NATHÁLIA SILVEIRA BARSOTTI

**Avaliação da frequência de linfócitos B reguladores
produtores de IL-10 (B10) em pacientes com
Imunodeficiência Comum Variável (ICV)**

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

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

**SÃO PAULO
2015**

NATHÁLIA SILVEIRA BARSOTTI

**Avaliação da frequência de linfócitos B reguladores
produtores de IL-10 (B10) em pacientes com
Imunodeficiência Comum Variável (ICV)**

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

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

**SÃO PAULO
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Barsotti, Nathália Silveira

Avaliação da frequência de linfócitos B reguladores produtores de IL-10 (B10) em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) / Nathália Silveira Barsotti. -- São Paulo, 2015.

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

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Cristina Maria Kokron.

Descritores: 1.Linfócitos B reguladores 2.Interleucina-10 3.Imunodeficiência de variável comum 4.Autoimunidade 5.Linfócitos T reguladores 6.Linfócitos T

Dedico este trabalho a Rafael Ribeiro Almeida, por todo o auxílio, pelos conselhos e pela paciência durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Cristina Maria Kokron, pela oportunidade e pela condução do meu aprendizado durante toda a pós-graduação;

Aos funcionários e colaboradores do LIM-60 e LIM-19, particularmente à Rafael Ribeiro Almeida, Andréia Kuramoto, Susan Ribeiro e Priscilla Ramos Costa, pelo auxílio direto na condução dos experimentos e nas diversas etapas desse trabalho;

Aos funcionários e residentes do Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia, especialmente Serafim Fidalgo, Rosana Vieira Coutinho e Osvaldo Fernandes Júnior, pela cooperação e apoio junto aos pacientes;

Aos colegas do LIM-60 pelo acolhimento e apoio durante esta etapa contribuindo direta ou indiretamente com o desenvolvimento desse trabalho, proporcionando momentos de enriquecedoras discussões científicas e também pela amizade durante esses anos;

Ao INCT – Instituto de Investigação em Imunologia e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

E principalmente, aos pacientes por aceitarem contribuir um pouquinho mais para o entendimento de suas patologias e confiaram em nosso estudo.

Normalização adotada

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Imunodeficiência Comum Variável (ICV)	01
1.2 Ontogenia de células B	05
1.3 Células B reguladoras (B _{reg}) produtoras de IL-10	09
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVO	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Casuística	17
4.2 Métodos	18
4.3 Análise dos Resultados	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Características Gerais de Pacientes e Controles	29
5.2 Características Clínicas dos Pacientes ICV	31
5.3 Avaliação de células B10 de Pacientes e Controles	33
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES	53
8 ANEXOS	58
Figuras Suplementares	58
Tabelas Complementares	62
Parecer da CAPPesq	70
Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) pacientes	72
Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) controles	77
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	<i>Apoptotic cell</i>
APC	Fluorocromo alofococianina
APC-Cy7	Fluorocromo alofococianina conjugado com cianina 7
B10	Célula B reguladora produtora de interleucina 10
B10pro	Progenitora da célula B reguladora produtora de interleucina 10
BAFF-R	<i>B cell activating factor receptor</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
BFA	Brefeldina A
B_{reg}	Célula B reguladora
CD1d	Glicoproteína da família CD1 expressa em várias células apresentadoras de antígenos (APC). É uma molécula de MHC de classe I não clássica envolvida na apresentação de antígenos lipídicos às células T
CD3	<i>Cluster of differentiation 3</i> , molécula marcadora de células T
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> , molécula marcadora de células T helper
CD5	<i>Cluster of differentiation 5</i> , molécula marcadora de células B secretoras de IgM
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> , molécula marcadora de células T citotóxicas
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i> , molécula marcadora de monócitos
CD19	<i>Cluster of differentiation 19</i> , molécula marcadora de células B
CD21	<i>Cluster of differentiation 21</i> , receptor de C3d e também utilizado pelo EBV para adentrar a célula B.
CD24	<i>Cluster of differentiation 24</i> , molécula de adesão
CD27	<i>Cluster of differentiation 27</i> , receptor da família do fator de necrose tumoral, presente em células B de memória
CD38	<i>Cluster of differentiation 38</i> , molécula com função de adesão, transdução de sinal e sinalização por cálcio

CD40	<i>Cluster of differentiation</i> 40, molécula co-estimulatória de célula, apresentadora de antígeno, também importante para indução de comutação isotópica
CD40L	Ligante do <i>cluster of differentiation</i> 40, presente em células T
CD48	<i>Cluster of differentiation</i> 48, molécula de ativação e diferenciação de células do sistema imunológico
CD80	<i>Cluster of differentiation</i> 80, molécula presente em células apresentadoras de antígenos (APC) e em células B ativadas.
CD86	<i>Cluster of differentiation</i> 86, molécula presente em células apresentadoras de antígenos
CD148	<i>Cluster of differentiation</i> 148, molécula presente em células B de memória
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CpG ODN	<i>CpG oligodeoxynucleotide</i> . Molécula sintética curta de cadeia simples de DNA que contém um desoxinucleotídeo de citosina fosfatado seguido de um desoxinucleotídeo de guanossina fosfatado.
CVID	<i>Common Variable Immunodeficiency</i>
CVID-AI	<i>Common Variable Immunodeficiency with autoimmunity</i>
CVID-NAI	<i>Common Variable Immunodeficiency without autoimmunity</i>
DC	<i>Dendritic cells</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESID	<i>European Society for Immunodeficiencies</i>
FasL	Proteína da família do fator de necrose tumoral, ligante do receptor Fas
FITC	Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
FOXP3	Gene <i>Forkhead box</i> P3, fator de transcrição das células T reguladoras
Foxp3	Molécula intranuclear presente em células T reguladoras
FSC	<i>Forward Scatter</i> , parâmetro de tamanho
FSC-A	<i>Forward Scatter - Area</i>

FSC-H	<i>Forward Scatter - Height</i>
HC	<i>Healthy Controls</i>
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
ICV	Imunodeficiência Comum Variável
IDP	Imunodeficiências Primárias
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-10	Interleucina 10
IL-21	Interleucina 21
iNKT	Célula <i>Natural Killer</i> T invariante
IVAS	Infecções de Vias Aéreas Superiores
LPS	Lipopolissacarídeo
MD-2	Molécula associada ao <i>Toll Like Receptor 4</i>
NK	Células <i>natural killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGID	<i>Pan-American Group for Immunodeficiency</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PE	Fluorocromo ficoeritrina
PE-Cy7	Fluorocromo ficoeritrina conjugado com <i>cychrome 7</i>
PE-CF594	Fluorocromo ficoeritrina conjugado com CF594
PerCP-Cy5	Fluorocromo proteína piridina clorofila conjugada com <i>cychrome 5</i>
PFA	Paraformaldeído
PIB	PMA + Ionomicina + Brefeldina A
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
sCD14	CD14 solúvel
SFB	Soro Fetal Bovino

SSC	<i>Side Scatter</i> , parâmetro de granularidade
SSC-A	<i>Side Scatter-Area</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
T_{eff}	Célula T efetora
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
T_{H1}	Célula T <i>helper</i> 1
T_{H2}	Célula T <i>helper</i> 2
T_{H17}	Célula T <i>helper</i> 17
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
T_{reg}	Células T reguladoras

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	micrograma
μl	microlitro
L	litro
mg	miligrama
mL	mililitro
ng	nanograma
pg	picograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de Desenvolvimento de Células B	09
Figura 2: Mecanismos de ação das células B _{reg} em respostas imunes	14
Figura 3: Estratégia “Time, “Singlets” e “Viabilidade”	23
Figura 4: Estratégia de análise de células B10	24
Figura 5: Estratégia de análise de Ativação Celular	25
Figura 6: Estratégia de análise de células T _{reg}	26
Figura 7: Ativação de células B10 após 5 horas de estímulo com CpG+PIB	32
Figura 8: Ativação de células B10 após 5 horas de estímulo com LPS+PIB	33
Figura 9: Frequência de células CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} e CD24 ^{hi} CD27 ⁺ em pacientes ICV e Controles	34
Figura 10: Frequência de células B10 CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} e CD24 ^{hi} CD27 ⁺ em pacientes ICV e Controles	35
Figura 11: Número absoluto de células B10 CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} e CD24 ^{hi} CD27 ⁺ em pacientes ICV e Controles	36
Figura 12: Frequência de células B10 CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} e CD24 ^{hi} CD27 ⁺ em pacientes ICV antes e após o tratamento com gamaglobulinas	37
Figura 13: Frequência de células B10 CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} e CD24 ^{hi} CD27 ⁺ em subgrupos de pacientes ICV e Controles	38
Figura 14: Produção de IL-10 por células B CD19 ⁺ de pacientes ICV e Controles	39
Figura 15: Frequência de células B10 CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} e CD24 ^{hi} CD27 ⁺ em pacientes CVID-AI e CVID-NAI	41
Figura 16: Perfil de ativação crônica em pacientes ICV.....	42
Figura 17: Análise de correlação entre ativação crônica e células B10	43
Figura 18: Frequência de células T _{reg} e T _{reg} CD39 ⁺ em pacientes ICV e Correlação entre células B10 e T _{reg} e T _{reg} CD39 ⁺	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Painel de anticorpos monoclonais para avaliação das células B10	20
Tabela 2: Painel de anticorpos monoclonais para avaliação de ativação celular	21
Tabela 3: Painel de anticorpos monoclonais para avaliação das células T _{reg}	22
Tabela 4: Características Demográficas e Laboratoriais de Pacientes e Controles	29
Tabela 5: Características Laboratoriais dos Pacientes e Controles	29
Tabela 6: Características Clínicas dos Pacientes	31

RESUMO

Barsotti, NS. *Avaliação da frequência de linfócitos B reguladores produtores de IL-10 (B10) em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV)* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A Imunodeficiência Comum Variável (ICV) é a imunodeficiência primária sintomática mais comum em adultos. Pacientes ICV frequentemente apresentam diversas alterações de linfócitos B, número reduzido de células T_{reg} e ativação imune crônica, bem como infecções recorrentes, alta incidência de doenças autoimunes e um risco aumentado de doenças malignas. Testamos a hipótese de que a frequência de células B10 estaria diminuída nos pacientes ICV, já que elas desempenham um importante papel no desenvolvimento de células T_{reg}, no controle da ativação de células T e na autoimunidade. Para tanto, nós avaliamos a frequência de células B10 em pacientes ICV buscando correlacioná-la com as diferentes manifestações clínicas e imunológicas associadas à doença. Quarenta e dois (42) pacientes com diagnóstico de ICV e 17 indivíduos saudáveis foram convidados a participar do estudo. A partir das CMSP criopreservadas foram realizados testes de perfil de ativação celular, presença de células T reguladoras (T_{reg}) e caracterização das células B10. Os níveis de sCD14 no plasma foram determinados por ELISA. A produção de IL-10 foi determinada por ELISA em sobrenadante de cultura de células B. Pacientes ICV apresentam frequência diminuída de células B CD24^{hi}CD38^{hi} produtoras de IL-10 em diferentes condições de cultura celular e frequência diminuída de células B CD24^{hi}CD27⁺ em cultura celular estimulada por CpG+PIB. No entanto, a produção de IL-10 por células B não demonstrou diferença significativa entre pacientes ICV e controles. A frequência de células B10 não teve correlação com a presença de autoimunidade, ativação celular ou frequência de células T_{reg} em pacientes ICV. Este trabalho sugere que pacientes ICV têm um comprometimento na subpopulação de células B reguladoras, mas que não está correlacionado com as características clínicas e imunológicas apresentadas por esses indivíduos.

Descritores: Linfócitos B reguladores; Interleucina 10; Imunodeficiência de Variável Comum; Autoimunidade; Linfócitos T reguladores; Linfócitos T

ABSTRACT

Barsotti, NS. *Evaluation of IL-10-producing regulatory B cells in patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID) [Thesis]*. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Common variable immunodeficiency (CVID) is the most prevalent symptomatic primary immunodeficiency in adults. CVID patients often present changes in the frequency and function of B lymphocytes, reduced number of T_{reg} cells, chronic immune activation, recurrent infections, high incidence of autoimmunity and increased risk for malignancies. We hypothesized that the frequency of B10 cells would be diminished in CVID patients because these cells play an important role in the development of T_{reg} cells and in the control of T cell activation and autoimmunity. Therefore, we evaluated the frequency of B10 cells in CVID patients and correlated it with the different clinical and immunological characteristics of this disease. Forty-two CVID patients and 17 healthy controls were recruited for this study. Cryopreserved PBMCs were used for analysis of T cell activation, frequency of T_{reg} cells and characterization of B10 cells by flow cytometry. Plasma sCD14 levels were determined by ELISA. IL-10 production was determined in supernatant by ELISA after culture of B cells. We found that CVID patients presented a decreased frequency of IL-10-producing CD24^{hi}CD38^{hi} B cells in different cell culture conditions and decreased frequency of IL-10-producing CD24^{hi}CD27⁺ B cells stimulated with CpG+PIB. However, the B cells secretion of IL-10 was similar between CVID patients and healthy controls. The frequency of B10 cells had no correlation with autoimmunity, immune activation and T_{reg} cells in CVID patients. This work suggests that CVID patients have a compromised regulatory B cell compartment which is not correlated with clinical and immunological characteristics presented by these individuals.

Descriptors: B-lymphocytes, regulatory; interleukin-10; common variable immunodeficiency; autoimmunity; T-lymphocytes, regulatory; T-lymphocytes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Imunodeficiência Comum Variável (ICV)

A Imunodeficiência Comum Variável (ICV) é a imunodeficiência primária sintomática mais comum em adultos, caracterizada por hipogamaglobulinemia e reduzida/ausente capacidade de produção de anticorpos específicos (1-3). Considera-se que esta imunodeficiência, provavelmente, é um grupo de doenças que têm a hipogamaglobulinemia como denominador comum, com etiologia desconhecida (4). Essa doença afeta ambos os sexos de maneira equivalente e pode se estabelecer em qualquer faixa etária, porém tem distribuição bimodal, manifestando-se principalmente na 2ª-3ª décadas de vida ou na infância (por volta dos 8-10 anos de vida) (1).

Grande parte dos pacientes manifesta a doença de forma esporádica, porém, em torno de 10% apresentam padrão de herança familiar, tanto autossômica dominante como recessiva. É comum observar grupos familiares com portadores de ICV e Deficiência Seletiva de IgA (IgAD), por isso acredita-se que haja uma associação entre ambas, por compartilharem semelhanças entre alguns defeitos genéticos, pela ocorrência de hereditariedade de ambas as doenças nos mesmos grupos familiares e devido à progressão de alguns casos de IgAD para ICV. Muitos estudos têm sido feitos com o intuito de correlacionar fenótipos imunológicos entre essas imunodeficiências, bem como encontrar marcadores que possam definir o desencadeamento da ICV nos pacientes com IgAD (5-7).

Nas últimas décadas estudos foram realizados na tentativa de estabelecer mutações gênicas associadas à ICV. Dentre os genes avaliados, TACI (*tumor necrosis factor superfamily member 13B*), que codifica a proteína de mesmo nome responsável pela troca de isotipo de imunoglobulina, diferenciação terminal do linfócito B e resposta de anticorpo independente de célula T; e BAFFR (*tumor necrosis factor superfamily member 13C*), necessário ao crescimento e regulação normal de linfócitos B, foram encontrados em cerca de 10% dos pacientes ICV (8, 9). Outras mutações associadas à doença foram de ICOS, fator co-estimulador indutível de linfócitos T, com transmissão autossômica recessiva, e CD19, CD21 e CD81, membros do complexo de co-receptores do BCR (8, 9). Entretanto, todas as mutações juntas atingem apenas de 12-15% dos pacientes ICV e o restante dos pacientes não apresentam uma causa genética conhecida. O papel destas mutações na doença também não está estabelecido, uma vez que algumas delas podem ser encontradas em pessoas com imunoglobulinas séricas normais (8, 9).

As manifestações clínicas mais comuns na ICV são as infecções bacterianas de repetição, especialmente no trato respiratório (1-3). Além dessas, a ICV apresenta outras manifestações clínicas como autoimunidade, neoplasias e gastroenteropatia crônica (3, 10). Aproximadamente 20% a 50% dos pacientes ICV apresentam autoimunidade e doenças inflamatórias, sendo estas as manifestações clínicas não infecciosas mais comuns (1, 3, 11, 12). A predisposição à autoimunidade tem sido descrita por vários mecanismos incluindo alterações genéticas monogênicas; infecções recorrentes ou de difícil tratamento, que podem gerar eliminação defeituosa de antígenos não-próprios, inflamação crônica, deposição de imunocomplexos em órgãos ou a formação

de anticorpos anti-tecidos por mimetismo molecular; desregulações imunológicas, como produção alterada de citocinas, desequilíbrio entre as subpopulações celulares e a ativação crônica dos linfócitos; e até mesmo falha nos mecanismos de tolerância ou manutenção central e/ou periférica (12, 13). Dentro das manifestações autoimunes descritas, as citopenias, em especial a púrpura trombocitopênica idiopática (PTI), são as mais prevalentes (3). Em 2004, no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP a prevalência de doenças autoimunes nos pacientes ICV era de 24,1% (14). Em um levantamento recente foi observada uma prevalência de 39% de autoimunidades em uma coorte de 161 pacientes ICV, sendo púrpura trombocitopênica idiopática, anemia hemolítica autoimune, padrão celíaco, pangastrite atrófica, retocolite ulcerativa e vitiligo as mais frequentes. A presença de autoanticorpos é um importante critério para o diagnóstico de autoimunidade, contudo, é um fator que pode estar ausente ou diminuído em pacientes ICV, dificultando seu diagnóstico (12).

A ICV é considerada uma doença que abrange defeitos nas células B, sendo a hipogamaglobulinemia sua principal característica. Geralmente, os pacientes apresentam número normal de linfócitos B, porém, estas células exibem um fenótipo característico de células imaturas, apresentando dificuldade na diferenciação para células efetoras e de memória (15). É descrita uma redução de células B de memória comutadas ($CD19^+CD27^+IgM^-IgD^-$), como característica mais frequente (10, 16) e, também, a expansão da população de células B $CD21^{low}$, considerada uma população imatura, estando

os dois distúrbios associados à doença granulomatosa, esplenomegalia ou autoimunidade (10, 17).

Outras alterações celulares também já foram descritas, sugerindo defeitos imunológicos combinados (11). Muitos estudos demonstraram defeitos em células T, como diminuição de células T *naïve* (10, 18, 19), defeitos envolvendo o efluxo tímico (20), diminuição da proliferação em contato com antígenos específicos (1), produção deficiente de citocinas (21-23), aumento de apoptose (24), redução na expressão de CD40L em células T ativadas (25), diminuição de células T reguladoras (T_{reg}) (26-30), aumento crônico da ativação de células T CD4⁺ (10, 31, 32), entre outros. Também já foram descritos defeitos na diferenciação, maturação e função de células dendríticas e monócitos (33, 34). A ausência ou falha na interação dos linfócitos T e células fagocitárias com os linfócitos B resulta na ativação ineficiente e insuficiente produção de anticorpos específicos, o que contribui para o perfil deficiente das células B nesses pacientes (25, 33).

Recentemente, foi sugerido que o estado de ativação crônica das células T que ocorre na ICV está relacionado a níveis elevados de CD14 solúvel (32, 35). O CD14 é um componente da imunidade inata, ligante de LPS, que pode ser expresso de duas maneiras: como receptor na membrana de células mielóides, entre outras, ou de forma solúvel no plasma, proveniente da própria membrana ou liberada diretamente de vesículas (36). Na sua forma solúvel também se liga ao LPS e interage com o complexo receptor (TLR4 e MD-2) desse antígeno nas células, ativando-as. Essa molécula é frequentemente utilizada como indicador de presença de LPS no plasma (35).

Inicialmente o diagnóstico de ICV era baseado predominantemente na deficiência de anticorpos, mas, novos parâmetros foram associados para englobar características clínicas e imunológicas já encontradas nessa doença. A definição mais completa de ICV foi apresentada pela Sociedade Europeia de Imunodeficiências Primárias (ESID) e pelo Grupo Pan Americano em Imunodeficiências Primárias (PAGID) de 1999 (37). Em 2009, Chapel & Cunningham-Rundles propuseram como critérios de diagnóstico da ICV: paciente homem ou mulher acima de 4 anos; níveis séricos de IgG < 4,5 g/L para adultos ou menor que 2,5% do normal para a idade; IgA e/ou IgM abaixo do limite inferior para a idade; ausência de resposta significativa de produção de anticorpos antígeno-específicos após imunização ou exposição ao antígeno em pelo menos 2 ensaios; exclusão de todas as outras causas conhecidas de falha na produção de imunoglobulinas (38). Recentemente, em 2014, os critérios diagnósticos da ESID foram revistos e pequenas alterações feitas para melhor englobar os pacientes. Entre as principais mudanças estão o nível sérico de IgG que passa a ser menor que 5,0 g/L e uma redução concomitante de IgA. IgM pode ou não estar reduzida nesses pacientes (39, 40), além da incorporação de achados laboratoriais característicos e manifestações clínicas bem definidas na ICV (37, 39).

Com base nos diversos parâmetros clínicos e laboratoriais apresentados pelos pacientes ICV alguns trabalhos se propõem a subdividir a ICV em subgrupos mais homogêneos para melhor caracterizar o prognóstico e o tratamento entre eles (3, 38, 41). Chapel *et al.*, 2009 sugerem que os pacientes ICV sejam divididos de acordo com 5 (cinco) fenótipos clínicos sendo eles: sem complicações (apenas infecções de repetição), presença de autoimunidade,

doença linfoproliferativa benigna, enteropatia e presença de linfoma (3). Jolles *et al.*, 2012 propõem os seguintes subgrupos: sem complicações (apenas infecções de repetição), citopenias (trombocitopenias, anemia hemolítica e neutropenias), doenças linfoproliferativas e enteropatias não-explicadas (41). Abbott *et al.* (2015), em revisão recente, divide clinicamente os pacientes entre: doenças hepáticas, doenças intestinais, doenças pulmonares, citopenias, doenças linfoproliferativas e malignidade (37).

1.2 Ontogenia de células B

A origem de todas as linhagens de células sanguíneas se dá pelas células tronco hematopoiéticas localizadas na medula óssea ou no fígado fetal. Após o seu amadurecimento, as células tronco hematopoiéticas pluripotentes se tornam progenitores linfóides comuns que podem originar células T, células B, células NK e algumas células dendríticas (42). A origem e maturação das células B a partir do progenitor dessa linhagem ocorrem principalmente na medula óssea, porém, no feto ocorre no fígado fetal e são então denominadas B-1. Em adultos as células B-1 são autorenováveis e se localizam nas mucosas e no peritônio, no entanto, sua geração e desenvolvimento após o nascimento ocorrem exclusivamente na medula óssea que origina a maior parte das células B foliculares, também denominadas B-2. (42, 43).

O desenvolvimento de linfócitos B é dependente de células estromais não-linfóides presentes na medula óssea. As células do estroma apresentam dois papéis frente ao desenvolvimento das células B, um relacionado à adesão dessas células por meio de moléculas de adesão e seus ligantes específicos e

outro por fornecer fatores de crescimento, o que gera a diferenciação e a proliferação das primeiras linhagens de células B. Conforme o processo de maturação avança, menor é a necessidade do contato das linhagens de B com as células estromais e assim elas migram para o eixo central da cavidade medular como célula B imatura, apresentando apenas receptores IgM em sua superfície. Por fim, para tornar-se célula B madura o processo final do desenvolvimento passa a acontecer no baço (42, 43).

Durante todo o processo de desenvolvimento de linfócitos B é possível separar os diferentes estágios das linhagens de B por um padrão específico de expressão de genes, de imunoglobulinas e outras proteínas de membrana celular que geram uma característica fenotípica em cada etapa do desenvolvimento (44). As primeiras células dessa linhagem são chamadas de células pró-B, sendo essas progenitoras derivadas diretamente das células-tronco hematopoiéticas pluripotentes. As células pró-B não apresentam imunoglobulinas (Ig) na membrana, mas expressam CD10 e CD22 o que as restringem à linhagem de células B (44). Nesse estágio do desenvolvimento ocorrem os processos de rearranjos dos segmentos gênicos da cadeia pesada das imunoglobulinas que culminam na expressão de uma cadeia pesada μ , que passa a caracterizar a próxima linhagem do processo de desenvolvimento, as células pré-B. Dentro do estágio de pré-B as células expressam o pré-BCR, um receptor formado pela cadeia pesada de imunoglobulina associada a proteínas substitutas de cadeia leve, homólogas entre si, e proteínas de transdução de sinal e também expressam CD19 e CD24 (42-44). O pré-BCR regula os sinais para que haja os processos de parada do rearranjo da cadeia pesada e rearranjo das cadeias leves. Quando ocorre a formação completa de uma

molécula de IgM, essa passa a ser expressa também na superfície e a linhagem passa a ser chamada de célula B imatura. A partir dessa etapa as células B imaturas migram para o baço para terminar seu processo de maturação (42, 43).

No baço, as células B imaturas podem ser chamadas de células B transicionais, pois passam por dois estágios de transição tornando-se célula B de zona marginal ou células B foliculares. Essas últimas expressam em sua membrana CD19, CD21, CD24, CD38, IgM e IgD. A presença de ambas as imunoglobulinas de membrana confere a habilidade dessas células circularem, por isso, as células B foliculares formam a maior parte de células B *naïve* maduras e representam a maioria da população de células B na periferia. Nessa etapa as células B circulantes migram para outros órgãos linfoides secundários, se alojando em nichos conhecidos como folículos de células B (42, 44). As células B de zona marginal expressam CD19, CD21, CD24, CD27 e IgM em sua superfície e, como sugerido pelo nome, ficam localizadas na zona marginal do baço tendo o papel de secretar espontaneamente anticorpos IgM inespecíficos que reagem com polissacarídeos e lipídeos bacterianos, chamados anticorpos naturais, também reagem rapidamente a microrganismos no sangue, diferenciando-se em plasmócitos secretores de IgM de vida curta. As células B de zona marginal são consideradas independentes de células T, mas podem mediar algumas respostas imunológicas dependentes de células T (42, 44).

Os próximos estágios das células B estão relacionados ao seu processo de ativação e diferenciação. Frente a um estímulo antigênico específico, as células B ativadas sofrem expansão clonal e diferenciação em plasmócitos,

células secretoras de anticorpos, e células B de memória (42). Os plasmócitos produzem e secretam outras classes de anticorpos além de IgM e IgD, num processo conhecido como troca de isotipo da cadeia pesada. Após a infecção, alguns plasmócitos migram para a medula óssea e passam a produzir uma pequena quantidade de anticorpos específicos, que garantem uma proteção imediata no caso de uma nova infecção pelo mesmo agente infeccioso, por um longo tempo. Outra parte das células B ativadas sofre diferenciação em células B de memória, caracterizada pela expressão do marcador CD27, que apresentam uma capacidade de reação mais rápida e eficaz num caso de nova infecção (42, 44).

Figura 1. Esquema representativo do desenvolvimento de células B central e periférico. Os marcadores de superfície representam os mais relevantes em cada estágio (44).

1.3 Células B reguladoras (B_{reg}) produtoras de IL-10

Os linfócitos B são células predominantemente relacionadas à resposta imune humoral, sendo responsáveis pela produção de anticorpos antígeno-específicos. Porém, outras funções têm sido descritas para essas células como apresentação de antígenos, produção de citocinas inflamatórias e, mais recentemente, funções regulatórias, desempenhadas pelas células B reguladoras (B_{reg}), que modulam negativamente a resposta imune celular (45-53). A ausência ou inabilidade dessas células contribuem para um agravamento de quadros inflamatórios e autoimunes (49, 51, 53, 54).

As células B_{reg} produtoras de interleucina 10 (IL-10) foram recentemente descritas em humanos, sendo chamadas de B10 e caracterizadas como principal fonte dessa citocina dentre as linhagens de células B (48, 50, 51, 53, 55). Foram também descritas suas células progenitoras (B10pro), que secretam IL-10 quando estimuladas *in vitro* por lipopolissacarídeo (LPS), CpG ou outros agonistas de *Toll Like Receptors* (TLR) e CD40 (48, 52).

O desenvolvimento das células B10 em humanos mostra similaridades com o desenvolvimento em murinos (56). Esse processo ocorre a partir de suas células progenitoras (B10pro), que se ativam quando estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS), CpG ou outros agonistas de *Toll Like Receptors* (TLR) e CD40. De fato, o LPS e o CpG foram os agonistas de TLR com maior potencial de induzir a diferenciação das células B10 a partir das B10pro (46, 48, 49, 51, 52, 57). Agonistas de TLR são referidos como potentes ativadores das células B10, sendo suficientes para iniciar a produção de IL-10 por células B *naïve* num primeiro momento, ativando as células progenitoras a expressar

IL-10 e TGF- β assim como moléculas inibitórias, que inibem diretamente a ação patogênica de células T e de células B autoreativas. Porém, numa segunda etapa, para uma produção mais efetiva é requerida a ativação do receptor de célula B antígeno-específico (BCR) e a co-estimulação do CD40, o que garante a sobrevivência e expansão das B10, tornando-as mais efetivas. A ativação do BCR é essencial para o desenvolvimento dessas células e muitos trabalhos já constataram esse fato (46, 49-51, 57, 58). Yanaba *et al.* (59) observaram que camundongos deficientes de CD19 têm uma diminuição de 70 a 80% de células B10+B10pro. Ma *et al.* (60) também demonstraram a importância do BCR ao observar que há indução da produção de IL-10 por células B por domínios de imunoglobulina de células T (TIM-1), já que ambas as moléculas são intimamente relacionadas.

Outros fatores já foram descritos como promotores das células B10, o fator de ativação de célula B (BAFF), que aumenta o número de células e provoca uma expansão seletiva das B10 (61) e células apoptóticas, que são estímulos endógenos para a produção de IL-10 (51, 62). Um fato interessante é que a presença de células T não se faz necessária durante seu desenvolvimento, apesar da interação com células T CD4⁺ ser importante para a função efetora das células B10 (49). Alguns fatores de transcrição foram identificados em algumas fases do desenvolvimento das células B10, porém nenhum fator de transcrição se mostrou exclusivo dessas células (63).

A caracterização fenotípica das células B10 isoladas de sangue periférico ainda não foi bem definida, pois não existem marcadores específicos para elas, portanto, para identificação dessas células é necessária a constatação da produção de IL-10 quando estimuladas corretamente, sendo

esse um marcador fundamental (48, 52, 56, 64, 65). A IL-10 é uma citocina imunomoduladora que inibe a polarização de células T CD4⁺ em T_h1 e T_h2 e suprime as células apresentadoras de antígenos (APCs) por impedir a apresentação antigênica e a produção de citocinas pro-inflamatórias (48, 51, 52). Isto define o papel regulatório das células B10 no controle de inflamações e autoimunidades relacionadas às células T (46-48, 63, 66). Também são propostos alguns marcadores de superfície presentes nas células B10, mas que não são exclusivos dessa subpopulação de células B. Em camundongos, essas células são caracterizadas por expressar altos níveis de CD1d (CD1d^{hi}), molécula expressa predominantemente em APCs com papel na apresentação de antígenos lipídicos; e CD5, que diferencia subpopulações de linfócitos B. Em humanos são descritos altos níveis de CD24 (CD24^{hi}), uma molécula de adesão; CD27, molécula associada a células de memória por promover a manutenção a longo prazo; e, em 60% dos casos, apresentam também CD38, uma glicoproteína de membrana que promove adesão, sinalização via cálcio e transdução de sinal (48, 51-53, 56, 65, 66). Outros marcadores utilizados para definição de células B_{reg} são CD48^{hi}, receptor que participa da ativação e diferenciação das células quando ativadas e CD148^{hi}, que é um marcador de células B de memória (48). Também foi descrito a presença de níveis elevados de IgM (51). Baseado nisso, as células B10 em humanos assumem uma característica de células de memória, o que justifica uma resposta mais rápida frente a um estímulo quando comparadas às B10 de camundongo (48, 52, 56). Alguns estudos afirmam que em humanos existem duas diferentes subpopulações de células B_{reg} com capacidade supressora caracterizadas pela expressão de CD24^{hi}CD27⁺ e CD24^{hi}CD38^{hi} (48, 53, 57, 64, 65, 67). Porém,

estudos mais recentes têm demonstrado que as B10 não são restritas a uma única subpopulação (65).

A frequência de células B10 no sangue periférico de adultos saudáveis é baixa, descrita em torno de 0,7%, porém, quando somada à frequência de B10pro esse valor é de 4% (48). Pacientes com autoimunidade apresentam frequências de células B_{reg} comparáveis a controles saudáveis da mesma idade, entretanto, um aumento de até 20 vezes na frequência dessas células no contexto da autoimunidade é observado quando somadas as frequências de B10 e B10pro (48, 51). O mesmo aumento na frequência de B10+B10pro pode ser visto em quadros inflamatórios (48, 49).

As funções regulatórias das células B10 em doenças inflamatórias, câncer e autoimunidades estão bem caracterizadas em modelos animais (figura 2), porém em humanos poucos estudos foram realizados (50). Blair *et al.* (67) demonstraram células B_{reg} pouco funcionais em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em comparação a controles saudáveis. Por outro lado, alguns estudos clínicos demonstraram que a ausência de células B pode contribuir para um agravamento de doenças autoimunes mediadas por células T_{H1} corroborando o fato da existência das B_{reg} em humanos e sua importância no controle das doenças mediadas por células T (50, 68). Além de suas funções supressoras já descritas, as células B10 também são capazes de induzir a formação de células T_{reg} a partir de células T efectoras (62, 69) e sua ação se mostrou essencial para a produção de IL-10 pelas células T (62), o que sugere que as células B_{reg} alteram o balanço entre T_{reg} e T_{H17} (50, 51, 69).

As B10 têm se mostrado importantes na imunoregulação de infecções e autoimunidades e podem ter um papel significativo no prognóstico de doenças (48, 50), inclusive em imunodeficiências primárias.

Figura 2. Mecanismos de ação das células B_{reg} em respostas imunes. Os possíveis mecanismos pelos quais as células B_{reg} modulam as respostas imunes podem incluir: Células B_{reg} restauram o equilíbrio entre Th1/Th2 pela produção de IL-10; Células B_{reg} inibem a diferenciação de células Th1 e Th17, mas promovem a expansão de células T_{reg}. Estes efeitos são mediados não só através da liberação de fatores solúveis, tais como IL-10 e TGF- β , mas também através de contato célula a célula que envolve CD80, CD86 e FasL, etc. Interações entre B_{reg} e T_{effs} resultam na indução de apoptose (AC??), bem como a indução de ambas células T_{reg} Foxp3⁺ e células Tr1 produtoras de IL-10. Células B_{reg} podem diminuir a ativação de DC e macrófagos. Além disso, as células B_{reg} expressam CD1d que pode ativar as células iNKT com funções regulatórias. AC: células apoptóticas; B_{reg}: células B reguladoras; DC: células dendríticas; iNKT: célula *Natural Killer* T invariante; T_{eff}: células T efetoras; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; T_{reg}: células T reguladoras (50).

2 JUSTIFICATIVA

O fato de pacientes ICV frequentemente apresentarem diversas alterações em linfócitos B, número reduzido de células T_{reg} , e alta incidência de autoimunidade, bem como os pacientes com ICV apresentarem estado de ativação imune crônica, sugere que a frequência de células B10 possa estar diminuída nesses pacientes, uma vez que tais células desempenham importante papel no desenvolvimento de células T_{reg} , assim como no controle da ativação celular e autoimunidade. Entretanto, a presença de infecções bacterianas recorrentes e os altos níveis de CD14 circulantes em pacientes com ICV, associados ao papel do LPS como indutor da diferenciação das células B10, sugerem que a frequência de células B10 possa estar aumentada.

Portanto, esse estudo propõe uma análise da frequência de células B10 em pacientes ICV, acompanhados pelo Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP, assim como sua relação com as alterações clínicas e imunológicas previamente descritas nesses pacientes, a fim de promover um avanço no entendimento dessa doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a frequência de células B10 em pacientes ICV buscando correlacioná-la com as diferentes manifestações clínicas e imunológicas associadas à doença.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência das células B10 nos pacientes e controles saudáveis;
- Avaliar a frequência de células B10 em pacientes pré e pós tratamento com imunoglobulina humana;
- Avaliar a frequência de células B10 encontradas nos diferentes fenótipos clínicos dos pacientes ICV;
- Definir o perfil de ativação dos pacientes ICV, avaliando a ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ e os níveis de CD14 solúvel nos pacientes e controles saudáveis;
- Avaliar a frequência de células T_{reg} e T_{reg} CD39⁺ nos pacientes e controles saudáveis;
- Avaliar a produção de IL-10 das células B10 de pacientes e controles saudáveis;
- Correlacionar os achados desse estudo com a frequência das células B10 encontrada nos pacientes ICV.

4 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram convidados a participar do estudo 42 pacientes com diagnóstico de ICV, sendo 17 pacientes com autoimunidade, acompanhados no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP e 17 indivíduos saudáveis para compor o grupo controle. Os critérios diagnósticos de ICV utilizados estão de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), PAGID e ESID (2). Os critérios de inclusão foram pacientes com idade entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de ICV e com frequência de células B CD19⁺ acima de 1%. E os critérios de exclusão, pacientes com infecções graves agudas e/ou em tratamento de doenças malignas na ocasião da coleta e gravidez. O grupo controle é composto por voluntários saudáveis de idade pareada aos pacientes, sem histórico familiar de imunodeficiências ou autoimunidade e sem alterações de imunoglobulinas ou autoanticorpos específicos.

No decorrer do estudo, foram utilizadas amostras criopreservadas de 7 (sete) pacientes ICV antes e depois do início do tratamento com gamaglobulina para avaliação da frequência de células B10. As amostras foram cedidas por outro grupo de pesquisa do próprio LIM-60, supervisionadas pelo Prof. Dr. Esper Georges Kallás. Esses pacientes também são acompanhados pelo Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP, seguindo os mesmos critérios de inclusão e exclusão apresentados nesse estudo.

O projeto foi aprovado pela CAPPesq (Número do Parecer: 742.526) e todos os participantes do estudo foram esclarecidos quanto à natureza e finalidade do trabalho e convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta e processamento das amostras

Foram coletados 30 mL de sangue periférico em tubos heparinizados e 5 mL em tubo de EDTA dos pacientes ICV antes da infusão endovenosa mensal de gamaglobulina e de indivíduos saudáveis. As amostras em EDTA foram submetidas a um hemograma completo. Das amostras em heparina uma alíquota de 2 mL foi centrifugada e o plasma separado e congelado para posterior avaliação de sCD14. Adicionalmente, foram separadas alíquotas de 100 µL de sangue total periférico para realização de imunofenotipagem de células T. O restante do material foi submetido à separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP), por meio de centrifugação com Ficoll-Hypaque (GE, Healthcare). As CMSP foram avaliadas quanto a sua viabilidade e criopreservadas em uma concentração de 5×10^6 cel/mL, em galão de nitrogênio líquido, para posteriormente serem usadas nos testes de citometria de fluxo.

O processamento das amostras assim como os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Investigação Médica 60 (LIM-60), pertencente à Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP.

4.2.2 Avaliação da frequência de B10

A determinação das células B10 foi realizada em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) criopreservadas. Um teste entre células frescas e criopreservadas foi feito no início do estudo mostrando que não há diferenças entre ambas, portanto, escolhemos utilizar as CMSP criopreservadas. Após descongelamento, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 1% de tampão Hepes, piruvato de sódio, penicilina-streptomicina, L-glutamina e 0,1% de 2-mercaptoetanol e aliqüotadas em concentração de 1×10^6 cel/mL por poço, em placa de 96 poços de fundo “U”. Foram então incubadas com LPS (10 μ g/mL, *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich) ou CpG (ODN 2006, 10 μ g/mL), PMA (50 ng/mL) e ionomicina (1 μ g/mL) por 5h a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂; após 1 hora da estimulação foi acrescentada a brefeldina A (Golgi Plug, BD Bioscience (53, 65). Os últimos estímulos e a brefeldina A serão referidos como “PIB” até o final do estudo. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas com a solução tampão *MACS Buffer* (*Phosphate Buffer Saline*, 5mg/mL de SFB, 2mM EDTA) e marcadas com os anticorpos monoclonais de superfície anti-CD19, anti-CD24, anti-CD27, anti-CD38, anti-CD3, anti-CD14 e com o corante de viabilidade celular *Live/Dead* (Invitrogen) por 30 minutos, ao abrigo da luz. Para determinação da produção de IL-10 das células foi realizada uma marcação intracelular utilizando o kit Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience) e o anticorpo anti-IL-10 (Tabela 1). Após marcação foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 1%. A aquisição foi feita em FACS Canto[®] II e a análise no software FlowJo (Tree Star[®]).

Tabela 1: Pannel de anticorpos monoclonais para avaliação das células B10

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Marca
CD19	HIB19	APC	BD
CD24	ML5	PerCP-Cy 5.5	BD
CD27	M-T271	PE-Cy7	BD
CD38	HIT-2	FITC	BD
CD3	UCHT1	PE-CF594 (Texas Red)	BD
CD14	Tük4	PE-CF594 (Texas Red)	BD
IL-10	JES3-19F1	PE	BD
<i>Live/Dead</i>	-	PE-CF594 (Texas Red)	Invitrogen

4.2.3 Avaliação da ativação de células T

A ativação celular foi avaliada em CMSP em meio RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 1% de tampão Hepes, piruvato de sódio, penicilina-streptomicina, L-glutamina e 0,1% de 2-mercaptoetanol e aliqotadas em concentração de 1×10^6 cel/mL por poço, em placa de 96 poços de fundo “V”. As células foram incubadas com os anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-HLA-DR, anti-CD38, anti-CD69 e com o corante de viabilidade celular *Live/Dead* (Invitrogen) por 30 minutos ao abrigo da luz (Tabela 2). Posteriormente as células foram lavadas e fixadas com PFA 1%. A aquisição foi em um citômetro de fluxo FACS Canto[®] II e a análise no software FlowJo (Tree Star[®]).

Tabela 2: Pannel de anticorpos monoclonais para avaliação de ativação celular

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Marca
CD3	UCHL1	PE-CF594 (Texas Red)	BD
CD4	RPA-T4	APC-Cy7	BD
CD8	SK1	PerCP-Cy5.5	BD
CD69	FN50	PE	BD
CD38	HIT-2	FITC	BD
HLA-DR	G46-6	Alexa Fluor 700	BD
Live/Dead	-	Aqua	Invitrogen

4.2.4 Avaliação da frequência de células T_{reg}

A frequência das células T_{reg} foi avaliada em CMSP em meio RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 1% de tampão Hepes, piruvato de sódio, penicilina-estreptomicina, L-glutamina e 0,1% de 2-mercaptoetanol e aliquoteadas em concentração de 1×10^6 cel/mL por poço, em placa de 96 poços de fundo “V”. As células foram incubadas com os anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25, anti-CD127, anti-CD39 e com o corante de viabilidade celular *Live/Dead* (Invitrogen) por 30 minutos ao abrigo da luz. Posteriormente as células foram lavadas 2 vezes com *MACS Buffer*. Para determinação de FoxP3 foi realizada uma marcação intranuclear utilizando o Kit Human FoxP3 Buffer Set (BD Bioscience) e anti-FoxP3 (Tabela 3). Após marcação as células foram fixadas em PFA 1%. A aquisição foi feita em FACS Canto[®] II e a análise no software FlowJo (Tree Star[®]).

Tabela 3: Pannel de anticorpos monoclonais para avaliação das células T_{reg}

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Marca
CD3	UCHL1	PE-CF594 (Texas Red)	BD
CD4	RPA-T4	APC-Cy7	BD
CD8	SK1	PerCP-Cy5.5	BD
CD127	HIL-7R-M21	FITC	BD
CD25	M-A251	PE	BD
CD39	A1	PE-Cy7	Biolegend
FOXP3	259D/C7	Alexa Fluor 647	BD
Live/Dead	-	Aqua	Invitrogen

4.2.5 Estratégia de Análise dos Painéis de Citometria

As análises dos dados obtidos na citometria de fluxo foram feitas pelo software FlowJo (Tree Star®). Primeiramente é feita a compensação das amostras, determinada pela utilização de Comp-beads anti-IgG Mouse (BD Bioscience) marcadas para cada fluorescência. Após compensação utilizou-se o parâmetro “Time”, que permite retirar as variações do laser que possam ter ocorrido durante a aquisição. Nessa estratégia, coloca-se no eixo da ordenada o parâmetro PE, sendo o detector desse comprimento de onda o mais sensível, e no eixo da abscissa a opção Time e então, delimita-se a região mais contínua. Em seguida, foi realizada a estratégia dos “Singlets”, que permite separar apenas as células que passaram uma a uma em frente ao laser, eliminando células que passaram juntas, e que podem acarretar em dados errôneos. Para isso, coloca-se no eixo da ordenada o parâmetro *Forward Scatter-Height* (FSC-H) e na abscissa, *Forward Scatter-Area* (FSC-A) e, delimita-se a região em diagonal mais condensada com os eventos. Outro grupo delimitado após os parâmetros acima citados é o de células viáveis, com

a utilização do kit Live & Dead (Invitrogen), no qual as células mortas são coradas com o marcador. Todos os painéis de citometria apresentados nesse trabalho têm a presença desse marcador de viabilidade (Figura 3).

Figura 3. Estratégia “Time”, “Singlets”, “Viabilidade”. (A) As variações do laser são eliminadas com base no gráfico determinado pelos parâmetros “PE-A” e “Time”. (B) Células únicas são selecionadas com base no gráfico determinado pelos parâmetros “FSC-H” e “FSC-A”. (C) As células viáveis são delimitadas na posição negativa.

Para avaliação das células B10 o grupo de linfócitos foi separado por tamanho e granularidade (FSC-A X SSC-A) e para uma melhor purificação das células B foi realizado a exclusão de células CD3⁺ e CD14⁺ e células não viáveis, marcados com anticorpos monoclonais conjugados com o mesmo fluorocromo (SSC-A X CD3, CD14 e Live&Dead PE-CF594). Em seguida, o grupo CD19⁺ foi separado (SSC-A X CD19 APC) (Figura 4). A partir do grupo de células CD19⁺, dois subtipos de células B10 são avaliadas, as células CD24^{hi}CD27⁺ (CD27 PE-Cy7 X CD24 PerCP-Cy5.5) e as células CD24^{hi}CD38^{hi} (CD24 PerCP-Cy5.5 X CD38 FITC), e a presença de IL-10 é observada em ambos os subtipos (CD19 APC X IL-10 PE).

Figura 4. Estratégia de análise de células B10. (A) Exclusão de células $CD3^+CD14^+$ e não viáveis. (B) Separação de células $CD19^+$. (C) Separação de células $CD24^{hi}CD27^+$ (D) Produção de IL-10 nas células provenientes do grupo $CD24^{hi}CD27^+$. (E) Separação de células $CD24^{hi}CD38^{hi}$ (F) Produção de IL-10 nas células provenientes do grupo $CD24^{hi}CD38^{hi}$.

Para avaliação do perfil de ativação celular o grupo de linfócitos foi separado por tamanho e granularidade (FSC-A X SSC-A) e as células T foram determinadas pela presença de CD3 (SSC-A X CD3 PE-Texas Red). Em seguida foram separadas as populações de células $CD4^+$ e $CD8^+$ ($CD4$ APC-Cy7 X $CD8$ PerCP-Cy5.5) e dentro de cada subtipo foi analisada a presença de CD69 (SSC-A X CD69 PE), CD38 (SSC-A X CD38 FITC) e HLA-DR (SSC-A X

HLA-DR Alexa Fluor 700), no qual $CD69^+$ indica ativação recente e $CD38^+$ e $HLA-DR^+$ indicam ativação crônica. A partir desses dados foi realizada a análise booleana, da qual é permitido fazer todas as combinações possíveis dos marcadores utilizados, dentro das subpopulação de células $CD4^+$ e $CD8^+$ (Figura 5).

Figura 5. Estratégia de análise de Ativação Celular. (A) Seleção das células $TCD4^+$ e $TCD8^+$, a partir de um *gate* de células $CD3^+$. (B) Determinação da expressão de CD69, CD38 e HLA-DR a partir da população $TCD4^+$. (C) Determinação da expressão de CD69, CD38 e HLA-DR a partir da população $TCD8^+$.

Para avaliação das células T_{reg} o grupo de linfócitos foi separado por tamanho e granularidade (FSC-A X SSC-A) e as células T foram determinadas pela presença de CD3 (SSC-A X CD3 PE-Texas Red). Em seguida foi separada a população de células $CD25^{hi}CD4^{+}$ (CD25 PE X CD4 APC-Cy7) e, depois, as células $CD127^{lo}FoxP3^{+}$ (CD127 FITC X FOXP3 Alexa Fluor 645). Para determinar as células T_{reg} com perfil supressor foi avaliado dentro do grupo $FOXP3^{+}$ a presença de CD39 (SSC-A X CD39 PE-Cy7) (Figura 6).

Em todos os painéis, como parâmetro negativo para alguns marcadores foi utilizada a estratégia de análise baseada no *Fluorescence Minus One* (FMO), na qual o anticorpo monoclonal em questão é excluído da marcação sendo possível definir a população negativa para estes marcadores.

Figura 6. Estratégia de análise de células T_{reg} . (A) Seleção das células $CD3^{+}$. (B) Seleção das células $CD4^{+}$. (C) Seleção das células $CD4^{+}CD25^{high}$. (D) Seleção das células $CD127^{low}FoxP3^{+}$.

4.2.6 Determinação de sCD14 no plasma

A determinação de sCD14 foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit comercial *Quantikine® ELISA - Human sCD14 Immunoassay* (R&D Systems, cat. DC140). Os plasmas foram diluídos numa concentração de 1/200 em solução de diluição própria num volume total de 200µl e o teste realizado segundo instruções do fabricante, na qual as amostras são incubadas em placa sensibilizada com anticorpo anti-CD14 e, após sucessivas lavagens é acrescentado um anticorpo secundário conjugado à peroxidase. Após esse período de incubação o substrato é adicionado e em seguida um estabilizador de cor. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450nm. As amostras foram feitas em duplicatas e a média dos valores foi o valor final atribuído a elas.

4.2.7 Quantificação da produção de IL-10 por células B_{reg}

A quantificação da produção de IL-10 por células B foi realizada a partir do sobrenadante de cultura de células B CD19⁺ após cultura de 48h com CpG+PIB. As CMSP foram separadas do sangue total como descrito anteriormente e marcadas com os anticorpos monoclonais de superfície anti-CD19, anti-CD3, anti-CD14 e com o corante de viabilidade celular *Live/Dead* (Invitrogen) por 30 minutos, ao abrigo da luz. Em seguida, foram separadas as células B CD19⁺ por *sorting* em FACS Aria IIu (BD, Bioscience). As células B CD19⁺ foram colocadas em placa de 96 poços de fundo “U” na quantidade de $2,5 \times 10^5$ cel/poço e incubadas com CpG (ODN 2006, 10 µg/mL) e CD40L

(1 μ g/mL), por 48h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂; nas últimas 5 (cinco) horas de cultura foram acrescentados PMA (50 ng/mL) e ionomicina (1 μ g/mL) (48). Decorrido o tempo de cultura, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80°C. A dosagem de IL-10 no sobrenadante de cultura foi realizado por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit comercial *Quantikine*[®] *ELISA - Human IL-10 Immunoassay* (R&D Systems, cat. D1000B) e seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450nm.

4.3 Análise dos Resultados

Para as análises estatísticas foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos por meio do *software* GraphPad Prism 6[®]. A comparação entre os grupos foi feita utilizando o teste de *Mann-Whitney*. A comparação entre os grupos de pacientes com e sem autoimunidade e o grupo controle foi feita utilizando o teste *ordinary one-way ANOVA* e o teste de *Dunn's Multiple Comparision*. A avaliação do perfil de células estimuladas comparadas ao basal foi feita pelo teste de *Wilcoxon*. Para os testes de correlação foi utilizado o teste de *Spearman*. Foram considerados significantes os valores de P abaixo de 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Características dos Pacientes ICV e Controles

Foram selecionados neste estudo um total de 59 pacientes e controles, com amostras sanguíneas coletadas no período de janeiro de 2014 a setembro de 2015. O grupo de pacientes ICV é composto de 42 indivíduos no total, sendo 17 portadores de autoimunidade. O grupo controle é composto de 17 indivíduos saudáveis. Os dados demográficos, de idade, gênero e os dados laboratoriais de ambos os grupos de pacientes e do grupo controle se encontram na tabela 4 e 5.

Tabela 4: Características Demográficas dos Pacientes e Controles Saudáveis

	Controles Saudáveis	ICV
N	17	42
Gênero		
Masculino	7	21
Feminino	10	21
Idade (anos)	30,70 (23 – 46)	35,83 (23 – 58)

Tabela 5: Características Laboratoriais dos Pacientes e Controles Saudáveis

	Controles Saudáveis (N = 17)	ICV (N = 42)	
	Mediana		*p
Linfócitos (mil/mm³)	2,25 (1,36 – 3,34)	1,66 (0,29 – 3,24)	0,0128*
T CD3⁺ (mil/mm³)	1,70 (0,80 – 2,60)	1,30 (0,26 – 2,60)	0,0906
T CD4⁺ (mil/mm³)	0,90 (0,44 – 1,55)	0,55 (0,09 – 1,35)	0,0001*
T CD8⁺ (mil/mm³)	0,43 (0,18 – 0,82)	0,59 (0,14 – 1,51)	0,2741
Razão T CD4⁺ / T CD8⁺	1,80 (1,00 – 5,00)	0,59 (0,14 – 1,51)	0,0005*
B CD19⁺ (mil/mm³)	0,17 (0,09 – 0,41)	0,09 (0,01 – 0,61)	0,0657

*p = Mann-Whitney test.

Os valores absolutos referentes aos linfócitos totais e a imunofenotipagem destes foram obtidos pelo hemograma realizado no dia da coleta da amostra pelo Laboratório Central do HC-FMUSP e por marcação de citometria de fluxo, no qual os valores absolutos dos Linfócitos CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ foram calculados com base no valor da frequência desses marcadores na análise por citometria de fluxo e dos linfócitos totais apresentados no hemograma.

A análise estatística mostrou diferenças significativas no número de linfócitos totais entre os grupos, e os pacientes ICV apresentaram menor número de linfócitos totais em relação ao grupo controle. O número de linfócitos T CD4⁺ está significativamente diminuído em relação ao grupo de controle e, os linfócitos T CD8⁺ não apresentam diferença estatística entre os grupos. Outra relação observada é a razão entre linfócitos T CD4⁺/T CD8⁺, nesse caso a razão se encontra diminuída significativamente nos pacientes ICV em relação aos controles.

Os dados clínicos deste estudo referentes aos tipos de infecções recorrentes e doenças crônicas apresentadas, assim como os tipos de doenças autoimunes que acometem os grupos de pacientes ICV com autoimunidade estão relacionados na tabela 6. Os pacientes participantes deste estudo apresentam infecções diversas, e mais de um tipo em sua maior parte, das quais as infecções do trato respiratório são as mais prevalentes. Quanto às doenças autoimunes observadas em nosso grupo nota-se uma ampla variedade, sendo as autoimunidades gastrointestinais (pangastrite atrófica, anemia perniciosa e padrão celíaco) e as citopenias autoimunes (PTI e anemia hemolítica autoimune) as mais presentes entre os pacientes. Assim como as

infecções recorrentes, alguns pacientes apresentam mais de uma doença autoimune concomitantemente.

Tabela 6: Características Clínicas dos Pacientes com ICV

Infecções Recorrentes	N = 42
Pneumonia	34/42
Sinusite	23/42
Diarreia	15/42
Otite	3/42
IVAS	2/42
Amigdalite	1/42
Meningite	1/42
Sem Autoimunidade	25/42
Autoimunidade	17/42
Citopenias	
PTI	4/17
Anemia Hemolítica	1/17
Doenças Gastrointestinais	
Pangastrite Atrófica	6/17
Padrão Celíaco	3/17
Colite Ulcerativa	1/17
Doenças Endocrinológicas	
Hipotireoidismo	3/17
Diabetes Mellitus	1/17
Síndrome de Sjögren	1/17
Doenças de Pele	
Vitiligo	2/17
Vasculite	2/17
Psoríase	1/17

5.2 Avaliação dos estímulos utilizados para ativação das células B10

Em nosso estudo optamos pela cultura de 5h com CpG ou LPS, PMA e ionomicina para ativação das células B10 em CSMP total. Para comprovar a eficácia dos estímulos utilizados para ativação das células B10 tanto de

pacientes quanto de controles foram feitas análises comparando as condições não estimuladas (BFA) e estimuladas (GpG+PIB ou LPS+PIB) (Figura 7 e 8).

Figura 7. Ativação de células B10 após 5 horas de estímulo com CpG+PIB. Comparação entre a frequência de células (A, B) CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ e (C, B) CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ em CMSP nas condições basal (BFA) e estimulada com “CpG+PIB” de 17 controles saudáveis (HC) e 42 pacientes CVID. Os valores de *P* foram calculados pelo teste de *Wilcoxon*.

Figura 8. Ativação de células B10 após 5 horas de estímulo com LPS+PIB. Comparação entre a frequência de células (A, B) $CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10^{+}$ e (C, B) $CD24^{hi}CD27^{+}IL-10^{+}$ em CMSP nas condições basal (BFA) e estimulada com “LPS+PIB” de 17 controles saudáveis (HC) e 44 pacientes (CVID). Os valores de P foram calculados pelo teste de *Wilcoxon*.

5.3 Avaliação de células B10 de Pacientes e Controles

As células B10 foram identificadas a partir da produção de IL-10 de dois grupos celulares diferentes, $CD27^{+}CD24^{hi}$ e $CD24^{hi}CD38^{hi}$, seguindo os trabalhos mais importantes na caracterização dessas células (48, 53, 57, 65, 67, 70). Foram avaliados nesse parâmetro 42 pacientes e 17 controles e foram feitas comparações entre o total de pacientes e o grupo controle, bem como comparações entre os grupos ICV com e sem autoimunidade e entre as diferentes classificações da ICV de acordo com suas manifestações clínicas.

5.3.1 Pacientes ICV tem a frequência de células B10 diminuídas

Primeiramente analisamos a frequência das populações para se encontrar as células B produtoras de IL-10 ($CD24^{hi}CD27^{+}$ e $CD24^{hi}CD38^{hi}$) e nos pacientes ICV ambas se mostram significativamente diminuídas quando comparadas ao grupo controle (Figura 9).

Figura 9. Frequência de células $CD24^{hi}CD38^{hi}$ e $CD24^{hi}CD27^{+}$ em pacientes ICV e Controles. As subpopulações das células B foram determinadas pela expressão dos marcadores de superfície CD24, CD38 e CD27 e analisadas por citometria de fluxo. Os pontos no gráfico mostram a porcentagem das subpopulações de células B (A) $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ e (B) $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ no sangue periférico de 17 controles saudáveis (HC) e 42 pacientes ICV (CVID). As barras representam a mediana dos valores. Os valores de P foram calculados pelo teste de Mann-Whitney.

Posteriormente avaliamos a frequência das células $CD24^{hi}CD38^{hi}$ e $CD24^{hi}CD27^{+}$ produtoras de IL-10 em diferentes condições de cultura; apenas com BFA, CpG+PIB e LPS+PIB; por 5h. Em todas as condições de cultura a frequência de células $CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10^{+}$ estava significativamente diminuída nos pacientes ICV (Figura 10 A,B,C). A população $CD24^{hi}CD27^{+}IL-10^{+}$ estava

significativamente diminuída nos pacientes ICV apenas na condição com CpG+PIB (Figura 10E).

Figura 10. Frequência de células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} e CD24^{hi}CD27⁺ em pacientes ICV e Controles. A expressão intracelular de IL-10 e dos marcadores de superfície CD24, CD38 e CD27 foram determinadas por citometria de fluxo após cultura celular de PBMC por 5h em 3 condições (apenas BFA, CpG+PIB e LPS+PIB). Os pontos no gráfico mostram a porcentagem das subpopulações de células B10 (A) CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ e (B) CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ no sangue periférico de 17 controles saudáveis (HC) e 42 pacientes ICV (CVID). As barras representam a mediana dos valores. Os valores de P foram calculados pelo teste de Mann-Whitney.

Para melhor caracterizar a frequência de células B10 nos pacientes, fizemos as análises utilizando os valores absolutos de células, ao invés de somente a frequência, porém as diferenças se mantiveram as mesmas (Figura 11).

Figura 11. Número absoluto de células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} e CD24^{hi}CD27⁺ em pacientes ICV e Controles. A expressão intracelular de IL-10 e dos marcadores de superfície CD24, CD38 e CD27 foram determinadas por citometria de fluxo após cultura celular de PBMC por 5h em 3 condições (apenas BFA, CpG+PIB e LPS+PIB). Os pontos no gráfico mostram a porcentagem das subpopulações de células B10 (A) CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ e (B) CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ no sangue periférico de 17 controles saudáveis (HC) e 42 pacientes ICV (CVID). As barras representam a mediana dos valores. Os valores de *P* foram calculados pelo teste de Mann-Whitney.

Outra análise realizada foi estratificar as populações de células B CD19⁺ e também das populações CD24^{hi}CD38^{hi} e CD24^{hi}CD27⁺ em relação às suas diferentes frequências nos pacientes e avaliamos a frequência de células B10 nos diferentes grupos que se formaram, porém, não encontramos diferenças significativas entre os grupos (Figura 3-S - anexos).

5.3.2 O tratamento com imunoglobulina humana não interfere na frequência de células B10 de pacientes ICV

Também foi avaliada a frequência das células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} e CD24^{hi}CD27⁺ entre pacientes ICV antes do início do tratamento com

gamaglobulina mensal, para comparar possíveis alterações após o início do tratamento. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em nenhuma condição de cultura (Figura 12).

Figura 12. Frequência de células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} e CD24^{hi}CD27⁺ em pacientes ICV antes e após o início do tratamento com gamaglobulina. A expressão intracelular de IL-10 e dos marcadores de superfície CD24, CD38 e CD27 foram determinadas por citometria de fluxo após cultura celular de PBMC por 5h em 2 condições (apenas BFA e CpG+PIB). Os pontos no gráfico mostram a porcentagem das subpopulações de células B10 (A, B) CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ e (C, D) CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ no sangue periférico de 7 pacientes ICV antes (CVID-PRE) e depois (CVID-POST) do início do tratamento. As barras representam a mediana dos valores. Os valores de *P* foram calculados pelo teste de Mann-Whitney.

5.3.3 Frequência de células B10 de acordo com as manifestações clínicas da ICV

Para melhor caracterizar os pacientes ICV optamos por separá-los em grupos de acordo com seus fenótipos clínicos sugeridos por Chapel *et al.*, 2008 (3) e avaliar se a frequência de células B10 apresentava diferenças entre os subgrupos de pacientes ICV, mas não observamos diferenças significativas entre os grupos de pacientes, apesar de o grupo de pacientes ICV com citopenias apresentarem uma frequência mais baixa que os demais subgrupos clínicos nas B10 CD24^{hi}CD38^{hi} estimuladas com CpG + PIB (Figura 13A). Quanto à frequência das células B10 CD24^{hi}CD27⁺, a divisão em subgrupos clínicos não apresentou diferença significativa nem mesmo em relação aos controles saudáveis (Figura 13 C, D).

Figura 13. Frequência de células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} e CD24^{hi}CD27⁺ em subgrupos de pacientes ICV e Controles. A expressão intracelular de IL-10 e dos marcadores de superfície CD24, CD38 e CD27 foram determinadas por citometria de fluxo após cultura celular de PBMC por 5h em 3 condições (apenas BFA, CpG+PIB e LPS+PIB). Os pontos no gráfico mostram a porcentagem das subpopulações de células B10 (A, B) CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ e (C, D) CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ no sangue periférico de 17 controles saudáveis (HC), 10 pacientes ICV com enteropatias (CVID (Enteropathy)), 13 pacientes ICV com doença linfoproliferativa (CVID (Splenomegaly)), 6 pacientes ICV com citopenias (CVID (Cytopenias)) e 15 pacientes ICV que apresentam apenas infecções de repetição (CVID (Infections Only)). As barras representam a mediana dos valores. Os valores de P foram calculados pelo teste de Mann-Whitney.

5.3.4 Produção de IL-10 por células B de pacientes ICV e controles

Para melhor caracterizar as células B10 dos pacientes ICV, nós analisamos a produção de IL-10 por células B CD19⁺ após cultura de 48h com

CpG (10 $\mu\text{g/mL}$), CD40L (1 $\mu\text{g/mL}$) e PMA (50 ng/mL) e ionomicina (1 $\mu\text{g/mL}$) nas últimas 5h. A secreção de IL-10 por células B não apresentou diferença significativa entre os grupos de paciente e controles (figura 14).

Figura 14. Produção de IL-10 por células B de pacientes e controles. A produção de IL-10 foi determinada após cultura de células B CD19⁺ por 48h com CpG, CD40L e PMA e ionomicina nas últimas 5 horas. Os pontos no gráfico mostram a concentração de IL-10 em pg/mL de 6 pacientes ICV e 7 controles saudáveis. As barras representam o erro padrão da média dos valores. O valor de *P* foi calculado pelo teste de Mann-Whitney.

5.3.5 A frequência de células B10 é similar em pacientes ICV com e sem autoimunidade

Devido ao fato de pacientes ICV terem alta incidência de autoimunidades, decidimos avaliar separadamente pacientes ICV com e sem autoimunidades (CVID-AI e CVID-NAI, respectivamente). No entanto, não observamos diferenças significativas entre os grupos (Figura 15 A, C). Porém, quando separamos o grupo de autoimunidades em subgrupos de acordo com suas características fenotípicas em comum (citadas na tabela 6), observamos uma diminuição na frequência de células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} nos pacientes ICV

com citopenias autoimunes em relação aos demais grupos de pacientes ICV-AI, sendo a diferença significativa quando se compara ao subgrupo de doenças gastrointestinais ($p = 0,0075$) e doenças de pele ($p = 0,0366$) (Figura 15 B, D). As B10 estimuladas com LPS + PIB não apresentaram diferenças significativas entre nenhum grupo. Esses dados sugerem que a frequência de células B10 pode estar alterada em pacientes ICV com autoimunidades e isso varia de acordo com o tipo de manifestação autoimune presente.

Figura 15. Frequência de células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} e CD24^{hi}CD27⁺ em controles, pacientes CVID-AI e CVID-NAI. A expressão intracelular de IL-10 e dos marcadores de superfície CD24, CD38 e CD27 determinadas por citometria de fluxo após cultura celular de CMSP por 5h com CpG+PIB. Os pontos no gráfico mostram a porcentagem das células B10 (A, B) CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} e (C, D) CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ no sangue periférico de 17 controles saudáveis (HC), 25 pacientes ICV sem autoimunidade (CVID-NAI) e 17 pacientes ICV com autoimunidade (CVID-AI). As barras representam a mediana dos valores. Os valores de P foram calculados pelo teste de Mann-Whitney.

5.3.6 Ativação crônica de células T e níveis de sCD14 não se correlacionam com a frequência de células B10 no pacientes ICV

Estudos demonstram que pacientes ICV apresentam alta frequência de células T ativadas e níveis elevados de sCD14 no plasma (35). Portanto,

avaliamos se esses parâmetros se correlacionavam à frequência de células B10. Analisamos a frequência de células T $CD4^+CD38^+HLA-DR^+$ e $CD8^+CD38^+HLA-DR^+$ por citometria de fluxo e a concentração de sCD14 no plasma por ELISA e correlacionamos com a frequência de ambas as populações de B10. Como esperado, encontramos a frequência de ativação de células T bastante elevada, assim como maiores níveis de sCD14 nos pacientes ICV (Figura 16 A e B), contudo, nenhuma correlação foi encontrada entre ativação celular crônica e sCD14 (Figura 16C). Avaliamos então esses parâmetros de ativação crônica e a frequência de células B10 $CD24^{hi}CD38^{hi}$ e $CD24^{hi}CD27^+$ e também não encontramos correlação (Figura 17).

Figura 16. Perfil de ativação crônica em pacientes ICV. A ativação crônica de células T foi avaliada em CMSP de 17 controles saudáveis e 41 pacientes ICV pela expressão dos marcadores de superfície CD4, CD8, CD38 e HLA-DR sem estimulação em cultura celular e analisado por citometria de fluxo. Os níveis de sCD14 foram determinados por ELISA no plasma de 17 controles saudáveis e 44 pacientes ICV. Os pontos no gráfico mostram a porcentagem de **(A)** ativação crônica de células T CD4⁺CD38⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺ e **(B)** níveis plasmáticos de sCD14. **(C)** Correlação entre sCD14 e as frequências de células T CD4⁺ e T CD8⁺ ativadas em pacientes ICV. As barras representam a mediana dos valores. Os valores de P foram calculados pelo teste de Mann-Whitney. As linhas representam a análise de regressão linear. Os valores de R e P foram calculados pelo teste de correlação de *Spearman*.

Figura 17. Análise de correlação entre ativação crônica e células B10. A expressão intracelular de IL-10 e dos marcadores de superfície CD24, CD38 e CD27 foram determinadas por citometria de fluxo após cultura celular de CMSP por 5h em 3 condições (apenas BFA, CpG+PIB e LPS+PIB). A ativação crônica de células T foi avaliada em CMSP pela expressão dos marcadores de superfície CD4, CD8, CD38 e HLA-DR, sem estimulação em cultura celular e analisada por citometria de fluxo. Os níveis de sCD14 foram determinados por ELISA. Correlação entre células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} e células (A) T CD4⁺ e (B) T CD8⁺ e (C) sCD14 em 41 pacientes ICV e, correlação entre células B10 CD24^{hi}CD27⁺ e células (D) T CD4⁺ e (E) T CD8⁺ e (F) sCD14 em 41 pacientes ICV. As linhas representam análise de regressão linear. Os valores de R e P foram calculados pelo teste de correlação de *Spearman*.

5.3.7 A frequência de células B10 não se correlaciona com a frequência de T_{reg} em pacientes ICV

Pacientes ICV apresentam baixa frequência de células T_{reg}. Avaliamos a frequência de células T_{reg} de nossos pacientes por citometria de fluxo, bem como a frequência de células T_{reg} CD39⁺. Como esperado, a frequência de células T_{reg} se encontra significativamente diminuída nos pacientes ICV quando comparado ao grupo controle (Figura 18A). A frequência de células T_{reg} CD39⁺ também está diminuída nos pacientes (Figura 18B) e não encontramos

diferenças entre os grupos de pacientes ICV com e sem autoimunidade. Também não encontramos nenhuma correlação entre células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} B10 e T_{reg} CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ ou T_{reg} CD39⁺ (Figura 18 C e D), assim como com as células B10 CD24^{hi}CD27⁺ (Figura 18 E e F).

Figura 19. Frequência de células T_{reg} e T_{reg} CD39⁺ em pacientes ICV e Correlação entre células B10 e T_{reg} e T_{reg} CD39⁺. A expressão do marcador intracelular FOXP3 e dos marcadores de superfície CD4, CD25 e CD39 foram determinados por citometria de fluxo no sangue periférico de 17 controles saudáveis (HC) e 42 pacientes ICV (CVID). A expressão intracelular de IL-10 e dos marcadores de superfície CD24, CD38 e CD27 foram determinadas por citometria de fluxo após cultura celular de CMSP por 5h com CpG+PIB. Os pontos no gráfico mostram (A) células T_{reg} e (B) células T_{reg} CD39⁺. As barras representam a média dos valores. Os valores de *P* foram calculados pelo teste de Mann-Whitney. Correlação entre (C) B10 CD24^{hi}CD38^{hi}, (D) B10 CD24^{hi}CD27⁺ e células T_{reg}. Correlação entre (E) B10 CD24^{hi}CD38^{hi}, (F) B10 CD24^{hi}CD27⁺ e células T_{reg} CD39⁺. As linhas representam análise de regressão linear. Os valores de *R* e *P* foram calculados pelo teste de correlação de *Spearman*.

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi avaliada a frequência de células B10 em 42 pacientes com diagnóstico de ICV e 17 controles saudáveis, a frequência dessas células nos diferentes fenótipos clínicos da ICV e suas possíveis correlações com o perfil de ativação celular e frequência de T_{reg}.

As células B10, como apresentadas anteriormente, foram recentemente descritas em humanos e, portanto, sua caracterização fenotípica ainda não é bem definida. Algumas populações precursoras dessas células já foram propostas e as mais estudadas até o momento são as células CD24^{hi}CD27⁺, subgrupo das células B de memória (48, 64, 71, 72) e as células CD24^{hi}CD38^{hi}, subgrupo das células B transicionais (67, 73-77). Segundo Daien *et al.* (65) as células B10 não são restritas a uma única subpopulação da linhagem de células B, apesar de terem demonstrado em seu trabalho que as células B10 provenientes de células CD24^{hi}CD27⁺ produziram maior quantidade de IL-10 que as demais subpopulações estudadas. Contudo esse fato não foi visto em nosso estudo onde, aparentemente, as células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} tem uma frequência ligeiramente maior que as B10 CD24^{hi}CD27⁺.

O desenvolvimento das células B10 em humanos é dependente da estimulação das células B com agonistas de TLR, especialmente LPS e CpG, ligantes de TLR-4 e TLR-9, respectivamente (46, 48, 49, 51, 52, 57). Para a obtenção de células B10 optamos por uma cultura curta (5h) com os dois principais tipos de agonistas de TLR separadamente. A cultura longa, recomendada pelos estudos de Iwata *et al.* 2011 (48) e Blair *et al.* 2008 (67), a

princípio foi descartada para a caracterização dessas células já que alguns testes preliminares mostraram que após 48h de cultura a expressão de CD27 e CD24 diminui significativamente não sendo possível separar o grupo precursor das B10 na análise por citometria de fluxo (Figura 1S, Anexos). Nesses casos, os estudos citados optaram por fazer *sorting* das subpopulações e posteriormente estimulá-las em cultura por 24, 48, 72 e até 96h. No entanto, a cultura de 5h com agonistas de TLR também foi descrita e utilizada como forma de caracterização por citometria de fluxo da produção de IL-10 pelas células B em vários estudos (48, 53, 65). Conhecendo a baixa expressão de CD27 pelos pacientes ICV (1, 15), consideramos o *sorting* das populações CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} e CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ para posterior cultura longa inviável, dessa maneira, a cultura de 5h foi o método escolhido.

A escolha dos agonistas de TLR, CpG e LPS, foi também baseada na literatura, que afirma que o CpG, agonista de TLR-9, é o estímulo mais eficaz para a produção de IL-10 nas células B (48, 53, 65). Mesmo assim, o LPS também se mostrou eficaz no estudo de Iwata *et al.* (48) e, como apresentado na revisão do trabalho, o estado de ativação crônica das células T que ocorre na ICV está relacionado a níveis elevados de CD14 solúvel, molécula frequentemente utilizada como indicador de presença de LPS no plasma (35, 36), achamos interessante observar a produção de IL-10 das células B na presença de LPS.

Em nosso estudo mostramos que ambas as populações precursoras das células B reguladoras, CD24^{hi}CD38^{hi} e CD24^{hi}CD27⁺, estão diminuídas nos pacientes ICV. Na realidade, esses indivíduos são conhecidos por apresentarem defeitos funcionais de células B como hipogamaglobulinemia e

produção de anticorpos específicos comprometida, apesar de apresentarem um número normal ou próximo ao normal de células B CD19⁺ (15). Pacientes ICV apresentam número diminuído de células B *naïve*, assim como células B de memória comutadas (CD19⁺CD27⁺IgM⁻IgD⁻) e expansão das células B CD21^{low} sendo esses os defeitos mais comuns dentre essa população de células desses pacientes (14, 15, 78). Nossos dados sugerem que os pacientes ICV apresentam um comprometimento da população B reguladora, descrita como a maior fonte produtora de IL-10 em humanos, devido às frequências reduzidas das subpopulações de B precursoras das B10 (53, 65, 67, 76).

Em seguida, avaliamos a produção de IL-10 nessas subpopulações e observamos que os pacientes ICV apresentam a frequência de células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} diminuída nas diferentes condições de cultura celular e as células B10 CD24^{hi}CD27⁺ diminuída na condição de estimulação com CpG+PIB, quando comparados ao grupo controle. De fato, um trabalho recente de Vlkova *et al.*, 2015 (79) descreveram que pacientes ICV apresentam diminuição de células B10 CD24^{hi}CD38^{hi}, corroborando com nossos dados.

Também buscamos avaliar se pacientes em tratamento mensal com imunoglobulina humana apresentavam diferenças nas populações de B10 em relação à quando ainda não haviam iniciado o tratamento. Alguns estudos mostram que o tratamento com imunoglobulina intravenosa pode causar diversos efeitos no sistema imune dos pacientes, dentre eles, a diminuição do estado de ativação crônica é o mais importante, especialmente a redução de ativação de células dendríticas, iNKT e células T (32, 80). Em relação às células B, a imunoglobulina intravenosa pode induzir a proliferação e produção de anticorpos, no entanto, inibem a produção de citocinas inflamatórias, como

IL-6 (80, 81). Conhecendo as alterações que a reposição de gamaglobulina intravenosa pode levar, avaliamos se ela poderia causar alguma interferência em relação à frequência de células B10. Porém, não observamos diferenças entre os pacientes antes e depois do início da terapia intravenosa, o que indica que a reposição de gamaglobulina não interfere no perfil dessas células nos pacientes ICV.

Muitos estudos demonstram que a estimulação por CpG+PIB é a mais eficaz para a ativação de células B10 (48, 53, 65). No entanto, o LPS também foi caracterizado como um ativador efetivo das células B10 em humanos, mesmo como estímulo de células B isoladas (48, 57, 71). Em nosso trabalho, a estimulação por CpG+PIB foi a única que apresentou diferença significativa entre ambas populações de B10 dos pacientes e dos controles, porém, as diferentes condições de cultura utilizadas não nos permitiram avaliar qual dos dois agonistas de TLR é o mais eficaz em estimular a produção de IL-10 pelas células B. Isso pode ocorrer devido ao fato de termos optado pela cultura de 5h, não sendo possível notar num prazo maior diferenças que poderiam ser significativas (48). Entretanto, podemos observar que ambos os estímulos foram eficientes quando comparados à condição sem estímulo.

Ao analisarmos os valores de frequência de células B10 encontramos uma frequência elevada em todos os grupos, em ambas as subpopulações e em todas as condições de cultura, quando comparada a outros trabalhos. Em nossas análises, encontramos uma média de frequência de células CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ em controles saudáveis na condição basal de 2,51% (0,98 – 4,70), na condição “CpG+PIB” de 4,63% (2,63 – 6,67) e na condição “LPS+PIB” de 4,28% (2,06 – 6,76). E a frequência de células CD24^{hi}CD38^{hi}IL-

IL-10⁺, na condição basal de 3,90% (2,25 – 6,27), na condição “CpG+PIB” de 6,00% (4,05 – 8,35) e na condição “LPS+PIB” de 6,28% (4,03 – 9,55). Iwata *et.al.* 2011 (48) demonstraram em seu estudo que nas culturas de 5h havia uma frequência de 0,1% de células B10 na condição basal, 1,4% na condição estimulada com LPS+PIB e 1,7% na condição estimulada com CpG+PIB. Já Bouaziz *et al.* 2010 (53) revelaram uma frequência de 1,8% na condição estimulada com CpG+PIB em cultura de 5h e Daien *et al.* 2014 (65) descreveram que na condição estimulada com CpG+PIB por 5h apenas 0,11% de células IL-10⁺, enquanto na cultura de 24 e 48h encontraram uma frequência de aproximadamente 5%. Essas diferenças em parte podem ser explicadas porque os dados apresentados nos trabalhos citados são da frequência de células CD19⁺IL-10⁺ totais, sem diferenciar por subpopulações. Em nosso trabalho utilizamos a condição basal como parâmetro para estipular o *gate* de IL-10⁺ nas outras condições de cultura. Optamos por não descontar a condição basal das condições estimuladas porque estamos buscando a frequência total dessas células na periferia sanguínea e a estimulação é apenas um meio de observarmos a máxima frequência dessas células num indivíduo. Outros trabalhos também optam por demonstrar os dados dessa maneira (48, 65).

Apesar de os pacientes apresentarem baixas frequências de células B10, a produção de IL-10 por células B CD19⁺ totais de pacientes e controles não apresentou uma diferença significativa entre os grupos ($p = 0,1445$), no entanto a média de produção de IL-10 dos pacientes ICV (659,493 pg/mL) é menor do que a média dos controles saudáveis (1926,55 pg/mL), o que sugere que pode haver uma deficiência na produção dessa citocina pelos pacientes.

Entretanto, devido à grande variação na produção de IL-10 pelos controles e o número reduzido de amostras, esse dado não apresentou uma diferença estatística. Iwata *et al.*, 2011 (48) demonstraram uma produção de IL-10 por células B CD19⁺ de indivíduos saudáveis em torno de 500 pg/mL após o mesmo método de separação e estimulação das células B, porém, em nosso estudo encontramos uma média maior nesses indivíduos, mais comparável ao estudo de Bouaziz *et al.*, 2010 (53) que demonstra uma média semelhante em indivíduos saudáveis, porém com estímulo de CpG e anti-Ig por 48h. Frente a esses achados acreditamos que um número maior de pacientes e controles são necessários para melhor avaliar esse parâmetro. Além do mais, encontramos algumas limitações nessa metodologia, especialmente devido à linfopenia crônica apresentada pelos pacientes ICV, dificultando a obtenção de células desejadas pelo método do *sorting* por citometria de fluxo.

Outro fator a ser considerado são os defeitos de sinalização por TLR-9 em células apresentadoras de antígenos, como as células B, encontradas em pacientes ICV. Os estudos descrevem uma capacidade diminuída de proliferação e produção de imunoglobulinas frente ao estímulo de CpG-ODN (82-84). No entanto, Clemente *et al.* 2011 (82) observaram que a estimulação de células B isoladamente não apresentou diferença significativa na diferenciação dessas células em plasmócitos quando comparados à indivíduos saudáveis, sendo apenas a produção de imunoglobulinas deficiente. É interessante notar que a deficiência de sinalização de TLR-9 esta restrita a estimulação de células B isoladas, pois a estimulação de CMSP de pacientes ICV por CpG-ODN não apresenta diferenças comparada à controles saudáveis (84, 85), o que sugere que a capacidade de ativação por agonistas de TLR-9, e

por outras vias de sinalização de TLR, esta mantida. Esse efeito pode estar relacionado à presença de IFN- α produzido principalmente pelas células dendríticas plasmocitóides induzido na presença de CpG, que restaura a capacidade de sinalização de TLR-9, e de outros TLR, nas células B de pacientes ICV (85, 86).

A falha de células B10 de pacientes ICV em suprimir a produção de IFN- γ e TNF- α em células TCD4⁺, demonstrado por Vlkova *et al.*, 2015 (79), também corrobora com o fato de que a produção de IL-10 possa ser deficiente nos pacientes, impedindo a ação reguladora das células B10, já que o efeito supressor das células B está diretamente relacionada à ação reguladora da IL-10 (67, 87). E, portanto, além da frequência diminuída, podemos sugerir que as células B10 de pacientes ICV tem um comprometimento em sua função.

Nesse trabalho, buscamos também correlacionar a frequência das células B10 com parâmetros clínicos e imunológicos dos pacientes ICV, a presença de autoimunidade, perfil de ativação celular e células T reguladoras.

Estudos recentes indicam que as células B10 estão alteradas em frequência e função em várias doenças autoimunes como artrite reumatóide (65), doença de Graves (64), trombocitopenia autoimune (88) e lúpus eritematoso sistêmico (67). Além disso, já é descrito na literatura que de 20-50% dos pacientes ICV desenvolvem autoimunidades (1, 11). Portanto, investigamos como a presença de autoimunidade poderia alterar a frequência de células B10 em pacientes ICV e não encontramos diferenças entre os pacientes ICV com e sem autoimunidade. No entanto, quando subdividimos as autoimunidades em grupos mais homogêneos, observamos uma frequência reduzida de células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} em pacientes ICV com PTI em relação

aos demais subgrupos como doenças gastrointestinais e doenças de pele, sendo que esses dois últimos não apresentam diferença significativa em relação aos controles saudáveis. Esses dados sugerem que a frequência de B10 pode ter diferentes impactos de acordo com a manifestação autoimune apresentada pelos pacientes ICV. É interessante notar que Li *et al.*, 2012 (88) já haviam demonstrado que pacientes com PTI apresentam uma redução de células B10 CD24^{hi}CD38^{hi}, indicando que as células B10 desempenham um papel nas citopenias independente do distúrbio da ICV. Entretanto, como não observarmos diferenças entre os pacientes ICV sem autoimunidade e pacientes ICV com autoimunidade, independente da manifestação autoimune apresentada, acreditamos que as disfunções imunes associadas à ICV e a heterogeneidade das manifestações autoimunes podem mascarar as possíveis alterações de células B reguladoras já observadas em pacientes com doenças autoimunes. Outro fator relevante da presença de autoimunidades nesse grupo de pacientes é que as manifestações autoimunes presentes podem apresentar mecanismos fisiopatológicos ainda desconhecidos, dificultando compreender a atuação das células B10 nesses casos.

Como demonstrado neste estudo, a frequência de ativação crônica de células T e os níveis plasmáticos de sCD14 nos pacientes ICV são bastante elevados quando comparados aos controles saudáveis e similares em magnitude aos apresentados na literatura (1, 35). No entanto, nós não encontramos nenhuma correlação entre esses parâmetros e a frequência de células B10 nos pacientes ICV, o que sugere que as disfunções nas células B reguladoras desses indivíduos podem apresentar outras causas ou consequências além da ativação crônica do sistema imune. Porém, uma

correlação positiva entre a ativação crônica de células T e células B_{reg} foi encontrada em pacientes HIV (76). Consideramos que as particularidades imunológicas de cada condição possam ter contribuído para os resultados distintos. Até o momento, não encontramos na literatura nenhum outro estudo que avalie esse tipo de correlação com células B10.

Outro parâmetro relevante analisado foi a frequência de células T_{reg} e sua correlação com as células B10 nos nossos pacientes ICV. Alguns trabalhos na literatura já descrevem que as células T_{reg} (CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺) encontram-se diminuídas nesses indivíduos (28-30). Nosso estudo também corrobora com esse fato. Observamos que a frequência de células CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ T_{reg} apresenta uma redução significativa quando comparada à de indivíduos saudáveis. E somos o primeiro trabalho a demonstrar que também há uma redução de T_{reg} expressando o marcador CD39 nos pacientes ICV. Apesar das células T_{reg} CD39⁺ serem conhecidas por seu envolvimento no controle de doenças autoimunes inflamatórias (89), nós não encontramos diferenças na frequência dessa população entre pacientes ICV portadores ou não de autoimunidades.

Devido ao fato das células B10 serem importantes para a indução de células iT_{reg} (50, 51), nós avaliamos como esses parâmetros poderiam se correlacionar nos pacientes ICV e, apesar de termos observado a redução na frequência de ambos subtipos celulares nos pacientes, não encontramos nenhuma correlação significativa entre eles. E também não observamos nenhuma correlação entre as células T_{reg} CD39⁺ e B10 nesses indivíduos. Assim como no caso da ausência de correlação entre as células B10 e os parâmetros de ativação celular, acreditamos que as diversas disfunções

imunológicas apresentadas pelos pacientes ICV, tanto nas populações de células T e B, possam ser responsáveis por esse resultado.

Apresentamos nesse trabalho uma descrição do perfil de células B10 na ICV. Conseguimos caracterizar as células B10 nos pacientes ICV com os principais parâmetros da literatura relacionados a elas. Este estudo sugere que os pacientes portadores de ICV tem um comprometimento nas células B reguladoras o qual não se correlaciona com características clínicas e imunológicas presentes nesses indivíduos. Acreditamos que nossos achados podem oferecer informações importantes para melhor entendimento das disfunções imunes relacionadas à ICV. Outras análises serão necessárias para melhor compreender o papel dessas células na ICV e as disfunções imunológicas que elas possam estar envolvidas.

7 CONCLUSÕES

- Os pacientes ICV apresentaram uma frequência diminuída de células B10 em relação aos controles saudáveis;
- A frequência de células B10 em pacientes pré e pós-tratamento com gamaglobulina não apresenta diferença significativa;
- Não foram encontradas diferenças entre as frequências de células B10 nos diferentes fenótipos clínicos dos pacientes ICV. Nem mesmo quando separamos os pacientes que apresentam autoimunidade em relação aos que não apresentam manifestações autoimunes. No entanto, dentro do grupo de pacientes ICV com autoimunidade, os pacientes que apresentavam citopenias autoimunes mostraram uma menor frequência de células B10 em relação aos pacientes com outras manifestações autoimunes;
- O perfil de ativação celular dos pacientes ICV se mostrou significativamente elevado em relação aos controles saudáveis quando avaliados os níveis de CD14 solúvel e a ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺;
- A frequência de células T_{reg} e T_{reg} CD39⁺ é significativamente diminuída nos pacientes ICV quando comparados aos controles saudáveis;

- A produção de IL-10 pelas células B de pacientes tem média bem menor que a média de produção dos controles saudáveis, o que pode indicar uma deficiência de funcionalidade de suas células B10, contudo, devido a grande variação da produção de IL-10 pelos controles e o número reduzido de amostras, esse dado não apresentou uma diferença estatística;
- Apesar de os pacientes ICV apresentarem um comprometimento em suas células B reguladoras esse defeito não se correlaciona com as características clínicas e imunológicas presentes nesses indivíduos. Devido à heterogeneidade da ICV e de suas inúmeras alterações imunológicas, a falta de correlação entre os fatores imunológicos, como ativação celular e frequência de células T_{reg} , podem apresentar outras causas ou consequências que não a frequência de células B10, ou até mesmo mascarar as relações diretas entre esses parâmetros.

8 ANEXOS

Anexo 1: Figuras Suplementares

Figura 1-S: População de células CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺. Demonstração da população CD24^{hi}CD27⁺ em cultura por 48h sem estímulo ou com estímulo de CpG+PIB.

Figure 2-S. Estratégia de análise para identificação de células B10 em pacientes ICV e controles. A expressão intracelular de IL-10 e os marcadores de superfície CD24, CD38 e CD27 foram determinados por citometria de fluxo após estimulação *in vitro* de CMSP por 5h em 3 condições: apenas BFA; CpG + PIB e LPS + PIB. **(A)** B10 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} e **(B)** B10 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺. HC: controle saudável; CVID: ICV

Figure 3-S. Frequência de células B10 CD24^{hi}CD38^{hi} e CD24^{hi}CD27⁺ em pacientes ICV e Controles de acordo com a frequência de células B CD19⁺, CD24^{hi}CD38^{hi} e CD24^{hi}CD27⁺. A expressão intracelular de IL-10 e dos marcadores de superfície CD24, CD38 e CD27 foram determinadas por citometria de fluxo após cultura celular de PBMC por 5h com CpG+PIB. Os pontos no gráfico mostram a porcentagem das subpopulações de células B10 no sangue periférico de 17 controles saudáveis (HC) e 42 pacientes ICV (CVID). As barras representam a mediana dos valores. Os valores de *P* foram calculados pelo teste de Mann-Whitney.

Anexo 2: Tabelas Complementares

Tabela 1-S: Características Clínicas dos pacientes ICV.

IDENTIFICAÇÃO	Data de Nascimento	Ano do Diagnóstico	Manifestações Clínicas	Autoimunidades
P1ICV	14/09/1984	2001	Sinusite	NA
P2ICV	24/04/1987	1999	Pneumonia, Sinusite, Otite	NA
P3ICV	22/01/1974	2000	Broncopneumonia	NA
P6ICV	30/08/1957	2009	Pneumonia	NA
P7ICV	08/04/1982	***	Broncopneumonias, Sinusite, Esplenomegalia	NA
P8ICV	18/10/1966	2000	Broncopneumonia, Diarréia	NA
P9ICV	26/01/1984	2004	Pneumonia, Sinusite, Diarréia (não inflamatória)	NA
P10ICV	07/03/1974	2008	IVAS, Pneumonia, Diarréia (não inflamatória)	NA
P11ICV	21/02/1978	2004	Pneumonia, Sinusite e Diarréia (não inflamatória)	NA
P12ICV	04/11/1980	2007	Pneumonia, Sinusite	NA
P13ICV	19/05/1982	2010	Pneumonia, Sinusite, Esplenomegalia	NA
P14ICV	27/06/1988	1998	Pneumonia, Sinusite, Diarréia (não inflamatória)	NA
P15ICV	11/08/1989	2008	Broncopneumonia, Sinusite, Osteomielite, Esplenomegalia	NA
P16ICV	15/04/1958	2008	Pneumonia, Sinusite	NA
P18ICV	11/07/1971	2004	Broncopneumonia, Sinusite, Doença linfoproliferativa	NA
P19ICV	07/12/1969	2010	Broncopneumonia, Sinusite, Diarréia, Esplenomegalia	NA
P21ICV	17/12/1975	2001	Pneumonia, Sinusite, Diarréia, Meningite	NA
P22ICV	08/01/1974	1998	Pneumonia, Diarréia (não inflamatória), Esplenomegalia	NA
P23ICV	21/01/1977	2005	IVAS, Granulomatose, Esplenomegalia	NA

P24ICV	23/05/1967	2000	Pneumonia, Sinusite, Diarréia (não inflamatória)	NA
P26ICV	14/02/1974	2011	Pneumonia, Sinusite	NA
P27ICV	01/04/1971	***	Broncopneumonia, Sinusite, Diarréia	NA
P28ICV	03/04/1988	1996	Diarréia (não inflamatória)	NA
P29ICV	16/03/1980	2003	Broncopneumonias, Diarréias (não inflamatória)	NA
P31ICV	25/08/1988	2007	Pneumonia, Sinusite, Diarréia (não inflamatória)	NA
P1ICVAI	20/01/1969	2007	***	Pangastrite Atrófica, Anemia Megaloblástica, Hipotireoidismo
P2ICVAI	12/04/1969	2008	Broncopneumonia, Esplenomegalia	PTI
P3ICVAI	07/06/1982	2009	Pneumonia, Diarréia, Otite, Amigadalite, Esplenomegalia	Padrão Celíaco
P4ICVAI	05/04/1987	2010	Pneumonia, Esplenomegalia	DM, Pangastrite Atrófica, Hipotireoidismo
P5ICVAI	02/07/1986	2006	Pneumonias	Pangastrite Atrófica, Anemia Megaloblástica
P6ICVAI	16/05/1955	2002	Broncopneumonia, Sinusite	Vitiligo
P7ICVAI	27/11/1981	2004	Broncopneumonia, Diarréia	Pangastrite Atrófica, RU, Anemia Megaloblástica
P8ICVAI	20/01/1964	2000	Pneumonias	Pangastrite Atrófica, Anemia Hemolítica, SS
P9ICVAI	17/09/1990	2011	Sinusite	Vasculite
P10ICVAI	17/08/1977	2005	Broncopneumonia, Sinusite, Otite, Diarréia	Padrão celíaco
P11ICVAI	13/12/1977	2003	Sinusite, Amigdalites, Esplenomegalia	PTI, Psoríase
P13ICVAI	04/06/1981	2010	Pneumonias	Pangastrite Atrófica, Anemia Megaloblástica
P14ICVAI	02/07/1985	2012	Pneumonia, Sinusite, Esplenomegalia	Vitiligo
P15ICVAI	30/05/1983	2011	Diarréia	PTI
P17ICVAI	25/06/1973	***	Broncopneumonia, Diarréia	Pangastrite Atrófica, Anemia Megaloblástica
P18ICVAI	09/10/1990	2009	Pneumonia, Sinusite, Diarréia	Urticária Vasculite
P19ICVAI	03/05/1986	2007	Sinusite	PTI, Psoríase

DM: Diabetes Mellitus tipo I; **PTI:** Púrpura Trombocitopênica Idiopática; **RU:** Retocolite Ulcerativa; **SS:** Síndrome de Sjogren. **NA:** Não apresenta. *** Ausência o dado.

Tabela 2-S: Valor absoluto e frequência de linfócitos em pacientes ICV.

IDENTIFICAÇÃO	Linfócitos Totais mil/mm ³ / (%)	Linfócitos T CD3 ⁺ mil/mm ³ / (%)	Linfócitos T CD4 ⁺ mil/mm ³ / (%)	Linfócitos T CD8 ⁺ mil/mm ³ / (%)	Linfócitos B CD19 ⁺ mil/mm ³ / (%)
P1ICV	2,06 (24,6%)	1,28 (62,2%)	0,73 (57,1%)	0,47 (36,5%)	0,45 (21,9%)
P2ICV	1,19 (23,4%)	1,00 (84,0%)	0,43 (43,2%)	0,45 (44,9%)	0,11 (9,1%)
P3ICV	1,61 (29,9%)	1,29 (80,4%)	0,55 (42,3%)	0,62 (48,1%)	0,09 (5,3%)
P6ICV	1,87 (24,2%)	1,27 (67,8%)	0,71 (55,7%)	0,42 (32,7%)	0,31 (16,7%)
P7ICV	1,67 (32,7%)	0,82 (49,1%)	0,50 (60,9%)	0,21 (26,1%)	0,58 (35,0%)
P8ICV	0,55 (34,2%)	0,49 (89,4%)	0,09 (18,4%)	0,33 (67,9%)	0,02 (3,9%)
P9ICV	1,74 (22,1%)	1,30 (74,7%)	0,57 (43,8%)	0,60 (45,9%)	0,11 (6,3%)
P10ICV	2,80 (35,3%)	2,36 (84,5%)	0,86 (36,5%)	1,30 (55,3%)	0,38 (13,5%)
P11ICV	3,17 (54,0%)	2,32 (73,2%)	1,26 (54,2%)	0,93 (40,1%)	0,54 (17,0%)
P12ICV	1,18 (24,5%)	0,99 (83,6%)	0,38 (38,3%)	0,48 (48,3%)	0,04 (3,3%)
P13ICV	1,84 (61,5%)	1,40 (77,6%)	0,62 (44,0%)	0,65 (46,6%)	0,16 (8,8%)
P14ICV	1,86 (26,6%)	1,69 (90,7%)	0,77 (45,8%)	0,75 (44,5%)	0,03 (1,4%)
P15ICV	1,59 (30,2%)	1,43 (90,2%)	0,58 (40,6%)	0,69 (4,80%)	0,04 (2,7%)
P16ICV	3,24 (31,1%)	2,11 (65,0%)	0,57 (27,1%)	1,40 (66,4%)	0,44 (13,7%)
P18ICV	1,66 (37,8%)	1,52 (91,6%)	0,90 (59,6%)	0,56 (36,7%)	0,03 (1,6%)
P19ICV	1,37 (30,0%)	1,22 (88,9%)	0,58 (47,7%)	0,53 (43,7%)	0,02 (1,1%)
P21ICV	1,73 (49,9%)	1,60 (92,5%)	0,46 (28,8%)	0,98 (61,5%)	0,02 (1,2%)
P22ICV	2,25 (21,1%)	1,92 (85,2%)	0,47 (24,5%)	1,25 (64,9%)	0,03 (1,3%)
P23ICV	2,14 (48,9%)	2,02 (94,2%)	0,44 (21,8%)	1,51 (74,6%)	0,03 (1,6%)
P24ICV	1,33 (47,3%)	0,97 (72,7%)	0,56 (58,1%)	0,30 (31,1%)	0,06 (4,8%)
P26ICV	3,06 (18,5%)	2,07 (67,7%)	0,78 (37,7%)	0,95 (45,7%)	0,31 (10,2%)
P27ICV	1,96 (24,4%)	1,32 (67,3%)	0,42 (32,0%)	0,72 (54,2%)	0,21 (10,6%)
P28ICV	1,56 (13,3%)	0,94 (60,6%)	0,36 (38,9%)	0,44 (47,2%)	0,06 (3,8%)
P29ICV	1,66 (26,3%)	1,48 (89,2%)	0,79 (53,6%)	0,61 (41,1%)	0,02 (1,0%)

P31ICV	1,91 (24,5%)	1,51 (79,0%)	0,59 (38,8%)	0,81 (53,6%)	0,04 (2,2%)
P11ICVAI	0,81 (14,8%)	0,63 (77,4%)	0,37 (58,5%)	0,18 (29,2%)	0,11 (13,4%)
P21ICVAI	1,28 (31,1%)	1,06 (83,2%)	0,81 (76,5%)	0,16 (15,6%)	0,03 (2,1%)
P31ICVAI	1,37 (30,8%)	0,94 (68,3%)	0,44 (46,6%)	0,38 (39,9%)	0,25 (18,6%)
P41ICVAI	1,99 (39,4%)	1,52 (76,5%)	0,83 (54,9%)	0,57 (37,6%)	0,29 (14,8%)
P51ICVAI	3,05 (42,5%)	2,56 (84,0%)	1,35 (52,6%)	0,84 (32,8%)	0,37 (12,1%)
P61ICVAI	1,92 (23,7%)	1,75 (91,3%)	0,35 (20,2%)	1,25 (71,5%)	0,26 (13,5%)
P71ICVAI	2,34 (34,5%)	1,79 (76,6%)	0,65 (36,3%)	0,94 (52,3%)	0,06 (2,4%)
P81ICVAI	1,74 (38,2%)	1,40 (80,6%)	0,52 (37,3%)	0,72 (51,5%)	0,23 (13,5%)
P91ICVAI	0,68 (9,7%)	0,48 (70,7%)	0,27 (56,5%)	0,15 (31,0%)	0,04 (6,0%)
P101ICVAI	0,29 (18,1%)	0,26 (91,7%)	0,10 (38,0%)	0,14 (53,2%)	0,01 (2,3%)
P111ICVAI	2,73 (48,8%)	1,80 (66,1%)	0,36 (19,9%)	1,40 (77,8%)	0,61 (22,3%)
P131ICVAI	1,52 (32,1%)	1,28 (84,3%)	0,81 (63,5%)	0,32 (24,8%)	0,12 (7,6%)
P141ICVAI	1,35 (23,9%)	1,18 (87,8%)	0,26 (21,9%)	0,74 (62,9%)	0,03 (2,4%)
P151ICVAI	1,09 (20,4%)	0,95 (86,9%)	0,47 (49,6%)	0,44 (46,0%)	0,03 (2,9%)
P171ICVAI	1,56 (22,0%)	1,05 (67,1%)	0,48 (45,8%)	0,51 (48,4%)	0,08 (5,1%)
P181ICVAI	1,53 (26,9%)	1,17 (76,6%)	0,86 (73,9%)	0,23 (19,5%)	0,15 (9,9%)
P191ICVAI	0,98 (15,9%)	0,74 (76,0%)	0,50 (68,0%)	0,17 (23,2%)	0,05 (5,4%)

Tabela 3-S: Valor absoluto e frequência de linfócitos em Controles Saudáveis.

IDENTIFICAÇÃO	Linfócitos Totais mil/mm ³ / (%)	Linfócitos T CD3 ⁺ mil/mm ³ / (%)	Linfócitos T CD4 ⁺ mil/mm ³ / (%)	Linfócitos T CD8 ⁺ mil/mm ³ / (%)	Linfócitos B CD19 ⁺ mil/mm ³ / (%)
CS1	1,38 (21,5%)	0,82 (59,3%)	0,44 (53,5%)	0,29 (35,0%)	0,09 (6,2%)
CS2	2,56 (29,3%)	1,67 (65,4%)	1,03 (61,9%)	0,42 (25,2%)	0,23 (8,9%)
CS3	1,89 (39,5%)	1,30 (68,9%)	0,78 (59,6%)	0,41 (31,5%)	0,13 (7,0%)
CS4	2,41 (24,3%)	1,69 (70,1%)	0,90 (53,2%)	0,63 (37,1%)	0,41 (17,1%)
CS5	2,35 (31,9%)	1,82 (77,6%)	1,13 (61,9%)	0,33 (29,6%)	0,18 (7,8%)
CS6	1,96 (32,8%)	1,20 (61,1%)	0,66 (55,0%)	0,36 (30,2%)	0,25 (12,5%)
CS7	2,48 (43,2%)	2,26 (91,2%)	0,92 (40,9%)	0,78 (34,5%)	0,11 (4,4%)
CS8	***	*** (75,0%)	*** (62,4%)	*** (32,1)	*** (11,4%)
CS9	1,68 (20,0%)	1,17 (69,5%)	0,61 (52,2%)	0,43 (36,6%)	0,18 (10,9%)
CS10	2,24 (34,7%)	1,83 (81,8%)	0,82 (44,7%)	0,82 (45,0%)	0,17 (7,5%)
CS11	2,51 (30,1%)	1,86 (74,2%)	0,93 (50,1%)	0,44 (23,5%)	0,14 (5,5%)
CS12	2,94 (36,9%)	2,09 (71,1%)	1,17 (56,1%)	0,75 (36,0%)	0,37 (12,6%)
CS13	2,25 (34,8%)	1,83 (81,5%)	0,81 (44,4%)	0,71 (38,9%)	0,18 (7,9%)
CS14	***	*** (74,2%)	*** (54,7%)	*** (32,7)	*** (11,0%)
CS15	1,60 (37%)	1,35 (84,4%)	0,90 (66,8%)	0,18 (13,7%)	0,14 (8,5%)
CS16	3,34 (44,2%)	2,62 (78,6%)	1,55 (59,3%)	0,73 (28,0%)	0,16 (4,8%)
CS17	1,36 (22,4%)	0,94 (68,8%)	0,61 (65%)	0,24 (25,8%)	0,09 (6,8%)

*** Ausência de resultado.

Tabela 4-S: Frequência de células B10 em pacientes ICV.

IDENTIFICAÇÃO	CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} B10 (%)			CD24 ^{hi} CD27 ⁺ B10 (%)		
	BFA	CpG + PIB	LPS + PIB	BFA	CpG + PIB	LPS + PIB
P1ICV	2,57	4,71	4,00	1,63	3,31	3,18
P2ICV	2,42	5,07	3,75	1,66	3,25	3,62
P3ICV	1,93	3,37	2,42	3,31	4,80	2,70
P6ICV	3,65	5,28	4,79	2,72	4,62	3,98
P7ICV	1,54	3,24	3,82	1,81	3,19	2,33
P8ICV	2,68	3,10	4,96	2,17	4,15	5,28
P9ICV	1,81	5,76	3,45	0,88	3,06	1,69
P10ICV	3,58	4,38	4,40	2,90	3,27	3,91
P11ICV	2,46	4,72	6,10	2,87	4,65	4,78
P12ICV	3,19	4,90	5,50	3,43	3,55	4,36
P13ICV	2,56	3,22	5,03	2,40	2,98	4,08
P14ICV	1,95	3,93	4,29	2,33	3,33	3,61
P15ICV	2,44	3,86	3,49	2,52	3,60	2,34
P16ICV	2,08	3,02	3,86	2,03	4,21	2,68
P18ICV	4,15	6,45	4,53	3,50	4,08	5,96
P19ICV	3,27	2,65	3,67	1,44	2,58	3,09
P21ICV	3,66	4,44	4,17	2,15	2,33	4,00
P22ICV	2,35	3,85	2,78	3,72	5,45	2,62
P23ICV	3,18	4,92	3,92	3,95	4,04	5,06
P24ICV	2,70	5,43	5,48	3,17	3,41	3,57
P26ICV	5,18	2,74	2,03	7,02	5,79	5,58
P27ICV	2,02	2,80	2,09	2,54	3,13	3,55

P28ICV	0,81	2,78	6,43	3,48	3,64	5,6
P29ICV	3,05	4,35	5,56	1,88	5,94	6,96
P31ICV	1,58	2,39	2,62	2,53	2,94	5,27
P1ICVAI	2,23	4,91	2,63	1,26	3,69	2,35
P2ICVAI	1,13	2,56	4,85	1,73	3,35	3,69
P3ICVAI	2,94	5,42	3,77	2,04	4,08	3,57
P4ICVAI	4,19	4,43	3,23	3,16	5,40	3,10
P5ICVAI	3,84	5,96	4,98	2,07	4,37	2,92
P6ICVAI	3,62	5,17	3,59	1,93	5,44	2,64
P7ICVAI	3,07	5,41	3,79	2,88	5,56	3,25
P8ICVAI	2,20	2,84	3,53	2,32	3,57	5,71
P9ICVAI	3,25	5,49	3,72	3,17	6,14	4,54
P10ICVAI	2,10	4,94	1,43	3,97	4,46	3,12
P11ICVAI	0,79	3,01	8,82	1,59	4,95	3,60
P13ICVAI	2,61	4,20	4,50	2,31	3,13	3,36
P14ICVAI	0,95	5,00	1,29	1,08	5,63	3,61
P15ICVAI	5,53	4,15	3,10	3,31	4,75	5,50
P17ICVAI	5,88	6,03	5,71	2,48	3,6	3,66
P18ICVAI	2,36	5,88	4,01	2,29	3,15	3,32
P19ICVAI	3,51	3,63	4,02	3,40	3,53	4,19

Tabela 5-S: Frequência de células B10 em Controles Saudáveis.

IDENTIFICAÇÃO	CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} B10 (%)			CD24 ^{hi} CD27 ⁺ B10 (%)		
	BFA	CpG + PIB	LPS + PIB	BFA	CpG + PIB	LPS + PIB
CS1	3,23	4,61	6,67	2,02	3,22	4,21
CS2	2,34	5,96	5,58	0,98	5,33	4,73
CS3	4,44	5,22	5,59	2,09	3,91	3,68
CS4	4,88	7,39	9,55	1,89	3,34	2,69
CS5	2,99	4,05	4,29	2,84	4,22	4,01
CS6	2,25	6,72	5,09	1,91	6,09	3,80
CS7	4,52	6,67	6,54	4,70	5,39	2,99
CS8	5,46	6,06	3,60	4,74	5,07	4,95
CS9	2,62	5,69	5,59	1,19	3,80	2,06
CS10	3,37	6,43	4,03	2,93	6,67	4,95
CS11	6,27	7,34	8,96	3,40	5,92	6,89
CS12	5,26	6,39	5,25	3,52	4,15	3,65
CS13	3,13	5,10	6,07	2,98	4,43	6,47
CS14	3,65	4,03	4,11	3,93	4,24	4,64
CS15	5,93	8,35	6,11	3,32	5,24	3,27
CS16	3,32	4,03	8,53	1,60	2,63	6,76
CS17	2,04	4,79	5,59	2,74	6,00	5,27

Anexo 3: Parecer da CAPPesq

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

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS B REGULADORES PRODUTORES DE IL-10 (B10) EM PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL (ICV) E PACIENTES COM DEFICIÊNCIA DE IGA (IGAD)

Pesquisador Responsável: Cristina Maria Kokron

Versão: 4

Pesquisador Executante: Nathália Silveira Barsotti

CAAE: 26737114.1.0000.0068

Coautores: Myrthes Toledo BarrosAna Karolina B B Marinho

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Orientador: Cristina Maria Kokron

Instituição: HCFMUSP

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11936

Número do Parecer: 742.526

Data da Relatoria: 06/08/14

Apresentação do Projeto: Trata-se de projeto de Mestrado visando identificar uma população rara de linfócitos B produtores de IL10 em pacientes normais ou portadores de imunodeficiências. Trata-se de questionamento sobre o volume de sangue coletado para a amostragem, que foi explicado pelo coordenador do projeto em carta separada. Os motivos para a coleta são válidos, apenas havia o questionamento do volume, que foi adequadamente explicado pela proponente.

Objetivo da Pesquisa: Pesquisa de células IL-10 regulatórias em portadores de imunodeficiência.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: O risco é do projeto decorrer da necessidade de coleta excessiva de sangue para o exame em um número de pacientes muito grande e sem um embasamento científico adequado para o número excessivo de sangue ou de coletas. A resposta lacônica da pesquisadora responsável não permite responder aos questionamentos efetuados quando da primeira revisão, já que ela deve ter os valores aproximados encontrados no sangue periférico de normais. O fato de ainda não ter sido efetuado nos imunodeficientes não justifica o volume de sangue solicitado nem o número amostral solicitado. Existem 380

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

referencias na PubMed com o tema B cells IL-10 and regulatory, o que deve embasar a justificativa da coleta de 40 ml ou seja 4×10^7 linfócitos periféricos. Mesmo que a população seja rara, ou seja, abaixo de 1% o citômetro do fluxo usualmente analisa um máximo de 400000 eventos, bem abaixo da proposta.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Nenhum.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequados.

Recomendações: Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Nenhuma.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Avaliação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 06 de Agosto de 2014

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

Anexo 4: Termo De Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Avaliação da frequência de linfócitos B reguladores produtores de IL-10 (B10) em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) e pacientes com Deficiência de IgA (IgAD).**

PESQUISADOR : Dra. Cristina Maria Kokron

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 49888

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 ANOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HC-FMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária, ou de seu filho, neste estudo. O senhor (a) tem uma doença, na qual não existe produção de algumas substâncias, chamadas anticorpos, que normalmente protegem as pessoas das infecções. Esta doença recebe o nome de Imunodeficiência Comum Variável (ICV). Alguns trabalhos têm mostrado que além da produção defeituosa de anticorpos, outras células do sangue que também participam da defesa imunológica (que é responsável pela defesa do nosso organismo contra microorganismos infecciosos) podem estar alteradas, entre elas as células chamadas B10, que regulam a resposta imune e são importantes na defesa contra alguns microorganismos. Devido a estas várias alterações, os pacientes apresentam muitas infecções, como sinusites, pneumonias, infecções intestinais, e ainda podem apresentar doenças autoimunes. Dessa forma, seria interessante encontrar uma maneira de entender estas alterações para melhorar a imunidade e com isso diminuir a quantidade de infecções. Por este motivo, gostaríamos de avaliar a frequência das células B10 na sua doença. Estamos convidando você para participar deste estudo inovador no nosso meio. Se concordar, vamos colher 40 mL de sangue para a pesquisa, onde verificaremos o perfil da resposta imunológica;

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Será realizada a coleta de 40 mL de sangue, para realização dos exames de laboratório para avaliação da frequência de células B10 e outros parâmetros importantes para correlaciona-las.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: Coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Os desconfortos da coleta de sangue podem ser dor local e formação de pequenas manchas roxas (hematomas) no local da coleta. Os riscos são mínimos e iguais aos de qualquer outra coleta de sangue para exames de rotina.

5 – Benefícios para o participante: Você não receberá qualquer a curto-prazo participando deste estudo. As informações obtidas a partir desta pesquisa poderão beneficiar outras pessoas, inclusive você mesmo no futuro, pois entendendo melhor a doença e seus mecanismos, podemos tentar encontrar um tratamento mais eficiente para reduzir o número de infecções.

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

7 – Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. As principais investigadoras são a *Dra. Cristina Kokron* e a aluna de mestrado *Nathália Silveira Barsotti*, que podem ser encontradas no endereço R. Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 5º andar bloco 4B. Telefone(s): 3061-8315; 3061-8396; 2661-6098. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br;

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

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

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

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

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Avaliação da frequência de linfócitos B reguladores produtores de IL-10 (B10) em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) e pacientes com Deficiência de IgA (IgAD)**”.

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

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

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Anexo 5: Termo De Consentimento Livre e Esclarecido – Controles Saudáveis**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Avaliação da frequência de linfócitos B reguladores produtores de IL-10 (B10) em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) e pacientes com Deficiência de IgA (IgAD).**

PESQUISADOR : Dra. Cristina Maria Kokron

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 49888

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 ANOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HC-FMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária como controle (sem deficiência imunológica) neste estudo, cujo objetivo é avaliar a frequência de células B10 em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável e pacientes com Deficiência Seletiva de IgA, com e sem autoimunidade, buscando correlacioná-la com as diferentes manifestações clínicas e imunológicas associadas às doenças. Alguns trabalhos têm mostrado que além da produção defeituosa de anticorpos, outras células do sangue que também participam da defesa imunológica (que é responsável pela defesa do nosso organismo contra microrganismos infecciosos) podem estar alteradas, entre elas as células chamadas B10, que regulam a resposta imune e são importantes na defesa contra alguns microrganismos. Devido a estas várias alterações, os pacientes apresentam muitas infecções, como sinusites, pneumonias, infecções intestinais, e ainda podem apresentar doenças autoimunes. Dessa forma, seria interessante encontrar uma maneira de entender estas alterações para melhorar a imunidade e com isso diminuir a quantidade de infecções. Por este motivo, gostaríamos de avaliar a frequência das células B10 na sua doença. Estamos convidando você para participar deste estudo inovador no nosso meio. Se concordar, vamos colher 40 mL de sangue para a pesquisa, onde verificaremos o perfil da resposta imunológica. O senhor(a) está sendo convidado(a) a participar deste estudo por ser um indivíduo sadio, sem histórico de imunodeficiências primárias, e será um controle normal para o estudo;

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Será realizada a coleta de 40 mL de sangue, para realização dos exames de laboratório para avaliação da frequência de células B10 e outros parâmetros importantes para correlaciona-las.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: Coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Os desconfortos da coleta de sangue podem ser dor local e formação de pequenas manchas roxas (hematomas) no local da coleta. Os riscos são mínimos e iguais aos de qualquer outra coleta de sangue para exames de rotina.

5 – Benefícios para o participante: Você não receberá qualquer a curto-prazo participando deste estudo. As informações obtidas a partir desta pesquisa poderão

beneficiar outras pessoas, inclusive você mesmo no futuro, pois entendendo melhor a doença e seus mecanismos, podemos tentar encontrar um tratamento mais eficiente para reduzir o número de infecções.

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

7 – Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. As principais investigadoras são a *Dra. Cristina Kokron* e a aluna de mestrado *Nathália Silveira Barsotti*, que podem ser encontradas no endereço R. Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 5º andar bloco 4B. Telefone(s): 3061-8315; 3061-8396; 2661-6098. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br;

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

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

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

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

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Avaliação da frequência de linfócitos B reguladores produtores de IL-10 (B10) em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) e pacientes com Deficiência de IgA (IgAD)**”.

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

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

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol.* 1999;92(1):34-48.
2. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol.* 1999;93(3):190-7.
3. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood.* 2008;112(2):277-86.
4. Salzer U, Warnatz K, Peter H. Common variable immunodeficiency - an update. *Arthritis Research & Therapy.* 2012;14(5).
5. Litzman J, Vlková M, Pikulová Z, Stikarovská D, Lokaj J. T and B lymphocyte subpopulations and activation/differentiation markers in patients with selective IgA deficiency. *Clin Exp Immunol.* 2007;147(2):249-54.
6. Cunningham-Rundles C. Physiology of IgA and IgA deficiency. *J Clin Immunol.* 2001;21(5):303-9.
7. Aghamohammadi A, Mohammadi J, Parvaneh N, Rezaei N, Moin M, Espanol T, et al. Progression of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;147(2):87-92.
8. Park MA, Li JT, Hagan JB, Maddox DE, Abraham RS. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *Lancet.* 2008;372(9637):489-502.
9. Yazdani R, Hakemi MG, Sherkat R, Homayouni V, Farahani R. Genetic defects and the role of helper T-cells in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Adv Biomed Res.* 2014;3:2.
10. Mouillot G, Carmagnat M, Gérard L, Garnier JL, Fieschi C, Vince N, et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *J Clin Immunol.* 2010;30(5):746-55.
11. Agarwal S, Cunningham-Rundles C. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2009;9(5):347-52.
12. Lopes-da-Silva S, Rizzo LV. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2008;28 Suppl 1:S46-55.
13. Saifi M, Wysocki CA. Autoimmune Disease in Primary Immunodeficiency: At the Crossroads of Anti-Infective Immunity and Self-Tolerance. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2015;35(4):731-52.
14. Kokron CM, Errante PR, Barros MT, Baracho GV, Camargo MM, Kalil J, et al. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. *An Acad Bras Cienc.* 2004;76(4):707-26.
15. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood.* 2002;99(5):1544-51.

16. Avalos JdJR, Brocardo, Graciela A., Kokron, Cristina Maria, Rizzo, Luiz Vicente, Kalil, Jorge, Barros, Myrtes T. Caracterização imunofenotípica de linfócitos B de memória na deficiência de IgA e imunodeficiência comum variável Rev bras alerg imunopatol [Internet]. 2010; 33:[8 p.].
17. Rakhmanov M, Keller B, Gutenberger S, Foerster C, Hoenig M, Driessen G, et al. Circulating CD21low B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(32):13451-6.
18. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008;111(1):77-85.
19. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, et al. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol*. 2007;178(6):3932-43.
20. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, et al. CLASSIFICATION OF COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY BY QUANTIFICATION OF T CELL RECEPTOR RECOMBINATION EXCISION CIRCLES (TREC) AND IG KAPPA-DELETING RECOMBINATION EXCISION CIRCLES (KREC). *Journal of Clinical Immunology*. 2012;32:256-.
21. Kondratenko I, Amlot P, Webster A, Farrant J. Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 1997;108(1):9-13.
22. Hel Z, Huijbregts RP, Xu J, Nechvatalova J, Vlkova M, Litzman J. Altered serum cytokine signature in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2014;34(8):971-8.
23. Varzaneh FN, Keller B, Unger S, Aghamohammadi A, Warnatz K, Rezaei N. Cytokines in common variable immunodeficiency as signs of immune dysregulation and potential therapeutic targets - a review of the current knowledge. *J Clin Immunol*. 2014;34(5):524-43.
24. Di Renzo M, Serrano D, Zhou Z, George I, Becker K, Cunningham-Rundles C. Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas/fasligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS. *Clinical and Experimental Immunology*. 2001;125(1):117-22.
25. FARRINGTON M, GROSMARE L, NONOYAMA S, FISCHER S, HOLLENBAUGH D, LEDBETTER J, et al. CD40 LIGAND EXPRESSION IS DEFECTIVE IN A SUBSET OF PATIENTS WITH COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(3):1099-103.
26. Fevang B, Yndestad A, Sandberg WJ, Holm AM, Müller F, Aukrust P, et al. Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: association with chronic inflammation in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(3):521-5.
27. Carter CR, Aravind G, Smalle NL, Cole JY, Savic S, Wood PM. CVID patients with autoimmunity have elevated T cell expression of granzyme B and HLA-DR and reduced levels of Treg cells. *J Clin Pathol*. 2013;66(2):146-50.
28. Arumugakani G, Wood PM, Carter CR. Frequency of Treg cells is reduced in CVID patients with autoimmunity and splenomegaly and is

associated with expanded CD21lo B lymphocytes. *J Clin Immunol*. 2010;30(2):292-300.

29. Melo KM, Carvalho KI, Bruno FR, Ndhlovu LC, Ballan WM, Nixon DF, et al. A decreased frequency of regulatory T cells in patients with common variable immunodeficiency. *PLoS One*. 2009;4(7):e6269.

30. Genre J, Errante PR, Kokron CM, Toledo-Barros M, Câmara NO, Rizzo LV. Reduced frequency of CD4(+)CD25(HIGH)FOXP3(+) cells and diminished FOXP3 expression in patients with Common Variable Immunodeficiency: a link to autoimmunity? *Clin Immunol*. 2009;132(2):215-21.

31. Paquin-Proulx D, Sandberg JK. Persistent Immune Activation in CVID and the Role of IVIg in Its Suppression. *Front Immunol*. 2014;5:637.

32. Paquin-Proulx D, Santos BA, Carvalho KI, Toledo-Barros M, Barreto de Oliveira AK, Kokron CM, et al. IVIg immune reconstitution treatment alleviates the state of persistent immune activation and suppressed CD4 T cell counts in CVID. *PLoS One*. 2013;8(10):e75199.

33. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Galicier L, Lepelletier Y, Webster D, et al. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. *Blood*. 2004;104(8):2441-3.

34. Scott-Taylor TH, Green MR, Eren E, Webster AD. Monocyte derived dendritic cell responses in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 2004;138(3):484-90.

35. Litzman J, Nechvatalova J, Xu J, Ticha O, Vlkova M, Hel Z. Chronic immune activation in common variable immunodeficiency (CVID) is associated with elevated serum levels of soluble CD14 and CD25 but not endotoxaemia. *Clin Exp Immunol*. 2012;170(3):321-32.

36. Lødrup Carlsen KC, Granum B. Soluble CD14: role in atopic disease and recurrent infections, including otitis media. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007;7(6):436-43.

37. Abbott JK, Gelfand EW. Common Variable Immunodeficiency: Diagnosis, Management, and Treatment. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2015;35(4):637-58.

38. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *Br J Haematol*. 2009;145(6):709-27.

39. Ameratunga R, Brewerton M, Slade C, Jordan A, Gillis D, Steele R, et al. Comparison of diagnostic criteria for common variable immunodeficiency disorder. *Front Immunol*. 2014;5:415.

40. Ameratunga R, Woon ST, Gillis D, Koopmans W, Steele R. New diagnostic criteria for CVID. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(2):183-6.

41. Jolles S. The variable in common variable immunodeficiency: a disease of complex phenotypes. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2013;1(6):545-56; quiz 57.

42. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro 2011. 433 p.

43. Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway*. 7ª ed. Porto Alegre 2010. 885 p.

44. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74(5):261-71.

45. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008;112(5):1570-80.
46. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*. 2012;491(7423):264-8.
47. Mauri C. Regulation of immunity and autoimmunity by B cells. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(6):761-7.
48. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011;117(2):530-41.
49. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol*. 2009;182(12):7459-72.
50. Yang M, Rui K, Wang S, Lu L. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(2):122-32.
51. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:221-41.
52. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther*. 2013;15 Suppl 1:S1.
53. Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol*. 2010;40(10):2686-91.
54. Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. 2002;3(10):944-50.
55. DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1183:38-57.
56. Goode I, Xu H, Ildstad ST. Regulatory B Cells: The New "It" Cell. *Transplant Proc*. 2013.
57. van der Vlugt LE, Mlejnek E, Ozir-Fazalalikhan A, Bonas MJ, Dijksman TR, Labuda LA, et al. CD24(hi) CD27(+) B cells from allergic asthma patients have impaired regulatory activity in response to LPS. *Clin Exp Allergy*. 2013.
58. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, Neves P, Calderón Gómez E, Sweeney CH, et al. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol*. 2008;180(7):4763-73.
59. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 2008;28(5):639-50.
60. Ma J, Usui Y, Takeda K, Harada N, Yagita H, Okumura K, et al. TIM-1 signaling in B cells regulates antibody production. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;406(2):223-8.
61. Yang M, Sun L, Wang S, Ko KH, Xu H, Zheng BJ, et al. Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells. *J Immunol*. 2010;184(7):3321-5.
62. Gray M, Miles K, Salter D, Gray D, Savill J. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(35):14080-5.

63. Maseda D, Smith SH, DiLillo DJ, Bryant JM, Candando KM, Weaver CT, et al. Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production in vivo. *J Immunol*. 2012;188(3):1036-48.
64. Zha B, Wang L, Liu X, Liu J, Chen Z, Xu J, et al. Decrease in proportion of CD19⁺ CD24(hi) CD27⁺ B cells and impairment of their suppressive function in Graves' disease. *PLoS One*. 2012;7(11):e49835.
65. Daïen CI, Gailhac S, Mura T, Audo R, Combe B, Hahne M, et al. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(8):2037-46.
66. Vadasz Z, Haj T, Kessel A, Toubi E. B-regulatory cells in autoimmunity and immune mediated inflammation. *FEBS Lett*. 2013;587(13):2074-8.
67. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19⁺CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010;32(1):129-40.
68. Dass S, Vital EM, Emery P. Development of psoriasis after B cell depletion with rituximab. *Arthritis Rheum*. 2007;56(8):2715-8.
69. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol*. 2011;186(10):5569-79.
70. Bao W, Zhong H, Manwani D, Vasovic L, Uehlinger J, Lee MT, et al. Regulatory B-cell compartment in transfused alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2013;88(9):736-40.
71. Jin L, Weiqian C, Lihuan Y. Peripheral CD24^{hi} CD27⁺ CD19⁺ B cells subset as a potential biomarker in naïve systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis*. 2013;16(6):698-708.
72. Rolle L, Memarzadeh Tehran M, Morell-García A, Raeva Y, Schumacher A, Hartig R, et al. Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70(6):448-53.
73. Das A, Ellis G, Pallant C, Lopes AR, Khanna P, Peppas D, et al. IL-10-Producing Regulatory B Cells in the Pathogenesis of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Journal of Immunology*. 2012;189(8):3925-35.
74. Furuzawa-Carballeda J, Hernández-Molina G, Lima G, Rivera-Vicencio Y, Férrez-Blando K, Llorente L. Peripheral regulatory cells immunophenotyping in primary Sjögren's syndrome: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(3):R68.
75. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med*. 2013;5(173):173ra23.
76. Siewe B, Stapleton JT, Martinson J, Keshavarzian A, Kazmi N, Demarais PM, et al. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8⁺ T cell function in vitro. *J Leukoc Biol*. 2013;93(5):811-8.

77. Bouaziz JD, Le Buanec H, Saussine A, Bensussan A, Bagot M. IL-10 producing regulatory B cells in mice and humans: state of the art. *Curr Mol Med*. 2012;12(5):519-27.
78. Brouet JC, Chedeville A, Femand JP, Royer B. Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol*. 2000;30(9):2516-20.
79. Vlkova M, Ticha O, Nechvatalova J, Kalina T, Litzman J, Mauri C, et al. Regulatory B cells in CVID patients fail to suppress multifunctional IFN- γ (+)TNF- α (+)CD4(+) T cells differentiation. *Clin Immunol*. 2015;160(2):292-300.
80. Kaveri SV, Maddur MS, Hegde P, Lacroix-Desmazes S, Bayry J. Intravenous immunoglobulins in immunodeficiencies: more than mere replacement therapy. *Clin Exp Immunol*. 2011;164 Suppl 2:2-5.
81. Bayry J, Fournier EM, Maddur MS, Vani J, Wootla B, Sibril S, et al. 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*. 2011;36(1):9-15.
82. Clemente A, Pons J, Matamoros N, Iglesias J, Ferrer JM. B cells from common variable immunodeficiency patients fail to differentiate to antibody secreting cells in response to TLR9 ligand (CpG-ODN) or anti-CD40+IL21. *Cell Immunol*. 2011;268(1):9-15.
83. Escobar D, Pons J, Clemente A, Iglesias J, Regueiro V, Bengoechea JA, et al. Defective B cell response to TLR9 ligand (CpG-ODN), *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* extracts in common variable immunodeficiency patients. *Cell Immunol*. 2010;262(2):105-11.
84. Yu JE, Knight AK, Radigan L, Marron TU, Zhang L, Sanchez-Ramn S, et al. Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(2):349-56, 56.e1-3.
85. Trujillo CM, Muskus C, Arango J, Patio PJ, Montoya CJ. Quantitative and functional evaluation of innate immune responses in patients with common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(3):207-15.
86. Yu JE, Zhang L, Radigan L, Sanchez-Ramon S, Cunningham-Rundles C. TLR-mediated B cell defects and IFN- α in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2012;32(1):50-60.
87. Bouaziz JD, Yanaba K, Tedder TF. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol Rev*. 2008;224:201-14.
88. Li XJ, Zhong H, Bao WL, Boulad N, Evangelista J, Haider MA, et al. Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia. *Blood*. 2012;120(16):3318-25.
89. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3(+) Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110(4):1225-32.