BIANCA ALMEIDA NATALI DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE PD-1 E SEU LIGANTE PD-L1 NAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B EM PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL (ICV) COM INFECÇÕES DE REPETIÇÃO

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

PROGRAMA DE ALERGIA E IMUNOPATOLOGIA ORIENTADORA: DRA. CRISTINA MARIA KOKRON

SÃO PAULO

2021

BIANCA ALMEIDA NATALI DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE PD-1 E SEU LIGANTE PD-L1 NAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B EM PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL (ICV) COM INFECÇÕES DE REPETIÇÃO

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

PROGRAMA DE ALERGIA E IMUNOPATOLOGIA ORIENTADORA: DRA. CRISTINA MARIA KOKRON

SÃO PAULO

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Bianca Almeida Natali dos
Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu
ligante PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B em
pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV)
com infecções de repetição / Bianca Almeida Natali
dos Santos. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da

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

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

Descritores: 1.Imunodeficiência comum variável 2.Subpopulações de linfócitos B 3.Linfócitos T 4.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-079/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus que me acompanha e me mostra que nem sempre o caminho é fácil, mas que com esforço e dedicação somos merecedores de nossas conquistas.

A minha querida orientadora Dra. Cristina Maria Kokron por ter aberto as portas de seu laboratório e permitir que eu integrasse sua equipe, por todas as oportunidades que me foram fornecidas visando o desenvolvimento intelectual, profissional e pessoal, por quem tenho enorme admiração e respeito.

A toda minha família em especial meu pai Rubens e minha mãe Églê pelo apoio incondicional, por cuidarem do meu filho Luigi todas as vezes que precisei me ausentar, por sempre acreditar em mim e me estimular a seguir em frente em busca de realizar meus sonhos e objetivos profissionais e pessoais.

Ao meu marido por me ajudar a encarar a realidade da vida me estimulando a batalhar pela minha independência e a nunca desistir.

Ao meu amigo Fernando Ramon Zilinski por quem tenho enorme gratidão e admiração, que me incentivou diariamente a tentar me tornar uma pessoa melhor, mais paciente e persistente; sem falar na amizade que levarei para toda vida.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pelas discussões enriquecedoras e pela coordenação do Programa de Alergia e Imunopatologia.

Ao Prof. Dr. Edécio Cunha Neto coordenador do LIM 60 pelo acolhimento.

A todos os colegas de laboratório do LIM-60 com quem tive convívio durante o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas amigas Milena exemplo de esforço e dedicação, Erica minha referência de leveza e sorriso no rosto, Priscila por sempre buscar ajudar, ensinar, amiga que tem o maior coração do mundo, uma verdadeira flor na minha vida e Amanda que chegou quietinha e emana luz; Palavras são incapazes de refletir minha eterna gratidão, obrigada a todas pelo apoio, conversas, risadas por sempre estarem dispostas a ceder um ombro amigo nos momentos de alegria e desafios.

As minhas amigas do coração Juliana e Keity, por tudo de bom que vivemos juntas e pela amizade que se propagou na vida aqui fora.

Aos amigos Ruth e Carlos pela inestimável ajuda, atenção e carinho disponibilizados nesta etapa de minha vida.

Aos funcionários do Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia, em especial à Rosana Vieira Coutinho e Serafim Fidalgo, pela cooperação a apoio junto aos pacientes;

Ao INCT – Instituto de Investigação em Imunologia e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio dado através da bolsa de doutorado concedida que proporcionou a realização deste trabalho.

E principalmente aos pacientes, pela confiança em nosso trabalho e pela imensa contribuição para a pesquisa.

Aos professores Daniela Santoro Rosa, Dewton Moraes de Vasconcelos e Priscilla Ramos Costa pela enorme contribuição com críticas e sugestões em minha qualificação do trabalho de doutorado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

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

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

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

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

LISTA	DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLASviii
LISTA	DE FIGURASxi
LISTA	DE TABELASxix
RESU	MOxx
ABSTI	RACTxix
INTRO	ODUÇÃO 1
1.1	Imunodeficiência Comum Variável (ICV)
1.2	Imunidade Adaptativa na ICV
1.3	Fatores genéticos relacionados à ICV
1.4	Critérios de diagnóstico e classificação fenotípica da ICV
1.5	Via de sinalização PD-1/PD-L1
1.6	Linfócito T Helper Folicular – T _{FH} e a ICV
	TIFICATIVA
3. HIP	ÓTESE
4. OB J	IETIVOS
4.1	Objetivo Geral
4.2	Objetivos Específicos
5. CAS	SUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS23
5.1	Desenho do estudo
5.2	Locais do estudo
5.3	Casuística
5.3.1	Critérios de inclusão
5.3.2	Critérios de exclusão
5.4	Recrutamento
5.5	Seleção e avaliação dos pacientes
5.6	Coleta das amostras
5.7	Processo de separação das células mononucleares do sangue periférico
5.8	Descongelamento das células mononucleares criopreservadas oriundas do sangue periférico
5.9	Imunofenotipagem de superfície celular em células mononucleares do sangue
5 10	periférico 28
5.10	Preparação das microesferas ("beads") para o ajuste das voltagens do Citômetro de Fluxo
5.11	Estratégia de análise para caracterização das células B e suas respectivas subpopulações com a coexpressão das moléculas PD-1 e PD-L1
5.12	Estratégia de análise para população de linfócitos T helper foliculares
5.13	Análise de dados adquiridos por citometria de fluxo
5.14	Exames laboratoriais
5.15	Análise estatística
5.16	Aspectos éticos
6. RES	SULTADOS
6.1	Dados Demográficos
6.2	Avaliação da frequência de linfócitos B e suas subpopulações em células
	mononucleares do sangue periférico e, expressão de PD-1 e PD-L1
	CUSSÃO97
8. CO	NCLUSÕES 107
ANEX	OS
REFE	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS116

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

% Porcentagem

ACD Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose

APC Aloficocianina

BAFF Fator de ativação de célula B

BAFFR Receptor do fator de ativação de célula B

BCL-6 Proteína 6 de linfoma de células B

BCR Receptor de linfócito B

Bregs Linfócitos B reguladores

BTLA Atenuador de Linfócito B e T

CAPPesq Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CD Designação de grupos

CVID Imunodeficiência Comum Variável

CMSP Células Mononucleares do Sangue Periférico

CMV Citomegalovírus

CTLA-4 Proteína 4 associada a Linfócito T Citotóxico

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

DC Células dendríticas

DMSO Dimetil-sufóxido

EII Erros Inatos da Imunidade

ELISA Ensaio de imunoabsorção enzimática

et al. E outros

FITC Isotiocianato de fluoresceína

FMUSP Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FSC Forward Scatter – dispersão frontal da luz que mede altura

FSC-A Forward Scatter – dispersão frontal da luz que mede área

FSC-H Forward Scatter – dispersão frontal da luz que mede altura

GC Centro germinativo

GI Gastrointestinal

HC Hospital das Clínicas

HNL Hiperplasia Nodular Linfóide

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

ICOS Co-Estimulador Indutível

ICV Imunodeficiência Comum Variável

IDPs Imunodeficiências primárias

Ig Imunoglobulina

IgAD Deficiência seletiva de Imunoglobulina A

IGIV Imunoglobulina Intravenosa

IL Interleucina

IL-R Receptor de interleucina

IFN-γ Interferon Gama

ITIM Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motiff

LB Linfócito B

LB_{FH} Linfócito B *helper* folicular

LT Linfócito T

LT_{FH} Linfócito T *helper* folicular

LT_{FHreg} Linfócito T *helper* folicular regulador

LIM60 Laboratório de Investigação Médica 60

mL Mililitro

μL Microlitro

MO Medula óssea

MZB Células B de zona marginal

NFKB1 Fator-Kappa nuclear humano B1

NFKB2 Fator-Kappa nuclear humano B2

ng Nanograma

°C Grau centígrado

PBL Plasmoblastos

PBS Tampão fosfato-salino

PCR Proteína C Reativa

PD-1 Proteína-1 de morte celular programada

PD-L1 Ligante da proteína-1 de morte celular programada

PD-L2 Ligante da proteína-2 de morte celular programada

PE Ficoeritrina

PerCP Proteína clorofilperidina

PFA Paraformaldeído

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

codificante

PLCG2 Phospholipase C Gamma 2 proteína codificante

PRÓ-B Células B progenitoras

PRÉ-B Células precursoras de células B

R10 Meio RPMI suplementado com 10% SFB

rpm Rotações por minuto

RPMI Meio de Cultura para células desenvolvido pelo Instituto Roswell

Park Memorial

SFB Soro Fetal Bovino

SSC Side Scatter – dispersão lateral da luz

TACI Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin

ligand interactor

TCLE Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TCR Receptor de célula T

TNF Fator de necrose tumoral

TGF-β Fator de crescimento transformador beta

TGI Trato gastrointestinal

TLR Receptor do tipo Toll

Treg Linfócito T regulador

USP Universidade de São Paulo

UV Ultravioleta

XLA Agamaglobulinemia Ligada ao Cromossomo X

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características clínicas dos pacientes com ICV	3
Figura 2: Moléculas coestimulatórias responsáveis por regular positiva ou negativamente a resposta imune	12
Figura 3: Influência da sinalização da via PD-1/PD-L1 na resposta humoral	14
Figura 4: Efeito da Via PD-1/PD-L1	15
Figura 5: Estratégia de análise para caracterização das subpopulações de linfócitos B	34
Figura 6: Estratégia de análise para avaliar a coexpressão das moléculas PD-1 e PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B	35
Figura 7: Estratégia de análise para caracterização de linfócitos LT _{FH}	37
Figura 8: Porcentagem de células CD19 ⁺ (linfócitos B) em CMSP de pacientes ICV-Geral em comparação com indivíduos CTRL	46
Figura 9: Porcentagem de células CD19 ⁺ (linfócitos B totais) em CMSP de pacientes ICV-S/C, ICV-C/C em comparação com indivíduos CTRL	47
Figura 10: Porcentagem de células CD19 ⁺ (linfócitos B) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL	48
Figura 11: Porcentagem linfócitos B CD19 ⁺ com expressão de PD-1 ⁺ em CMSP de pacientes ICV-Geral em comparação com indivíduos CTRL	49

Figura 12: Porcentagem de linfócitos B CD19+ com expressão de PD-1+ em CMSP de pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação com indivíduos CTRL.	49
Figura 13: Porcentagem de linfócitos B totais CD19+ com expressão de PD-1+ nos diferentes subgrupos de pacientes com ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL	50
Figura 14: Porcentagem de linfócitos B totais CD19+ com expressão de PD-L1 em CMSP de pacientes ICV-Geral em comparação com indivíduos CTRL	51
Figura 15: Porcentagem de linfócitos B CD19+ com expressão de PD-L1+ em CMSP de pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação com indivíduos CTRL	51
Figura 16: Porcentagem de linfócitos B totais CD19+ com expressão de PD-L1+ nos diferentes subgrupos de pacientes com ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL	52
Figura 17: Porcentagem de células B transicional (CD19+CD24+CD38+) em CMSP de pacientes ICV-Geral em comparação com indivíduos CTRL	53
Figura 18: Porcentagem de linfócitos B transicional (CD19+CD24+CD38+) em CMSP de pacientes ICV apenas com infecções de repetição sem complicação (ICV-S/C), pacientes ICV com complicações não-infecciosas (ICV-C/C) em comparação com indivíduos CTRL	54

Figura 19: Porcentagem de linfócitos B Transicional CD19+CD24+CD38+ em	55
CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em	
comparação a indivíduos CTRL	
Figura 20: Porcentagem linfócito B Transicional (CD19+CD24+CD38+) com	56
expressão de PD-1+ em CMSP de pacientes ICV-Geral em comparação com	
indivíduos CTRL	
Figura 21: Porcentagem de linfócito B Transicional (CD19+CD24+CD38+) com	56
expressão de PD-1+ em CMSP de pacientes ICV-S/C e ICV-C/C quando	
comparados aos indivíduos CTRL	
Figura 22: Porcentagem de linfócitos B Transicional (CD19+CD24+CD38+) com	57
expressão do marcador PD-1+ em CMSP de cada subpopulação de pacientes ICV-	
S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL	
Figura 23: Porcentagem de linfócitos B Transicional (CD19+CD24+CD38+) com	58
expressão do marcador PD-1+ em CMSP de pacientes ICV-Geral em comparação	
aos indivíduos CTRL	
	50
Figura 24: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL	39
CIVISP de pacientes IC v -gerai em comparação aos individuos CTRL	
Figura 25: Porcentagem de linfócitos B Naïve em CMSP de pacientes ICV-S/C e	60
pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL	
Figura 26: Porcentagem de linfócitos B Naïve em CMSP nos diferentes subgrupos	61
de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL	
	<i>(</i> 2
Figura 27: Porcentagem de linfócito B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com	62
expressão do marcador PD-1+ em CMSP dos pacientes ICV-Geral quando comparados aos indivíduos CTPI	

Figura 28: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão do marcador PD-1+ em pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C comparados aos indivíduos CTRL	62
Figura 29: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão de PD-1+ em CMSP de nos diferentes subgrupos de pacientes ICV – S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL	63
Figura 30: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão de PD-L1+ em CMSP dos pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL	64
Figura 31: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão do marcador PD-L1+ em CMSP de pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação com indivíduos CTRL	65
Figura 32: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão de PD-L1+ em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL	66
Figura 33: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação com indivíduos CTRL	67
Figura 34: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) em CMSP de pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL	67
Figura 35: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19 ⁺ CD20 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV – S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos	68

Figura 36: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de	69
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ em CMSP	
dos pacientes ICV-Geral em comparação aos indivíduos CTRL	
Figura 37: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de	70
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ em CMSP	
de pacientes ICV-S/C em comparação aos grupos ICV-C/C e CTRL	
Figura 38: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de	71
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ em CMSP	
de nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em	
comparação a indivíduos CTRL	
Figura 39: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de	72
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-L1+ nas	
CMSP dos pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL	
Figura 40: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de	72
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-L1+ em	
pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL	
Figura 41: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de	73
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-L1+ de	
pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL	
Figura 42: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de	74
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) em CMSP dos pacientes	
ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL. e controles	
Figura 43: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de	75
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) em CMSP de pacientes ICV-	
S/C e pacientes ICV-C/C em relação aos indivíduos CTRL	

Figura 44: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de	76		
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) em CMSP em cada			
subpopulação de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos			
indivíduos CTRL			
Figura 45: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de	77		
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ em CMSP			
de pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL			
Figura 46: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de	78		
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ nos			
pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL			
Figura 47: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de	79		
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) com expressão de PD-1+ em			
CMSP de cada subpopulação de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em			
comparação ao grupo de indivíduos CTRL			
Figura 48: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de	80		
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-L1+ em			
CMSP dos pacientes ICV-geral em comparação com os indivíduos do grupo			
CTRL			
Figura 49: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de	81		
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ em CMSP			
dos pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos			
CTRL			
	02		
Figura 50: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de	82		
imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ em CMSP			
dos pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos			
CTRL			

Figura 51: Porcentagem de Plasmoblasto (CD19+IgD-CD27+CD20-CD38+) em CMSP dos pacientes ICV-geral em comparação com o grupo de indivíduos CTRL.	83
Figura 52: Porcentagem de Plasmoblasto (CD19 ⁺ IgD ⁻ CD27 ⁺ CD20 ⁻ CD38 ⁺) em pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL	84
Figura 53: Porcentagem de Plasmoblasto (CD19+IgD-CD27+CD20-CD38+) em CMSP nos pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL	85
Figura 54: Porcentagem de Plasmoblasto (CD19+IgD-CD27+CD20-CD38+) com expressão de PD-1+ em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação aos CTRL	86
Figura 55: Porcentagem de Plasmoblasto (CD19+IgD-CD27+CD20-CD38+) com expressão de PD-L1+ em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação aos CTRL	86
Figura 56: Porcentagem de expressão de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe e plasmoblastos em CMSP dos indivíduos CTRL	88
Figura 57: Porcentagem de expressão de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe e plasmoblastos em CMSP dos pacientes ICV-geral	89
Figura 58: Porcentagem de expressão de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe e plasmoblastos em CMSP dos pacientes ICV-S/C	90

Figura 59: Porcentagem de expressão de PD-1 nas subpopulações de LB: LB	91
transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com	
troca de classe, e plasmoblastos em CMSP dos pacientes ICV-C/C	
Figura 60: Porcentagem de PD-1 nas subpopulações de linfócitos B: LB	92
transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com	
troca de classe e plasmoblastos em CMSP dos grupos ICV-geral e indivíduos CTRL	
CTKL	
Figura 61: Porcentagem de PD-1 nas subpopulações de linfócitos B: LB LB	93
transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com	
troca de classe e plasmoblastos em CMSP dos grupos ICV-S/C, ICV-C/C e	
indivíduos CTRL	
Figura 62: Porcentagem de LTFH (CD3+CD4+CXCR5+PD-1+) em CMSP de	94
pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL	
Figura 63: Porcentagem de LTFH (CD4+CXCR5+PD-1+) em CMSP de pacientes	94
ICV-S/C, pacientes ICV-C/C em comparação com o grupo de indivíduos CTRL	
Figura 64: Porcentagem de LTFH (CD3+CD4+CXCR5+) em CMSP dos pacientes	95
ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL	
Figura 65: Correlação da expressão de PD-L1 nos LB e frequência de LTFH. A.	95
pacientes com ICV-Geral; B. CTRL; C. pacientes com ICV-S/C; D. Pacientes	
ICV-C/C	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Defeitos monogênicos associados a ICV e principais características	6
Tabela 2: Critérios diagnósticos para ICV (ESID, 2014)	10
Tabela 3: Informações sobre lasers, espectro (nm) dos comprimentos de onda de excitação e de emissão dos fluorocromos conjugados aos anticorpos monoclonais utilizados	30
Tabela 4: Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados imunofenotipagem de superfície das subpopulações de linfócitos B e co-expressão das moléculas PD-1 e seu ligante PD-L1	32
Tabela 5: Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem de superfície dos LT _{FH} e a co-expressão da molécula PD-1	35
Tabela 6: Anticorpo monoclonal característico de viabilidade celular para exclusão de células mortas	36
Tabela 7: Características demográficas dos grupos controles saudáveis e pacientes com Imunodeficiência Comum Variável – ICV-geral	41
Tabela 8: Características demográficas dos grupos de pacientes ICV com infecções apenas, ICV com complicações não-infecciosas e controles saudáveis	42
Tabela 9: Infecções identificadas nos pacientes ICV-S/C e IV-C/C	43

RESUMO

Santos BAN. Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) com infecções de repetição [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Introdução: A Imunodeficiência Comum Variável (ICV) é uma síndrome de deficiência de anticorpos com patogênese heterogênea, na maioria desconhecida. Frequentemente, está associada ao desenvolvimento de bronquiectasias ao longo do tempo sendo que, cerca de 50% dos pacientes com ICV têm complicações não infecciosas secundárias como linfoproliferação benigna, doenças autoimunes e inflamatórias, neoplasias, que contribuem para maior morbidade e mortalidade. Estudos recentes mostram que a via PD-1/PD-L1 pode ter importância na resposta humoral, principalmente durante a sinalização entre linfócitos T_{FH} e linfócitos B, sendo que, quando alterada, pode levar a diminuição das células plasmáticas de vida longa e produção de anticorpos. Hipotetizamos que a expressão de PD-1 e seu ligante PD-L1 nas diferentes subpopulações de LB de pacientes com ICV e apenas infecções sem outras complicações (ICV-S/C) está alterada, interferindo na maturação dos plasmoblastos (PBL), que estão diminuídos nesses pacientes. **Objetivos:** avaliar a expressão destas moléculas nas subpopulações de LB dos pacientes com ICV-S/C, buscando correlacionar com as diferentes manifestações clínicas e imunológicas relacionadas à doença. Pacientes e Métodos: Foram coletadas amostras de sangue periférico de 69 pacientes portadores de ICV, sendo 14 deles ICV-S/C e 55 ICV com complicações não-infecciosas (ICV-C/C), além de 24 controles saudáveis. Avaliamos a expressão de PD-1 e PD-L1 nas diferentes subpopulações de LB por citometria de fluxo. Resultados: Pacientes ICV-S/C e ICV-C/C apresentaram frequência aumentada de linfócitos B transicional e de LB naïve quando comparados aos controles e frequência diminuída de LB de memória sem troca de isotipo e também de plasmoblastos. Ao avaliarmos os LB totais e de memória com troca de classe dos pacientes ICV. observamos uma diminuição significativa destes subtipos celulares quando avaliados de forma geral, no entanto, quando subdividimos os pacientes de acordo com o fenótipo clínico, percebemos que há diminuição significativa de linfócitos B totais apenas dos pacientes com complicações. Ao compararmos a frequência das subpopulações de LB nos pacientes ICV-S/C com os pacientes ICV-C/C observamos que não há diferenças significativas entre eles. Avaliando a expressão de PD-1, identificamos que essa molécula está reduzida nos LB totais dos pacientes com ICV e quando subdividimos entre pacientes sem complicações e com complicações, essa diferença se mantém apenas no grupo ICV-C/C. Nos subgrupos de LB apenas nos LB transicionais encontramos diferenças significativas da expressão de PD-1 comparada aos CTRL, estando aumentada em ambos os grupos de pacientes com ICV. Entre os subgrupos de ICV, ICV-S/C apresenta aumento da expressão de PD-1 nos LB de memória sem troca. A frequência de PD-L1 também apresentou alterações importantes, estando aumentada nos grupos ICV-S/C e CTRL em comparação aos ICV-C/C em LB totais, e também apresentou frequência menor nos pacientes ICV-C/C em relação aos controles nos LB naïve. Conclusões: A expressão de PD-1 e PD-L1 ocorre de maneira divergente entre os grupos de pacientes ICV-S/C, ICV-C/C e controles sugerindo que trata-se de perfis diferentes de pacientes, o que nos mostra a necessidade de esforços contínuos para entender como essa via se comporta na biologia e diferenciação das células B para a melhor compreensão da sua função na ICV.

Descritores: Imunodeficiência comum variável; Subpopulações de linfócitos B; Linfócitos T; Citometria de fluxo.

ABSTRACT

Santos BAN. Evaluation of the expression and function of PD-1 and its PD-L1 ligand in subpopulations of B lymphocytes in patients with Common Variable Immunodeficiency (ICV) with recurrent infections [thesis]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Introduction: Common Variable Immunodeficiency (CVID) is an antibody deficiency syndrome with heterogeneous pathogenesis, mostly unknown. Over time, it is often associated with the development of bronchiectasis, with approximately 50% of patients with CVID having secondary non-infectious complications such as benign lymphoproliferation, autoimmune and inflammatory diseases, neoplasms, which contribute to higher morbidity and mortality. Recent studies show that the PD-1/PD-L1 pathway may be important in antibody response, especially during signaling between T_{FH} and B cells, and when disturbed, it can lead to a decrease in long-lived plasma cells and antibody production. We hypothesized that the expression of PD-1 and its ligand PD-L1 in the different B cells subpopulations of CVID patients with infections only (CVID-IO) is altered, interfering with the maturation of plasmablasts (PBL), which are known to be decreased in these patients. Objectives: to evaluate the expression of PD-1/PD-L1 molecules in B cells subpopulations of CVID-IO patients, and correlate it with the different clinical and immunological manifestations related to this syndrome. Patients and Methods: Peripheral blood samples were collected from 69 patients with CVID, 14 of them CVID-IO and 55 CVID with non-infectious complications (CVID-WC), in addition to 24 healthy controls (HC). We evaluated the expression of PD-1 and PD-L1 in the different B cell subpopulations by flow cytometry. Results: CVID-IO and CVID-WC patients had an increased frequency of transitional and naïve B cells when compared to HC, and decreased frequency of unswitched memory B cells and also plasmablasts. A significant decrease was observed in total and switched memory B cells of CVID patients. however, when we subdivided patients according to clinical phenotype, we noticed that there was a significant decrease in total B cells only in CVID patients with complications. When comparing the frequency of B cell subpopulations in CVID-IO and CVID-WC, we observed that there were no significant differences between them. As for PD-1 expression, we identified that this molecule is reduced in the total B cells of CVID patients and when we divided them in patients with/without complications, only CVID-WC group presented a significant reduction. In B cells' subgroups, PD-1 expression was increased only in the transitional B cells compared to HC, being increased in both groups of CVID patients. Among CVID subgroups, CVID-IO showed increased expression of PD-1 in switched memory B cells. The frequency of PD-L1 also showed important changes, being increased in the CVID-IO and HC groups compared to CVID-WC in total B cells. PD-L1 expression in naïve B cells was also lower in CVID-WC patients compared to controls. Conclusions: The expression of PD-1 and PD-L1 differs among CVID-IO, CVID-WC and HC groups, suggesting that these groups represent different patient profiles, which reinforces the need for ongoing efforts to understand how this pathway behaves in B cell biology and differentiation to better understand its role in CVID.

Descriptors: Common variable immunodeficiency; B-lymphocytes subsets; T-lymphocytes; Flow cytometry.

1. INTRODUÇÃO

O Sistema Imune é o responsável pela defesa do organismo, com função de proteger o indivíduo da invasão de microorganismos¹. As células B atuam na linha de frente promovendo imunidade diante dos patógenos através das células B de memória e da secreção de anticorpos pelas células plasmáticas². Durante o desenvolvimento e diferenciação das células B ocorrem eventos de recombinação gênica com amplo espectro de especificidade para que o receptor de célula B (BCR) seja capaz de reconhecer qualquer antígeno. Somente as células B que expressam a porção não-autorreativa do BCR são toleradas e capazes de sobreviver³. A partir de então, os linfócitos B (LB) saem da medula óssea expressando dois isotipos de imunoglobulinas (Ig) chamadas de IgM e IgD. Ambos isotipos são expressos por meio de splicing alternativo e possuem especificidade idêntica. Ao haver o encontro com antígeno através do seu BCR, esses LB naïve que estavam em repouso, tornam-se ativados e subsequentemente passam a gerar uma resposta imune. A expansão clonal é fundamental para que a resposta das células B do Centro Germinativo (GC) seja funcional e produza uma quantidade ideal de células selecionadas capazes de garantir a memória imunológica. As vias e moléculas que controlam as respostas proliferativas são essenciais para modular a resposta imune que adquirimos por meio de contato com antígenos¹.

O defeito de um ou mais componentes do Sistema Imune podem induzir a patologias graves, que são coletivamente designadas como Imunodeficiências Primárias⁴ ou, mais recentemente, Erros Inatos da Imunidade (EII). Falhas do Sistema Imune podem envolver elementos da Imunidade Inata como fagócitos mononucleares, polimorfonucleares, células dendríticas, células Natural Killer (NK) e proteínas do Sistema Complemento, ou da imunidade adaptativa, como os linfócitos T (LT) e B, levando mais frequentemente a quadros de infecções de repetição, mas também, doenças autoimunes, alergias, doenças endócrinas e desenvolvimentos de tumores⁵.

1.1 Imunodeficiência Comum Variável (ICV)

A Imunodeficiência Comum Variável (ICV) foi descrita pela primeira vez em 1953 por Janeway et al.⁶, como um erro relacionado à imunidade, que se insere no grupo de deficiências predominantes de anticorpos e que, na grande maioria dos pacientes, resulta em infecções de repetição além de suscetibilidade aumentada a doenças autoimunes, inflamatórias e neoplasias⁶. É a imunodeficiência diagnosticada por exclusão de outras causas primárias e secundárias sintomática mais comum em adultos, caracterizada por hipogamaglobulinemia e reduzida/ausente capacidade de produção de anticorpos específicos^{6; 7; 8}. Esta imunodeficiência representa um grupo heterogêneo de doenças que têm a hipogamaglobulinemia como denominador comum, a maioria com etiologia desconhecida⁹, estabelecendo-se em qualquer faixa etária, porém com distribuição bimodal preferencial, com picos na infância em torno dos 10 anos, mas de forma mais prevalente, entre a segunda e terceira década de vida⁷. Homens e mulheres são afetados igualmente, entretanto, estudos mostram que existe uma predominância do sexo masculino (2:1) antes dos 11 anos, e esta diferença vai se tornando cada vez menos pronunciada até os 30 anos, e, após a terceira década de vida há um ligeiro predomínio do sexo feminino (1,3:1)^{10; 11}.

Não há dados precisos em relação à prevalência da ICV, entretanto, é estimado que ocorra entre 1 a cada 10.000 até 1 a cada 50.000 indivíduos⁵. A maioria dos pacientes manifesta a doença de forma esporádica, porém, entre 10-25% apresentam herança familiar, podendo ser autossômica dominante ou recessiva^{12; 13; 14}.

As manifestações clínicas mais comuns na ICV são as infecções bacterianas de repetição, especialmente no trato respiratório^{6; 7; 8} como sinusites, otites e pneumonias, causadas principalmente por bactérias encapsuladas como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*¹⁰.

Além destas, a ICV apresenta outras manifestações clínicas como autoimunidade, com ligeira predominância em mulheres, neoplasias e gastroenteropatia crônica com diarreia decorrente de infecções por microorganismos como *Giardia lambia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*, podendo inclusive levar à Síndrome de má-absorção; diarreia por intolerâncias alimentares ou diarreia decorrente de doenças inflamatórias intestinais. Entre 20% a 50% dos pacientes ICV desenvolvem algum fenômeno autoimune ou

doenças inflamatórias, sendo estas as manifestações clínicas não infecciosas mais comuns^{11; 15}.

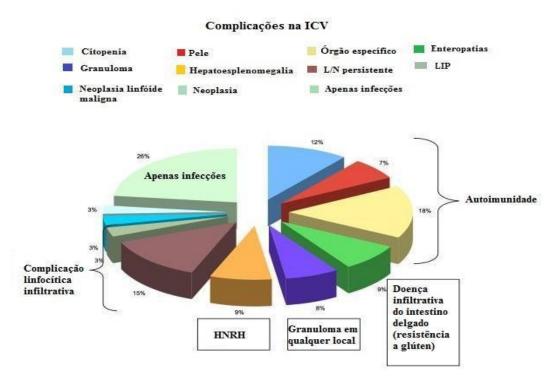


Figura 1: Características clínicas dos pacientes com ICV

Pacientes com ICV podem ter mais de uma complicação. [abreviações: L/N = Linfoadenopatia; LIP = Pneumonia linfocítica intersticial; HNRH = Hiperplasia nodular regenerativa hepática]. Modificado de: Chapel H, 2009¹⁶.

1.2 Imunidade Adaptativa na ICV

Diversos distúrbios celulares foram observados nos pacientes com ICV. A principal alteração encontrada nesses indivíduos está ligada aos linfócitos B (LB). Apesar da maioria dos pacientes apresentarem níveis normais de LB, alguns estudos reportaram diminuição da quantidade destes linfócitos em 40 a 50% dos acometidos, entre os quais, 10% apresentaram redução drástica ou até ausência destas células, levando provavelmente a uma progressão mais rápida e grave da doença¹⁷.

Os LB dos pacientes com ICV expressam um fenótipo característico de células imaturas, apresentando dificuldade na diferenciação para células efetoras e de memória¹⁵. Morbach *et al.*, 2010, estudando as subpopulações destas células, verificaram que a frequência de LB *naïve* e LB transitório diminuem consideravelmente no decorrer dos

anos em indivíduos saudáveis¹⁸, enquanto que, pacientes com ICV apresentam aumento da frequência destas duas subpopulações^{19; 20}, contudo, o aumento na população *naïve* estava relacionado à presença de linfadenopatia, dados que foram corroborados por Mouilot *et. al.*, 2010²¹.

Em indivíduos saudáveis observa-se, com o passar dos anos, aumento gradativo das subpopulações de LB de memória, já que no decorrer da vida as pessoas entram em contato com diversos microorganismos, desenvolvendo anticorpos eficazes contra eles, e assim gerando memória imunológica. O oposto ocorre nos pacientes com ICV, e está associado à deficiência de anticorpos e consequente suscetibilidade aumentada a infecções²².

A redução de LB de zona marginal (MZB) faz com que os pacientes com ICV sejam mais suscetíveis a infecções por *Streptococcus pneumoniae*, apresentem resposta deficiente à imunização contra pneumococos, e desenvolvam dano pulmonar progressivo^{22; 23}.

Outra subpopulação de LB cujas anormalidades foram associadas a manifestações clínicas foi a de plasmoblastos (PBL). Em 2007, Castigli *et al.*, ²⁴ verificaram considerável redução na frequência desta subpopulação em pacientes com ICV e Wehr *et al.*, 2008¹⁹ constataram uma correlação inversa entre autoimunidade e a frequência de PBL, pois os pacientes com redução deste subtipo de LB apresentavam maior prevalência de doenças autoimunes.

Na nossa coorte, Pedreschi *et al.*, 2014²⁵ também observou redução das células B de memória comutadas, entretanto, não verificou alteração de frequência das células B de zona marginal (MZBs). Ainda, constatou redução do número de plasmoblastos, mas sem correlação com a presença de autoimunidade. Notou também aumento da população de células CD21^{low} em pacientes do sexo feminino.

Alterações em linfócitos T também já foram descritas, sugerindo defeitos imunológicos combinados²⁶. Diversos estudos demonstraram falhas em linfócitos T (LT), como diminuição de LT *naïve*^{21;26;27}, defeitos envolvendo o efluxo tímico²⁸, diminuição da proliferação ao estímulo com antígenos específicos⁷, produção deficiente de citocinas, como IL-10, IL-17, IL-13, e IL-9^{29; 30}, aumento de apoptose³¹, redução na expressão de CD40L em LT ativados²⁷, diminuição de células T_{reg}^{32; 33; 34; 35; 36}, aumento crônico da ativação de LT CD4⁺²¹, entre outros. Também já foram descritos defeitos na diferenciação, maturação e função de células dendríticas (DCs) e monócitos^{37; 38}. A

ausência ou falha na interação dos LT e células fagocitárias com os LB resulta na ativação ineficiente e insuficiente produção de anticorpos específicos, o que contribui para o perfil deficiente dos LB nestes pacientes^{31; 36}.

Em nosso grupo, Paquin-Proulx *et al.*, 2013 e Barsotti *et al.*, 2016 também observaram redução de células Treg nos pacientes com ICV^{39; 40}. Ainda, Barsotti *et al.*, notaram a redução de células B reguladoras produtoras de IL-10 (B10). E embora as células B10 desempenhem um papel vital na expansão de Treg, não foi observada uma frequência alta destas células em nossa coorte⁴⁰. Outro dado interessante, referente aos pacientes estudados, e apontado por Paquin-Proulx *et al.*, 2014, foi o persistente quadro de ativação e exaustão de LT em pacientes recém diagnosticados com ICV sem tratamento com IGIV. Foi observado ainda o aumento da expressão de moléculas inibitórias, como PD-1 e CTLA-4 em LT CD4⁺ nestes pacientes⁴¹.

Alterações na frequência de células T foliculares (LT_{FH}), que são essenciais para auxiliar o LB na troca de classes de imunoglobulinas, produzir células plasmáticas e gerar LB de memória tem sido descrito em diversos estudos^{42; 43; 44}. Coraglia *et al.*, 2016 estudaram as características e funções dessas células em pacientes com ICV e relataram aumento da expressão delas nos pacientes em relação aos indivíduos saudáveis, tendo sido observado inclusive o aumento da coexpressão das moléculas CXCR5 e PD-1⁴².

1.3 Fatores genéticos relacionados à ICV

Os defeitos monogênicos associados ao fenótipo de ICV, apesar de serem observados numa menor porcentagem dos pacientes, têm se expandido rapidamente, sendo estimado em algumas coortes entre 30% e 50%, dependendo da população estudada e do rigor do diagnóstico da ICV^{45; 46}.

Análise de exoma completo e do genoma inteiro destes pacientes são importantes para descobrir alterações genéticas, contudo, mais da metade dos pacientes com ICV ainda não tem um diagnóstico molecular definido. Apenas 10 a 20% dos pacientes têm histórico familiar positivo, enquanto a maioria dos casos ocorre esporadicamente^{9; 45}.

Os primeiros defeitos monogênicos descritos em pacientes ICV são autossômicos recessivos (*ICOS*, *CD19*, *CD20*, *CD21*, *CD27*, *CD81*, *IL-21*, *IL-21-R*, *LRBA*, *PRKCD*, *RAC2*), geralmente associados à consanguinidade. Mutações bialélicas em genes como

TACI (*Transmembrane Activator and CAML Interactor*) e BAFF-R (*B cell activating factor receptor*), ADA (*adenosine deaminase*, RAG1 e RAG2 (*Recombination activating* gene 1 *and* 2) também podem levar ao quadro de ICV. Defeitos autossômicos dominantes (*TNFSF12, CTLA-4, PLCG2, NFKB1, NFKB2, PIK3CD, PIK3R1, VAV1, BLK, IKZF-1 e IRF2BP2*) que levam ao quadro de hipogamaglobulinemia também vêm sendo descritos ultimamente^{45; 46; 47}.

Muitos dos genes identificados nos fenótipos de ICV podem ser associados a outras síndromes ou distúrbios, mas não necessariamente são responsáveis por levar à hipogamaglobulinemia, inclusive algumas mutações como no gene TACI que estão presentes em 10% dos pacientes com ICV também podem ser encontradas em 1% dos indivíduos saudáveis^{9; 45; 47}.

Todas as mutações encontradas podem influenciar diretamente na diferenciação dos linfócitos B e também nas manifestações clínicas desses pacientes, podendo estar relacionadas com fatores ambientais e causas epigenéticas⁴⁵. Os principais defeitos genéticos já descritos e suas características podem ser observados na **Tabela 1**^{47; 48}.

Tabela 1 – Defeitos monogênicos associados a ICV e principais características

Gene	Características clínicas	Características laboratoriais
CD19	Infecções respiratórias recorrentes	Nível baixo de IgG e IgA, não responde bem a vacinas, LB normais e poucos LB de memória
CD20	Infecções respiratórias recorrentes	Nível baixo de IgG, não responde bem a vacinas, LB normais e poucos LB de memória com troca de isotipo
CD21	Infecções respiratórias recorrentes e diarreia	Nível baixo de IgG, responde bem a vacinas, LB normais e poucos LB de memória com troca de isotipo
CD27	Infecção por EBV associado a distúrbios linfoproliferativos, linfoma e alguns casos sinusite recorrente	\mathcal{E}

CD81	Infecções respiratórias recorrentes, Púrpura de Henoch-Schönlein, PTI	Nível baixo de IgG e IgA, não responde bem a vacinas, LB normais e poucos LB de memória
CTLA-4	Autossômica dominante, infecções respiratórias, diarreia, infiltrado em órgãos linfóides, autoimunidade	Nível baixo de IgG e IgA, não responde bem a vacinas, LB totais diminuídos e poucos LB de com troca de isotipo
ICOS	Infecções respiratórias recorrentes, infecções gastrointestinais, autoimunidade em alguns	Nível baixo de IgG e IgA (IgM em alguns casos), não responde bem a vacinas, poucos LB totais, poucos LB de memória e baixa função efetora de LT CD4/CD8
IL21	Infecções respiratórias recorrentes, Cryptosporidium, outras infecções bacterianas/ virais	Nível baixo de IgG, nível alto de IgE, não responde bem a vacinas, poucos LB, poucos LB de memória, pouca produção de citocinas por LT, baixa citotoxicidade de células NK
IL21R	Infecções respiratórias recorrentes, DII	Nível baixo de IgG, nível alto de IgE, não responde bem a vacinas, poucos LB, poucos LB de memória, baixa resposta de LT a antígenos
LRBA	Infecções respiratórias recorrentes, enteropatia, citopenias autoimunes	Nível baixo de IgG, IgA e IgM, não responde bem a vacinas, poucos ou normais LB totais, poucos LB de memória com troca de isotipo
NFKB2		Em alguns casos: nível baixo de IgG, IgA e/ou IgM, não responde bem a vacinas, LB normais e poucos LB de memória
PIK3CD	Autossômica dominante ou recessiva, infecções respiratórias recorrentes, autoimunidade, linfoma de células B	Nível baixo de IgG e IgA , IgM aumentada, não respondem bem a vacinas, poucos LT e LB, poucos LB de memória com troca de isotipo, muitos LB transicionais
PIK3R1	Autossômica dominante ou recessiva, infecções respiratórias recorrentes, Linfoma de células B, atraso no desenvolvimento neurológico	Nível baixo de IgG e IgA, IgM aumentada

RAC-2 Infecções respiratórias Nível baixo de IgG, IgA e IgM, não recorrentes, glomerulonefrite responde bem a vacinas, poucos/normais pós-estreptocócica, tireoidite autoimune LB, poucos LT naïve **TWEAK** infecções Autossômica dominante. Nível baixo de IgG e IgA, não produz anti-pneumocócico respiratórias recorrentes, meningite anticorpo meningocócica, verrugas responde bem a vacinas, poucos/normais LB totais e poucos LB de memória, neutropenia, trombocitopenia Autossômica recessiva, manifestações Nível baixo de IgG e IgM BAFF-R clínicas diversas NFKB1 Autossômica dominante, infecções Nível normal ou baixo de IgG, IgA e IgM, normal ou pouco LB, pouco LB de sinopulmonares recorrentes, DPOC, **EBV** associado a distúrbios memória linfoproliferativos, citopenias autoimunes, alopecia, e tireoidite autoimune NFKB2 Autossômica dominante, Nível baixo de IgG, IgA e IgM, poucos infecções sinopulmonares recorrentes, alopecia, endocrinopatias IKZF1 Autossômica infecções Nível baixo de IgG e IgA e/ou IgM dominante, recorrentes, LLA LRBA Autossômica recessiva, DPI, Nível baixo de IgG e IgA autoimunidade, doença inflamatória intestinal, endocrinopatias em alguns pacientes IRF2BP Autossômica dominante, infecções Hipogamaglobulinemia recorrentes, Colite MOGS Autossômica recessiva, infecções virais Hipogamaglobulinemia e bacterianas, distúrbios neurológicos severos, hipotonia, convulsões, características dismórficas **PTEN** infecções Nível baixo de IgG e IgA Autossômica dominante, recorrentes. síndrome de Cowden. macrocefalia TRNT1 Autossômica recessiva, anemia Nível baixo de IgG, IgA e IgM, sideroblástica congênita, surdez, atraso Linfopenia B no desenvolvimento

Autossômica recessiva, infecções Hipogamaglobulinemia por produção recorrentes virais e bacterianas, deficiente de anticorpo tricorrexis nodosa
 ATP6AP Autossômica dominante, Hepatopatia, Hipogamaglobulinemia anormalidades neurocognitivas

PLCG2 Autossômica dominante, urticária a Nível baixo de IgG e IgA, poucos LB, frio, lesões cutâneas, pneumonite produção deficiente de anticorpos intersticial inespecífica

Modificado de Bonilla *et al.*, 2016; Picard C, Gaspar HB, AL-Herz W, et al.,2018. [Abreviações: EBV= Vírus Epstein Barr; DII = Doença inflamatória intestinal; PTI = púrpura trombocitopênica idiopática; NK = células assassinas naturais]; DPOC = Doença pulmonar obstrutiva crônica; LLA = Leucemia linfoblástica aguda; DPI = Doença pulmonar intersticial³⁷.

1.4 Critérios diagnósticos e classificação fenotípica da ICV

Os critérios diagnósticos da ICV estabelecidos em 1999 por Conley et al.,³ foram revisados em 2009, por Chapel & Cunningham-Rundles: paciente homem ou mulher com idade igual ou acima de 4 anos; níveis séricos de IgG < 4,5 g/L para adultos ou menor que percentil 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 das outras causas conhecidas de falha na produção de imunoglobulinas¹⁶.

Entretanto, Ameratunga *et al.* 2013 propôs novos critérios de diagnóstico da ICV onde, além das características já estabelecidas anteriormente também se acrescentam critérios como sequelas que podem ser atribuídas à deficiência imunológica, evidências laboratoriais que reforçam a hipótese de ICV ou a presença de marcadores histológicos relativamente específicos para ICV⁴⁹.

A ESID em 2019⁵⁰ adaptou os critérios de diagnósticos para ICV, conforme apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Critérios diagnósticos para ICV (ESID, 2019)

Critérios para provável diagnóstico clínico

Sugestão para diagnóstico clínico alternativo

Deve atender ao menos um:

- Susceptibilidade aumentada infecções
- 2. Manifestações autoimunes
- 3. Doença granulomatosa
- 4. Linfoproliferação policional inexplicável
- deficiência de anticorpos
- Diminuição dos níveis séricos de IgG e IgA, podendo ou não ser acompanhada da diminuição de IgM (< 2 desvios padrão da média para idade)
- Pacientes menores de 4 anos devem ser considerados como "Deficiência de anticorpos não-classificada"
- **Pacientes** com evidência Ter algum membro da família com deficiência profunda de células T devem ser considerados "Imunodeficiência como Combinada não-classificada"

E ao menos um dos seguintes:

- Resposta prejudicada a vacinas e/ou ausência de isohemaglutininas
- Redução de células B de memória (< 70% da média para idade)
- E exclusão de outras causas para hipogamaglobulinemia
- E diagnóstico pode ser estabelecido após os 4 anos de idade, entretanto, os sintomas podem aparecer antes

E nenhuma evidência de deficiência profunda de células T, definidas como as seguintes:

- CD4 (cél/mL): 2 a 6 anos < 300, 6 a 12 anos < 250, > 12 anos < 200
- %CD4 naïve: 2 a 6 anos <25%, 6 a 16 anos <20%, >16 anos <10%
- Ausência de proliferação de células T.

Adaptado de: Sociedade Européia de Imunodeficiências (ESID) registrado em 2019.

Em 2008, o grupo multicêntrico europeu realizou um estudo com 303 pacientes com ICV a fim de estabelecer um consenso entre as duas classificações existentes com base na fenotipagem de células B através da citometria de fluxo (classificação de Freiburg e Paris), propondo a classificação EUROclass, sendo as células B fenotipadas pela expressão de CD19, IgD/IgM, CD27, CD21 e CD38, onde os pacientes com mais de 1% de células B circulantes (B⁺, cerca de 90% dos pacientes) foram diferenciados daqueles com menos de 1% de células B circulantes (B⁻, menos de 10% dos pacientes)^{9; 19}. Neste estudo, Wehr *et al.*, 2008, dividiram os linfócitos B circulantes em até seis subpopulações diferentes para análise e a distribuição dessas subpopulações, diferenciando as células B antígeno-dependentes e antígeno-independentes, sendo possível diferenciar células B *naïve* (IgM+IgD+CD27-) de células B de zona marginal – MZB (IgM+IgD+CD27+) e de células B de memória com troca de isotipo - SMB (IgD-CD27+), células B transitórias (CD38high IgMhigh) de células B ativadas (CD21lowCD38low) e de plasmoblastos com troca de isotipo – PBL (CD38+++IgM-). Uma observação importante foi a frequência maior de LB CD21low em pacientes com ICV, considerada uma população de célula B imatura, em relação a indivíduos saudáveis, sendo este aumento relacionado à maior prevalência de esplenomegalia e granulomatose^{9; 19}.

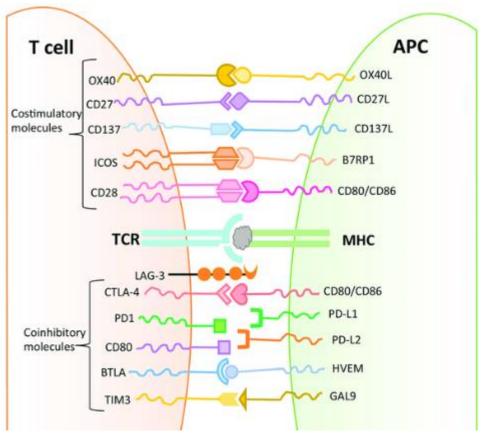
Por conta da variedade de manifestações clínicas e imunológicas descritas em pacientes com ICV, Chapel *et al.*, 2008 propuseram a divisão dos pacientes em cinco fenótipos clínicos: a) sem complicações (apenas infecções de repetição); b) presença de autoimunidade; c)doença linfoproliferativa benigna; d) enteropatia; e) presença de linfoma. Jolles *et al.*, 2012⁴⁰ propuseram os seguintes subgrupos: a) sem complicações (apenas infecções de repetição), b) citopenias (trombocitopenias, anemia hemolítica e neutropenias), c) pacientes com linfoproliferação policlonal (granulomas, pneumonia linfocítica intersticial, linfadenopatia persistente inexplicável) e d) enteropatias não-explicadas⁶. Na nossa coorte, Pedreschi *et al.*, 2014 ³⁷ também observaram redução das células de memória comutadas, entretanto, não observaram alteração de frequência das MZBs²⁵. Em um estudo anterior realizado em 2011 Pedreschi *et al.*, observaram redução do número de plasmoblastos, mas sem correlação com a presença de autoimunidade e, em relação as células CD21^{low}, constatou um aumento desta população nos pacientes com ICV, mas apenas no sexo feminino⁵¹.

Mais recentemente, em 2015, Abbott *et al.*, dividiram clinicamente os pacientes entre: portadores de doenças hepáticas, doenças intestinais, doenças pulmonares, citopenias, doenças linfoproliferativas e malignidade⁵². Por último, Bonilla *et al.*, 2016 sugere a divisão em dois grupos: os com infecções apenas e os que apresentam complicações não-infecciosas; uma vez que o primeiro grupo tem comportamento semelhante a indivíduos normais e o segundo tem risco de morte onze vezes maior⁴⁷.

1.5 Via de sinalização PD-1/PD-L1

A família de coestimuladores CD28/B7 é uma das mais importantes para formar e regular as respostas imunes adaptativas, sendo composta pelos sinais positivos de CD28 e coestimulador indutível de célula T (ICOS) e pelos sinais negativos de proteína 4 associada a linfócito T citotóxico (CTLA-4), proteína de morte celular programada 1 (PD-1) e atenuador de linfócito T e B (BTLA). Esses sinais são conhecidos principalmente pelo seu papel regulador na ativação dos linfócitos T, entretanto, também estão envolvidos em outros aspectos do sistema imune adaptativo, como na diferenciação de linfócitos, maturação, adesão, quimiotaxia e produção de citocinas⁵³ conforme demonstrado na **Figura 2**⁵⁴.

Figura 2: Moléculas coestimulatórias responsáveis por regular positiva ou negativamente a resposta imune.



As moléculas supressoras são representadas por LAG3, TIM-3, PD-1 e CTLA-4 e seus respectivos ligantes B7-H3 ou H4, Galectina 9, PD-L1 ou PD-L2 e B7-1 ou B7-2. As moléculas estimuladoras são representadas por CD28, ICOS, HVEN, OX40, 41BB, CD40L e seus respectivos ligantes B7-1-B7-2, ICOS-L, LIGHT, OX40L, 41BBL e CD40.

Adaptado de: Agrawal et al., 2018.

PD-L1 é expresso em LB, LT, DC, macrófagos, e em células endoteliais, epiteliais, musculares e trofoblásticas, enquanto PD–L2 em linfócitos B1. O papel destes ligantes nos LB ainda é pouco estudado, sendo a maioria das pesquisas voltadas para interação de células T com células dendríticas. Curiosamente, PD-1 é altamente expresso em linfócitos T_{FH}, que são essenciais na interação com LB para a formação do GC, expansão e troca de classe de imunoglobulinas^{53; 55}.

Segundo trabalho de Thibult *et al.*, 2013, PD-1 é expresso em todas as subpopulações de LB no sangue periférico e linfonodos, desde LB *naïve* até mais fortemente expresso nos LB de memória IgM, entretanto, a expressão de PD-1 é muito reduzida nos LB do Centro Germinativo. Esta importante observação sugere que a expressão de PD-1 necessita ser "desligada" no Centro Germinativo para permitir que ocorra a proliferação de LB e o processo de seleção de outros LB de memória. Do ponto de vista funcional, há evidências de que PD-1 é uma nova molécula inibidora da ativação de linfócitos B humanos. Em particular, este estudo mostrou que o PD-1 agrupado com o BCR em resposta ao estímulo de *Toll-Like Receptor 9* (TLR9), ocasionou numerosos efeitos inibitórios sobre o processo de ativação de LB. De fato, algumas doenças causam danos irreversíveis devido a respostas imunológicas exacerbadas, tais como infecção pelo Vírus Sincicial Respiratório (VSR) em crianças pequenas, doenças alérgicas ou doenças autoimunes. Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que PD-1 é um outro inibidor da ativação de LB mediada por ligantes do tipo *Toll-Like Receptor* (TLR)⁵³.

A via de sinalização PD-1/PD-L1 está sendo objeto de intensa pesquisa, já que um maior entendimento e uma adequada manipulação destas novas vias coestimuladoras levariam à criação de estratégias para modular a resposta imune, uma vez que PD-1/PD-L1 é capaz de modular as respostas de linfócitos T e B previamente ativados bloqueando a proliferação antígeno específica, produção de citocinas e função citolítica^{53; 56}.

Em especial nas doenças malignas, demonstrou-se que o aumento da expressão de PD-L1 pode permitir que as células cancerígenas escapem do sistema imune. Neste contexto, existem inúmeros inibidores de PD-L1 em desenvolvimento e alguns já em uso na prática clínica^{53; 57}.

Em 2010, Good-Jacobson *et al.* relataram que PD-1 e seus ligantes tinham um papel desconhecido na regulação da resposta humoral primária e que o efeito mais proeminente na ausência PD-1 era a diminuição das células plasmáticas de vida longa. Eles utilizaram camundongos com deficiência de PD-1 ou em PD-L1 e/ou PD-L2 juntamente com a

transferência de células da medula óssea para delinear as principais interações e requisitos celulares para a regulação da resposta, e seus resultados mostraram o envolvimento de PD-1 nas células T e de PD-L1 e/ou PD-L2 nas células B para a formação das células plasmáticas de vida longa⁵⁵.

Na **figura 3**, ilustra-se como esta via de sinalização pode influenciar na produção de anticorpos e células plasmáticas⁵⁸.

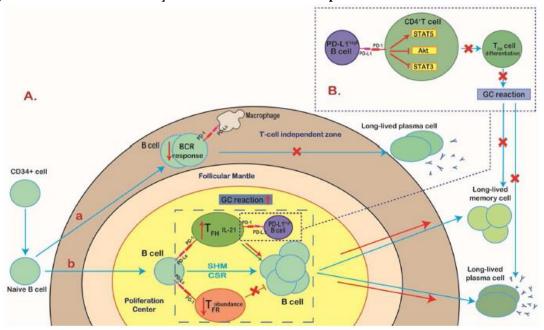


Figura 3: Influência da sinalização da via PD-1/PD-L1 na resposta humoral.

A.(a) PD-1 é altamente expresso em LB *naïve*. Na imunidade humoral independente de células T, a ativação da sinalização desta via inibe a resposta do BCR e, portanto, suprime a expansão dos linfócitos B1 e a subsequente produção de IgG de longa duração. (b) em contraste nítido com a resposta imune inata, a sinalização por PD-1 atua como um promotor, pelo menos parcialmente, da imunidade humoral dependente de célula T. Tanto as células T_{FH}, como as T_{FR} expressam PD-1. As células T_{FH} são especializadas em auxiliar as reações do GC, enquanto as células T_{FR} servem para inibir as funções das T_{FH}. No centro de proliferação, a ligação de PD-1 com PD-L1 expressos nos LB reduz profundamente a abundância de células T_{FR} e aumenta o nível de IL-21 produzido por células T_{FH}, levando a uma melhor reação do GC e consequentemente a uma melhor formação de células plasmáticas de vida longa e LB de memória. **B.** Entretanto, um subtipo de LB que expressa elevados níveis de PD-L1 pode suprimir as funções de células T_{FH} de maneira dependente de PD-L1. Os LB que expressam elevados níveis de PD-L1 limitam a diferenciação de LT CD4⁺ para T_{FH} por autoregulação de STAT5 e inibição de Akt e STAT3, e portanto diminui as reações do GC, reduzindo consequentemente a resposta humoral dependente de célula T. Adaptado de XIA *et al.*, 2016.

No estudo de Good-Jacobson *et al.*, 2010, apesar de reduzidas, as respostas de plasmócitos não estão ausentes na falta de sinalização por PD-1, indicando que a interação entre PD-1 e seus ligantes controla o decorrer da resposta, entretanto, não é o único responsável pela resposta de produção de anticorpos. Ainda, eles sugerem que a produção

de resposta humoral quantitativa e qualitativa ocorre de forma integrada pelas moléculas responsáveis pelos sinais de sobrevivência e diferenciação nos linfócitos B do GC, como PD-1 e IL-21⁵⁵.

Cubas *et al.*, 2013, notaram que na interação dos LB e células T_{FH} no centro germinativo de pacientes com HIV, ocorria um aumento da expressão de PD-1 em células T_{FH}, que resultava na inibição da proliferação e ativação celular, além da inibição da atividade de ICOS, afetando outros fatores de transcrição e reduzindo a secreção de citocinas importantes como IL-4 e IL-21⁴⁴. Consequentemente, a diferenciação terminal de LB em células plasmáticas e produção de imunoglobulinas estaria prejudicada⁵⁹. Ainda, descreveram que a suplementação com IL-21 pode restaurar e melhorar a produção de anticorpos e que o bloqueio da via PD-1/ PD-L1 através de um ensaio de coculturas de linfócitos T_{FH} com células B restaura significativamente a produção de IgG. Contudo, em indivíduos sem infecção não houve melhora na produção de anticorpos⁴⁴.

BAFF BAFF Or APRIL

Baff Bells

CD4' T cell

CD5TATS

CCD4' T cell

CD5TATS

CD5TATS

CXCR5

Figura 4: Efeito da Via PD-1/PD-L1.

Essa via funciona regulando a resposta imune negativamente, suprimindo a proliferação, ativação, sobrevivência e expressão de ICOS, consequentemente afeta os sinais de transcrição de c-MAf e reduz a expressão de IL-21 e IL-4 que são citocinas importantes para prevenir a apoptose e induzir a sobrevivência de linfócitos B, sua diferenciação e proliferação, consequentemente reduzindo a quantidade de células plasmáticas e anticorpos.

Adaptado de: Khan et al., 2014.

Khan *et al.*, 2015 demonstrou que a expressão de PD-L1 em células Breg pode exibir um papel importante na resposta humoral através da supressão de linfócitos T_{FH}⁵⁹.

1.6 Linfócitos T_{FH} e a Imunodeficiência Comum Variável

Os linfócitos B de memória (células de vida longa) se desenvolvem durante a resposta imune, após contato com antígenos e consequente expansão clonal e diferenciação dos linfócitos. Tais células de memória garantem certa proteção quando há um novo contato com o antígeno, possibilitando uma resposta qualitativa e quantitativamente maior e mais rápida, comparada àquela originada pelas células *naïve*⁵¹.

Células T foliculares (T_{FH}) são um subtipo de LT CD4⁺ que migram para o centro germinativo para auxiliar no direcionamento da maturação e diferenciação de LB no GC. No início, eram identificadas pela expressão da quimiocina CXCR5. Posteriormente, identificou-se que estas células também podem expressar ICOS, PD-1 e IL-21, além de BCL-6, que é o fator de transcrição mais importante para geração destas células^{60; 61}.

Normalmente, o padrão de receptores de quimiocinas, expressos funcionalmente, costuma ser próprio de populações de células T. Já foi comprovado que CXCR5 costuma ser visto em células T situadas em GCs e folículos, que dizem respeito a moléculas coestimulatórias (CD40L, ICOS), essenciais à maturação e à sobrevivência das células B^{62;}

Esse co-estimulador induzível (ICOS) é essencial às células T_{FH}. Tanto humanos, quanto camundongos com deficiência de ICOS apresentam redução significativa da função reguladora na ativação dos LT do GC e de células T_{FH}. Assim, os fatores mediados por ICOS são imprescindíveis a estas células. São fornecidos por células dendríticas na zona de células T, induzindo estas a expressarem Bcl-6, um repressor transcricional fundamental para estas células T_{FH}. O ICOS também atua como uma molécula coestimuladora crítica na indução da produção de IL-21 pelas células T_{FH}. O receptor imune inibitório PD-1 é igualmente expresso em células T_{FH} e parece regular a atividade destas células nos GCs^{62; 64; 65}.

As células T CD4⁺, além de dar uma resposta de GC em órgãos linfoides secundários, também são úteis às células B em locais extrafoliculares, induzindo a

diferenciação de células B em células plasmáticas. Com isso, há uma contribuição importante para a geração precoce de anticorpos específicos, após o desafio antigênico. Estas células T auxiliares $CD4^+$ extrafoliculares costumam compartilhar os mecanismos de desenvolvimento, fenótipos e de propriedades funcionais com células T_{FH} . São, assim, considerados como pertencentes à linhagem T_{FH}^{65} .

As células T CD4⁺CXCR5⁺ do sangue humano correspondem a um compartimento de memória circulante de células da linhagem T folicular auxiliar (T_{FH}). Determinados estudos têm demonstrado que as células T_{FH} de memória do sangue costumam ser formadas fenotipicamente e funcionalmente por subconjuntos distintos. Estas células T_{FH} são essenciais para o entendimento da patogênese de doenças autoimunes e do modo de ação das vacinas^{62; 64; 65}.

Localizadas nas citocinas expressas, as células T CXCR5 não entram na classificação Th1/Th2, mas fazem parte de um subconjunto associado às células B. Considerando que tais células apresentam todas as características requeridas à manutenção das células B nos folículos linfóides, estas podem ser denominadas de "células T auxiliares B foliculares (T_{FH})"⁶².

As células T foliculares (T_{FH}) desempenham um papel imprescindível na imunidade protetora, auxiliando as células B na produção de anticorpos contra patógenos estranhos. Estão localizadas nos órgãos secundários linfóides (SLOs), incluindo a tonsila, o baço e os gânglios linfáticos. Tais órgãos possuem inúmeros linfócitos, separados em zonas de células T e B. No entanto, são vistos interagindo, na maior parte do tempo, com células B. Além de estarem presentes em SLOs, as T_{FH} também podem ser encontradas na circulação $^{62; 63; 64; 65}$.

As células T_{FH} exercem uma função vital também na formação de centros germinativos, que são estruturas diversas localizadas dentro das zonas de células B de SLOs no decorrer de uma resposta imune contínua $^{62; 63; 65}$.

Essas células são indispensáveis para a geração de células B de alta afinidade através da reação do centro germinativo. Células T_{FH} podem ser encontradas em GCs nos órgãos linfóides e dispõem de diversos recursos associados às suas funções auxiliares. O ligante de CD40 (CD40L) na superfície deste tipo de células possibilita o envio de sinais para as células B, por meio do CD40, e induz as células B na diferenciação e na comutação de classe. A proteína relacionada a SLAM do adaptador de sinalização (SAP) possui um

papel fundamental nas interações de células T e B estáveis, necessárias à célula T_{FH} $^{62; 63; 64; 65}$

Dentro de GCs, as células B costumam ser conhecidas como células GC B e costumam se multiplicar rapidamente, além de apresentarem grande diversificação de anticorpos. GCs se constituem ainda no ambiente em que essas células B são divididas entre células plasmáticas secretoras de anticorpos e células B de memória que possibilitam a produção de anticorpos de longa duração^{63; 64}.

Tal processo de divisão das células é conduzido pelas T_{FH}, que fornecem diretamente a co-estimulação para as células B, por meio da molécula co-estimuladora CD40 interagindo com o ligante de CD40 (CD40L) e pela produção da citocina IL-21, que leva à proliferação de células B. Normalmente a produção por T_{FH} pode definir qual tipo de anticorpo será produzido. Há uma forte correlação entre T_{FH} e as células GC B. No entanto, na ausência de T_{FH}, GCs costumam não se formar, podendo ser observados possíveis defeitos de anticorpos^{62; 63}.

Geralmente as T_{FH} são determinadas pelo fator de transcrição, pelos linfomas de células B 6 (Bcl-6) e por uma série de células determinantes de superfície, incluindo CXCR5, PD1 e ICOS. O processo de diferenciação de T_{FH} inclui diferentes etapas. A primeira delas diz respeito à zona de células T dos SLOs^{62; 63}.

Devido à dificuldade de se estudar os tecidos linfóides, pesquisadores têm investido em estudar um subtipo circulante de células T CD4⁺ de memória que se assemelham parcialmente às células T_{FH} presentes nos linfonodos, sendo nomeadas como células T_{FH} periféricas (pT_{FH}). Essas células são caracterizadas pela expressão de CXCR5 e IL-21 durante interação com as células B. Diferentemente das células T_{FH} convencionais, as pT_{FH} expressam somente moderados níveis de PD-1 e BCL-6, entretanto, apresentam semelhança na capacidade de aumentar a expressão de ICOS e CD40L através de estimulação por antígenos⁶⁶.

Inicialmente as células T CD4⁺ naïve reconhecem através de seu receptor de células T (TCR) peptídeos de proteínas apresentados pelo MHC de classe II por células dendríticas (DCs). Isso, junto com a estimulação adicional por meio da molécula coestimuladora, ICOS-L, e a produção de citocina IL-6 por DCs fornece sinais para a Célula T CD4⁺ expressar Bcl-6 e se comprometer com a linhagem T_{FH}. A produção de T_{FH} costuma demonstrar o receptor de quimiocina CXCR5 e regular negativamente o

receptor de quimiocina CCR7, possibilitando que as células migrem em direção à zona de células B.

Na zona das células T e B fronteiriças, a coestimulação TCR e ICOS-L é entregue às células B ativadas, levando ao desenvolvimento de Tfh para expressar níveis mais altos de CXCR5, ICOS e PD1 e migrar para a zona B da célula. Em algumas situações, as Tfh auxiliam no desenvolvimento de GCs completos. As T_{FH} diferenciadas dentro do GC costumam ser denominadas de GC T_{FH} e expressam o nível mais alto de CXCR5, PD1 e ICOS.

Normalmente as células CXCR5 CD4, quando direcionadas a folículos de células B, demonstram ICOS, CD154 e IL-10⁶⁷. Como consequência, ao co-cultivar células T tonsilares, classificadas como células B, é possível analisar a produção de Ig apenas dentro da fração CXCR5, identificando, assim, esta população de células como as células T_{FH} clássicas^{68; 69}.

A função T_{FH} demonstrou ser desregulada em casos onde há uma quantidade de doenças de anticorpos em excesso ou insuficiente. Em determinados experimentos, foram evidenciados aumentos de T_{FH} circulantes no sangue de pacientes com doenças autoimunes, incluindo lúpus sistêmico eritematoso e artrite reumatóide⁷⁰. Em pacientes com imunodeficiência comum variável, causada pela deficiência ICOS, houve redução severa de T_{FH} circulante e maiores defeitos na geração de anticorpos⁷¹.

Por fim, alguns defeitos na função de T_{FH} às células B foram analisados em pacientes infectados com HIV e contribuem para a incapacidade dos pacientes, na produção de anticorpos específicos para a eficácia contra a doença⁴⁴.

Diferentes experimentos têm comprovado a ocorrência de alterações imunológicas no compartimento de célula T em pacientes com ICV. Nota-se certa associação entre o fenótipo clínico analisado em determinados pacientes e os componentes e a função dessas células^{42;72}.

2. JUSTIFICATIVA

Pacientes com ICV apresentam níveis reduzidos de linfócitos B comutados e níveis reduzidos ou ausentes de plasmoblastos por conta de um distúrbio na diferenciação terminal de linfócitos B. As observações recentes indicam que a via PD-1/PD-L1 podem influenciar na diferenciação de linfócitos B, sugerindo uma necessidade de estudo desta via nesses pacientes.

Por ser uma doença complexa e heterogênea, buscamos homogeneizar o grupo de pacientes a ser estudado, e optamos por focar nos pacientes com ICV que apresentam apenas infecções de repetição, e utilizamos o grupo de pacientes com ICV com complicações não infecciosas, além de indivíduos saudáveis caracterizados como controles.

O estudo do envolvimento da via PD-1/PD-L1 nos pacientes com ICV pode melhorar a compreensão dos mecanismos desta doença e sugerir possíveis novas formas terapêuticas a serem aplicadas.

3. HIPÓTESE

A expressão das moléculas PD-1/PD-L1 nos diferentes subtipos de linfócitos B está alterada em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável, interferindo na diferenciação terminal destas células, levando a uma falha na produção de anticorpos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Avaliar a expressão de PD-1 e PD-L1 nas diferentes subpopulações de linfócitos B de indivíduos com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) e que apresentam apenas infecções de repetição e comparar a pacientes com ICV e manifestações não infecciosas e também controles normais.

4.2 Objetivos Específicos:

- Estudar a expressão de PD-1/PD-L1 nas diferentes subpopulações de linfócitos B e identificar possíveis alterações que justifiquem falhas na diferenciação terminal de linfócitos B dos pacientes com ICV em células mononucleares criopreservadas oriundas do sangue periférico;
- Observar possíveis diferenças de expressão destas moléculas entre pacientes com ICV com infecções apenas - sem complicações (ICV-S/C) e pacientes ICV com complicações não-infecciosas (ICV-C/C).
- Avaliar a frequência de LT_{FH} em pacientes com ICV
- Correlacionar a expressão de PD-L1 de linfócitos B com PD-1 de linfócitos T foliculares.

5. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho do Estudo

Este trabalho foi desenvolvido como um estudo prospectivo de corte transversal, com a participação voluntária dos sujeitos da pesquisa.

5.2 Locais do estudo

O estudo envolveu pacientes com diagnóstico de Imunodeficiência Comum Variável (ICV) acompanhados no ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica (LIM 60) da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP.

5.3 Casuística

Foram incluídos neste estudo pacientes com diagnóstico de Imunodeficiência Comum Variável (ICV), acompanhados no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HCFMUSP. Os critérios diagnósticos utilizados estão de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997) e Grupo Panamericano de Imunodeficiências (PAGID) (Conley *et. al.*,1999) e ESID. Esses pacientes foram divididos em subgrupos e selecionados 14 pacientes do grupo com diagnóstico de ICV com infecções apenas e sem complicações (ICV-S/C). Para comparação entre os grupos, estudamos outro subgrupo de pacientes composto por 57 pacientes com ICV complicações não infecciosas além de, adicionarmos um terceiro grupo que denominamos de Controle representado por 24 indivíduos saudáveis que, assim foram classificados por não apresentarem nenhuma doença descrita durante anamnese.

5.3.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com idade entre 18 a 60 anos, de ambos os gêneros com diagnóstico de ICV, sendo em grupo de pacientes que apresenta infecções apenas e outro que apresenta complicações não infecciosas.
- Pacientes que apresentem frequência igual ou superior de 1% de linfócitos
 B (CD19⁺)

5.3.2 Critérios de exclusão:

- pacientes com ICV menores de 18 anos
- pacientes com ICV e linfócitos B <1%
- pacientes com ICV com infecções agudas graves
- pacientes com ICV gestantes
- pacientes com ICV e doenças malignas em tratamento
- pacientes com ICV e imunossupressão grave

5.4 Recrutamento

Todos os voluntários participantes deste estudo leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 1**), aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo – CAAE: 58699416.2.0000.0068 número do parecer – 1.752.240) (**Anexo 2**).

5.5 Seleção e avaliação dos pacientes

Os pacientes com ICV são acompanhados no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HCFMUSP e comparecem mensalmente ao Serviço para receber a infusão de Imunoglobulina Intravenosa (IGIV). Dentre estes pacientes, 14 pacientes com ICV e apenas infecções de repetição foram convidados a participar do estudo, assim como, 57 pacientes com ICV e complicações

não-infecciosas. As amostras de sangue foram coletadas, processadas e criopreservadas no LIM 60.

5.6 Coleta das amostras

Foram coletados 40 mililitros (mL) de sangue periférico por punção venosa em membro superior de cada indivíduo participante do estudo, após cuidadosa assepsia local.

Foi utilizada a técnica de coleta a vácuo na qual é feita a punção da veia do paciente permitindo que o sangue flua diretamente para o tubo de coleta a vácuo contendo Ácido Cítrico Citrato de Sódio e Dextrose (ACD). Esta técnica é ideal, pois possibilita a coleta de vários tubos e se caracteriza por ser um sistema fechado e sem a necessidade de contato com a amostra.

O material foi coletado no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HCFMUSP antes dos pacientes receberem a infusão de Imunoglobulina Intravenosa (IGIV) e levados para serem processados no mesmo dia ao Laboratório de Investigação Médica 60 (LIM 60) da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados em cabine de segurança biológica devidamente esterilizada. Foi realizada a separação das células mononucleares e posterior criopreservação em nitrogênio líquido.

5.7 Processo de separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Em cabine de segurança biológica nível 2, esterilizada por 15 minutos através da utilização de luz ultravioleta (UV), os 40mL de sangue coletados de cada voluntário

foram diluídos separadamente com Solução Tampão Salina balanceada de Hank's (HBSS) (GibcoTM) na mesma proporção.

Foram adicionados a cada um de 3 tubos de fundo cônico de 50mL, devidamente identificados, 15mL de Ficoll-PaqueTM PLUS (1:1:1, em relação a sangue e HBBS) (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, United Kingdom) (Baerlocher, 2002). Com estes tubos inclinados a 45°C a amostra diluída em Hank's foi cuidadosamente acrescentada pelas paredes criando uma interface entre o Ficoll-PaqueTM PLUS e a amostra de sangue diluída, sem homogeneização do tubo. Estes foram então centrifugados por 40 minutos a 300xg em temperatura de 18 a 20°C, com aceleração de 5 e freio de 9.

Após a centrifugação, as células se separaram pela diferença de densidade de gradiente, e a camada de interesse com as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi aspirada e transferida para um novo tubo de fundo cônico, devidamente identificado. Em seguida, foi adicionado Hank's à camada de CMSP, completando o volume de 50mL e procedida à centrifugação a 250xg por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e as células novamente lavadas com Hank's e centrifugadas nas mesmas condições anteriores, removendo-se posteriormente o sobrenadante, tendo a homogeneização do botão de células.

As hemácias ainda presentes foram lisadas acrescentando 2mL de solução tampão de Lise ACK [com cloreto de amônia – 8,3g/L, EDTA disódico dihidratado – 0,0372 e bicarbonato de potássio – 1,0g/L (GibcoTM)] por um período de 3 minutos. Para neutralizar a ação da solução de lise, após 3 minutos foram adicionados 10mL de meio de cultura R10, composto por: 500mL de meio de cultura RPMI 1640 (GibcoTM), 50mL Soro Fetal Bovino (SFB) (GibcoTM) inativado pelo calor (56°C por 45 minutos), 5mL solução tampão Hepes 1M (GibcoTM); 5mL L-Glutamina – 200mM (GibcoTM), solução piruvato 100mM (GibcoTM), 5mL penicilina e estreptomicina (GibcoTM), 0,5mL 2-mercaptoetanol (GibcoTM) e novamente foram centrifugados por 10 minutos a 250xg em temperatura de 18 a 20°C. O sobrenadante foi removido e o botão de células formado foi cuidadosamente homogeneizado. Posteriormente foram acrescentados à amostra 10 mL de Hank's.

A partir de uma alíquota de células obtidas definimos a viabilidade celular através da utilização do corante azul de Tripan 1% (Sigma®), na diluição 1:10 e a correção da concentração celular estabelecida para 1x10⁷ células/mL através da contagem realizada utilizando o contador de células automatizado *Countess*TM (Thermo Fisher Scientific).

Após os cálculos, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 250xg em temperatura de 18 a 20°C. As células foram ressuspendidas em 1mL de meio de congelamento, composto por 90% soro fetal bovino (GIBCOTM), 10% dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma®) e transferidas para criotubos específicos, armazenados no freezer - 80°C por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, foram transferidos para o tanque de nitrogênio líquido.

Todas as amostras permaneceram estocadas no próprio LIM 60 até o momento da realização dos experimentos.

5.8 Descongelamento das células mononucleares criopreservadas oriundas do sangue periférico.

Este procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica nível 2, previamente esterilizado por 15 minutos através da utilização de luz ultravioleta (UV).

Os criotubos foram retirados do tanque de nitrogênio líquido e mantidos em um isopor contendo gelo seco até o momento do seu descongelamento a fim de minimizar o estresse celular e manter a viabilidade e integridade das células. As células contidas nos criotubos foram parcialmente descongeladas em banho-maria a 37°C, em seguida, as células foram transferidas para tubo de fundo cônico contendo 9mL de meio de cultura R10 previamente identificados. Para realização da lavagem do criotubo foi adicionado mais 1mL de R10 e este volume foi transferido para o tubo que estava a amostra.

Em seguida, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 250xg em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o botão celular homogeneizado e ressuspendido em 2mL meio de cultura R10 para realização da contagem celular através do contador de

células automatizado *Countess*TM (Thermo Fischer Scientific) utilizando o mesmo procedimento e cálculos descritos anteriormente, considerando-se apenas o valor obtido a partir de células vivas.

Novamente o tubo foi centrifugado e as células ressuspendidas em R10 no volume de 1,0x10⁶ células/mL e então, as células foram transferidas respectivamente para uma placa de 96 poços com fundo em V (NUNC® Brand Products), previamente identificada.

5.9 Imunofenotipagem de superfície celular em células mononucleares do sangue periférico

Com o objetivo de caracterizar as populações celulares presentes nas amostras de células mononucleares do sangue periférico, as amostras coletadas foram processadas para realização da imunofenotipagem de superfície celular através da técnica de citometria de fluxo para avaliação fenotípica.

Para cada um dos painéis 1,0x10⁶ células por poço foram transferidas respectivamente para placas de 96 poços com fundo em V (NUNC® Brand Products), previamente identificadas, uma Painel Linfócitos B (LB) e outra Painel de Linfócitos T foliculares (LT_{FH}); As placas seguiram para centrifugação a 250xg por 5 minutos, para a realização da lavagem celular, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 170μL de Tampão MACS, composto por 498mL de tampão salina fosfatada 7,2 (GIBCOTM) (PBS 1x), 2mL de EDTA [500mM], 2,5g de albumina de soro bovino (SIGMA®) (BSA); Seguida de uma segunda centrifugação, onde sobrenadante foi desprezado.

Para iniciar a marcação das proteínas presentes na superfície das células foram adicionados os anticorpos conjugados com seus respectivos fluorocromos, de acordo com os painéis descritos na **Tabela 5** – Células B e suas subpopulações e **Tabela 6** – LT_{FH} além co-expressão das moléculas PD-1 e seu ligante PD-L1, juntamente com o marcador "live/dead" utilizado para verificar a viabilidade celular.

A fim de evitar possíveis contestações, como critério de exclusão na análise por citometria de fluxo, utilizamos o *Dump chanell* que nada mais é do que um canal utilizado como "lixo", onde utilizamos o mesmo fluorocromo para marcar todas as células que não são do nosso interesse entretanto, também expressam as proteínas PD-1 e PD-L1; Neste trabalho foi necessário excluir os monócitos caracterizados pela expressão de CD14⁺ assim como também excluímos as células *Natural Killer* (NK) caracterizadas pela expressão das moléculas CD16⁺ e CD56⁺.

Após a adição dos reagentes, as células permaneceram sob incubação por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao término da incubação as placas foram centrifugadas a 250xg por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com 170μL de tampão MACS, seguindo novamente para centrifugação, por duas vezes.

Finalizando, a técnica de imunofenotipagem de superfície celular, foram adicionados 100µL de paraformaldeído a 1% (PFA 1%), composto por 9mL de PBS (1x) e 1mL de paraformaldeído 10x (SIGMA®), visando promover a fixação dos anticorpos monoclonais utilizados.

As células foram transferidas, respectivamente para microtubos (Fisherbrand®, Houston, TX) previamente identificados e permaneceram armazenadas sob-refrigeração na geladeira a 4°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo modelo LSRFortessaTM X-20 (BD Bioscience), disponível no LIM 60, dotado de detectores capazes de adquirir e analisar eventos com até 18 cores.

5.10 Preparação das microesferas ("beads") para o ajuste das voltagens do Citômetro de Fluxo

Em cabine de segurança biológica nível 2, previamente esterilizada por 15 minutos através da utilização de UV, em um microtubo foram adicionados 1600μL de Tampão MACS, duas gotas de *Negative Control* (FBS) (BDTM) e duas gotas de *Anti-Mouse* Ig, κ (BDTM), 100μL deste homogeneizado foi distribuído em outros 16

microtubos previamente identificados, com os nomes dos fluorocromos utilizados. Em cada um destes microtubos foram adicionados, individualmente, os anticorpos monoclonais correspondentes aos fluorocromos utilizados.

Ao início da leitura no Citômetro de Fluxo, foram primeiramente utilizadas as amostras não marcadas (NM), possibilitando a definição da localização correta da população de interesse através dos parâmetros de *Forward Scatter* (FSC) - tamanho celular e *Side Scatter* (SSC) - granularidade celular, além da definição do limite das células que emitem fluorescência das que não emitem nenhuma fluorescência, e posteriormente, as *beads*, que possibilitam a realização do melhor ajuste das voltagens de emissão de fluorescência ideal para cada fluorocromo, descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Informações sobre laser, espectro (nm) dos comprimentos de onda de excitação e de emissão dos fluorocromos conjugados aos anticorpos monoclonais utilizados.

Laser	Fluorocromos	Espelho	Filtro	Espectro (nm) Excitação — Emissão
Azul	PerCP-Cy5-5 TM	685 LP	695/40	685-715
(488 nm)	FITC	505 LP	530/30	515-545
Vermelho	APC-H7	750LP	780/60	750-810
(640nm)	APC-R700	710 LP	730/45	710-752,5
	APC	665 LP	670/14	665-677
UV	INDO-1	505 LP	530/30	515-545
(355 nm)	BUV-395	355 LP	450/50	425-475
	BV 786 TM	750 LP	780/60	750-810
	BV711 TM	685 LP	710/50	685-735

Violeta	BV650 TM	635 LP	670/30	655-685
(405 nm)	$BV605^{TM}$	595 LP	610/20	590-620
	BV510 TM	505 LP	525/50	505-550
	BV421 TM	405 LP	450/50	425-475
Yellow Green (561nm)	PE	580 LP	586/15	578,5-593,5

Fonte: Própria autora (2020).

Realizado então o ajuste definitivo de cada voltagem, o aparelho tornou-se apto a adquirir as demais amostras, referentes a cada painel. Para a realização do estudo de cada painel foram adquiridos no gráfico inicial de FSC x SSC aproximadamente 500.000 de eventos de cada amostra, sendo cada evento correspondente a uma célula.

5.11 Estratégia de análise para caracterização das células B e suas respectivas subpopulações com a co-expressão das moléculas PD-1 e PD-L1

Para a Imunofenotipagem das células B partimos de linfócitos B totais e as subpopulações: LB Transicional, LB Naive, LB de memória sem troca de classe de imunoglobulina, LB de memória com troca de classe de imunoglobulina, Plasmoblasto e a co-expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 utilizamos os anticorpos monoclonais descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados imunofenotipagem de superfície das subpopulações de linfócitos B e co-expressão das moléculas PD-1 e seu ligante PD-L1.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
CD3	PerCP-Cy5.5	UCHT1	* BD
CD19	PE	HIB19	* BD
CD20	АРС-Н7	L27	* BD
CD21	BV650	B-ly4	* BD
CD24	BV711	ML5	* BD
CD27	APC-R700	M-T271	* BD
CD38	FITC	HIT2	* BD
CD138	BV510	MI15	* BD
IgD	BV605	IA6-2	* BD
IgM	APC	G20-127	* BD
CD14	BUV395	ΜφΡ-9	* BD
CD16	BUV395	3G8	* BD
CD56	BUV395	NCAM16.2	* BD
PD-1	BV421	MIH4	* BD
PD-L1	BV786	MIH1	* BD

^{*} BD (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA)

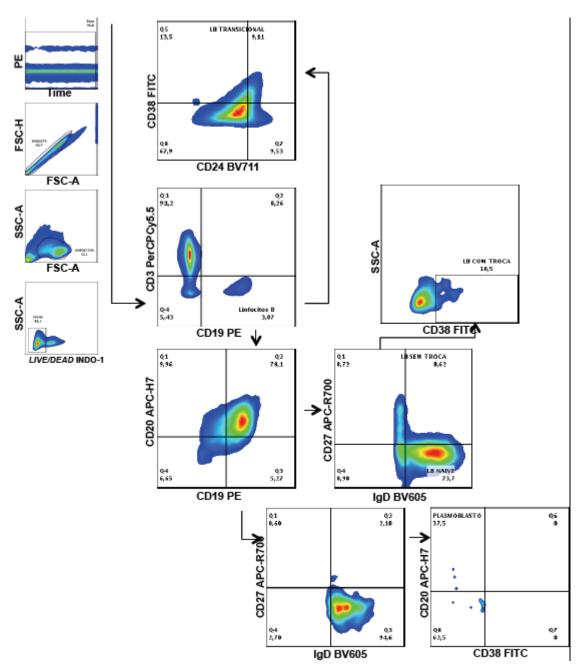
Fonte: Própria autora (2020).

Após a compensação das voltagens do citômetro, inicialmente delimitamos a área denominada por *Time*, para eliminar possíveis oscilações do laser que possam ocorrer durante a aquisição. Nessa estratégia, coloca-se no eixo da ordenada o parâmetro PE, sendo este o detector mais sensível, e no eixo da abscissa a opção *Time* para então, delimitar a região mais contínua.

A partir de então, utilizamos o parâmetro de "Singlets", que permite separar apenas as células que passaram uma a uma em frente ao laser num fluxo contínuo, eliminando as células que passaram juntas e assim, eliminamos dados errôneos. Para isso, foi delimitado no eixo da ordenada o parâmetro *Foward Scatter-Height* (FSC-H) e na abscissa, *Foward Scatter-Area* (FSC-A). Foi determinada a região em diagonal com os eventos mais condensados. Na sequência uma janela de aquisição de linfócitos totais (FSC-A x SSC-A) dentro do "gate" de "Singlets", que seguiu de uma janela composta por células vivas separadas das células mortas chamada de *Vivas* (*Live/Dead* x SSC-A) e posteriormente nós analisamos a nossa população de interesse — as células B através do "gate" delimitado na janela de cruzamento dos marcadores CD3 negativo x CD19 positivo característico da população de linfócitos B. A partir do "gate" de células B nós observamos a expressão das moléculas que caracterizam as subpopulações de linfócitos B (CD20, CD24, CD27, CD38, CD138, IgD e IgM). A partir daí outras seis janelas de aquisições foram feitas a fim de caracterizar as subpopulações de células B de acordo com seu estágio de desenvolvimento conforme fenótipo descrito na sequência:

- 1) Linfócito B (CD19⁺)
- 2) Linfócito B Transicional (CD19⁺CD24⁺CD38⁺)
- 3) Linfócito B Naive (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻)
- 4) Linfócito B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+)
- 5) Linfócito B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+)
 - 6) Plasmoblasto (CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺).

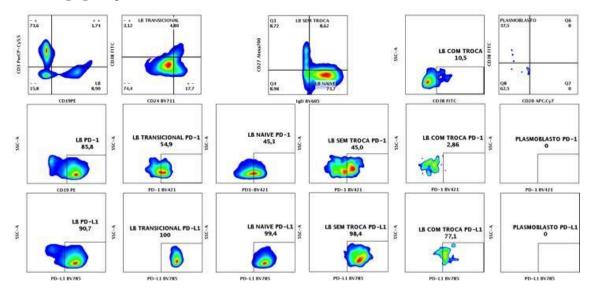
Todo esse processo da estratégia de análise citado acima pode ser observado no esquema da Figura 5: Estratégia de análise para caracterização das subpopulações de linfócitos B.



Primeiramente foi feita uma janela de aquisição na região denominada de *time* caracterizando a não oscilação do laser. Na sequência foi feita uma janela de aquisição na região das células que passaram apenas uma vez em frente ao laser, denominados *singlets* determinado pelo tamanho em relação a altura (FSC-H) e em relação a área (FSC-A). Em seguida foi feita uma janela de aquisição na população de linfócitos totais seguido de uma janela de aquisição na população de células vivas denominadas *live dead* e posteriormente foi feita uma janela de aquisição na população denominada CD19+. A partir daí, selecionamos as subpopulações de linfócitos B através da expressão das moléculas CD20, CD24, CD27, CD38, CD138, IgD e IgM. Fonte: Própria autora (2020).

Posteriormente à identificação das células B, avaliamos a co-expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 nas subpopulações de células B (**Figura 6**).

Figura 6: Estratégia de análise para avaliar a co-expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B.



A partir das subpopulações de linfócitos B e dentro de cada uma delas, foi feita uma janela de identificação para avaliar a expressão das moléculas PD-1 e PD-L1. Fonte: Própria autora (2020).

5.12 Estratégia de análise para população de linfócitos T helper foliculares

Para imunofenotipagem dos linfócitos T foliculares (LT_{FH}) em amostras de CMSP utilizamos o painel descrito na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem de superfície dos LT_{FH} e a co-expressão da molécula PD-1.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
CD3	PerCP-Cy5.5	UCHT1	* BD
CD4	APC.Cy7	RPA-T4	* BD
CD8	BV510	SK1	* BD

CD14	BUV395	ΜφΡ-9	* BD
CD16	BUV395	3G8	* BD
CD56	BUV395	NCAM16.2	* BD
CD19	PE	HIB19	* BD
CXCR5	BB515	RF8B2	* BD
PD-1	BV421	MIH4	* BD
PD-L1	BV-786	MIH1	* BD

^{*} BD (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA)

Fonte: Própria autora (2020).

Utilizamos o marcador de viabilidade "*live/dead*" (Life/ Thermo Fisher Scientific) para exclusão de morte celular conforme tabela abaixo (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Anticorpo monoclonal característico de viabilidade celular para exclusão de células mortas.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
Live/Dead	Indo-I		* Life

^{*} Life (Life/Thermo Fisher Scientific)

Fonte: Própria autora (2020).

De forma similar ao descrito acima para células B, a estratégia de análise para caracterizar a população de linfócitos T foliculares (LT_{FH}) na marcação das CMSP foi realizada da seguinte maneira: "Time" (PE x Time) delimitando a população onde não houve oscilação do laser, seguido de "Singlets" – FSC-H x FSC-A, onde selecionamos apenas os eventos que passaram isoladamente no feixe do laser. Então, seguiu-se para definição da população de linfócitos totais (FSC-A x SSC-A), seguindo para janela de células vivas, excluindo as células mortas (SSC-A x *Live/Dead*).

A partir da população de células vivas e a critério da estratégia de análise quanto a população avaliada, também foram utilizados os marcadores CD3 característico de

linfocitos T versus CD14/CD16 e CD56 marcadores de monócitos e células *Natural Killer* respectivamente pois, estas populações celulares também expressam a molécula PD-1 a fim de evitar possíveis contestações.

A partir da região delimitada somente com células CD3 positivas fizemos o próximo gráfico cruzando as moléculas CD4 com CD8 a fim de purificar somente os linfócitos T CD3+CD4+.

Na sequência temos a janela linfócitos T foliculares caracterizados pela expressão das moléculas CD4 x CXCR5 e por fim a expressão de PD-1 e de PD-L1.

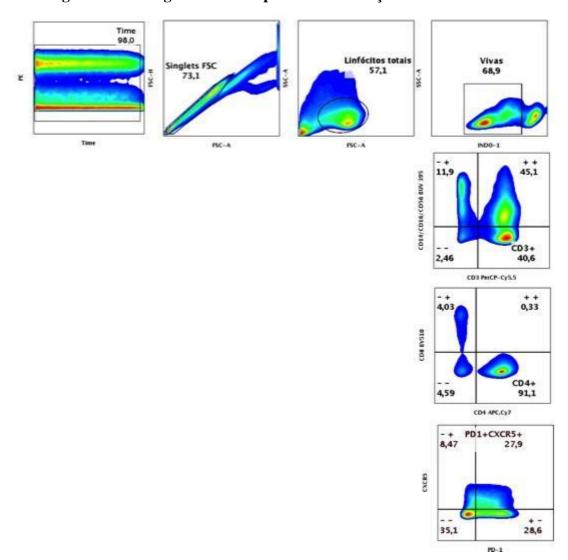


Figura 7. Estratégia de análise para caracterização de linfócitos LT_{FH}.

Foram selecionadas apenas células que passaram individualmente pelo citômetro com base nos gráficos determinados pelos parâmetros "FSC-H" x "FSC-A". Delimitamos a população de linfócitos totais, a partir dos parâmetros "SSC-A" e "FSC-A". Para analisar apenas os linfócitos T verificamos o *gate* CD3⁺/CD14⁻ CD16⁻CD56⁻. A partir daí, selecionamos as subpopulações de linfócitos T (CD4⁺/CD8⁻) e observamos a expressão das moléculas CD4/CXCR5/PD-1 e de LT_{FH} nas CMSP. Fonte: Própria autora (2020).

Neste trabalho, para identificar exatamente os *gates* delimitadores das populações celulares a partir de múltiplos fluorocromos utilizamos o método de separação das fluorescências sem uma marcação, denominado FMO (*fluorescence minus one*), usado para interpretar os dados de citometria de fluxo⁴⁶.

Testes de controle de qualidade no equipamento foram realizados, para assegurar a qualidade e objetividade dos experimentos. A análise dos dados foi realizada no programa FlowJo v.10.0 (FlowJo Software, Tree Star®, Ashland, OR), específico para análises de citometria de fluxo. Todas as técnicas de citometria foram realizadas com controles positivos e negativos.

5.13 Análise de dados adquiridos por citometria de fluxo

A análise dos dados adquiridos a partir de cada amostra foi realizada utilizando o software FlowJo (Tree Star®, Inc., Ashland, OR) versão 10.0, transformando a representação gráfica gerada a partir da captação da intensidade das cores, em porcentagens dos resultados finais, na subpopulação pré-selecionada, baseada nas suas propriedades físicas de dispersão frontal e lateral da luz.

Posteriormente estes valores foram transferidos para uma planilha de dados do programa *Microsoft Office Excel* 2007 (*Microsoft Corporation*, EUA).

5.14 Exames laboratoriais

Os exames laboratoriais de rotina foram realizados no Laboratório Central do HC-FMUSP. Foram realizados exames de hemograma, dosagem das imunoglobulinas: IgA, IgG e IgM além da imunofenotipagem de linfócitos T (CD3) e suas subpopulações (CD4 e CD8), linfócitos B (CD19) e células NK (CD16 e CD56).

5.15 Análise estatística

Os resultados dos ensaios laboratoriais foram analisados descrevendo o comportamento das subpopulações de linfócitos B (Naïve, Transicional, Memória sem troca de classe de imunoglobulina, Memória com troca de classe de imunoglobulina e Plamoblasto) e dos linfócitos T foliculares juntamente com a co-expressão dos marcadores PD-1 e PD-L1.

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa estatístico *GraphicPad PRISM* versão 8.0 para Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Os grupos foram comparados utilizando métodos não paramétricos. Os dados são relatados como mediana (M) e intervalo interquartil (IQR). Comparações entre grupos foram realizadas usando *test t* e teste não- paramétrico *Mann-Whitney* para comparar um parâmetro entre dois grupos, o teste ANOVA não-paramétrico para comparar um parâmetro entre três grupos e o teste de Comparações Múltiplas de *Dunn's*. Para todos os testes, foi adotado um nível de significância de 0,05 (α =5%), onde os valores descritivos (p) abaixo desse valor foram considerados significativos.

5.16 Aspectos éticos

A participação de voluntários neste estudo esteve condicionada a leitura, compreensão e assinatura de TCLE, tendo sido informados que poderiam retirar o consentimento para participar do estudo a qualquer momento, sem que os seus direitos à assistência médica e demais cuidados de saúde fossem prejudicados.

Os voluntários não foram submetidos a qualquer forma de intervenção experimental envolvendo drogas ou vacinas, havendo apenas os riscos inerentes à punção venosa, que raramente podem causar dor, hiperemia local ou um pequeno hematoma.

6. RESULTADOS

As amostras deste estudo foram coletadas entre 2016 e 2017. No total, foram incluídos 93 voluntários.

No caso dos 69 pacientes alocados no grupo de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável Geral (ICV – Geral) foram levantadas informações referentes à idade, sexo e contagem de células B (CD19⁺), assim como dosagem das imunoglobulinas IgA, IgG e IgM.

Para a avaliação dos 24 indivíduos alocados no grupo Controles Saudáveis (CTRL), foram coletados os dados de idade e sexo.

Para uma melhor caracterização do perfil clínico e imunológico dos pacientes com ICV, consideramos importante subdividir os pacientes em dois subgrupos:

- Pacientes ICV sem complicações (ICV S/C), caracterizados por apresentar apenas infecções de repetição
- 2) Pacientes ICV com complicações (ICV C/C), sendo este, por sua vez, subdividido em:
 - a. Doenças Gastrointestinais (GI)
 - b. Doenças Autoimunes (DAI)
 - c. Linfoproliferação Benigna (LP B)
 - d. Doenças Malignas (DM).

A análise estatística dos dados encontrados nos grupos foi feita a partir dos valores de frequência em porcentagem, a estatística foi considerada para cada variável e comparada entre os grupos. Os resultados mostraram que há um perfil diferente ao subdividimos os pacientes em subgrupos. Neste trabalho serão descritos os resultados encontrados entre os grupos de todas as análises, inclusive os resultados não estatisticamente significativos.

6.1 Dados Demográficos, clínicos e laboratoriais

No que diz respeito à idade, a mediana de idade foi de 42 anos no grupo de pacientes ICV – Geral e 36 anos no grupo CTRL. Os doadores avaliados neste estudo são de ambos os sexos, masculino e feminino. As características demográficas dos grupos de pacientes ICV - Geral e grupo CTRL estão descritas na **tabela 7**.

Tabela 7 – Características demográficas dos grupos de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV-geral) e grupo controle (CTRL).

Variável	ICV – geral (n= 69)	CTRL (n=24)	p
Idade em anos (Mediana e Interquartil 25% - 75%)	42 (32,50-52,50)	36 (27,25-52,50)	p=0,1378
Feminino	41 (32-54)	37 (34,75-49,50)	p=0,4937
Masculino	42 (32,50-51,25)	28,50 (23,50-57,25)	p=0,1291
Gênero (%)			
Feminino	56,52	58,33	
Masculino	43,48	41,67	

^{*}Variáveis contínuas apresentadas como medianas e intervalos interquartis; comparações realizadas com o teste de Wilcoxon (*Rank-sum test*).

CTRL – Controles;

Fonte: Própria autora (2020).

O grupo de pacientes com ICV – Geral participantes deste estudo, foi dividido em dois subgrupos: ICV apenas com infecções repetição sem complicações (ICV-S/C) e ICV com complicações não-infecciosas (ICV-C/C).

Ao analisarmos as características da imunodeficiência relacionadas à idade de início dos sintomas, idade ao diagnóstico, intervalo entre início dos sintomas e diagnóstico (dT) e tempo de doença, não observamos diferença estatística entre o grupo de pacientes ICV-S/C e o grupo de pacientes ICV-C/C (tabela 8).

Tabela 8 – Características da doença Imunodeficiência Comum Variável dos pacientes ICV com infecções apenas (ICV-S/C), dos pacientes do grupo ICV com complicações não-infecciosas (ICV-S/C) e do grupo controle (CTRL).

Variável	ICV Sem Complicação	ICV Com Complicações	CTRL	p
Gênero	11(M) e 3(H)	28 (M) e 27(H)	14(M) e 10(H)	
Idade (anos)	36	43	36	0.0754
Início dos sintomas (anos)	14	15		0.4101
Diagnóstico (idade em anos)	24,50	32		0.1610
δΤ	11,50	14		0.5419
Tempo de doença (anos)	23,50	26		0.3227

CTRL – Controles;

Fonte: Própria autora (2020).

Entre as manifestações clínicas da Imunodeficiência Comum Variável, as infecções estavam presentes em 100% do grupo ICV-S/C e 98.3% no grupo ICV-C/C.

A seguir analisamos as principais manifestações infecciosas e não infecciosas apresentadas pelos pacientes ICV-S/C e do grupo de pacientes ICV-C/C participantes deste estudo de acordo com a **tabela 9**.

Tabela 9 – Manifestações infecciosas e não infecciosas apresentadas pelos pacientes ICV-S/C (sem complicações não-infecciosas) e do grupo de pacientes ICV-C/C (com complicações não-infecciosas) participantes deste estudo

Patologias	ICV-S/C (n=14)	ICV-C/C (n=55)
Infecções	14 (100%)	54 (98.2%)
Infecções de respiratórias altas	13 (92.9%)	45 (81.8%)
Pneumonias	12 (85.7%)	50 (90,9%)
Diarréia Infecciosa	4 (28.6%)	7 (12.7%)
Outras infecções	2 (14.3%)	7 (12.7%)
Doenças Autoimunes		27 (49,1%)
Citopenias	-	7 (12.7%)
Anemia Perniciosa	-	5 (9.1%)
Vitiligo	-	6 (10.9%)
Síndrome Sjogren	-	1 (1.8%)
Vasculite	-	1 (1.8%)

Febre reumática	-	1 (1.8%)
Hipotireoidismo	-	1 (1.8%)
Padrão celíaco	-	9 (16.4%)
Doença inflamatória intestinal	-	1 (1.8%)
Hipertensão portal	-	13 (23.6%)
Linfoproliferação benigna	-	42 (76.4%)
Doenças malignas		12 (21.8%)
Linfoma	-	4 (7.3%)
Câncer gástrico	-	5 (9.1%)
Câncer esofágico	-	1 (1.8%)
Câncer de cólon	-	1 (1.8%)
Câncer anal	-	1 (1.8%)
Câncer de mama	-	1 (1.8%)
Melanoma/basocelular	-	3 (5.4%)
Alergias	9 (64.3%)	37 (67.3%)

Fonte: Própria Autora (2020).

Os pacientes com ICV fazem reposição de imunoglobulina humana mensalmente e, coletaram amostra de sangue periférico para exames de rotina de acordo com os protocolos do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP. Entre eles, são realizados hemograma, dosagem de imunoglobulinas e imunofenotipagem de células T, B e NK analisados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas – DLC HC/FMUSP.

Para este estudo, foram selecionados pacientes com ICV sendo incluídos somente aqueles com frequência de linfócitos B (CD19⁺) acima de 1% no sangue periférico.

6.2 Avaliação da frequência de linfócitos B e suas subpopulações em células mononucleares do sangue periférico e, expressão de PD-1 e PD-L1

A caracterização fenotípica das células B foi realizada por Citometria de Fluxo. As populações celulares foram caracterizadas de acordo com a fase de maturação celular e, a populações subdivididas de acordo com a fase de seu desenvolvimento em seis estágios:

- 1. Linfócito B total (CD19⁺)
- 2. Linfócito B Naïve (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻)
- 3. Linfócito B Transicional (CD19⁺CD24⁺CD38⁺)
- 4. Linfócito B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+)
- 5. Linfócito B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+)
- 6. Plasmoblasto (CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺).

A fim de facilitar a interpretação dos resultados encontrados, os mesmos serão descritos conforme a ordem de desenvolvimento dos linfócitos B. Serão descritas a frequência das subpopulações de LB, assim como, descreveremos também em cada uma delas, a frequência da coexpressão das moléculas PD-1 e PD-L1 encontradas.

Comparando, os pacientes ICV-Geral com os indivíduos controles, na sequência comparamos os pacientes ICV-S/C, ICV-C/C e CTRL. Prosseguimos as comparações, agora estratificando o grupo de ICV-C/C de acordo com as seguintes manifestações: A) Complicação Gastrointestinal – GI; B) Doença Autoimune – DAI; C) Linfoproliferação benigna – LP-B; D) Doença Maligna – DM e comparamos esses subtipos entre eles e o grupo CTRL.

Frequência de Linfócito B totais (CD19+)

Iniciamos a avaliação a partir da frequência dos linfócitos B totais CD19⁺. Observamos menor frequência de células B totais CD19⁺ em células mononucleares do sangue periférico dos pacientes ICV-geral quando comparados ao grupo de indivíduos CTRL, demonstrando que houve diferença significativa com menor expressão de linfócitos B totais CD19⁺ nos pacientes ICV-geral (p<0,0001) quando comparados aos CTRL (**Figura 8**).

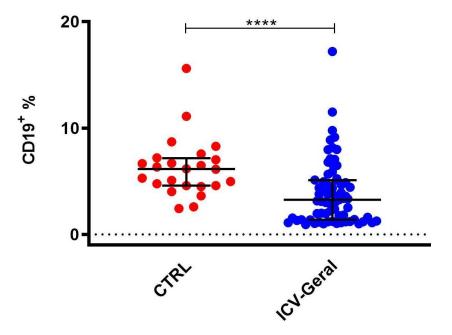


Figura 8: Porcentagem linfócitos B totais CD19⁺ em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste do teste não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***), p<0,001 (****).

Verificamos também a frequência de LB totais CD19⁺ das CMSP nos subgrupos de pacientes ICV com infecções de repetição apenas sem complicações (ICV-S/C), nos pacientes ICV com complicações não-infecciosas (ICV-C/C) e nos CTRLs (**Figura 9**). Observamos que houve redução significativa no grupo ICV-C/C quando comparados aos indivíduos CTRL (p=0,0002). Entretanto, houve apenas uma tendência à redução de LB totais CD19⁺ em CMSP dos pacientes ICS-S/C em relação aos CTRL (p=00923).

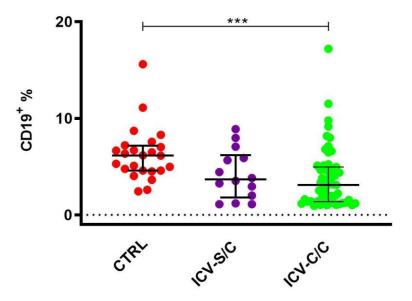


Figura 9: Porcentagem de células CD19⁺ (**linfócitos B totais**) **em CMSP de pacientes ICV-S/C, ICV-C/C em comparação com indivíduos CTRL.** As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***), p<0,001 (****).

Na análise estatística da frequência de linfócitos B totais CD19⁺ em porcentagem (**Figura 10**) não observamos diferença significativa ao compararmos sua expressão em CMSP dos pacientes dos grupos ICV-S/C, ICV-LP-B e aos pacientes com ICV-DM em relação aos indivíduos CTRL. Entretanto, observamos que houve diferença significativa com menor expressão de linfócitos B totais CD19⁺ dos pacientes com GI (p=0,0012) assim como dos pacientes com DAI em comparação aos indivíduos CTRL (p=0,0424).

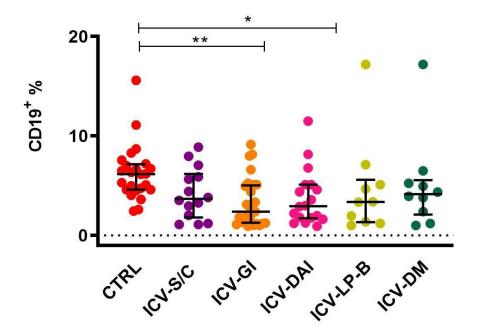


Figura 10: Porcentagem de linfócitos B CD19⁺ em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,0001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Expressão de PD-1+ em Linfócito B (CD19+)

A análise da expressão de PD-1⁺ nos linfócitos B totais CD19⁺ demonstra que houve redução significativa de PD-1 no grupo de pacientes ICV-geral em relação ao grupo controle (p=0,0335) (**Figura 11**).

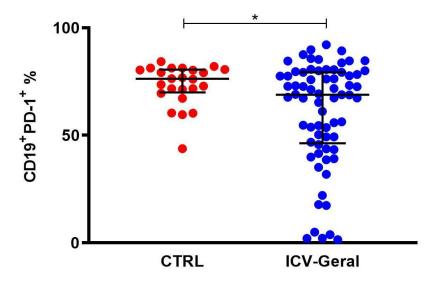


Figura 11: Porcentagem linfócitos B CD19⁺ **com expressão de PD-1**⁺ **em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação com indivíduos CTRL.** As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,001 (****).

A análise da expressão de PD-1⁺ nos linfócitos B CD19⁺ de pacientes ICV-S/C em comparação aos CTRL não mostrou diferença significativa na expressão deste marcador. Entretanto, observamos redução significativa da expressão de PD-1⁺ nos pacientes ICV-C/C quando comparados aos CTRL (p=0,0471) (**Figura 12**).

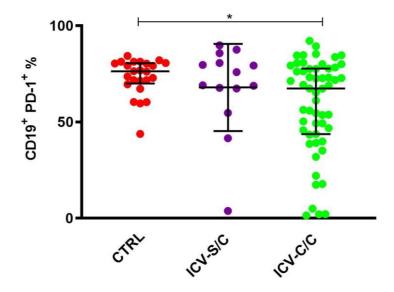


Figura 12 : Porcentagem de linfócitos B CD19⁺ com expressão de PD-1⁺ em CMSP de pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p < 0.05 (*), p < 0.01 (***), p < 0.001 (***), p < 0.001 (****).

Em seguida, avaliamos a frequência de PD-1⁺ em linfócitos B totais CD19⁺ nos subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos CTRL, e apesar de tender à redução da expressão de PD-1⁺ nos subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação os indivíduos CTRL, não observamos diferença significativa da porcentagem de expressão de PD-1⁺ em comparação aos indivíduos CTRL (**Figura 13**).

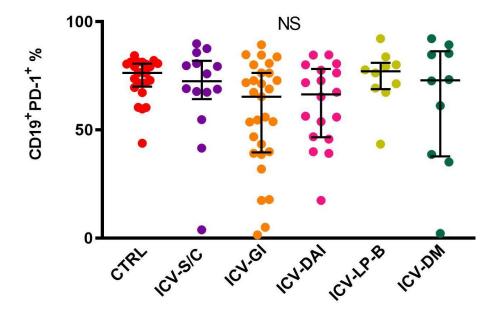


Figura 13: Porcentagem de linfócitos B totais CD19 $^+$ com expressão de PD-1 $^+$ em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Expressão de PD-L1+ em Linfócito B CD19+

Nossas análises demonstram que a expressão de PD-L1⁺ dos linfócitos B totais CD19⁺ em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL não apresentou diferença significativa (p=0,0627) (**Figura 14**).

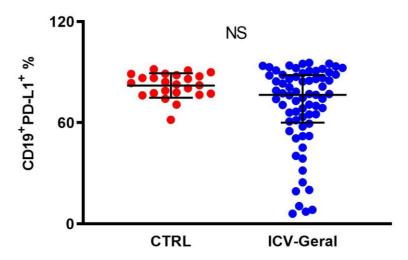


Figura 14: Porcentagem de linfócitos B totais CD19⁺ **com expressão de PD-L1 em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação com indivíduos CTRL.** As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste do teste não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****).

A análise da frequência de PD-L1⁺ nos linfócitos B totais CD19⁺ dos pacientes ICV-S/C em comparação aos indivíduos CTRL (**Figura 15**) demonstra ausência de diferença significativa (p>0,9999). Porém, houve diferença significativa com menor expressão de PD-L1⁺ dos pacientes ICV-C/C quando comparados aos indivíduos CTRL (p=0,0447) e também, ao comparar os dois grupos de pacientes com ICV, os ICV-S/C apresentou maior expressão de expressão de PD-L1⁺ em relação aos pacientes ICV-C/C (p=0,0327).

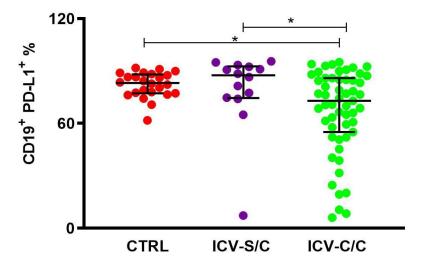


Figura 15: Porcentagem de linfócitos B CD19⁺ com expressão de PD-L1⁺ em CMSP de pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas

dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 (*), p <0,01 (***), p <0,001 (****).

Ao avaliarmos a expressão de PD-L1⁺ em linfócitos B totais CD19⁺ nos subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM. Em comparação aos CTRL, apesar de tender à redução, não observamos diferença significativa da porcentagem de expressão de PD-1⁺ em CMSP nos subgrupos de pacientes quando comparados aos CTRL (**Figura 16**).

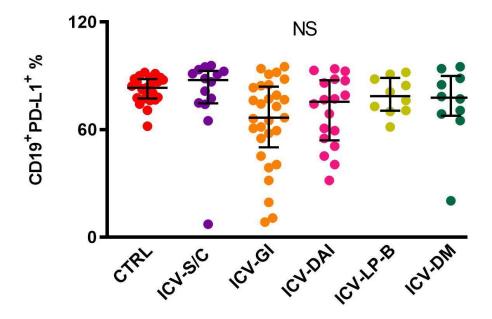


Figura 16: Porcentagem de linfócitos B totais CD19⁺ com expressão de PD-L1⁺ em CMSP dos diferentes subgrupos de pacientes com ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Linfócito B Transicional (CD19+CD24+CD38+)

A avaliação prossegue com a subpopulação de linfócito B Transicional, caracterizada por expressar as moléculas CD19⁺CD24⁺CD38⁺. Observamos um importante aumento da frequência de LB transicional no grupo de pacientes ICV-geral quando comparados aos indivíduos CTRL (p<0,0001) (**Figura 17**).

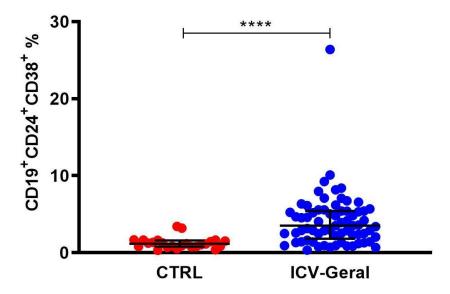


Figura 17: Porcentagem de células B transicional (CD19+CD24+CD38+) **em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação com indivíduos CTRL.** As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste do teste não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,001 (****).

Na sequência, avaliamos a frequência de linfócitos B transicional nos pacientes ICV-S/C, pacientes ICV-C/C e indivíduos CTRL e observamos um importante aumento da frequência da subpopulação de LB transicional no grupo de pacientes ICV-S/C quando comparados aos CTRL (p=0,0001). Observamos também um aumento ainda mais significativo no grupo ICV-C/C ao compararmos aos indivíduos CTRL (p<0,0001). Quando comparamos os dois grupos de pacientes ICV-S/C e ICV-C/C não constatamos diferença estatisticamente significativa (**Figura 18**).

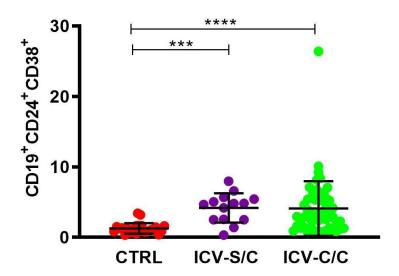


Figura 18: Porcentagem de linfócitos B transicional (CD19+CD24+CD38+) em CMSP de pacientes ICV-S/C, ICV-C/C em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,0001 (*****).

Na análise estatística da frequência de linfócitos В transicional CD19+CD24+CD38+ em porcentagem (Figura 19) não observamos diferença significativa ao compararmos sua expressão em CMSP dos indivíduos CTRL em relação aos grupos de pacientes ICV-LP-B e ICV-DM. Entretanto, observamos que houve diferença significativa com maior expressão de linfócitos B transicional nos pacientes ICV-S/C (p=0,0009), ICV-GI (p=0,0011) e ICV-DAI (p<0,0001) em comparação aos indivíduos CTRL.

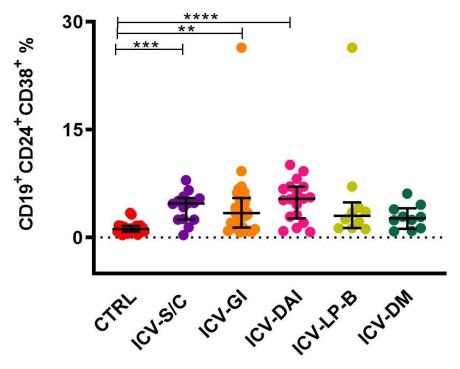


Figura 19: Porcentagem de linfócitos B Transicional CD19 $^+$ CD24 $^+$ CD38 $^+$ em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,0001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Expressão de PD-1⁺ em Linfócito B Transicional (CD19⁺CD24⁺CD38⁺)

A análise da frequência de PD-1⁺ nos linfócitos B transicionais (CD19⁺CD24⁺CD38⁺) em porcentagem (**Figura 20**), demonstra que houve uma diferença significativa com maior expressão do marcador PD-1⁺ em CMSP dos pacientes ICV-geral quando comparados aos CTRL (p<0,0001).

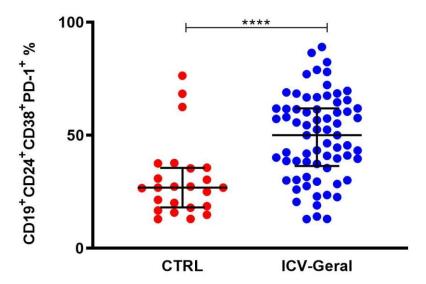


Figura 20: Porcentagem linfócito B Transicional (CD19 $^+$ CD24 $^+$ CD38 $^+$) com expressão de PD-1 $^+$ em CMSP de pacientes ICV-Geral em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (***), p<0,0001 (****).

A análise estatística da expressão de PD-1⁺ em porcentagem (**Figura 21**) demonstra que houve diferença significativa com maior expressão do marcador PD-1⁺ em CMSP dos pacientes ICV-S/C quando comparados aos indivíduos CTRL (p=0,0006) assim como, ao compararmos os pacientes ICV-C/C com os indivíduos CTRL (p=0,0005).

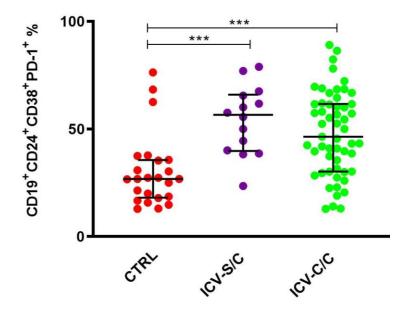


Figura 21: Porcentagem de linfócito B Transicional (CD19+CD24+CD38+) com expressão de PD-1+ em CMSP de pacientes ICV-S/C e ICV-C/C quando comparados aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (**), P <0,001 (***), P <0,0001 (****).

O estudo prossegue com a avaliação da expressão do marcador PD-1⁺ em linfócitos B transicionais (CD19⁺CD24⁺CD38⁺), comparando sua frequência nos pacientes subdivididos em ICV-S/C e também nos pacientes ICV-C/C estratificados conforme as manifestações clínicas mencionadas anteriormente em relação indivíduos CTRL.

Nossas análises mostraram aumento significativo da expressão do marcador PD-1⁺ de linfócitos B transicional (CD19⁺CD24⁺CD38⁺) em porcentagem (**Figura 22**) e demonstrou diferença significativa quando se compara sua expressão em CMSP dos pacientes ICV-S/C e ICV-DM onde ambos apresentaram maior frequência com maior expressão de PD-1 em relação aos CTRL (p=0,0012) e (p=0,0023) respectivamente; Entretanto ao compararmos os pacientes dos demais grupos: GI, DAI e LP-B observamos que não houve diferença significativa na expressão de PD-1⁺ em relação aos CTRL.

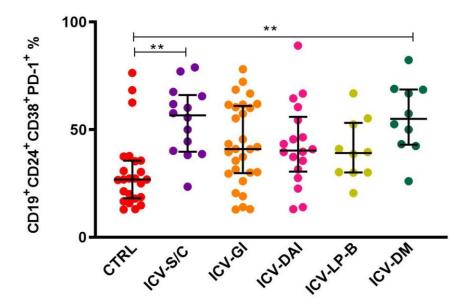


Figura 22: Porcentagem de linfócitos B Transicional (CD19+CD24+CD38+) com expressão do marcador PD-1+ em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (**),

Expressão de PD-L1⁺ em Linfócito B Transicional (CD19⁺CD24⁺CD38⁺)

Em relação à expressão de PD-L1 na subpopulação de linfócito B transicional, (CD19+CD24+CD38+) a maioria dos indivíduos estudados apresentou expressão deste marcador em 100%, portanto, não foi necessário separar os pacientes com ICV em outros subgrupos. (**Figura 23**)

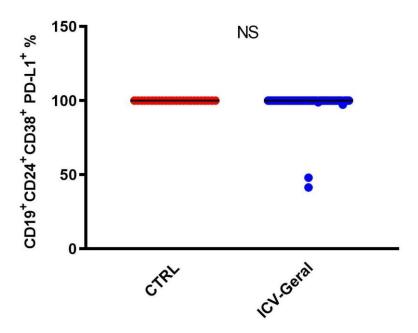


Figura 23: Porcentagem de linfócitos B Transicional (CD19+CD24+CD38+) com expressão do marcador PD-1+ em CMSP de pacientes ICV-Geral em comparação aos indivíduos CTRL. Gráfico representativo do valor em porcentagem para o marcador PD-L1⁺ em linfócito B Transicional (CD19+CD24+CD38+) nas CMSP demonstrando que não houve diferença significativa em relação aos pacientes ICV-geral quando comparados aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****).

Linfócito B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-)

Na sequência, a próxima fase de maturação é caracterizada pelos chamados Linfócitos B Naïve, cujo fenótipo expressa os marcadores CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻. A análise estatística da frequência deste subtipo de LB (**Figura 24**) demonstra que houve

maior frequência em CMSP nos pacientes ICV-geral (p<0,0001) quando comparados aos indivíduos CTRL.

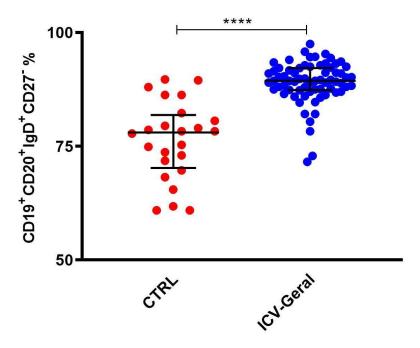


Figura 24: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,0001 (****).

A análise estatística em porcentagem (**Figura 25**) demonstra que houve diferença significativa com maior frequência de LB naïve em CMSP dos pacientes ICV-S/C (p<0,0001) quando comparados aos indivíduos CTRL. A mesma análise apontou aumento significativo da frequência de LB naïve em CMSP dos pacientes ICV-C/C quando comparados aos indivíduos CTRL (p<0,0001). Entretanto, entre os grupos de pacientes ICV-S/C e ICV-C/C não houve diferença significativa(p=0,3244).

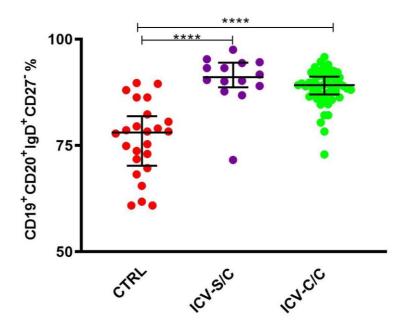


Figura 25: Porcentagem de linfócitos B Naïve em CMSP de pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), P <0,001 (****), P <0,0001 (****).

Na análise estatística seguinte, a frequência de LB naïve em porcentagem (**Figura 26**) demonstra que houve aumento significativo destas células em células mononucleares do sangue periférico dos pacientes dos grupos ICV – S/C (p<0,0001), GI (p=0,0002), DAI (p<0,0001) e DM (p=0,0016) quando comparados ao grupo controle, não havendo diferença estatística apenas na comparação dos CTRL com os pacientes do grupo LP-B.

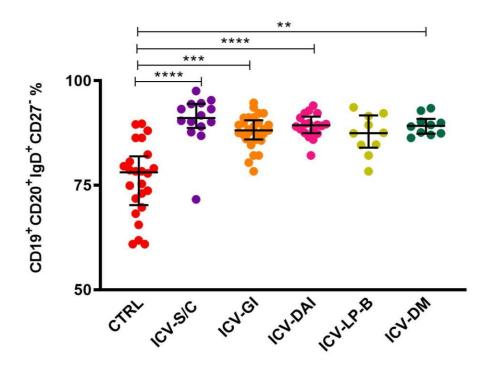


Figura 26: Porcentagem de linfócitos B Naïve em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,0001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Expressão de PD-1+ em Linfócito B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-)

Em seguida, foi avaliada a frequência da expressão da molécula PD-1⁺ em linfócitos B Naïve (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻) e não observamos diferença significativa na expressão de PD-1 em CMSP dos pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL (p=0,4827) (**Figura 27**).

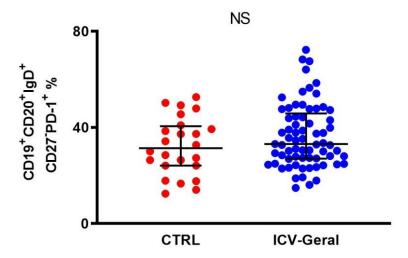


Figura 27: Porcentagem de linfócito B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão do marcador PD-1+ em CMSP dos pacientes ICV-Geral quando comparados aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,001 (****), p<0,001 (*****).

Ao compararmos a expressão de PD-1 em linfócitos B naïve (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻) nos diferentes grupos de pacientes: ICV sem complicações (ICV-S/C) e pacientes ICV com complicações (ICV-C/C) aos com controles, mais uma vez não observamos diferença significativa (p>0,999 e p>0,999 respectivamente). (**Figura 28**) .

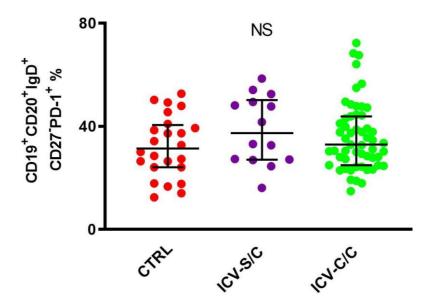


Figura 28: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão do marcador PD-1+ em pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C comparados aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste

de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0.05 .(*), p <0.01 (***), P <0.001 (***), P <0.0001 (****).

O estudo teve andamento com a análise da expressão do marcador PD-1⁺ em linfócitos B Naïve (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻), comparando sua frequência nos pacientes subdivididos em ICV-S/C e nos pacientes ICV- C/C, estes subdivididos conforme as manifestações clínicas já citadas em comparação com os indivíduos CTRL.

Na análise estatística da expressão do marcador PD-1⁺ de linfócitos B Naïve (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻) em porcentagem (**Figura 29**) demonstra que não houve diferença significativa na sua expressão em CMSP dos pacientes dos grupos ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL.

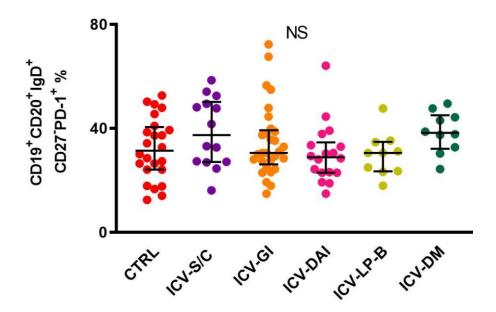


Figura 29: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻) com expressão de PD-1⁺ em CMSP de nos diferentes subgrupos de pacientes ICV – S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (***). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

A análise estatística da expressão de PD-L1⁺ nos linfócito B Naive (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻) em porcentagem (**Figura 30**) demonstra que houve diminuição significativo da expressão deste marcador em CMSP dos pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL (p=0,0056).

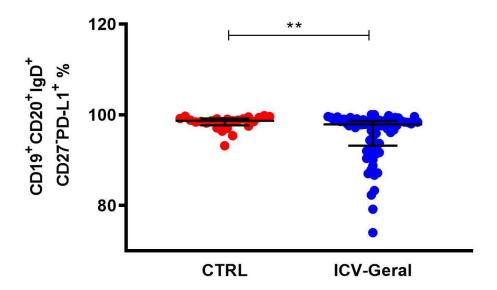


Figura 30: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão de PD-L1+ em CMSP dos pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (***), p<0,0001 (****).

Na sequência, analisamos a expressão de PD-L1 em linfócitos B Naïve (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻) nos diversos subgrupos de pacientes ICV e no grupo controle. (**Figura 31**). Não observamos diferença estatística ao comparar pacientes ICV-S/C com controles (p>0,999), porém, houve menor expressão de PD-L1⁺ nas CMSP dos pacientes ICV-C/C quando comparados aos indivíduos CTRL (p=0,0055). Entre os grupos de pacientes ICV-S/C e ICV-C/C não observamos diferença estatística (p=0,1994).

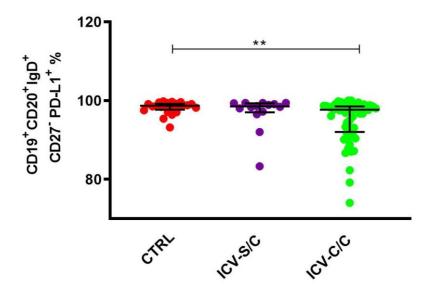


Figura 31: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19 $^+$ CD20 $^+$ IgD $^+$ CD27 $^-$) com expressão do marcador PD-L1 $^+$ em CMSP de pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), P <0,001 (****), P <0,0001 (*****).

Na análise estatística a expressão do marcador PD-L1⁺ de linfócitos B Naïve (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻), em porcentagem (**Figura 32**), demonstra que houve diferença significativa ao compararmos sua expressão em células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos CTRL em relação aos pacientes dos grupos DAI (p =0,0182), mas não houve diferença significativa ao compararmos sua expressão nos CTRL em relação aos grupos ICV – S/C, GI, LP-B e DM. Comparação entre os grupos foi realizada através do teste de Comparação Múltipla de Dunn's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis.

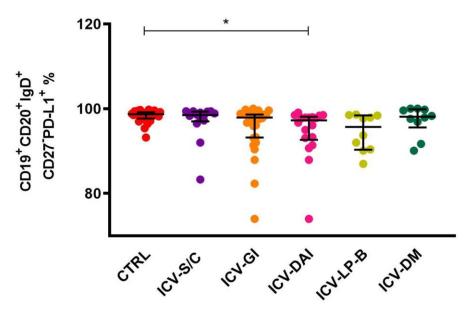


Figura 32: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão de PD-L1+ em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Frequência de Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19 $^+$ CD20 $^+$ IgD $^+$ CD27 $^+$)

Na sequência, a próxima fase de maturação é caracterizada pelos chamados Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina, cujo fenótipo caracteriza-se pela expressão dos marcadores CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺. A análise estatística revelou que pacientes com ICV-Geral apresentam frequência reduzida de LB de memória sem troca de classe de imunoglobulina em CMSP comparado aos CTRL (**Figura 33**) (p<0,0001).

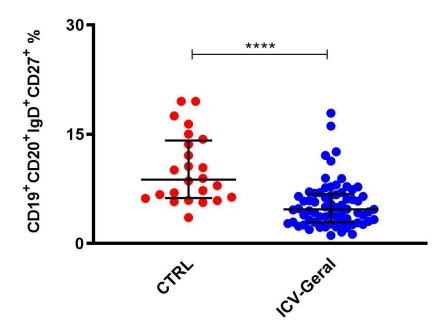


Figura 33: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) em CMSP de pacientes ICV-Geral em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,0001 (*****).

A análise estatística (**Figura 34**) demonstra que houve redução significativa na frequência de LB de memória sem troca de isotipo em CMSP nos dois grupos de ICV: ICV-S/C e ICV-C/C quando comparados aos controles (p<0,0001 e p<0,0001) respectivamente. Ao compararmos os pacientes ICV-S/C com os pacientes ICV-C/C não observamos diferença significativa (p>0,9999).

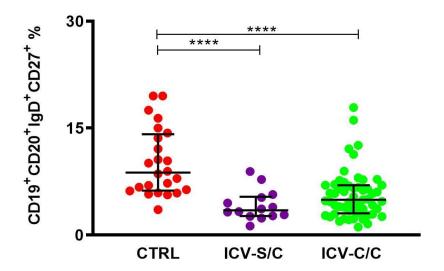


Figura 34: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) em CMSP de pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p < 0.05 .(*), p < 0.01 (**), P < 0.001 (***), P < 0.0001 (****).

Ao analisarmos a frequência de LB de memória sem troca de classe de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) em CMSP de pacientes com ICV-S/C e subgrupos de ICV-C/C e indivíduos CTRL (**Figura 35**), observamos que apenas o subgrupo ICV-LP-B não apresentou diferença significativa quando comparados aos indivíduos CTRL. Porém, todos os outros grupos de ICV apresentaram redução significativa da frequência deste subtipo de LB quando comparados com CTRL. ICV-S/C (p=0,0002), GI (p=0,0024) ,DAI (p=0,0174) e DM (p=0,0061).

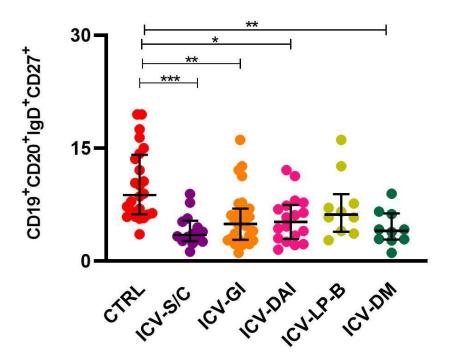


Figura 35: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV – S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (***), p<0,0001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Expressão de PD-1⁺ em Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺)

A análise da frequência de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺) com expressão de PD-1⁺ não demonstrou diferença significativa na expressão de PD-1⁺ em CMSP dos pacientes ICV-geral quando comparados aos CTRL (**Figura 36**).

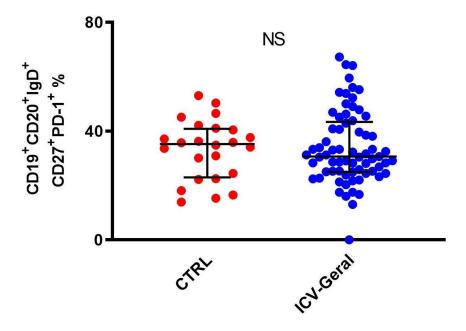


Figura 36: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ em CMSP dos pacientes ICV-Geral em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,0001 (****).

A análise estatística da expressão de PD-1⁺ na subpopulação de Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺) (**Figura 37**) demonstra aumento da expressão desta molécula em CMSP nos pacientes ICC-S/C (p=0,0212) em comparação aos pacientes ICV-C/C, já, em comparação aos controles o grupo sem complicações apresentou apenas uma tendência a ter aumento da expressão de PD-1.

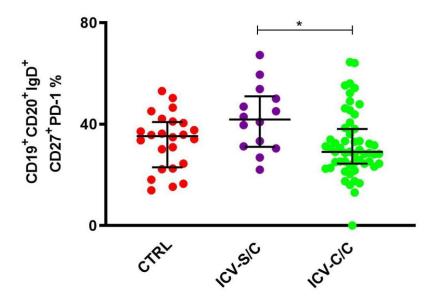


Figura 37: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ em CMSP de pacientes ICV-S/C em comparação aos grupos ICV-C/C e CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p < 0.05. (**), p < 0.01 (***), P < 0.001 (****), P < 0.0001 (*****).

Em relação à expressão de PD-1⁺ em linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺) nos diferentes subgrupos de ICV (**Figura 38**), observamos que o grupo ICV-S/C apresentou aumento significativo da expressão de PD-1⁺ comparado ao grupo ICV-LP-B, apenas (p=0,0202). Os demais subgrupos estudados não apresentaram diferenças significativas entre eles e demonstram uma tendência a estarem com níveis de PD-1⁺ reduzidos em comparação ao CTRL, enquanto que nos pacientes ICV-S/C foi observado uma tendência a ter essa expressão aumentada em relação aos CTRL e aos demais subgrupos.

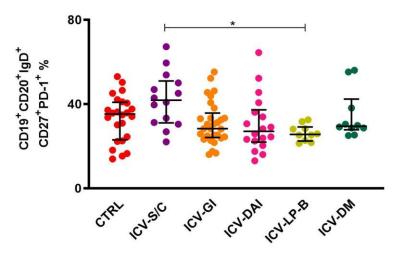


Figura 38: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ em CMSP de nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,0001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Expressão de PD-L1 $^+$ em Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19 $^+$ CD20 $^+$ IgD $^+$ CD27 $^+$)

A expressão do marcador PD-L1⁺ nos linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺) também foi avaliada não apresentou diferença significativa na comparação de sua expressão nos LB de memória sem troca de isotipo comparando pacientes ICV-geral e CTRL (**Figura 39**).

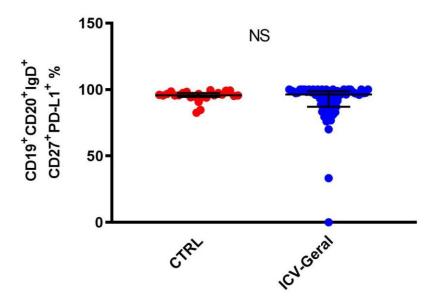


Figura 39: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-L1+ nas CMSP dos pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,0001 (****).

A análise estatística da porcentagem de Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺) com expressão de PD-1 não demonstra diferença significativa na expressão deste marcador entre pacientes ICV-S/C, paciente ICV-C/C em relação aos indivíduos CTRL (**Figura 40**).

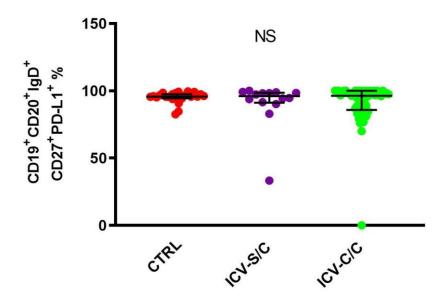


Figura 40: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-L1+ em pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), P <0,001 (****), P <0,0001 (****).

Da mesma forma, quando subdividimos os pacientes ICV-C/C de acordo com a complicação não infecciosa (GI, DAI, LP-B e DM), também não constatamos diferença estatística na expressão do marcador PD-L1⁺ de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺) na comparação entre grupos e com os grupos ICV-S/C e CTRL (**Figura 41**). Comparação entre os grupos foi realizada através do teste de Comparação Múltipla de Dunn's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis.

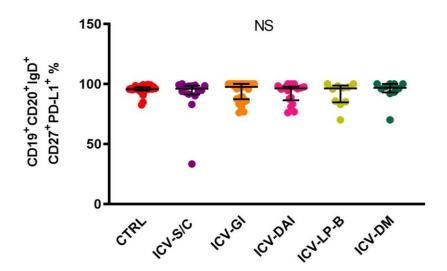


Figura 41: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-L1+ de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+)

O conjunto de marcadores CD19⁺CD20⁺IgD⁻CD27⁺CD38⁺ foi utilizado para caracterizar a subpopulação de linfócitos B de memória com troca de classe de

imunoglobulina. Ao compararmos o grupo de pacientes com ICV-geral com o grupo de indivíduos CTRL observamos uma redução significativa na frequência destes linfócitos em CMSP nos pacientes ICV-geral em comparação aos CTRL (p<0,0001) (**Figura 42**).

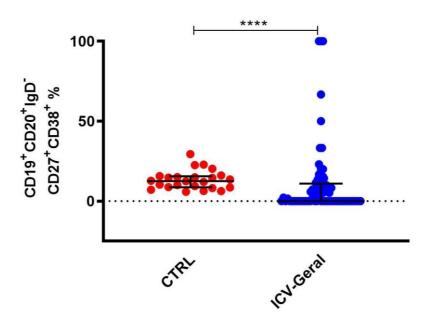


Figura 42: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) em CMSP dos pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL. e controles. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (***), p<0,0001 (****).

Ao subdividimos o grupo de pacientes em ICV-S/C e ICV-C/C, observamos que apenas o grupo de pacientes ICV-C/C demonstrou redução estatisticamente significante na porcentagem de Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) em CMSP comparado aos CTRL (p<0,0001) (**Figura 43**) sendo que o grupo ICV-S/C não apresentou diferença, nem em relação aos indivíduos CTRL assim como, nem com o grupo de pacientes ICV-C/C.

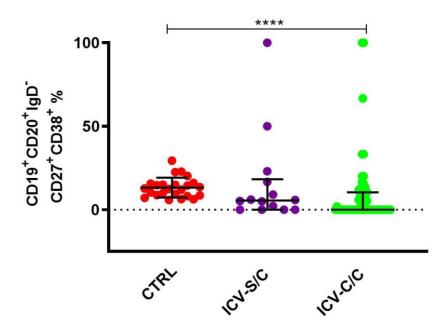


Figura 43: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) em CMSP de pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em relação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (**), P <0,001 (***), P <0,0001 (****).

Mais uma vez dividimos o grupo de pacientes ICV-C/C para avaliar se a porcentagem de Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁻CD27⁺CD38⁺) difería em algum subgrupo. Constatamos que dois subgrupos de pacientes ICV-GI e ICV-LP-B (p=0,0052 p=0,0058) apresentaram redução significativa na porcentagem destas células quando comparadas aos indivíduos CTRL (**Figura 44**).

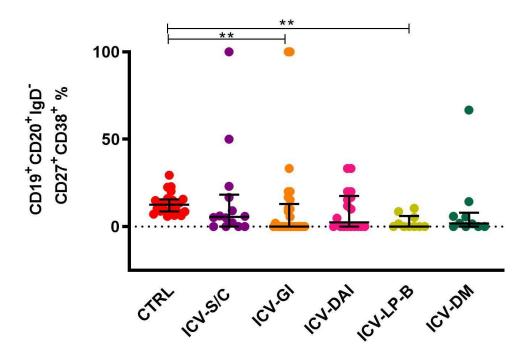


Figura 44: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) em CMSP em cada subpopulação de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (***), p<0,0001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Expressão de PD-1⁺ em Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺)

A análise da expressão de PD-1⁺ em Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺) em CMSP (**Figura 45**) demonstra que não houve diferença significativa na expressão do marcador PD-1⁺ nos pacientes ICV-geral quando comparados aos indivíduos CTRL.

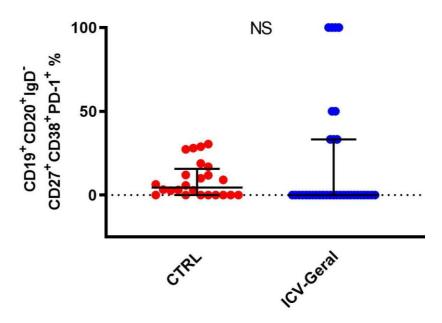


Figura 45: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (***), p<0,0001 (****).

De acordo com o mesmo racional de subdivisão dos grupos de pacientes vistos anteriormente, avaliamos a expressão de PD-1⁺ em linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺) nos pacientes ICV ICV-S/C e nos pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL. A análise estatística (**Figura 46**) demonstra que não houve diferença significativa da expressão do marcador PD-1⁺ em CMSP dos pacientes ICV-S/C, nem tão pouco dos pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL.

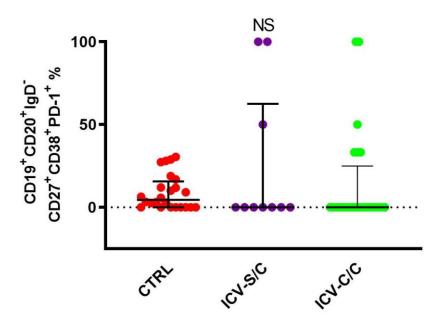


Figura 46: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ nos pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), P <0,001 (****), P <0,0001 (****).

Da mesma forma, como apresentado na **Figura 47**, a expressão do marcador PD-1⁺ de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺), não apresentou diferença significativa ao compararmos sua expressão em CMSP dos pacientes dos grupos ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL.

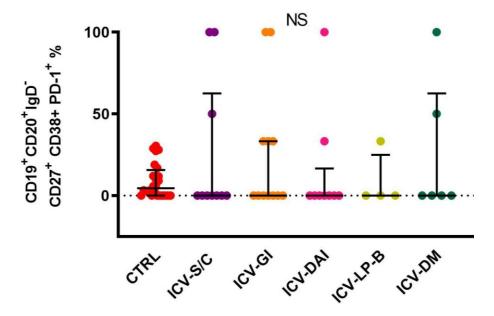


Figura 47: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) com expressão de PD-1+ em CMSP de cada subpopulação de pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação ao grupo de indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0.05 .(*), p <0.01 (***), p<0.001 (****), p<0.0001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Expressão de PD-L1⁺ em Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺)

A análise estatística da expressão de PD-L1⁺ em Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺) em porcentagem (**Figura 48**) demonstra que não houve diferença significativa na expressão do marcador PD-L1⁺ em CMSP dos pacientes ICV-geral em comparação ao grupo de indivíduos CTRL (p=0,0627).

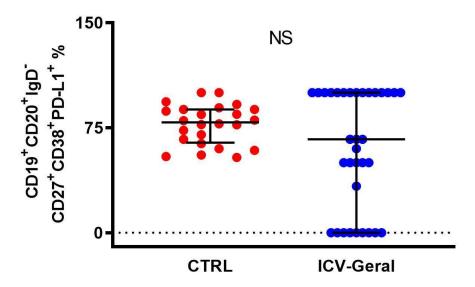


Figura 48: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-L1+ em CMSP dos pacientes ICV-geral em comparação com os indivíduos do grupo CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,0001 (****).

De acordo com a análise estatística (**Figura 49**), observamos que não houve diferença significativa na expressão de PD-L1+ nos Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) nas CMSP tanto dos pacientes ICV-S/C quanto em relação aos pacientes ICV-C/C em comparação com o grupo de indivíduos CTRL.

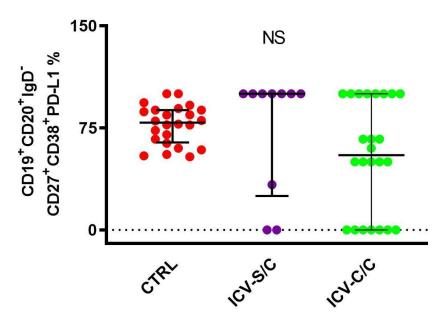


Figura 49: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ em CMSP dos pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p < 0.05.(*), p < 0.01 (***), P < 0.0001 (****), P < 0.0001 (****).

Na análise estatística, a expressão do marcador PD-L1⁺ de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺), em porcentagem, (**Figura 50**) não apresentou diferença significativa ao compararmos sua expressão em células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos CTRL em relação aos pacientes dos grupos ICV – S/C, GI, DAI, LP-B e DM. Comparação entre os grupos foi realizada através do teste de Comparação Múltipla de Dunn's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis.

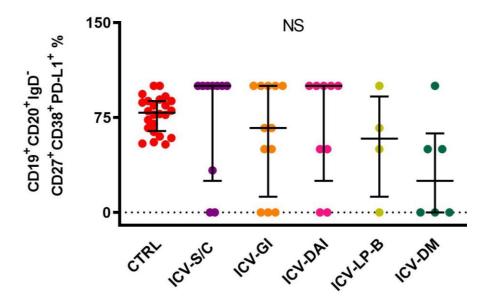


Figura 50: Porcentagem de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1+ em CMSP dos pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (***), p<0,0001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Plasmoblasto (CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺)

A penúltima fase de desenvolvimento dos linfócitos B é denominada de Plasmoblasto, cujos marcadores característicos são CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺. A análise estatística da expressão destes marcadores em porcentagem (**Figura 51**) demonstra que houve diferença significativa com menor expressão dos marcadores CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺ em CMSP dos pacientes ICV-geral (p<0,0001) em comparação ao grupo de indivíduos CTRL.

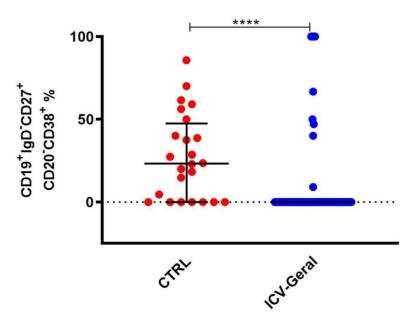


Figura 51: Porcentagem de Plasmoblasto (CD19+IgD-CD27+CD20-CD38+) em CMSP dos pacientes ICV-geral em comparação com o grupo de indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****).

A análise estatística, em porcentagem (**Figura 52**), demonstra que houve diferença significativa com menos expressão de Plasmoblastos caracterizados pelo marcadores CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺ em CMSP dos pacientes ICV-S/C (p=0,0018) em comparação aos indivíduos CTRL; Assim como, a mesma análise estatística demonstra que houve diferença significativa com menor expressão dos marcadores CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺ em CMSP dos pacientes ICV-C/C (p<0,0001) em comparação com os indivíduos do grupo CTRL.

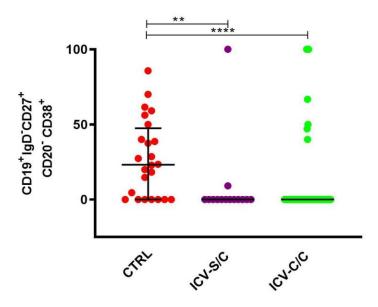


Figura 52: Porcentagem de Plasmoblasto (CD19⁺**IgD**⁻**CD27**⁺**CD20**⁻**CD38**⁺) **em pacientes ICV-S/C e pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL.** As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (**), P <0,001 (***), P <0,001 (****).

Ao analisar a frequência de Plasmoblastos nos subgrupos de pacientes ICV-S/C, ICV-GI, ICV-DAI, ICV-LP-B e ICV-DM em comparação ao indivíduos CTRL, notamos redução com diferença estatística menor dessa subpopulação de LB que nos CTRL em todos os subgrupos de pacientes respectivamente com p=0,0033; p=0,0002; p=0,0004; p=0,0004 e p=0,0004 em porcentagem (**Figura 53**).

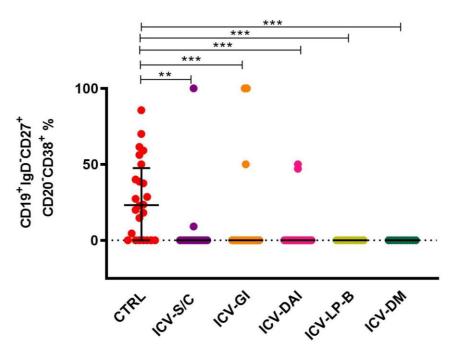


Figura 53: Porcentagem de Plasmoblasto (CD19*IgD*CD27*CD20*CD38*) em CMSP nos pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,0001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

Expressão de PD-1 em plasmoblasto (CD19+IgD-CD27+CD20-CD38+)

Na sequência analisamos a frequência de Plasmoblastos (CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺) com expressão de PD-1⁺ em CMSP nos pacientes com ICV-geral e comparamos aos indivíduos CTRL. Na análise da frequência de plasmoblastos com expressão de PD-1⁺ observamos que alguns indivíduos não apresentaram plasmoblastos, portanto, a análise da expressão de PD-1⁺ em plasmoblastos foi realizada respectivamente em nove pacientes ICV-geral e em 17 indivíduos do grupo CTRL e não verificamos diferença significativa entre os grupos avaliados em relação a expressão de PD-1 (**Figura 54**).

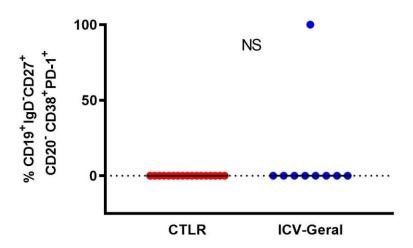


Figura 54: Porcentagem de Plasmoblasto (CD19+IgD-CD27+CD20-CD38+) com expressão de PD-1+ em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação aos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****).

Expressão de PD-L1 em plasmoblasto (CD19+IgD-CD27+CD20-CD38+)

Analisamos a frequência de plasmoblastos (CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺) com expressão de PD-L1⁺ em CMSP nos pacientes com ICV-geral e comparamos aos indivíduos CTRL. Na análise de frequência de plasmoblastos observamos que alguns indivíduos não apresentaram plasmoblastos, portanto, a análise da expressão de PD-L1⁺ em plasmoblastos foi realizada respectivamente em nove pacientes ICV-geral e 17 indivíduos do grupo CTRL e não foi observada diferença significativa entre os grupos avaliados (**Figura 55**).

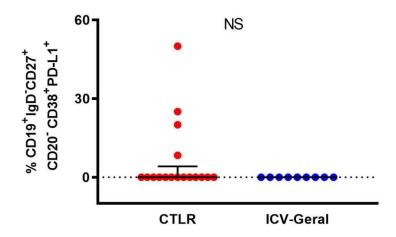


Figura 55: Porcentagem de Plasmoblasto (CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺) com expressão de PD-L1⁺ em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação aos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****).

Expressão de PD-1 nos diferentes tipos celulares da ontogenia dos LB

A ontogenia normalmente diz respeito ao desenvolvimento e à maturação de linfócitos, visando à produção de receptores de antígenos. Está relacionada ainda aos estímulos necessários à proliferação celular e àqueles voltados ao rearranjo gênico e ao comprometimento em uma linhagem específica B (com produção de BCR) ou T (a partir da produção de TCR).

Para melhor contrapor eventuais distúrbios de expressão, iniciamos a análise nos indivíduos CTRL (**Figura 56**). Observamos que LB de memória sem troca de classe e plasmoblastos mostram uma redução significativa de PD-1 em comparação à LB transicional (p=0,0020 e p<0,0001), LB naïve (p<0,0001 e p<0,0001) e LB de memória com troca de classe (p<0,0001 e p<0,0001) respectivamente. Ainda, constatamos dois grupos de expressão de PD-1 durante a ontogenia de LB: um grupo que engloba LB transicionais, LB naïve e LB de memória sem troca de isotipo e o outro grupo que engloba LB de memória com troca de isotipo e plasmoblastos. Não há diferença significativa na expressão de PD-1 intra-grupo, mas sim inter-grupos.

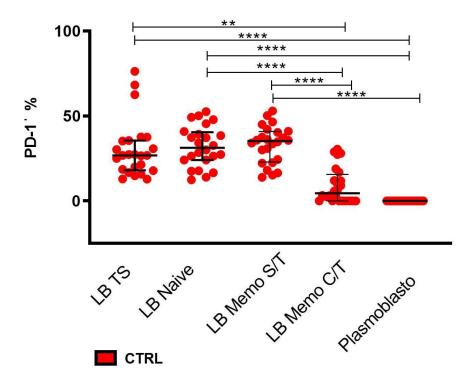


Figura 56: Porcentagem de expressão de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe e plasmoblastos em CMSP dos indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p < 0.05. (*), p < 0.01 (**), P < 0.001 (***), P < 0.0001 (****).

Em seguida, avaliamos a frequência de PD-1 nas subpopulações de LB nos pacientes com ICV-geral. Observamos que a frequência dessa molécula, assim como nos controles, tende a diminuir conforme o LB vai se desenvolvendo, tendo uma redução significativa (p=0,0053 e p=0,0299) nos LB de memória com troca e plasmoblastos em comparação com os LB sem troca e também, de LB naïve para LB com troca (p=0,0005) e naïve para plasmoblastos (p=0,0092); Além de que na medida que vai ocorrendo a diferenciação de LB transicional para todas as subpopulações de LB subsequentes observamos redução estatisticamente significativa da expressão de PD-1 nos LB naïve (p=0,0043), LB de memória sem troca de classe de imunoglobulina (p=0,0002), LB com troca de classe de imunoglobulina (p<0,0001) e por fim nos Plasmoblastos (p<0,0001) (**Figura 57**).

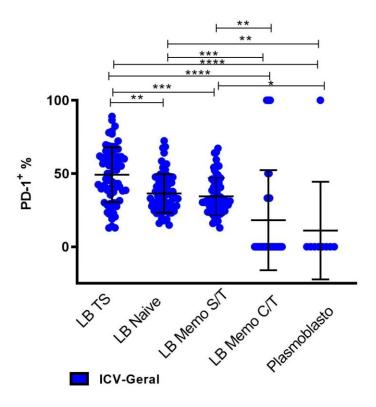


Figura 57: Porcentagem de expressão de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe e plasmoblastos em CMSP dos pacientes ICV-geral. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p < 0.05 .(*), p < 0.01 (**), P < 0.001 (***), P < 0.0001 (****).

Finalmente, fizemos a avaliação da frequência da expressão de PD-1 nos pacientes ICV-S/C. Observamos que PD-1 tem uma tendência a estar mais presente nos LB transicionais do que em relação aos outros subtipos de LB e, em comparação aos LB de memória com troca de classe observamos diferença estatisticamente significativa com menor expressão de PD-1 nos LB de memória com troca de classe de imunoglobulina quando comparados aos LB transicional (p=0,0205) (**Figura 58**).

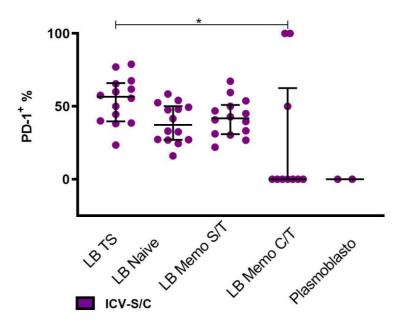


Figura 58: Porcentagem de expressão de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe e plasmoblastos em CMSP dos pacientes ICV-S/C. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (**), P <0,001 (***), P <0,0001 (****).

Ao analisarmos a expressão de PD-1⁺ em CMSP dos pacientes ICV-C/C verificamos que houve uma maior expressão de PD-1⁺ na subpopulação de LB transicional em comparação com todas as demais subpopulações que compõe a ontogenia dos LB sendo que essa diferença estatisticamente significativa foi de p=0.0457 nos LB naïve, p=0,0004 nos LB de memória sem troca de classe, p<0,0001 nos LB com troca de classe e também p=0,0003 nos plasmoblasto. Também observamos maior expressão de PD-1 nos LB naïve em comparação aos LB de memória com troca de classe (p=0,0007) e plasmoblastos (p=0,0487), e maior expressão de PD-1 em LB de memória sem troca de classe para LB de memória com troca de classe (p=0,0277) (**Figura 59**).

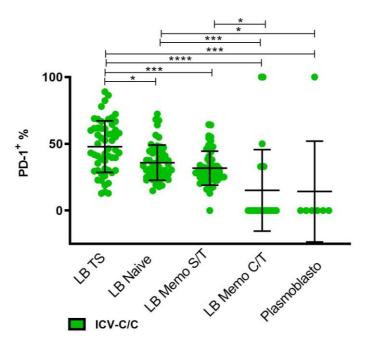


Figura 59: Porcentagem de expressão de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe, e plasmoblastos em CMSP dos pacientes ICV-C/C. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p < 0.05 .(*), p < 0.01 (**), P < 0.001 (***), P < 0.0001 (****).

Após avaliarmos cada grupo individualmente, comparamos a frequência de PD-1 durante a ontogenia dos LB entre os grupos de pacientes ICV-geral com o grupo de indivíduos CTRL. Observamos que PD-1 é significativamente mais expresso nos pacientes ICV-geral nas subpopulações de LB transicional em comparação aos indivíduos CTRL (p<0,0001), e possui uma tendência de estar mais expresso nos grupos de pacientes com ICV-geral em LB naïve, LB sem troca de classe, LB com troca de classe e nos plasmoblastos em comparação ao grupo de indivíduos CTRL (**Figura 60**).

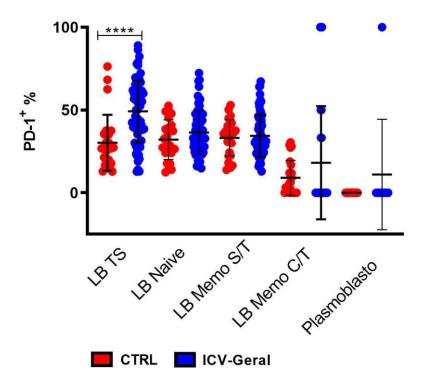


Figura 60: Porcentagem de PD-1 nas subpopulações de linfócitos B: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe e plasmoblastos em CMSP dos grupos ICV-geral e indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), P <0,001 (****), P <0,0001 (****).

Por fim avaliamos a análise estatística conforme a ontogenia das subpopulações de linfócitos B (**Figura 61**) como referência para a análise da expressão de PD-1⁺ nas CMSP dos pacientes ICV-S/C e dos pacientes ICV-C/C em comparação aos indivíduos CTRL e observamos diferença estatisticamente significativa com maior expressão de LB transicional em pacientes ICV-S/C em comparação aos indivíduos CTRL (p=0,0006) assim como, maior expressão de PD-1 no grupo pacientes ICV-C/C em comparação aos CTRL de LB transicional (p=0,0005); Ainda nessa análise conseguimos observamos maior expressão de PD-1 em LB de memória sem troca de classe dos pacientes ICV-S/C quando comparados aos pacientes ICV-C/C (p=0,0212).

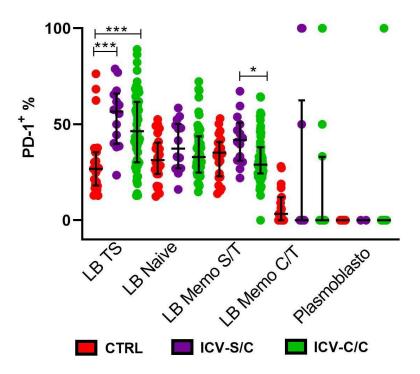


Figura 61: Porcentagem de PD-1 nas subpopulações de linfócitos B: LB LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe e plasmoblastos em CMSP dos grupos ICV-S/C, ICV-C/C e indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p < 0.05 .(*), p < 0.01 (***), P < 0.001 (****), P < 0.001 (****).

Após avaliarmos todo perfil estudado das subpopulações de linfócitos B e das moléculas co-expressas PD-1 e PD-L1, buscamos interpretar os resultados gerados pelos experimentos onde realizamos a Imunofenotipagem de Linfócitos T foliculares - LT_{FH}.

Linfócitos T foliculares – LT_{FH} (CD4⁺CXCR5⁺)

Para a caracterização fenotípica dos linfócitos T foliculares - T_{FH}, utilizamos os marcadores CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ (**Figura 61**).

Ao analisarmos a frequência dos LT_{FH} é possível observar que houve diferença significativa com maior expressão desses marcadores em pacientes ICV-geral quando comparados aos indivíduos CTRL (p<0,0001).

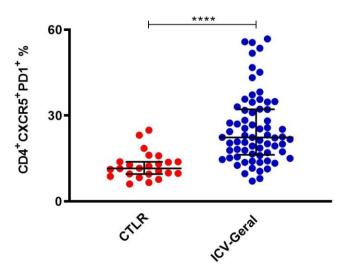


Figura 62: Porcentagem de LT_{FH} (CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺) **em CMSP de pacientes ICV-geral em comparação aos indivíduos CTRL.** As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p<0,05 (*), p<0,01 (***), p<0,001 (****), p<0,0001 (****).

Ao analisarmos frequência em porcentagem (**Figura 63**) dos Linfócitos T_{FH} verificamos que houve diferença significativa com maior expressão nos pacientes ICV-S/C em comparação aos CTRL (p=0,0349). A mesma análise estatística demonstra que também houve diferença significativa com maior expressão de LT_{FH} em CMSP dos pacientes ICV-C/C quando comparados aos indivíduos CTRL (p<0,0001).

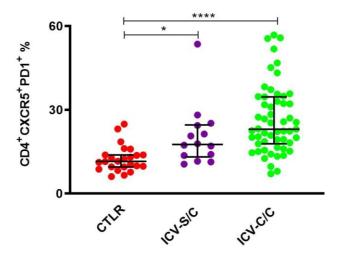


Figura 63: Porcentagem de LT_{FH} (CD4+CXCR5+PD-1+) em CMSP de pacientes ICV-S/C, pacientes ICV-C/C em comparação com o grupo de indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p < 0.05.(*), p < 0.01 (***), P < 0.001 (***), P < 0.001 (****).

Analisamos também a frequência de LT_{FH} nos subgrupos dos pacientes com complicações ICV-S/C e ICV-C/C. A análise estatística demonstra que houve diferença significativa com maior frequência destas células em pacientes com ICV-GI (p<0,0001), ICV-DAI (p=0,0002), ICV-LP-B (p=0,0074) em relação aos CTRL. O subgrupo ICV-S/C e ICV-DM não apresentam diferença significativa, porém mostra uma tendência a estarem com população de LT_{FH} aumentada em relação ao grupo CTRL (**Figura 64**).

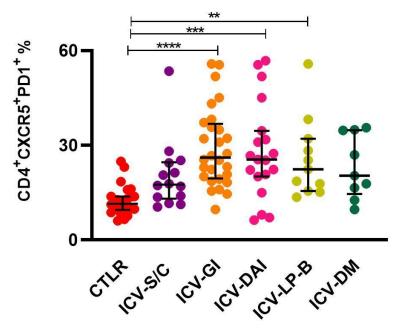


Figura 64: Porcentagem de LT_{FH} (**CD3+CD4+CXCR5+**) **em CMSP dos pacientes ICV-S/C, GI, DAI, LP-B e DM em comparação aos indivíduos CTRL.** As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de p foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn 's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (***), p<0,001 (***), p<0,0001 (****). Complicação Gastrointestinal – GI; Doença Autoimune – DAI; Linfoproliferação benigna – LP-B; Doença Maligna – DM e Controles - CTRL.

$Correlação\ entre\ expressão\ de\ PD-L1\ em\ LB\ e\ linfócitos\ T\ foliculares-LT_{FH}$ $(CD4^+CXCR5^+)$

Decidimos avaliar a correlação entre PD-L1 e LT_{FH} para melhor compreensão do funcionamento desta via nos pacientes com ICV. Observamos que pacientes com ICV demonstraram uma correlação negativa (P=0,0009 e r=0,39) entre PD-L1 de LB e LT_{FH}. Em contrapartida, essa correlação não foi observada nos indivíduos do grupo CTRL. Também observamos que ao dividir os pacientes com ICV em ICV-S/C e ICV-C/C só é

possível notar correlação negativa significativa nos pacientes com complicações (p=0,0066 e r=0,36 (**Figura 65**). A comparação entre os grupos foi realizada usando o teste de correlação de Spearman.

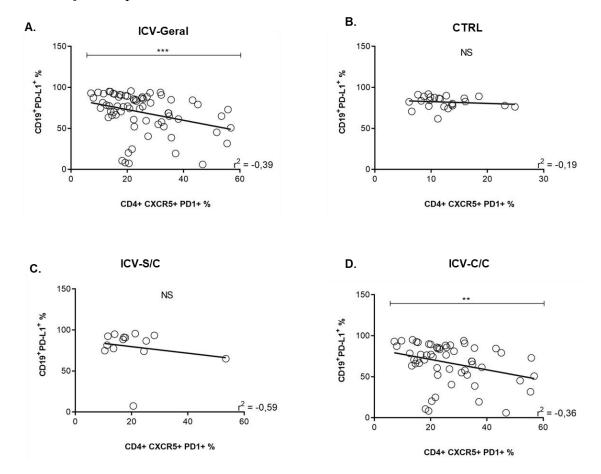


Figura 65: Correlação da expressão de PD-L1 nos LB e frequência de LT_{FH}. A. pacientes com ICV-geral; B. CTRL; C. pacientes com ICV-S/C; D. Pacientes ICV-C/C. Os valores de P e r foram calculados através do teste de spearman. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p < 0.05 .(*), p < 0.01 (***), P < 0.001 (****), P < 0.001 (****).

7. DISCUSSÃO

É possível definir como Imunodeficiências Primárias (IDP) o grupo composto por mais de 400 doenças ocasionadas por defeitos genéticos, gerando anormalidades no desenvolvimento e nas funções do sistema imune. Geralmente são identificadas por infecções recorrentes (graves ou geradas por agentes não usuais ou de baixa patogenicidade), manifestações autoimunes ou inflamatórias e com uma tendência maior a neoplasias⁷³.

Estes Erros Inatos da Imunidade (EII) podem ser enquadrados em dez categorias: imunodeficiências combinadas de células T e B, imunodeficiências combinadas com características associadas ou sindrômicas, deficiências predominantes de anticorpos, doenças de desregulação imunológica, defeitos congênitos de número e/ou função de fagócitos, defeitos da imunidade intrínseca e inata, doenças autoinflamatórias, deficiências de complemento, falhas da medula óssea e fenocópias de imunodeficiências primárias⁷³.

Para alguns autores a ICV corresponde ao segundo mais comum entre os EII (o primeiro é a deficiência de IgA), cujo diagnóstico é feito basicamente a partir de alguns critérios clínicos e laboratoriais, uma vez que a maior parte não tem diagnóstico molecular definido. Consequentemente, o diagnóstico é retardado e o início do tratamento da ICV com reposição de imunoglobulina humana, visando à prevenção de infecções, evitando, assim, a ocorrência de sequelas em órgãos como os pulmões, também ^{15;73}.

Trata-se de uma síndrome complexa constantemente chamada de "guarda chuva" por conta da variedade de manifestações clínicas apresentadas por seus pacientes ^{15;74}. Tem sido clinicamente dividida ultimamente em dois grupos principais: pacientes apenas com infecções recorrentes, sem outras manifestações, e pacientes que apresentam além de infecções outras complicações, como doenças autoimunes e inflamatórias, linfoproliferativas, doenças malignas ¹⁵. Cunningham-Rundles *et al.*, 2020 ⁷⁵ em uma revisão de 623 pacientes identificou que apenas 31% dos seus pacientes faziam parte do grupo de pacientes sem complicações, enquanto que Chapel *et al.*, 2008 relatou 26% de pacientes pertencentes a este grupo^{6, 75}. Estes dados mostram que a maior parte dos pacientes com ICV são os que têm complicações não infecciosas, sendo assim, pacientes que têm maior morbidade e mortalidade.

Em nosso estudo foram avaliados 14 (25%) pacientes pertencentes ao grupo sem complicações (ICV-S/C) e 55 (75%) pacientes pertencentes ao grupo (ICV-C/C). Apesar do nosso grupo ser apenas uma amostra da coorte de pacientes acompanhada no Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP, a proporção de pacientes S/C e C/C é semelhante à relatada em outras casuísticas. Os pacientes do grupo ICV-C/C ainda foram subdivididos em subgrupos de acordo com suas manifestações clínicas não infecciosas gastroenteropatias (52,7% - inclui pacientes com padrão celíaco, hipertensão portal, diarreia crônica e câncer gástrico), pacientes com doenças autoimunes (49,1%), com linfoproliferação benigna (76,4%) e com doenças malignas (21,8%, destes, 7,3% apresentaram linfoma), sendo que alguns pacientes foram incluídos em mais de um subgrupo. Em uma revisão publicada em 2020, Cunningham-Rundles relata que pelo menos 25% dos pacientes com ICV apresenta autoimunidade, 20-60% apresentam doenças gastrointestinais, 8-22% doença granulomatosa, 10% com doença hepática, e 1,8 a 5 vezes maior risco de desenvolver doenças malignas. Chapel et al., 2008 comparando as casuísticas de diversos centros europeus, observou linfoproliferação policional em 12-54% dos pacientes, autoimunidade em 27-48% dos pacientes, enteropatias em 3-15% e doenças linfoproliferativas em até 6% dos pacientes ^{6; 75}. Desta forma, podemos concluir que nossos pacientes apresentaram frequência semelhante de doenças autoimunes e linfoproliferativas malignas, mas maior prevalência de pacientes com linfoproliferação benigna e gastroenteropatias - possivelmente pelo fato deste nosso subgrupo englobar diversas patologias gastrointestinais.

Na ICV as infecções do trato respiratório, como pneumonia, bronquite crônica e sinusite costumam ser as manifestações mais presentes, inclusive, geralmente aparecem como primeiro sintoma nestes pacientes¹⁵. Estas infecções estão presentes em 70 a 99% dos pacientes com ICV⁷⁶, dado corroborado por nossos achados onde observamos em ambos os grupos de pacientes prevalência de 81 a 93% de infecções respiratórias altas e pneumonias.

Em uma coorte de 95 pacientes da Finlândia, Kainulainen *et al.*, 2001⁷⁷ descreveu que 66% dos seus pacientes sofriam com pneumonias recorrentes, enquanto que em uma coorte Francesa de 252 pacientes, Oksenhender *et al.*, 2008⁷⁸ identificou que 61% dos seus pacientes apresentaram pneumonias. Em nossa coorte as pneumonias estavam presentes em 90,9% dos pacientes com ICV-C/C, e em 85,7% dos ICV-S/C.

As infecções aparecem como a principal causa de morte em pacientes com deficiência de anticorpos nos Estados Unidos, porém, complicações não infecciosas são as principais responsáveis por diminuir a sobrevida dos pacientes ⁷⁶, sendo relatado por Resnick *et al.*, 2012⁷⁹ que o risco de morte em pacientes com ICV que apresentem complicações além das infecções é cerca de 11 vezes maior em comparação a pacientes sem complicações e levando em consideração as complicações inflamatórias e autoimunes do trato gastrointestinal (TGI) esse risco pode ser de 2,8 vezes maior comparado a pacientes sem complicações GI.

Em geral, grande parte dos pacientes de ICV apresentam níveis normais de linfócitos T e B no sangue periférico, mas as células B destes são incapazes de se diferenciar em células plasmáticas *in vivo*, o que pode ocasionar hipogamaglobulinemia. Tal deficiência em células B é responsável pela alta incidência de infecções bacterianas¹⁰.

O sistema imune adaptativo evoluiu para eliminar qualquer ameaça ao organismo e através de respostas imunes combinadas entre LT e LB consegue atingir seu objetivo causando danos aos antígenos invasores sem deixar de preservar suas células e manter a autotolerância. Essa proteção eficaz ocorre principalmente através de mecanismos reguladores que permitem o controle e equilíbrio das respostas imunes durante o desenvolvimento dos linfócitos nos órgãos linfóides centrais e também na periferia⁸⁰. PD-1 faz parte da família de co-receptores formada por CD28, CTLA-4 e ICOS, tem função de fornecer sinais regulatórios negativos para resposta imune de LT e LB e ao contrário de outros co-receptores que são expressos apenas nos LT, também podem ser expressos na superfície de LB ativados e ter um papel importante na regulação dos LB⁸¹.

A imunidade adaptativa utiliza diversos subtipos de LT para o combate de infecções geradas por diferentes patógenos. Para a imunidade humoral dependente de LT, os LT_{FH} são um subtipo especializado que migra para o GC onde interage com o LB auxiliando a diferenciação dessas células e consequentemente a produção de anticorpos⁶¹. Outra característica importante observada nos LT_{FH} é a elevada expressão de PD-1, que interage com seu ligante PD-L1 e PD-L2 expressos por células epiteliais e hematopoéticas⁵⁹.

Hams *et al.*, 2011, estudando camundongos deficientes de PD-L1 durante infecção por *S.mansoni* identificaram elevada produção de imunoglobulinas, expansão do GC e elevada frequência de LT_{FH}. Além destas observações, outro achado importante foi que o bloqueio da via PD-1/PD-L1 através do uso de anticorpos monoclonais melhorou a

produção de anticorpos e aumentou o número de LT_{FH}, porém o bloqueio da via PD-1/PD-L2 não alterou/interferiu na produção destas células, indicando que essa via não regula os LT_{FH}⁶¹.

Enquanto a via PD-1/PD-L1 tem sido frequentemente estudada na interação de LT e LB respectivamente, o papel de PD-1 nos LB ainda é muito pouco discutido, contudo, em 2013, Thibult *et al.*, estudou a expressão desta molécula nos LB de indivíduos saudáveis, observando que PD-1 era fortemente expresso nos LB e suas subpopulações, porém quando esses LB entravam no centro germinativo essa molécula deixava de ser expressa na superfície dessas células e só voltavam a ser expressas quando esses linfócitos saíam do GC para terminar sua maturação, sendo esse processo de "switch off" de PD-1, essencial para proliferação de LB e diferenciação em LB de memória⁵³.

Diante desses dados, nossa hipótese foi que uma possível expressão diferenciada de PD-1 e PD-L1 nos LB poderia estar interferindo diretamente no processo de maturação destes linfócitos e produção de anticorpos. Para tanto, avaliamos a frequência de PD-1 e PD-L1 nos diferentes subtipos de LB em pacientes diagnosticados com ICV, e comparamos a frequência destas moléculas nos diferentes fenótipos clínicos de ICV e com os indivíduos saudáveis.

Conforme ocorre a maturação dos LB, a composição dos subtipos de LB presentes no sangue periférico vai se modificando com o decorrer dos anos. Morbach *et al.*, 2010 avaliou a frequência das subpopulações de LB em sangue periférico de indivíduos saudáveis e observou que com o passar dos anos a frequência de LB transicionais e naïve diminuem rapidamente logo nos primeiros anos de vida, enquanto que a frequência de LB de memória sem troca de classe e com troca de classe aumentavam gradativamente. Já os plasmoblastos são raramente detectados no sangue periférico¹⁸.

Seguindo a ordem de ontogenia dos LB, primeiro avaliamos a frequência das subpopulações destes linfócitos em nossos pacientes para depois avaliar a frequência da expressão de PD-1 e PD-L1 em cada subtipo destes linfócitos.

Em nosso estudo, observamos redução da frequência de LB nos pacientes ICV em relação ao grupo CTRL. Wehr *et al.*, 2008, também observou uma ligeira redução de LB totais nos pacientes com ICV, sendo que em 10% deles essa redução era acentuada com menos de 1% de LB em sangue periférico¹⁹. Ai Kindi *et al.*, 2012 realizando um estudo com subtipos de LB em pacientes com ICV, também observou redução da frequência destas células em sua coorte⁸². Ainda, subdividindo nossos pacientes em pacientes com

infecções apenas e com complicações não infecciosas observamos que nos pacientes do grupo ICV-C/C essa redução era maior e significativa, enquanto em nossos pacientes ICV-S/C houve apenas uma tendência de redução dos LB totais. Outro achado relevante foi que subdividindo o grupo ICV-C/C, encontramos essa redução significativa apenas para os subgrupos com gastroenteropatias e doenças autoimunes. Esta redução da frequência de LB ser mais acentuada nos pacientes com complicações e em especial nos pacientes com manifestações do TGI faz sentido, uma vez que em 2012, Resnick *et al.*, já haviam relatado que em uma coorte de pacientes norte-americanos a redução de LB estava associada a maior morbidade e mortalidade⁷⁹, e em 2008, Chapel *et al.*, relatou que pacientes sem complicações tinham uma sobrevida maior em comparação a pacientes com complicações, e que dentre as complicações aqueles que tinham enteropatias tinham uma taxa de mortalidade mais elevada⁶.

Os LB recém formados que saíram da MO são considerados imaturos e denominados LB transicionais, são os precursores dos LB naïve maduros e também dos plasmócitos de vida curta. Em 2008, durante a classificação EUROclass para ICV, Wehr *et al.*, descreveram que esta população estava discretamente aumentada nos pacientes com ICV, e que em 15% dos pacientes este aumento mais proeminente estava associado à redução de LB de zona marginal¹⁹. Ainda, mutações em BAFF ("B cell activating factor") podem bloquear a diferenciação dos LB transicionais T1 para T2 nos pacientes com ICV e consequentemente contribuem para o aumento destas células nestes pacientes^{25; 83; 84}. Nossos dados corroboram com o que foi descrito na literatura, estando a frequência desta população de células aumentada também em nossos pacientes em comparação aos CTRL.

O aumento significativo se manteve quando dividimos nossos pacientes de acordo com o fenótipo clínico e comparados aos CTRL, entretanto, não houve diferença entre os 2 grupos de ICV. À subdivisão do grupo ICV-C/C observamos que apenas os pacientes com complicações GI e autoimunes mantinham um aumento de LB transicional em relação ao grupo controle. Um achado importante descrito na literatura que poderia contribuir para o aumento de LB transicionais nos pacientes ICV com autoimunidade é a presença de linfoadenopatia. Entretanto, Herrera *et al.*, 2019 apesar de observar aumento dos LB transicionais nos pacientes com ICV, não observou diferença significativa entre pacientes com autoimunidade e sem autoimunidade.

Como já observado por Morbach *et al.*, 2010 a frequência dos LB naïve em indivíduos saudáveis diminui logo nos primeiros anos de vida¹⁸. Já nos pacientes com ICV, Pedreschi *et al.*, 2014, avaliando a frequência de LB naïve em pacientes com ICV observou que os níveis de LB naïve são similares nos grupos ICV e controle²⁵. Contudo, quando linfócitos são cultivados com peptídeo HA de influenza pré-vacinação contra influenza observa-se uma redução dos níveis destes linfócitos nos pacientes com ICV, porém, pós-vacinação a frequência destas células aumenta nos pacientes, só que não o suficiente para gerar diferença significativa para com os CTRL²⁵.

Outro estudo que também demonstra não haver diferenças dos níveis de LB naïve entre pacientes com ICV e CTRL é o estudo de Piqueras *et al.*, que em 2003 avaliou pacientes com ICV a partir de 3 grupos, avaliando um grupo com frequência de LB naïve e de memória em níveis normais, um segundo grupo que apresenta redução de LB de memória sem troca de classe e níveis normais de LB de memória comutados, e um terceiro grupo com redução de ambas as populações de LB de memória. Nos três grupos, comparando aos indivíduos saudáveis, não foram observadas diferenças significativas de frequência de LB naïve⁸⁶.

Em nosso estudo, observamos que em nossa coorte os pacientes com ICV mostraram uma frequência de LB naïve aumentada em relação aos CTRL. Quando subdividimos os pacientes, esse aumento se manteve, porém sem diferença significativa entre pacientes ICV-S/C e ICV-C/C. Nossos resultados corroboram com o descrito por Vlkova *et al.*, que em 2006 observou aumento da frequência de LB naïve em pacientes ICV com níveis reduzidos de LB de memória com troca de classe, e em 2010 esse mesmo grupo de pesquisadores identificou aumento de LB naïve em pacientes com ICV com níveis reduzidos ou normais de CD21^{20; 87}.

Durante o processo de maturação dos LB, os linfócitos percorrem os folículos do baço, linfonodos e MO, até ser ativada por algum antígeno ou sofrer apoptose. Esse processo possibilita que os LB naïve completem sua maturação em LB de memória e plasmócitos⁸⁸.

A presença de CD27 na superfície de LB é uma das principais características encontradas em LB que sofreram hipermutação somática e que são capazes de produzir imunoglobulinas. CD27 é considerado um marcador de LB de memória e na ICV a distúrbio no processo de hipermutação somática indica também alteração dos LB no GC⁸⁸. No sangue periférico, os LB de memória CD27⁺ podem ser subdivididos em dois

subtipos: células IgD⁺CD27⁺, que caracterizam os LB de memória sem troca de classe de imunoglobulina, e produzem predominantemente IgM, e células IgD⁻CD27⁺, que são as células com troca de classe de imunoglobulinas, ou seja, produzem IgG, IgA ou IgE⁸⁹.

Em indivíduos saudáveis, 25% do total de LB são representados pelos LB de memória sem troca de isotipo, enquanto 40% é representado pelos LB de memória comutados em adultos²⁵. Segundo a literatura^{25; 90; 91} os LB de memória sem troca de classe nos pacientes com ICV podem estar reduzidos ou não. Já os LB de memória com troca de classe estão reduzidos de forma expressiva na ICV, fazendo parte inclusive dos critérios de diagnóstico desta imunodeficiência^{19;50}. Em nosso estudo, identificamos que tanto os LB de memória sem troca de classe, como os LB de memória com troca de isotipo apresentaram redução em comparação aos CTRL, corroborando com o descrito na literatura. Ainda, quando avaliamos os grupos ICV-S/C e ICV-C/C, essa redução dos LB de memória com troca de classe se manteve apenas nos pacientes com complicações, tendo apenas uma tendência a estar reduzido nos pacientes com ICV-S/C. A redução dos linfócitos B de memória sugere um defeito de desenvolvimento dos LB no centro germinativo¹⁹.

Os plasmoblastos foram a última população a ser estudada em nosso trabalho. Como dito anteriormente por Morbach *et al.*, 2010, essa população é raramente detectada em sangue periférico¹⁸. Nossos resultados mostraram que apesar da frequência reduzida em todos os grupos participantes do nosso estudo, a diminuição dos plasmoblastos foi mais expressiva nos pacientes com ICV em relação ao grupo controle. Em 2008, Wehr *et al.*, associou essa redução de plasmoblastos ao aumento da incidência de doenças autoimunes nos pacientes com ICV¹⁹, contudo, em nosso estudo, não observamos diferenças dos pacientes com doenças autoimunes para os demais pacientes. Pedreschi *et al.*, estudando a população de plasmoblastos em indivíduos que seriam vacinados com vírus influenza também verificou reduzida frequência destas células nos pacientes com ICV, mas que, após a vacinação, observaram um aumento significativo em todas as condições estudadas (basal, cultivo com lisado viral de influenza e com peptídeo HA). Contudo, após o terceiro mês de vacinação observaram que a frequência de plasmoblastos, mesmo com estímulo específico, caiu gradativamente ²⁵.

Em resumo, nossos achados em relação às alterações dos diversos subtipos de LB analisados estão de acordo com o descrito na literatura e refletem o distúrbio na maturação

dos linfócitos B e que, consequentemente, determinam a hipogamaglobulinemia característica da ICV.

Após a avaliação da frequência de LB, verificamos a expressão de PD-1 e PD-L1 nesses subtipos. Apesar de haver poucos estudos da expressão de PD-1 em LB, alguns autores demonstraram que PD-1 pode ter um papel importante no desenvolvimento de LB, como Good-Jacobson *et al.*, 2010, que estudando camundongos knockout, descreveram que a ausência de PD-1 pode contribuir para diminuição de células plasmáticas de vida longa⁵⁵.

Como citado anteriormente, Thibult *et al.*, 2013, avaliaram a expressão desta molécula nos subtipos de LB de indivíduos saudáveis. Eles quantificaram transcritos de PD-1 nos LB periféricos não ativados, e compararam a expressão desta molécula nos diversos subtipos de indivíduos saudáveis em CMSP e linfonodos. Foi descrito por Thibult *et al.*, PD-1 era expresso em LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe, porém nos LB do GC, foi observado perda da sinalização por PD-1, num processo chamado de "switch off" abordado mais cedo nesta discussão, onde PD-1 perde sua expressão e volta a expressar após sair do GC para completar sua maturação. Ainda, observaram também que os LB de memória sem troca de classe expressavam mais PD-1 em comparação aos LB naïve e LB comutados⁵³.

Em nosso estudo observamos que PD-1 também foi expresso nos LB naïve, LB de memória sem troca de classe e com troca de classe, corroborando com o descrito por Thibult *et al.*, 2013, porém sem diferença estatística na expressão de PD-1 nos LB de memória sem troca de classe para os LB naïve, contudo, observamos que os LB de memória com troca de classe PD-1 estava reduzido em comparação aos LB transicionais, LB naïve, e LB sem troca de classe nos indivíduos saudáveis. Já nos pacientes com ICV, observamos que PD-1 era mais expresso nos LB transicionais em comparação a todos os outros subtipos estudados. Também observamos que os LB naïve e de memória sem troca de classe expressavam mais PD-1 em comparação aos LB de memória comutados e plasmoblastos, porém, não houve diferença na expressão de PD-1 dos LB de memória sem troca de classe para LB naïve.

Quando separamos os grupos de ICV em ICV-S/C e ICV-C/C observamos diferenças da expressão de PD-1 durante a maturação de LB em cada grupo. Enquanto no grupo sem complicações só houve diferença estatística da expressão de PD-1 dos LB transicionais para os LB de memória com troca de classe, no grupo de ICV-C/C há um

aumento significativo da expressão de PD-1 nos LB transicionais comparado aos demais subtipos de LB, e também observamos que PD-1 foi mais expresso nos LB naïve do que em LB com troca de classe e plasmoblastos. PD-1 foi mais expresso também nos LB sem troca de classe do que em LB comutados.

Por fim, também comparamos a expressão de PD-1 nos subtipos de LB entre os pacientes com ICV e indivíduos CTRL. Entendemos que o perfil de expressão de PD-1 aparenta ser similar entre os CTRL e pacientes com ICV, contudo, notamos uma diferença significativa entre os LB transicionais, estando PD-1 muito mais expresso nos pacientes com ICV, porém, ainda não temos informações suficientes para definir o motivo desta diferença. Outro achado importante foi que PD-1 é mais expresso nos LB sem troca de classe de pacientes com complicações do que em pacientes com apenas infecções.

Assim como PD-1, também não temos conhecimento de nenhum outro estudo que tenha averiguado a expressão de PD-L1 em subpopulações de LB em pacientes com ICV.

PD-L1 expresso nos LB e em outras APCs, é o ligante de PD-1 expresso em LT_{FH}. Sabemos que essa interação é importante para a maturação final dos LB, e a via PD-1/PD-L1 tem um papel regulador nessa interação. Por este motivo o estudo da expressão de PD-L1 em LB e PD-1 em LT_{FH} é de suma importância.

Em nosso estudo, identificamos que a expressão de PD-L1 nos LB totais de pacientes com ICV e nos indivíduos controles é similar, apresentando apenas uma tendência a estar reduzido nos pacientes, contudo, quando dividimos os pacientes entre ICV-S/C e ICV-C/C, observamos uma redução significativa da expressão de PD-L1 em LB totais dos pacientes com complicações não infecciosas quando comparados aos pacientes sem complicação e controles, e uma redução significativa de PD-L1 em LB naïve dos pacientes ICV-C/C em relação aos CTRL. Ainda, quando selecionamos os pacientes ICV-C/C e subdividimos, encontramos redução significativa de PD-L1 em LB naïve apenas nos pacientes com autoimunidade. Em 2018, Zacca *et al.*, verificaram a expressão de PD-L1 em indivíduos saudáveis e pacientes com artrite reumatoide (AR), e observaram que PD-L1 é menos expresso nos pacientes com AR do que em indivíduos saudáveis. Esses dados sugerem que uma diminuição da expressão de PD-L1 em LB esteja relacionada a doenças autoimunes⁹².

Após avaliar a expressão de PD-L1 nos LB, seguimos nosso estudo verificando a frequência de LT_{FH}. Observamos que os pacientes com ICV têm frequência maior de LT_{FH} em comparação aos CTRL. Quando dividimos esses pacientes em ICV-S/C e IV-

C/C, encontramos maior frequência de LT_{FH} em ambos os grupos comparado aos CTRL, contudo, essa frequência é mais proeminente nos pacientes com complicações.

Coraglia *et al.*, 2016, já havia estudado a frequência dos LT_{FH} em uma coorte de pacientes com ICV na Argentina, onde subdividiram esses pacientes em 2 grupos, sendo o grupo I formado por pacientes com doenças autoimunes e/ou granulomatosas, e o grupo II formado por pacientes sem essas complicações. Eles também relataram uma frequência maior de LT_{FH} em pacientes com ICV, verificando também um aumento mais significativo destas células nos pacientes que apresentaram complicações autoimunes e/ou granulomatosas⁴².

Por último, também entendemos ser importante correlacionar a expressão de PD-L1 em LB com a expressão de LT_{FH} nos pacientes com ICV. Até o presente momento não temos conhecimento de outro estudo que tenha avaliado a correlação entre essas duas moléculas em pacientes com ICV.

Em nossos resultados de correlação de PD-L1 de LB com LT_{FH} observamos uma correlação inversa entre eles em pacientes com ICV, significando que, quanto menos PD-L1 em LB mais LT_{FH} é observado. Ainda, dividindo os pacientes ICV em ICV-S/C e ICV-C/C observamos uma correlação significativa apenas no grupo com complicações. Ainda, nos indivíduos CTRL também não observamos diferença significativa.

Concluindo, entendemos que a correlação de PD-L1 e LT_{FH} demonstra que a via PD-1/PD-L1 tem um papel importante no desenvolvimento dos LB em pacientes com ICV, e que sua alteração, contribui para um prejuízo na maturação e produção de imunoglobulinas nestes pacientes, contudo mais estudos são necessários para um melhor entendimento do papel desta via nos pacientes com ICV.

Em 2013, Cubas *et al.*, estudou o bloqueio da via PD-1/PD-L1 em LT_{FH} de pacientes com HIV. A expressão de PD-1 estava elevada nesses pacientes em comparação a indivíduos saudáveis. Esse aumento da expressão de PD-1 acarreta na inibição da proliferação e atividade celular já que regula negativamente a secreção de IL-4 e IL-21 e também inibe a função de ICOS. Nesse estudo, o bloqueio da via PD-1/PD-L1 permitiu uma melhora na produção de células plasmáticas e anticorpos⁴⁴.

Acreditamos também que estudos com bloqueio da via PD-1/PD-L1 podem ser importantes para entender o funcionamento desta via nos pacientes com ICV, podendo inclusive ter um potencial terapêutico para estes pacientes, permitindo talvez a conclusão da maturação dos LB e melhora na produção de imunoglobulinas.

8. CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados podemos concluir que:

- 1. Observamos redução de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina e plasmoblastos em pacientes com ICV de ambos os fenótipos clínicos e também de LB de memória com troca de classe de imunoglobulinas no grupo ICV com complicações não infecciosas confirmando dados reportados na literatura e que sugere uma falha de diferenciação das células B;
- 2. Não observamos ausência de expressão de PD-1 nos subtipos de LB: LB transicional, LB naïve e LB de memória sem troca de isotipo, de pacientes com ICV. Entretanto, LB de memória com troca de classe de imunoglobulinas e plasmoblastos apresentaram redução/ausência de expressão de PD-1 mas que também foi observada em controles, e, portanto, PD-1 não determina o bloqueio na maturação de LB.
- 3. Observamos expressão diferenciada de PD-1 nos diferentes subtipos de LB, sendo mais expresso em LB transicionais, LB naïve e LB de memória sem troca de isotipo. A expressão de PD-1 foi bastante reduzida e até ausente em LB de memória com troca de isotipo e em plasmoblastos. A expressão de PD-1 nos pacientes com ICV seguiu padrão semelhante aos controles, entretanto, controles apresentaram diferenças mais significativas entre os diversos subtipos de LB. Nos pacientes ICV estas diferenças seguiam apenas uma tendência para a maioria dos subtipos.
- 4. A expressão de PD-L1 está reduzida apenas no grupo de pacientes com ICV e complicações não infecciosas. Ainda, pacientes com este fenótipo clinico apresentaram uma correlação negativa entre expressão de PD-1 em LB e frequência de LT_{FH};
- 5. O grupo de pacientes ICV com complicações não-infecciosas tem expressão diferenciada de subtipos de linfócitos B, de expressão de PD-1/PD-L1 e de frequência de linfócitos T foliculares, sugerindo que possivelmente a doença tem fisiopatologias distintas. Dentro deste grupo de ICV com complicações, os que têm comportamento destoante preferencialmente são os pacientes com doenças autoimunes e os com complicações gastrointestinais.

6. A via PD-1/PD-L1 está alterada nos pacientes com ICV, possivelmente contribuindo para hipogamaglobulinemia nestes pacientes, entretanto acreditamos que alterações nesta via sejam consequência e não a causa da ICV já que a avaliação dos pacientes ICV sem complicações não mostrou diferença significativa na correlação entre PD-L1 em LB e LT_{FH};

ANEXOS

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃ	O DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL I
1. NOME:	
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:	
DATA NASCIMENTO://	/
ENDEREÇO:	
BAIRRO:	CIDADE:
CEP:	TELEFONE: DDD ()
2. RESPONSÁVEL LEGAL:	
NATUREZA (grau de parentesco, tutor	, curador etc.):
	SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO://	
ENDEREÇO:	
	CIDADE:
DADOS SOBRE A PESQUISA 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PE	SQUISA: "Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante P
DADOS SOBRE A PESQUISA 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PE nas subpopulações de Linfócitos B en	A SQUISA: "Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante P n pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV)."
DADOS SOBRE A PESQUISA 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PE	A SQUISA: "Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante P n pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV)."
DADOS SOBRE A PESQUISA 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PE nas subpopulações de Linfócitos B en	A SQUISA: "Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante P n pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV)." a Kokron
DADOS SOBRE A PESQUISA 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PE nas subpopulações de Linfócitos B en PESQUISADOR : Dra. Cristina Mari	A SQUISA: "Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante P n pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV)." a Kokron te INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 49888
DADOS SOBRE A PESQUISA 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PE nas subpopulações de Linfócitos B en PESQUISADOR : Dra. Cristina Mari CARGO/FUNÇÃO: Médica Assisten	A SQUISA: "Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante P n pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV)." a Kokron te INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 49888 na de Imunologia Clínica e Alergia
DADOS SOBRE A PESQUISA 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PE nas subpopulações de Linfócitos B en PESQUISADOR : Dra. Cristina Mari CARGO/FUNÇÃO: Médica Assisten UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplin	A SQUISA: "Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante P n pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV)." a Kokron te INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 49888 na de Imunologia Clínica e Alergia QUISA:

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : $\underline{3}$ ANOS

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

- 1 Desenho do estudo e objetivo(s): O senhor (a) tem uma doença na qual não existe produção de algumas substâncias que normalmente protegem as pessoas das infecções. Estas substâncias são chamadas de anticorpos ou imunoglobulinas. No caso da sua doença, a Imunodeficiência Comum Variável, o seu organismo, por um motivo que nós ainda desconhecemos, deixou de produzir estas imunoglobulinas. Por causa disto, o senhor (a) começou a apresentar várias infecções, e, para proteger-se dessas infecções é necessário repor estes anticorpos, que fazemos administrando imunoglobulinas, por via venosa, uma vez por mês. Este tratamento é feito gratuitamente no Hospital das Clínicas. mas para estudarmos melhor a causa desta doença e eventualmente descobrirmos um tratamento mais específico e eficiente, gostaríamos de avaliar a expressão das moléculas PD-1 e seu ligante PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B presente no seu sangue. Para esta avaliação serão necessárias coletas de 4 amostras de sangue, uma antes do senhor tomar imunoglobulina intravenosa, a segunda de 3 meses após, a terceira após 6 meses e a quarta 1 ano após do início do seu tratamento para realizarmos algumas análises científicas. Essas coletas de sangue periférico não apresentam nenhum risco. Em consequência da sua doença, não sabemos se essas moléculas interferem no seu tratamento e é exatamente isto que queremos estudar.
- 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 (4 colheres de sopa), para realização dos exames de laboratório para avaliação da expressão das moléculas PD-1 e seu ligante PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B e outros parâmetros importantes para correlacioná-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 doutorado *Bianca Almeida Natali dos Santos*, que podem ser encontradas no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – 8° andar – Bloco 8A, São Paulo-SP, Prédio dos Ambulatórios, secretaria de Imunologia e Alergia Telefone (s) 2661-6098 ou 2661-6225, e-mail: imunodisciplina.ichc@hc.fm.usp.br.

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 – 5° andar – CEP 05403010 São Paulo-SP. Tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.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 expressão e função de PD-1 e seu ligante PD-L1 nas subpopulações de Linfócitos B em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV)."

Eu discuti com a *Dra. Cristina Kokron e a aluna Bianca Almeida Natali dos Santos* 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 <u>/ /</u>
(Para casos de pacientes menores de 18 anos, an deficiência auditiva ou visual). (Somente para o responsável do projeto)	alfabetos, semi-analfabetos ou portadores de
Declaro que obtive de forma apropriada e volun	tária o Consentimento Livre e Esclarecido deste
paciente ou representante legal para a participaç	
Assinatura do responsável pelo estudo	Data/



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV)

Pesquisador: Cristina Maria Kokron

Área Temática: Versão: 1

CAAE: 58699416.2.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.752.240

Apresentação do Projeto:

Estudo prospectivo, composto por 40 pacientes de ambos os sexos com Imunodeficiência Comum Variável (Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP) e 20 voluntários saudáveis pareados por idade sem histórico da doença, entre 18 a 60 anos. Em 10 pacientes serão realizadas coletas seriadas em quatro intervalos de tempo: 1) no momento do diagnóstico, antes da administração de imunoglobulina e após 2) três meses, 3) seis meses e 4) um ano do início do tratamento com imunoglobulina intravenosa. Serão coletados 40 mL de sangue periférico por punção venosa.

Avaliar a expressão de PD-1 e PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável e sua correlação com as diferentes manifestações clínicas e imunológicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há benefícios diretos aos participantes. Riscos apenas relacionados à punção venosa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será testada a hipótese de que a expressão diferenciada de PD-1 e PD-L1 nos linfócitos B dos

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar UF: SP Muni CEP: 05.403-010

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Página 01 de 03



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 1.752.240

pacientes com Imunodeficiência Comum Variável interfere na diferenciação e função das subpopulações de linfócitos inclusive dos plasmoblastos destes indivíduos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Favor utilizar o formulário atualizado de TCLE constante no site CAPPesq.

Retirar a frase: "Essas coletas de sangue periférico não apresentam nenhum risco". Deixar apenas a frase do item 4 (Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Favor observar recomendação acima no item de considerações sobre TCLE.

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.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_737082.pdf	12/08/2016 10:56:02	multimas II als as	Aceito
Outros	Cadastro_de_Pesquisa_On_Line.PDF	12/08/2016 10:54:43	Bianca Almeida Natali dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Assinada.PDF	12/08/2016 10:52:38	Bianca Almeida Natali dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEv2.docx	21/07/2016 13:59:00	Bianca Almeida Natali dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	14/06/2016 15:12:15	Bianca Almeida Natali dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Página 02 de 03



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA **USP - HCFMUSP**



Continuação do Parecer: 1.752.240

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 29 de Setembro de 2016

Assinado por: ALFREDO JOSE MANSUR (Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar UF: SP Muni CEP: 05.403-010

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Página 03 de 03

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- OURICURI, G. Imunodeficiências Primárias: Quando suspeitar.In: Diagnóstico e Tratamento das Doenças Imunológicas. Elsevier pg 237-240 2005.
- AKKAYA, M.; KWAK, K.; PIERCE, S. K. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. **Nat Rev Immunol,** v. 20, n. 4, p. 229-238, 04 2020. ISSN 1474-1741. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31836872 >.
- NEMAZEE, D. Mechanisms of central tolerance for B cells. **Nat Rev Immunol,** v. 17, n. 5, p. 281-294, May 2017. ISSN 1474-1741. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28368006 >.
- ⁴ R, G. **Imunologia Clínica**: Reichman e Afonso Editora, 2001.
- MUELLER BU, P. P. Medical progress: cancer in children with primary and secondary immunodeficiencies: J Pediatr. 126: 1-10 p. 1995.
- ⁶ CHAPEL, H. et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. **Blood,** v. 112, n. 2, p. 277-86, Jul 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18319398 >.
- CUNNINGHAM-RUNDLES, C.; BODIAN, C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. **Clin Immunol,** v. 92, n. 1, p. 34-48, Jul 1999. ISSN 1521-6616 (Print) 1521-6616.
- CONLEY, M. E.; NOTARANGELO, L. D.; ETZIONI, A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). Clin Immunol, v. 93, n. 3, p. 190-7, Dec 1999. ISSN 1521-6616. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600329>.
- SALZER, U.; WARNATZ, K.; PETER, H. H. Common variable immunodeficiency: an update. **Arthritis Res Ther,** v. 14, n. 5, p. 223, 2012. ISSN 1478-6362. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23043756>.
- KOKRON, C. M. et al. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. **An Acad Bras Cienc,** v. 76, n. 4, p. 707-26, Dec 2004. ISSN 0001-3765 (Print)0001-3765. Disponível em: < http://dx.doi.org//S0001-37652004000400007 >.
- LOPES-DA-SILVA, S.; RIZZO, L. V. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. **J Clin Immunol**, v. 28 Suppl 1, p. S46-55, May 2008. ISSN 0271-9142. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443901>.
- LITZMAN, J. et al. T and B lymphocyte subpopulations and activation/differentiation markers in patients with selective IgA deficiency. **Clin Exp Immunol,** v. 147, n. 2, p. 249-54, Feb 2007. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104.

- CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Physiology of IgA and IgA deficiency. **J Clin Immunol**, v. 21, n. 5, p. 303-9, Sep 2001. ISSN 0271-9142 (Print) 0271-9142.
- AGHAMOHAMMADI, A. et al. Progression of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency. **Int Arch Allergy Immunol,** v. 147, n. 2, p. 87-92, 2008. ISSN 1018-2438.
- CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Common variable immune deficiency: Dissection of the variable. **Immunol Rev,** v. 287, n. 1, p. 145-161, 01 2019. ISSN 1600-065X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30565247>.
- CHAPEL, H.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. **Br J Haematol,** v. 145, n. 6, p. 709-27, Jun 2009. ISSN 1365-2141. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344423>.
- AVALOS, A. M.; MEYER-WENTRUP, F.; PLOEGH, H. L. B-cell receptor signaling in lymphoid malignancies and autoimmunity. **Adv Immunol**, v. 123, p. 1-49, 2014. ISSN 1557-8445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840946>.
- MORBACH, H. et al. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. **Clin Exp Immunol,** v. 162, n. 2, p. 271-9, Nov 2010. ISSN 1365-2249. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20854328>.
- WEHR, C. et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. **Blood,** v. 111, n. 1, p. 77-85, Jan 2008. ISSN 0006-4971. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17898316>.
- VLKOVÁ, M. et al. Age dependency and mutual relations in T and B lymphocyte abnormalities in common variable immunodeficiency patients. **Clin Exp Immunol,** v. 143, n. 2, p. 373-9, Feb 2006. ISSN 0009-9104. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16412063 >.
- MOUILLOT, G. et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. **J Clin Immunol**, v. 30, n. 5, p. 746-55, Sep 2010. ISSN 0271-9142. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s10875-010-9424-3>.
- SANCHEZ-RAMON, S. et al. Memory B cells in common variable immunodeficiency: clinical associations and sex differences. **Clin Immunol,** v. 128, n. 3, p. 314-21, Sep 2008. ISSN 1521-6616. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2008.02.013 >.
- ²³ CARSETTI, R.; ROSADO, M. M.; WARDMANN, H. Peripheral development of B cells in mouse and man. **Immunol Rev,** v. 197, p. 179-91, Feb 2004. ISSN 0105-2896 (Print) 0105-2896.
- CASTIGLI, E. et al. Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) enhances CD40 driven plasma cell differentiation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 120, n. 4, p. 885-91, Oct 2007. ISSN 0091-6749 (Print)1097-6825 (Electronic). Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2007.06.012 >.
- PEDRESCHI, M.; KOKRON, C. M. Avaliação do perfil dos linfócitos B de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável antes e após administração de antígenos

- **protéicos e polissacarídicos.** São Paulo (SP): Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 2014.
- AGARWAL, S.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. **Curr Allergy Asthma Rep,** v. 9, n. 5, p. 347-52, Sep 2009. ISSN 1529-7322 (Print) 1529-7322.
- FARRINGTON, M. et al. CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 91, n. 3, p. 1099-103, Feb 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7508119 >.
- KAMAE, C. et al. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ-deleting recombination excision circles. **J Allergy Clin Immunol,** v. 131, n. 5, p. 1437-40.e5, May 2013. ISSN 0091-6749.
- KONDRATENKO, I. et al. Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. MRC Immunodeficiency Group. **Clin Exp Immunol,** v. 108, n. 1, p. 9-13, Apr 1997. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104.
- BERRÓN-RUIZ, L. et al. Impaired selective cytokine production by CD4(+) T cells in Common Variable Immunodeficiency associated with the absence of memory B cells. **Clin Immunol,** v. 166-167, p. 19-26, May 2016. ISSN 1521-6616.
- DI RENZO, M. et al. Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas/fasligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS. **Clin Exp Immunol**, v. 125, n. 1, p. 117-22, Jul 2001. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104.
- FEVANG, B. et al. Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: association with chronic inflammation in vivo. **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 3, p. 521-5, Mar 2007. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104.
- CARTER, C. R. et al. CVID patients with autoimmunity have elevated T cell expression of granzyme B and HLA-DR and reduced levels of Treg cells. **J Clin Pathol,** v. 66, n. 2, p. 146-50, Feb 2013. ISSN 0021-9746.
- ARUMUGAKANI, G.; WOOD, P. M.; CARTER, C. R. Frequency of Treg cells is reduced in CVID patients with autoimmunity and splenomegaly and is associated with expanded CD21lo B lymphocytes. **J Clin Immunol,** v. 30, n. 2, p. 292-300, Mar 2010. ISSN 0271-9142.
- MELO, K. M.; CARVALHO, B. T. C. Células T regulatórias: mecanismo de ação e função nas doenças humanas. Revista brasileiro de alergia e imunopatologia: ASBAI. 32: 184-188 p. 2009.
- GENRE, J. et al. Reduced frequency of CD4(+)CD25(HIGH)FOXP3(+) cells and diminished FOXP3 expression in patients with Common Variable Immunodeficiency: a

- link to autoimmunity? **Clin Immunol**, v. 132, n. 2, p. 215-21, Aug 2009. ISSN 1521-6616. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2009.03.519 >.
- BAYRY, J. et al. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. **Blood,** v. 104, n. 8, p. 2441-3, Oct 2004. ISSN 0006-4971. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15226176>.
- SCOTT-TAYLOR, T. H. et al. Monocyte derived dendritic cell responses in common variable immunodeficiency. **Clin Exp Immunol**, v. 138, n. 3, p. 484-90, Dec 2004. ISSN 0009-9104. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15544626>.
- PAQUIN-PROULX, D. et al. IVIg immune reconstitution treatment alleviates the state of persistent immune activation and suppressed CD4 T cell counts in CVID. **PLoS One,** v. 8, n. 10, p. e75199, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130688 >.
- BARSOTTI, N. S. et al. IL-10-Producing Regulatory B Cells Are Decreased in Patients with Common Variable Immunodeficiency. **PLoS One,** v. 11, n. 3, p. e0151761, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26991898>.
- PAQUIN-PROULX, D.; SANDBERG, J. K. Persistent Immune Activation in CVID and the Role of IVIg in Its Suppression. **Front Immunol,** v. 5, p. 637, 2014. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25566250>.
- CORAGLIA, A. et al. Common Variable Immunodeficiency and Circulating TFH. **J Immunol Res,** v. 2016, p. 4951587, 2016. ISSN 2314-7156. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069935>.
- CROTTY, S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. **Immunity,** v. 41, n. 4, p. 529-42, Oct 2014. ISSN 1097-4180. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25367570>.
- CUBAS, R. A. et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. **Nat Med,** v. 19, n. 4, p. 494-9, Apr 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23475201>.
- ABOLHASSANI, H.; HAMMARSTRÖM, L.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Current genetic landscape in common variable immune deficiency. **Blood,** v. 135, n. 9, p. 656-667, Feb 2020. ISSN 1528-0020. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31942606>.
- BOGAERT, D. J. et al. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? **J Med Genet,** v. 53, n. 9, p. 575-90, 09 2016. ISSN 1468-6244. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27250108 >.
- BONILLA, F. A. et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. **J Allergy Clin Immunol Pract,** v. 4, n. 1, p. 38-59, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 2213-2201. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26563668>.
- PICARD, C. et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. **J Clin Immunol**, v. 38, n. 1, p. 96-128, 01 2018. ISSN 1573-2592. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29226302>.

- AMERATUNGA, R. et al. New diagnostic criteria for common variable immune deficiency (CVID), which may assist with decisions to treat with intravenous or subcutaneous immunoglobulin. **Clin Exp Immunol,** v. 174, n. 2, p. 203-11, Nov 2013. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104.
- SEIDEL, M. G. et al. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry Working Definitions for the Clinical Diagnosis of Inborn Errors of Immunity. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v. 7, n. 6, p. 1763-1770, Jul-Aug 2019.
- PEDRESCHI, M. Classificação de pacientes com imunodeficiência comum variável através da identificação de subtipos de linfócitos B. 2011. FMUSP, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP.
- ABBOTT, J. K.; GELFAND, E. W. Common Variable Immunodeficiency: Diagnosis, Management, and Treatment. **Immunol Allergy Clin North Am,** v. 35, n. 4, p. 637-58, Nov 2015. ISSN 1557-8607. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26454311>.
- THIBULT, M. L. et al. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. **Int Immunol,** v. 25, n. 2, p. 129-37, Feb 2013. ISSN 1460-2377. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23087177>.
- AGRAWAL, B.; GUPTA, N.; KONOWALCHUK, J. D. MUC1 Mucin: A Putative Regulatory (Checkpoint) Molecule of T Cells. **Front Immunol,** v. 9, p. 2391, 2018. ISSN 1664-3224.
- GOOD-JACOBSON, K. L. et al. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. **Nat Immunol,** v. 11, n. 6, p. 535-42, Jun 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453843>.
- WLASIUK, P. et al. Accumulation of CD5(+)CD19(+) B lymphocytes expressing PD-1 and PD-1L in hypertrophied pharyngeal tonsils. **Clin Exp Med,** v. 16, n. 4, p. 503-509, Nov 2016. ISSN 1591-8890 (Print) 1591-8890.
- SWAIKA, A.; HAMMOND, W. A.; JOSEPH, R. W. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. **Mol Immunol,** v. 67, n. 2 Pt A, p. 4-17, Oct 2015. ISSN 1872-9142. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25749122 >.
- XIA, Y.; JEFFREY MEDEIROS, L.; YOUNG, K. H. Signaling pathway and dysregulation of PD1 and its ligands in lymphoid malignancies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1865, n. 1, p. 58-71, Jan 2016. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.
- KHAN, A. R. et al. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. **Nat Commun**, v. 6, p. 5997, Jan 22 2015. ISSN 2041-1723.
- CUNILL, V. et al. Follicular T Cells from smB(-) Common Variable Immunodeficiency Patients Are Skewed Toward a Th1 Phenotype. **Front Immunol,** v. 8, p. 174, 2017. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28289412>.

- HAMS, E. et al. Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells. **J Immunol**, v. 186, n. 10, p. 5648-55, May 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21490158>.
- NUTT, S. L.; TARLINTON, D. M. Give and take in the germinal center. In: (Ed.). **Nat Immunol**. United States, v.11, 2010. p.464-6. ISBN 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking).
- Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? **Nat Immunol,** v. 12, n. 6, p. 472-7, Jun 2011. ISSN 1529-2916. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21739669>.
- WEINSTEIN, J. S. et al. B cells in T follicular helper cell development and function: separable roles in delivery of ICOS ligand and antigen. **J Immunol,** v. 192, n. 7, p. 3166-79, Apr 1 2014. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.
- GATTO, D.; BRINK, R. The germinal center reaction. J Allergy Clin Immunol, v. 126,
 n. 5, p. 898-907; quiz 908-9, Nov 2010. ISSN 0091-6749.
- PALLIKKUTH, S. et al. T Follicular Helper Cells and B Cell Dysfunction in Aging and HIV-1 Infection. **Front Immunol,** v. 8, p. 1380, 2017. ISSN 1664-3224 (Print) 1664-3224.
- MORITA, R. et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. **Immunity**, v. 34, n. 1, p. 108-21, Jan 28 2011. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613.
- GONG, F.; ZHENG, T.; ZHOU, P. T Follicular Helper Cell Subsets and the Associated Cytokine IL-21 in the Pathogenesis and Therapy of Asthma. **Front Immunol**, v. 10, p. 2918, 2019. ISSN 1664-3224.
- BRENNA, E. et al. CD4(+) T Follicular Helper Cells in Human Tonsils and Blood Are Clonally Convergent but Divergent from Non-Tfh CD4(+) Cells. **Cell Rep,** v. 30, n. 1, p. 137-152.e5, Jan 7 2020.
- MESQUITA, D. et al. Follicular helper T cell in immunity and autoimmunity. **Braz J Med Biol Res,** v. 49, n. 5, p. e5209, 2016. ISSN 1414-431X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27096200>.
- BOSSALLER, L. et al. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. **J Immunol**, v. 177, n. 7, p. 4927-32, Oct 1 2006. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.
- GIOVANNETTI, A. et al. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. **J Immunol,** v. 178, n. 6, p. 3932-43, Mar 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

- BOUSFIHA, A. et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. **J Clin Immunol,** v. 40, n. 1, p. 66-81, 01 2020. ISSN 1573-2592. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32048120 >.
- LE SAOS-PATRINOS, C. et al. Functions of Tfh Cells in Common Variable Immunodeficiency. **Front Immunol,** v. 11, p. 6, 2020. ISSN 1664-3224.
- HO, H. E.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Non-infectious Complications of Common Variable Immunodeficiency: Updated Clinical Spectrum, Sequelae, and Insights to Pathogenesis. **Front Immunol**, v. 11, p. 149, 2020. ISSN 1664-3224.
- WIĘSIK-SZEWCZYK, E.; JAHNZ-RÓŻYK, K. From infections to autoimmunity: Diagnostic challenges in common variable immunodeficiency. **World J Clin Cases,** v. 8, n. 18, p. 3942-3955, Sep 26 2020. ISSN 2307-8960 (Print) 2307-8960.
- KAINULAINEN, L.; NIKOSKELAINEN, J.; RUUSKANEN, O. Diagnostic findings in 95 Finnish patients with common variable immunodeficiency. **J Clin Immunol,** v. 21, n. 2, p. 145-9, Mar 2001. ISSN 0271-9142 (Print) 0271-9142.
- OKSENHENDLER, E. et al. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. **Clin Infect Dis,** v. 46, n. 10, p. 1547-54, May 15 2008. ISSN 1058-4838.
- RESNICK, E. S. et al. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. **Blood,** v. 119, n. 7, p. 1650-7, Feb 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22180439>.
- SHARPE, A. H.; PAUKEN, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. **Nat Rev Immunol,** v. 18, n. 3, p. 153-167, Mar 2018. ISSN 1474-1733.
- ZHANG, M.; SRIVASTAVA, G.; LU, L. The pre-B cell receptor and its function during B cell development. **Cell Mol Immunol,** v. 1, n. 2, p. 89-94, Apr 2004. ISSN 1672-7681. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212894>.
- AL KINDI, M. et al. Utility of peripheral blood B cell subsets analysis in common variable immunodeficiency. **Clin Exp Immunol,** v. 167, n. 2, p. 275-81, Feb 2012. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104.
- WARNATZ, K.; SCHLESIER, M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. **Cytometry B Clin Cytom,** v. 74, n. 5, p. 261-71, Sep 2008. ISSN 1552-4957. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18561200>.
- SAIKIA, B.; GUPTA, S. Common Variable Immunodeficiency. **Indian J Pediatr**, Feb 2016. ISSN 0973-7693. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26868026>.
- LÓPEZ-HERRERA, G. et al. Low percentages of regulatory T cells in common variable immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune diseases and its association with increased numbers of CD4+CD45RO+ T and CD21(low) B cells. **Allergol Immunopathol (Madr)**, v. 47, n. 5, p. 457-466, Sep-Oct 2019. ISSN 0301-0546.

- PIQUERAS, B. et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. **J Clin Immunol**, v. 23, n. 5, p. 385-400, Sep 2003. ISSN 0271-9142. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14601647>.
- VLKOVA, M. et al. Characterization of lymphocyte subsets in patients with common variable immunodeficiency reveals subsets of naive human B cells marked by CD24 expression. **J Immunol**, v. 185, n. 11, p. 6431-8, Dec 1 2010. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0903876>.
- PATUZZO, G. et al. Immunophenotypic Analysis of B Lymphocytes in Patients with Common Variable Immunodeficiency: Identification of CD23 as a Useful Marker in the Definition of the Disease. **ISRN Immunology**, v. 2013, p. 512527, 2013/04/04 2013. ISSN xxxx-xxxx. Disponível em: https://doi.org/10.1155/2013/512527 >.
- VODJGANI, M. et al. Analysis of class-switched memory B cells in patients with common variable immunodeficiency and its clinical implications. **J Investig Allergol Clin Immunol,** v. 17, n. 5, p. 321-8, 2007. ISSN 1018-9068 (Print) 1018-9068.
- BLANCO, E. et al. Defects in memory B-cell and plasma cell subsets expressing different immunoglobulin-subclasses in patients with CVID and immunoglobulin subclass deficiencies. **J Allergy Clin Immunol**, v. 144, n. 3, p. 809-824, 09 2019. ISSN 1097-6825. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30826363>.
- AHN, S.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Role of B cells in common variable immune deficiency. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 5, n. 5, p. 557-64, Sep 2009. ISSN 1744-8409. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20477641>.
- ⁹² ZACCA, E. R. et al. PD-L1. **Front Immunol,** v. 9, p. 2241, 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30327652>.