA, L.J; ESPANOL, B.T; RAGA BORJA, S; FONTAN, C.G. Primary Immunodeficiency Syndrome in Spain: First Report of the National Registry in Children and Adults. **J Clin Immunol.** 17:333-339, 1997.

62. MICHEL, M; CHANET, V; GALICIER, L; RUIVARD, M, LEVY, I; HERMINE, O, et al. Autoimmune Thrombocytopenic Purpura and Common Variable Immunodeficiency. **Medicine**. 83:254-263, 2004.

63. MOIR, S; MALASPINA, A; OGWARO, K.M; DONOGHUE, E.T; HALLAHAN, C.W; EHLER, L.A, et al. HIV-1 Induces Phenotypic and Functional Pertubations of B Cells in Chronically Infected Individuals. **Proc Natl Acad SCI USA.** 98: 10362-10367, 2001.

64. MORBACH, H; EICHHORN, E.M; LIESE, J.G; GIRSCHICK, H.J. Reference Values for B Cell Subpopulations from Infancy to Adulthood. **Clin Exp Immunol.** 162(2): 271-279, 2010.

65. MOUILOT, G; CARMAGNAT, M; GÉRARD, L; GARNIER, J; 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**. 30: 746-755, 2010.

66. 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.** 102(5): 553-563, 2000.

67. PARK, M.A; LI, J.T; HAGAN, J.B; MADDOX, D.E; ABRAHAM, R.S. Common Variable Immunodeficiency: a new look at an old disease. **Lancet**. 372: 489-502, 2008.

68. PINCHUK, L.M; KLAUSS, S.J; MAGALETTI, M; PINCHUK, G.V; NORSEN, J.P; CLARK, E. A. Functional CD40 Ligand Expressed by Human Blood Dendritic Cell is Up-Regulated by CD4 Ligation. **J Immunol.** 157:4363-4370, 1996.

69. PIQUERAS, B; LAVENU-BOMBLED, C; GALICIER, L; BERGERON-VAN DER CRUYSSEN, F; MOUTHON, L, et al. Common Variable Immunodeficiency Patient Classification Based on Impaired B Cell Memory Differentiation Correlates With Clinical Aspects**. J Clin Immunol.** 23(5): 385-400, 2003.

70. QUINTI, I; SORESINA, A; SPADARO, G, MARTINO, S; DONNANNO, S; AGOSTINI, C, et al. Long-term follow-up andoutcome of a large cohort of Patients with Common Variable Immunodeficiency. **J Clin Immunol.** 27(3): 308-316, 2007.

71. REZAEI, N; AGHAMOHAMMADI, A; MOIN, M; POURPAK, Z; MOVAHEDI, M; GHARAGOZLOU, M, et al. Frequency and Clinical Manifestations of Patients with Primary Immunodeficiency Disorders in Iran: Update from the Iranian Primary Immunodeficiency Registry. **J Clin Immunol.** 26: 519-526, 2006.

72. SALZER, U; MAUL-PAVICIC, A; CUNNINGHAM-RUNDLES, C; URSCHEL, S; BELOHRADSKY, B.H; LITZMAN, J, et al. ICOS Deficiency in Patients With Common Variable Immunodeficiency. **J Clin Immunol.** 113(3): 234-240, 2004.

73. SÁNCHEZ-RAMÓN, S; RADIGAN, L; YU, J.E; BARD, S; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Memory B Cells in Common Variable Immunodeficiency: Clinical Associations and Sex Differences. **NIH Public Access.** 128(3): 314-321, 2008.

74. SCHAFFER, A.A; SALZER, U; HAMMARSTROM, L; GRIMBACHER, B. Deconstructing Common Variable Immunodeficiency by Genetic Analysis. **Curr Opin Genet.** 17(3): 201-212, 2007.

75. SCHWARTZ, R; PORAT, Y.B; AHANDZEL, Z; STHOEGER, Z; GARTY, B.Z; CONFINO-COHEN, R, et al. Identification of a Subset of Common Variable Immunodeficiency Patients with Impared B Cell Protein Tyrosine Phosphorylation. **Clin Diagn Lab Immunol.** 6: 856-860, 1999.

76. SCOTT-TAYLOR, T.H; GREE, M.R.J; EREN, E; WEBSTER, A.D.B. Monocyte Derived Dentritic Cell Responses in Common Variable Immunodeficiency. **J Clin Exp Immunol.** 138: 484-490, 2004.

77. SNELLER, M.C. Common Variable Immunodeficiency. **J Med Sci**. 321:42-48, 2001.

78. SPICKETT, G.P; WEBSTER, A.D; FARRANT, J. Celular Abnormalities in Common Variable Immunodeficiency. **Immunodefic Rev**. 2:199-219, 1990.

79. STRAY-PEDRESEN, A; ABRAHAMSEN, T.G; FROLAND, S.S. Primary Immunodeficiency Diseases in Norway. **J Clin Immunol**. 20: 477-485, 2000.

80. TOUW, C.M; VAN DE VEN, A.A; DE JONG, P.A; TERHEGGEN-LAGRO, S; BEEK, E; SANDERS, E.A, et al. Detection of pulmonary complications in Common Variable Immunodeficiency**. Pediatr Allergy Immunol.** 21(5): 793-805, 2010.

81. THOMPSON, J.S; BIXLER, S.A; QUIAN, F, VORA, K; SCOTT, M.L; CACHERO, T.G, et al. BAFF-R, A Newly Identified TNF Receptor That Specifically Interacts With BAFF. **Science.** 293: 2108-2111, 2001.

82. VASCONCELOS, D; BARROS, M.T; JACOB, C.M; KOKRON, C.M; GRUMACH, A ; DORNA, M.B; DOMINGUES-FERREIRA, M; PASTORINO, A.C; RIZZO, L.V;DUARTE, A.J.S; KALIL, J;CARNEIRO-SAMPAIO, M. Primary Immunodeficiency Diseases in a single tertiary university hospital in São Paulo, Brazil. In: Primary Immunodeficiency Conference, 2010, Baltimore. **Clin Immunol**, 135: 304, 2010.

83. VASCONCELOS, D.M.; DUARTE, A.J.S. Imunodeficiência Comum Variável (hipogamaglobulinemia de inicio tardio ou hipogamaglobulinemia adquirida): breve revisão. **Rev Bras Alergia Imunopatol.** 12: 147-157, 1989.

84. VIALLARD, J.F; CAMOU, F; ANDRÉ, M; LIFERMAN, F; MOREAU, J.F; PELLEGRIN, J.L, et al. Altered Dendritic Cell Distribution in Patients With Common Variable Immunodeficiency. **Arthritis Res Ther**. 7(5):1052-1055, 2005.

85. VLKOVÁ, M; FRONKOVA, E; KANDEROVÁ, V; JANDA, A; RUZICKOVÁ, S; LITZMAN, J, et al. Characterization of Lymphocyte Subsets in Patients with Common Variable Immunodeficiency Reveals Subsets of Naïve Humans B cells marked by CD24 Expression. **J Immunol**. 185: 6431-6438, 2010.

86. WARNATZ, K; BOSSALLER, L; SALZER, U; SKRABL-BAUMGARTNER, A; SCHWINGER, W; VAN DER BURG, M, et al. Human ICOS Deficiency Abrogates the Germinal Center Reaction and Provides a Monogenetic Model for Common Variable Immunodeficiency. **Blood**. 107:3045-3052, 2006.

87. 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**. 99:1544-1551, 2002.

88. WARNATZ, K; SCHLESIER, M. Flowcytometric Phenotyping of CommonVariable Immunodeficiency. **Clin Cytometry.** 74B: 261-271, 2008.

89. WARNATZ, K; WEHR, C; DRÄGER, R; SCHMIDT, S; HERMANN, E; SCHLESIER, M, et al. Expansion of $CD19^{hi}CD21^{lo/neg}$ B cells in Common Variable Immunodeficiency (CVID) Patients With Autoimmune Citopenia. **Immunobiology**. 206: 502-513, 2002.

90. WEBSTER, A.D.B. Humoral Immunodeficiencies and the Lung. **Immunol Allergy Clin North America.** 21: 1-22, 2001.

91. WELLER, S; BRAUN, M.C; TAN, B.K; ROSENWALD, A; CORDIER, C; CONLEY, M.E, et al. Human Blood IgM "Memory" B Cells are Circulating Splenic Marginal Zone B Cells Harboring a Prediversified Immunoglobulin Repertoire. **Blood.** 104: 3647-3654, 2004.

92. WEHR, C; EIBEL, H; MASILAMANI, M; ILLGES, H; SCHLESIER, M, PETER, H.H, et al. A new $CD21^{low}$ B Cell Population in the Peripheral Blood of Patients With SLE. **J. ClinImmunol.** 113: 161-171, 2004.

93. WEHR, C; KIVIOJA, T; SCHMITT, C; FERRY, B; WITTE, T; EREN, E, et al. The EUROclass Trial: Defining Subgroups in Common Variable Immunodeficiency. **Blood.** 11: 77-85, 2008.

94. YONG, P.F.K; TARZI, M; CHUA, I; GRIMBACHER, B; CHEE, R. Common Variable Immunodeficiency: An Update on Etiology and Management. **J Allergy Clin Immunol.** 28: 367-386, 2008.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME DO PACIENTE :.....

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 (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : **Avaliação da resposta celular à imunização anti-infecciosa de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável.**

1. PESQUISADOR: Cristina Maria Kokron

2. CARGO/FUNÇÃO: Médica Assitente HC-FMUSP INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N: CRM 49888

3. UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Alergia e Imunopatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 1 ano

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. **Justificativa e os objetivos da pesquisa**:
   O senhor (a) tem uma doença na qual não existe produção de algumas substâncias que normalmente protegem as pessoas das infecções. Estas substâncias são chamadas anticorpos ou imunoglobulinas. No caso da sua doença, a Imunodeficiência Comum Variável, o seu organismo, por um motivo que nós ainda desconhecemos, deixou de produzir estas imunoglobulinas. Por causa disto, o senhor (a) começou a apresentar várias infecções, e, para proteger-se destas infecções é necessário repor estes anticorpos, que fazemos administrando imunoglobulinas, por via venosa, uma vez por mês. Este tratamento é feito gratuitamente no Hospital das Clínicas. Mas para estudarmos melhor a causa desta doença e eventualmente descobrirmos um tratamento mais específico e eficiente, gostaríamos de avaliar a sua capacidade de responder a vacinas. Para esta avaliação serão necessárias coletas de 3 amostras de sangue, uma antes, a segunda de 1 a 2 meses após e a terceira, 1 ano após a vacinação para realizarmos algumas análises científicas. A vacina que o senhor (a) vai receber não apresenta nenhum risco. Em consequência da sua doença, não sabemos se as vacinas conseguirão protegê-lo das infecções e é exatamente isto que queremos estudar.
2. **Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais (explicitar):**
   Colheremos 30 ml de sangue (3 colheres de sopa) por duas vezes, uma antes e uma um mês após a vacinação, e faremos a pesquisa da resposta imunológica após contato com a vacina.
   Desconfortos e riscos esperados:
   Apenas aqueles relacionados à punção venosa e à vacinação.
3. **Benefícios que poderão ser obtidos: (explicitar):**
   Entendendo melhor a doença, podemos tentar encontrar um tratamento mais eficiente.
4. **Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:** não há

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1) **Serão dadas, a qualquer tempo, informações sobre os testes de laboratório, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer qualquer dúvida.**
O Senhor(a) será informado (a) durante toda a duração da pesquisa e irá receber todas as informações por escrito onde constem os riscos e benefícios para que não fique nenhuma dúvida quanto à sua participação nela.

2) **O paciente poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo.**
O senhor(a) poderá sair do estudo a qualquer momento que quiser sem que isto acarrete qualquer prejuízo em seu atendimento de rotina no ambulatório.

3) **Haverá confidencialidade, sigilo e privacidade sobre as informações e resultados de exame.**
Seus dados pessoais e resultados de exames serão guardados de forma sigilosa, deixando a sua privacidade assegurada.

4) **Haverá assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, devidos a pesquisa.**
Está garantida assistência médica no Serviço de Imunologia e Complexo Hospital das Clínicas, caso ocorram problemas de saúde decorrentes da pesquisa.

5) **Possibilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.**
Como o risco de ocorrer algum dano decorrente desde estudo é mínimo, não está prevista indenização.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dr(a) Cristina Maria Kokron 3069-5914; 3069-6225; 3069-6098; 9981-3852

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

II - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2011 .

_____	_____
assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal (carimbo ou nome Legível)	assinatura do pesquisador

ANEXO 2: Aprovação da CAPPesq referente a mudança de título.

DE : FAX : 14 MAR 2011 12:06 Pág. 1

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

CIÊNCIA

O Coordenador da 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, em 01.03.11, **TOMOU CIÊNCIA do(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) referente ao Protocolo de Pesquisa nº **0460/06**, intitulado: "**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR À IMUNIZAÇÃO ANTI-INFECCIOSA DE PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL**", apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

- **M.1.02/11-Imunologia - datado de 20.01.11 – Comunicado que o sub-projeto de dissertação de mestrado da aluna Maíra Pedreschi que tem como orientadora a Dra. Cristina Maria Kakron passou a ter o seguinte título "*CLASSIFICAÇÃO DE PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL BASEANDO-SE NA FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS B*"**
- **PG-Imunologia 57/10 datado de 21.10.10 – Comunicado que o sub-projeto intituiado "*AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA E A RESPOSTA CLÍNICA DOS PACIENTES PORTADORES DE ICV SUBMETIDOS A VACINAÇÃO COM ANTÍGENOS PROTÉICOS E POLISSACARÍDICOS*" será dissertação de mestrado da Dra. Ana Karolina Barreto de Oliveira tendo como orientadora a Dra. Cristina Maria Kokron.**

CAPPesq, 01 de março de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador da Comissão Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnet.usp.br
matc

ANEXO 3: Dados Epidemiológicos de 70 pacientes da coorte de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável do ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP.

Características	**Homens**	**Mulheres**
Pacientes (N)	33	37
Idade (mediana)	32,5 anos	32 anos
Idade do Diagnóstico (mediana)	26 anos	27 anos
Retardo do Diagnóstico (mediana)	6,5 anos	8 anos

ANEXO 4: Frequência dos Subtipos de Linfócitos B nesta coorte de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável.

	LB	***Naive***	**MZB**	**SMB**	**CD21^{low}**	**Pbl**	**Trans**
	CD19^{+}	**CD19^{+}CD27^{-}IgD^{+}**	**CD19^{+}CD27^{+}IgD^{+}**	**CD19^{+}CD27^{-}IgD^{-}**	**CD19^{+}CD38^{-}CD21^{-}**	**CD19^{+}CD38^{+}IgM^{-}**	**CD19^{+}CD38^{+}IgM^{+}**
Pacientes	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**
ICV1001	13,7	63	23,3	3,97	15	0,08	9,88
ICV0902	0,87	54,6	14,4	15,5	1,71	14	0,37
ICV1003	38	89,2	8,73	0,36	2,49	0,078	4,29
ICV1004	17,1	88	3,18	0,48	14,8	0,34	1,15
ICV1005	6,43	89,5	8,87	0,16	14	0,57	8,18
ICV0906	10,4	96,5	2,17	0,12	5,42	0	4,28
ICV1007	6,78	90	8,37	0,23	21,1	1,1	12,2
ICV0908	7,09	87,1	3,09	0,51	22,4	0,1	2,96
ICV0909	28,1	72,4	27,5	0,015	62,3	0,047	3,7
ICV1010	27,8	38,8	56,1	2,99	80,3	0,13	0,71
ICV1011	14,7	93,2	4,11	0,56	1,87	0,06	3,53
ICV0912	7,22	93,9	2,62	0,19	4,21	0,07	3,33
ICV1013	5,56	82,2	12	1,95	22,3	0,25	5,34
ICV1014	0,11	89,4	1,77	0,88	22,8	12,2	8,13
ICV0915	5,66	77,1	17,1	1,94	39,5	0,24	3,77
ICV1016	17,1	83,3	13,6	1,43	3,46	0,08	4,49
ICV1017	16,3	96,3	1,53	0,19	4,21	0,06	3,68
ICV1018	10,2	76,3	18,2	2,34	20,3	0,05	3,23
ICV1019	0,6	94,3	5,27	0	3,85	0,4	40,3
ICV1020	9,1	85,4	13,6	0,29	9,12	0,17	1,17
ICV1021	0,86	94,00	1,45	0,73	1,72	0,00	53,60
ICV0922	7,67	92,9	2,11	0,09	62,2	1,35	4,82
ICV1023	8,46	69,2	15,1	8,59	31,8	0,23	5,4
ICV1024	3,56	97,50	1,36	0,09	8,33	0,00	14,40
ICV0925	8,67	7,56	87,2	3,52	1,75	0,15	8,21
ICV1026	0,48	92,4	2,87	0,69	7,65	0,11	27,6
ICV0927	10,4	94,90	3,23	0,36	1,14	0,03	6,21
ICV0928	0,82	61,60	24,30	6,02	11,90	1,28	4,90
ICV0929	15	83,7	1,61	0,7	57,8	0,14	5,19
ICV1030	3,56	92,5	3,4	0,93	12,2	0,17	5,01
ICV0931	1,11	97,70	1,29	0,00	33,00	0,00	22,40
ICV0932	20,8	14,9	1,52	0,94	16,3	0,03	0,01
ICV0933	24,9	94,2	0,9	1,01	27,2	0,02	0,61
ICV0934	10,1	30,3	65,5	3,86	18,7	0,19	4,25
ICV1035	0,8	30,9	42,6	22,4	49	3,19	4,31
ICV1036	10,9	89,5	1,4	2,85	3,18	0,13	2,68
ICV0937	9,31	86,2	6,88	2,44	11,5	0,82	2,2
ICV0938	3,66	93,20	2,86	0,66	13,00	0,13	5,00
ICV0939	3,29	71,3	27,3	0,93	9,6	0,057	31,3
ICV1040	20,3	93	0,9	3,11	4,6	0,13	1,56
ICV0941	12,4	97,1	1,24	0,4	2,38	2,67	77,9
ICV1042	0,78	73,3	14,7	6,67	21,1	1,51	55,4
ICV1043	9,11	95	0,76	4,33	7,68	11,7	0,22
ICV0944	2,86	23,1	75,1	1,58	14	0,17	12,9
ICV1045	4,95	85,5	3,82	6,08	7,23	4,87	0,62
ICV0946	6,28	98,8	0,36	0,03	4,61	0,1	20,8
ICV0947	9,54	81,7	17,6	0,01	50,1	0,32	26,3
ICV0948	3,93	73,5	7,25	6,19	20	0,08	3
ICV1049	10,1	79,4	6,35	10,7	23,9	0,15	10,2
ICV0950	3,27	89,8	6,06	0,4	8,81	0,13	8,94
ICV0951	9,05	83,00	9,00	3,00	6,00	0,04	2,71
ICV1052	14,3	85,2	5,81	2,64	9,56	0,33	2,83
ICV0953	12,90	95,10	1,79	0,47	4,00	0,00	1,91

	LB	***Naive***	**MZB**	**SMB**	**CD21^{low}**	**Pbl**	**Trans**
	CD19^{+}	**CD1^{9+}CD27^{-}IgD^{+}**	**CD19^{+}CD27^{+}IgD^{+}**	**CD19^{+}CD27^{-}IgD^{-}**	**CD19^{+}CD38^{-}CD21^{-}**	**CD19^{+}CD38^{+l}gM^{-}**	**CD19^{+}CD38^{+}IgM^{+}**
Pacientes	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**
ICV1054	13,4	84,7	2,01	1,34	15,4	0,96	3,51
ICV0955	12	89,5	5,61	0,92	21,5	0,02	3,89
ICV0956	0,88	96,4	0,82	0,12	48,9	0,13	24,4
ICV0957	3,58	73,5	15,9	1,96	32,4	0,78	30,6
ICV0958	20,8	93,5	1,71	0,72	2,81	17,3	0,02
ICV1059	8,03	75,5	23,4	0,6	2,12	0,06	5,86
ICV0960	15,3	78,3	9,25	7,05	5,37	0,08	3,87
ICV1061	11,7	87,5	7,56	1,93	2,8	0,04	8,83
ICV1062	4,9	93,5	2,62	0,39	1,18	0,32	3,65
ICV0963	4,94	57	39	1,27	15,5	0,02	3,95
ICV0964	5,16	49,00	42,30	5,15	9,95	0,60	0,55
ICV1065	2,94	61	32,1	4,32	34,4	0,4	3,94
ICV1066	4,21	83,9	13	0,43	13,1	0,25	11,3
ICV0967	8,10	48,00	28,00	15,40	18,30	0,09	0,34
ICV1068	17,1	97	0,76	0,13	1,8	0,04	2,14
ICV1069	0,85	74,9	15,9	4,4	23,5	2,73	6,73
ICV0970	11,2	76,7	18,3	2,7	22,4	0	1,5

Freqüências individuais para cada um dos 6 subtipos de LB avaliados no grupo dos pacientes com ICV.
MZB: LB de zona marginal.
SMB: LB de memória com troca de isotipo.
CD21^{low}: LB CD21^{low}.
Pbl: plasmoblasto.
Trans: LB Transitório.

ANEXO 5: Frequência dos Subtipos de Linfócitos B em indivíduos controles.

	LB	***Naive***	**MZB**	**SMB**	**CD21^{low}**	**Pbl**	**Trans**
	CD19^{+}	**CD1^{9+}CD27^{-}IgD^{+}**	**CD19^{+}CD27^{+}IgD^{+}**	**CD19^{+}CD27^{-}IgD^{-}**	**CD19^{+}CD38^{-}CD21^{-}**	**CD19^{+}CD38^{+I}gM^{-}**	**CD19^{+}CD38^{+}IgM^{+}**
Controles	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**
CTR0901	7,6	64,1	20,5	10,8	3,41	0,33	1,95
CTR0902	10,1	83,1	5,96	7,98	1,14	0,26	0,85
CTR0903	9,98	81,9	6,79	8,83	1,77	0,43	2,51
CTR0904	6,44	85,4	10,2	3,11	5,07	0,77	0,69
CTR0905	8,35	66,2	8,78	18,6	3,97	0,77	5,46
CTR0906	6,55	59,2	9,32	25,3	6,68	2,31	8,38
CTR0907	7,29	57,1	7,06	32,9	4,68	3,15	5,38
CTR0908	5,27	72,1	8,5	13,4	4,67	6,93	6,72
CTR0909	10,1	25,4	58,8	14,2	5,05	0,69	7,42
CTR0910	10,1	31,5	51,9	15,9	4,21	1,2	10,9
CTR0911	6,11	69,9	15,3	12,2	0,96	0,68	5,17
CTR0912	6,67	71,2	16,4	9,56	14	0,48	7,42
CTR0913	8,93	66,6	10,4	14,5	3,51	0,39	5
CTR1014	7,01	57,1	16,8	18,4	6,78	2,3	5,17
CTR1015	6,6	63,1	12,3	13,4	8,24	1,2	6,36
CTR1016	2,99	58,7	13,4	20,5	12,6	3,29	3,14
CTR1017	8,03	68,3	5,41	15,3	5,32	2,1	3,59
CTR1018	9,55	76,6	5,19	8,86	2,48	0,27	5,36
CTR1019	9,62	79,9	6,52	7,54	2,41	0,19	3,36
CTR1020	10,3	78,6	5,59	8,05	3,28	0,21	3,02
CTR1021	9,49	79,1	8,03	7,81	5,06	0,13	3,98
CTR1022	12,6	67,4	11,6	11,3	7,18	0,227	7,43
CTR1023	11,9	67,7	8,49	18,2	11,6	1,62	5,3
CTR1024	11,7	68,1	7,44	16,1	7,38	0,41	2,83
CTR1025	10,5	66,2	6,99	19	7,25	0,618	4,68
CTR1026	10,4	66,2	16,9	6,49	7,74	0,19	4,37
CTR1027	15	74,3	6,56	14,7	1,27	0,27	6,46
CTR1028	8,64	43,2	33,9	19,4	3,99	0,8	5,33
CTR1029	15	70,8	6,17	18,2	1,52	0,23	6,66
CTR1030	10,7	41	32,7	24,1	4,72	0,37	3,51

Freqüências individuais para cada um dos 6 subtipos de LB avaliados no grupo dos pacientes com ICV.
MZB: LB de zona marginal.
SMB: LB de memória com troca de isotipo.
CD21^{low}: LB CD21^{low}.
Pbl: plasmoblasto.
Trans: LB Transitório.

ANEXO 6: Comparação entre os valores de referência encontrados nesta coorte e a coorte européia.

Subtipo	Fenótipo	Valores de Referência (%)	
		Warnatz et al., (2008)[a]	**Nossos Resultados[b]**
LB naive	$CD19^{+}IgD^{+}CD27^{-}$	42,6% - 82,3%	25,4% - 85,4%
LB de zona marginal	$CD19^{+}IgD^{+}CD27^{+}$	7,4% - 32,5%	5,19% - 58,8%
LB de memória com troca de isotipo	$CD19^{+}IgD^{-}CD27^{-}$	6,5% - 29,1%	3,11% - 32,9%
LB Transitório	$CD19^{+}IgM^{+}CD38^{+}$	0,6% - 3,4%	0,69%¨- 10,9%
Plasmoblasto	$CD19^{+}IgM^{-}CD38^{+}$	0,4% - 3,6%	0,13% - 6,93%
LB $CD21^{low}$	$CD19^{+}CD21^{-}CD38^{-}$	0,9% - 7,6%	0,96% - 14%

[a] Valores de referência baseados na análise de 54 controles (idades entre 19 e 61 anos).
[b] Valores de referência baseados na análise de 30 controles (idades entre 19 e 60 anos).