

João Henrique Fagundes Bastos Narciso

**Uso de IL-2 humana recombinante em pacientes com
imunodeficiência comum variável**

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

Área de Concentração: Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Myrthes Toledo Barros

São Paulo
2008

João Henrique Fagundes Bastos Narciso

**Uso de IL-2 humana recombinante em pacientes com
imunodeficiência comum variável**

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

Área de Concentração: Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Myrthes Toledo Barros

São Paulo
2008

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Dra. Myrthes Toledo Barros.

AGRADECIMENTOS

Dra. Myrthes Toledo Barros, Prof. Jorge Kalil, Prof. Luiz Vicente Rizzo e Dra. Cristina Maria Kokron. Agradeço a constante presença e apoio durante todas as etapas deste trabalho.

Dr. Abílio Motta, Dr. Luiz Augusto Fonseca e Dr. Antonio Carlos Pastorino (Comissão de Qualificação). Agradeço as valiosas sugestões e apoio prestados.

Sandra Emiko, Santa, Annette, Ruth e Simone. Agradeço pelo carinho e atenção com que me receberam no Laboratório (LIM 60).

Tânia Joice Mota. Primeira pessoa com quem tive contato ao ingressar na Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia, tornou-se uma amiga presente em todas as etapas de minha formação.

Rosana, Seraphim, Genair, Leoni . Agradeço ao valioso apoio prestado.

Aos amigos Fanny Dantas Lima, Sérgio Eid e Sérgio Fabrício Menandro. Agradeço a amizade, companheirismo e incentivo.

Aos pacientes. Agradeço a disponibilidade e total colaboração.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	14
3 Métodos.....	15
4 Resultados.....	25
5 Discussão.....	30
6 Conclusões.....	41
7 Anexos.....	43
8 Referências bibliográficas.....	51

RESUMO

Narciso JHB. Uso de IL-2 Humana Recombinante em Pacientes com Imunodeficiência Comum Variável [dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008. 69p.

Na imunodeficiência comum variável (ICV) têm sido descritas alterações de linfócitos T, incluindo a produção diminuída da interleucina-2 (IL-2). Desde que a IL-2 pode promover a produção de imunoglobulinas *in vitro*, nosso principal objetivo foi investigar os efeitos *in vivo* do tratamento com IL-2 recombinante (IL-2r) em pacientes com ICV. Foram selecionados 4 pacientes que apesar de tratamento adequado com imunoglobulina EV apresentavam infecções recorrentes. Após um período de observação de 12 meses, os pacientes receberam doses crescentes de IL-2r durante 16 semanas com reposição de imunoglobulina apenas se a IgG sérica atingisse níveis menores do que 400mg/dL. A seguir, permaneceram em observação por mais 12 meses recebendo imunoglobulina. A gravidade das infecções foi avaliada segundo um "score" numa escala de 3 a 10. A avaliação *in vitro* incluiu: quantificação dos níveis de IgG, IgA e IgM séricas; resposta linfoproliferativa à PHA; populações linfocitárias CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ e CD25⁺ no sangue periférico. As reações adversas à IL-2r foram leves e localizadas. Houve redução aparente do número e gravidade das infecções durante os 12 meses subseqüentes ao término da IL-2r. Os níveis da IgG sérica e das células CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ mantiveram-se estáveis durante todo o estudo. Em 3 pacientes houve relação entre melhora clínica

e aumento da proporção de linfócitos T CD25⁺. Isto permite supor que a remissão de infecções em alguns pacientes com ICV, sob terapêutica com IL-2r associada ou não à imunoglobulina EV, esteja parcialmente relacionada à melhora da imunidade celular. Adicionalmente, nossos dados indicam que a IL-2r pode ser utilizada de modo seguro nas dosagens e período utilizados como terapêutica adjuvante em alguns pacientes com ICV que apresentam infecções recorrentes e má resposta terapêutica à imunoglobulina endovenosa.

Descritores: 1.Imunodeficiência de variável comum/terapia 2.Interleucina-2
3.Infecção 4.Imunoglobulinas intravenosas

SUMMARY

Narciso JHB. Use of Recombinant Human IL-2 in Patients with Common Variable Immunodeficiency [dissertação de Mestrado]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2008. 69p.

In Common Variable Immunodeficiency (CVID) T cell function may be impaired and interleukin-2 (IL-2) production diminished. Since IL-2 stimulates immunoglobulin production *in vitro*, the aim of this study was to determine the *in vivo* effects of recombinant interleukin-2 (rIL-2) in patients with CVID. We selected four CVID patients, who despite intravenous immunoglobulin infusion (IVIg) had recurrent infections. After a twelve-month run-in period, escalating dosages of rIL-2 were administered during 16 weeks, during which rescue IVIg treatment was performed whenever serum IgG levels dropped below 400 mg/dL. During follow-up (12 months), patients were observed and treated with IVIg. Infection severity was assessed using a 3 to 10 infection score. *In vitro* analysis included: measurement of serum levels of IgG, IgA and IgM; lymphocyte proliferative responses to phytohaemagglutinin (PHA); CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ and CD25⁺ lymphocyte populations in peripheral blood. Few local side-effects were observed in 2 patients. In the follow-up period after rIL-2 treatment, patients experienced reduction of the number and severity of infections. Levels of serum IgG, CD4⁺, CD8⁺ and CD19⁺ were stable throughout the study. In 3 patients we observed a relation between improvement of clinical parameters and number of T CD25⁺ cells. These

findings suggest that remission of infections in some CVID patients treated with rIL-2, in combination or not with IVIG is, in part, associated with the improvement of cell immunity. Additionally, our results indicate that rIL-2 administration is safe and may serve as adjuvant therapy in some CVID patients with recurrent infections and poor response to IVIG treatment.

Descriptors: 1.Common variable immunodeficiency/therapy 2.Interleukin-2
3.Infection 4.Intravenous immunoglobulins

1.1 INTRODUÇÃO

A Imunodeficiência Comum Variável (ICV) constitui a mais comum das imunodeficiências primárias, excluindo-se a deficiência de IgA. Sua prevalência varia de 1:25.000 a 1:100.000, sendo aparentemente mais alta em habitantes do norte europeu e seus descendentes. É caracterizada por hipogamaglobulinemia com níveis baixos (menores do que dois desvios-padrão da média para a idade) de pelo menos duas classes de imunoglobulinas: IgG e IgA e/ou IgM (Leiva et al., 2007; Notarangelo et al., 2006).

Em pacientes com ICV, o número de linfócitos B está normal ou discretamente diminuído, enquanto a produção de anticorpos em resposta à exposição natural ou após imunização está reduzida ou ausente (Notarangelo et al., 2006).

A imunidade celular pode estar comprometida em 50% dos pacientes caracterizando-se pela inversão da relação de células T $CD4^+/CD8^+$, tanto por diminuição de células $TCD4^+$ como por aumento de células $TCD8^+$, e pela ausência de resposta cutânea ao PPD, tricofitina e candidina (Buckley, 2002; Cunningham-Rundles, 1989; Cunningham-Rundles & Bodian, 1999; Kokron et al., 2004).

A ICV está associada a um amplo espectro de manifestações clínicas. A idade de início dos sintomas é variável, afetando desde crianças até adultos idosos, embora haja evidências de uma distribuição bimodal com picos entre 1 e 5 anos e entre 18 e 25 anos (Cunningham-Rundles, 2004).

As infecções agudas, crônicas ou de repetição, especialmente pneumonias (freqüentemente associadas a bronquiectasias), bronquite, sinusite, otite e conjuntivite são comuns. Existe alta prevalência de doenças gastrintestinais infecciosas e inflamatórias incluindo giardíase, doença “sprue-like”, má-absorção inespecífica, hiperplasia nodular linfóide e doenças intestinais inflamatórias (colite ulcerativa, proctite ulcerativa ou doença de Crohn (Cunningham-Rundles, 1989; Cunningham-Rundles & Bodian, 1999; Kokron et al., 2004).

Ocorre maior susceptibilidade a infecções por enterovírus que se manifestam com sintomas clássicos de meningoencefalite (associados ou não a sintomas de vasculite dermatomiosite-“like”). Infecções oportunistas com agentes virais ou fúngicos também podem ocorrer, mesmo na presença de imunidade celular aparentemente conservada (Ballou, 2002; Bonilla & Geha, 2006; Buckley, 2002; Cunningham-Rundles, 2004).

Aproximadamente 10% dos pacientes apresentam disfunção hepática associada à infecção pelos vírus B e C da hepatite e cirrose biliar primária. Alguns indivíduos desenvolvem granulomas não caseosos no pulmão, fígado, baço e pele, mimetizando a sarcoidose, sendo que as causas da relação aparente entre as duas doenças são desconhecidas (Ballou, 2002; Bonilla & Geha, 2006; Buckley, 2002; Cunningham-Rundles, 2004).

Estima-se que 22% dos pacientes apresentem doenças auto-imunes associadas, como anemia hemolítica, púrpura trombocitopênica idiopática, doença reumatóide, anemia perniciosa e vitiligo (Ballou, 2002; Bonilla & Geha, 2006; Cunningham-Rundles & Bodian, 1999; Kokron et al., 2004).

Anticorpos anti-IgA ocorrem apenas raramente (2,8%) e, neste caso, os pacientes apresentam risco maior de reações adversas quando submetidos a transfusões parenterais contendo traços de IgA (Orange et al., 2006).

Também está documentada incidência aumentada de processos malignos, com risco 300 vezes maior de linfoma não-Hodgkin (principalmente entre mulheres) e 50 vezes maior de câncer gástrico, neste caso possivelmente devido à maior frequência de anemia perniciosa ou gastrite atrófica em pacientes com ICV. O quadro clínico e laboratorial da doença é bastante heterogêneo, sugerindo etiologias diversas (Ballow, 2002; Bonilla & Geha, 2006; Cunningham-Rundles & Bodian, 1999; Kokron et al., 2004).

O diagnóstico é estabelecido frente a pacientes com hipogamaglobulinemia e nos quais outras causas de hipogamaglobulinemias primárias bem definidas foram afastadas, tais como agamaglobulinemia e síndrome de hiper-IgM (Bonilla, 2007; Durandy et al., 2006; Etzioni & Ochs, 2004).

Também devem ser excluídas hipogamaglobulinemias secundárias a várias doenças ou condições, tais como: a) neoplasias (timoma, leucemia linfocítica crônica e linfomas); b) uso de medicamentos, sendo os mais comuns os imunossupressores e os anti-convulsivantes; c) infecções virais (Epstein-Barr, HIV, citomegalovírus, rubéola congênita e parvovírus B19); d) enteropatias perdedoras de proteínas, como a linfangiectasia intestinal; e) síndrome nefrótica; f) queimaduras extensas; g) doenças sistêmicas

associadas à supressão da medula óssea (Ballow, 2002; Bonilla, 2007; Bonilla & Geha, 2006; Cunningham-Rundles & Bodian, 1999)

O tipo de herança genética envolvida na ICV ainda não foi estabelecido, sendo provavelmente poligênica. Há relatos de defeito monogênico e de um padrão de herança autossômica dominante. A maioria dos casos parece ser esporádica, embora em familiares de 20% dos pacientes com ICV sejam detectadas alterações da imunidade humoral, tais como deficiência de IgA, deficiências de subclasses de IgG e hipogamaglobulinemia relativa (níveis baixos de imunoglobulinas mas acima de dois desvios-padrão da média para a idade) (Ochs et al., 1999).

Há evidências de que a ICV e a deficiência de IgA sejam doenças polares de um mesmo espectro de imunodeficiências: mulheres com ICV apresentam risco maior de ter filhos com DIgA; ambas imunodeficiências podem ocorrer na mesma família; ocasionalmente, pacientes com DIgA podem evoluir para hipogamaglobulinemia (Hammarström et al., 2000). Esta hipótese é corroborada pela incidência aumentada de mesmos haplótipos do MHC nas duas doenças, sugerindo a existência de um locus de susceptibilidade ainda não identificado nas regiões classes II/III do MHC (Ochs et al., 1999).

Apesar de todos os avanços na área da biologia molecular, a etiopatogenia da ICV permanece pouco conhecida. A doença aparentemente pode resultar da desregulação do sistema imunológico em vários níveis, levando à falha da diferenciação de linfócitos B e conseqüente falha na produção de imunoglobulinas e anticorpos (Bonilla & Geha, 2006).

Em aproximadamente 50% dos pacientes ocorrem também alterações das células T evidenciadas por anergia cutânea e diminuição da resposta proliferativa a mitógenos (Cunningham-Rundles, 1989; Cunningham-Rundles & Bodian, 1999; Kokron et al, 2004), redução da expressão e/ou produção de IL-2 (Cunningham-Rundles et al., 1992; Cunningham-Rundles et al., 1994; Cunningham-Rundles et al., 2001), além de IL-4, IL-5 e IFN- γ (Di Renzo et al., 2000).

Neste contexto, é possível que vários defeitos da imunorregulação resultem numa via final comum – a hipogamaglobulinemia – o que poderia explicar a grande heterogeneidade do quadro clínico da ICV. Esta hipótese é corroborada pelo fato de que a alta incidência de doenças auto-imunes, doenças inflamatórias e neoplasias encontrada na ICV não é observada na agamaglobulinemia ligada ao X, na qual ocorre especificamente uma falha no desenvolvimento de linfócitos B (Bonilla & Geha, 2006; Buckley, 2002; Cunningham-Rundles et al., 1999).

A ativação e diferenciação do linfócito B para célula formadora de anticorpos depende da interação entre as células T e B e conseqüente co-estimulação através de receptores e seus ligantes, como CD40/CD40L, CD28/CTLA4, CD28/CD80 e CD28/CD86. Durante a ativação da célula B, a co-estimulação desencadeada pela ligação cruzada entre CD40/CD40L é crucial para a sinalização da troca de isótipo (“switch”) de imunoglobulinas e formação de anticorpo (Abbas et al., 2007).

Em relação ao linfócito T, a expressão de CD40L e a produção de citocinas são induzidas após ligação do co-receptor CD28 com seus ligantes

B7 (CD80 e CD86) expressos por células B, macrófagos e células dendríticas. Embora ambos ligantes tenham afinidades similares para o CD28, a existência de diferentes distribuições celulares e cinéticas de expressão sugerem que as interações diferenciais com estes ligantes possam levar a sinais diferentes (Abbas et al., 2007).

Neste contexto, estudos experimentais em camundongos deficientes de CD86 demonstraram ausência de troca de isótipos, de formação de centros germinativos e de produção de anticorpos após estimulação antigênica. No entanto, camundongos deficientes de CD80 apresentaram resposta humoral normal, o que enfatiza a importância do CD86 neste tipo de resposta imunológica e as diferenças entre estas duas moléculas (Abbas et al., 2007).

Durante interações T-B cognitivas, células T antígeno-específicas são ativadas incompletamente e os linfócitos podem morrer por apoptose via CD95 (Di Renzo et al, 2000). Esta ativação incompleta também pode levar à produção insuficiente de IL-2 e à expressão instável de CD40L, sendo que estas duas características corroboram a hipótese de que a ICV possa estar relacionada a um defeito primário da célula TCD4⁺ (Denz et al., 2000).

A Interleucina- 2 (IL-2), uma glicoproteína de peso molecular de 15.000 d, é a primeira citocina produzida após ativação de células TCD4⁺. Embora seja conhecida historicamente como um fator de crescimento essencial para todas as populações de linfócitos T, a IL-2 age também sobre macrófagos e células NK (Abbas et al., 2007).

A ativação celular aumenta rapidamente a capacidade do linfócito T de ligar-se e responder à IL-2 através da expressão do seu receptor específico. Está bem estabelecido que células T “naive” expressam o receptor de baixa afinidade para IL-2, um dímero composto pelas cadeias β e γ_c , esta última referente à “cadeia γ comum” porque constitui um componente de receptores para várias outras citocinas. Após ativação celular decorrente de reconhecimento antigênico e co-estimulação, os linfócitos T produzem IL-2 e expressam adicionalmente a cadeia α (CD25), que associada às cadeias β e γ_c passa a integrar um composto trimérico denominado receptor de alta afinidade para IL-2 (Abbas et al., 2007).

As moléculas de IL-2, produzidas por células T ativadas, ligam-se preferencialmente aos receptores de alta afinidade expressos pelas mesmas células que as produziram; estas entram no ciclo celular e proliferam, levando ao aumento do número de linfócitos T antígeno-específicos (Abbas et al., 2007).

A ativação de linfócitos T através do receptor de alta afinidade para IL-2 é mediada pela ativação de JAK 1 e JAK 3 com subsequente fosforilação e ativação de STAT 3 e STAT 5. Estes fatores de transcrição, uma vez ativados, deslocam-se para o núcleo onde iniciam uma série de eventos de transcrição responsáveis por vários efeitos funcionais decorrentes do estímulo da IL-2. A ligação da IL-2 a seu receptor de alta afinidade também leva à ativação de outras vias de sinalização, incluindo MAPK (sigla do termo em inglês “mitogen-activated protein kinase”) e PI 3K (sigla do termo em inglês “phosphatidilinositol 3- kinase”), vias estas também

responsáveis pelos efeitos variados da IL-2 sobre diferentes células do sistema imunológico (Zorn et al., 2006).

Embora a IL-2 desempenhe um papel importante no desenvolvimento e expansão de células T efetoras, estudos recentes têm sugerido que esta citocina também seja crítica para o estabelecimento e manutenção da tolerância imunológica (Nelson, 2004).

O principal mecanismo envolvido na indução da tolerância mediada pela IL-2 parece ser a geração e manutenção de células T reguladoras (Treg) (Abbas et al., 2007). As células Treg humanas, inicialmente caracterizadas como células T CD4⁺ CD25⁺ com função supressora, são encontradas no sangue periférico (Jonuleit et al., 2001). Expressam constitutivamente a unidade α (CD25) do complexo trimérico de alta afinidade para IL-2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$ c), ao lado de outros marcadores fenotípicos, tais como: o antígeno CTLA-4 (sigla do termo em inglês “cytolytic T-lymphocyte-associated antigen 4”), o receptor GITR (sigla do termo em inglês “glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor-related protein”) e, CD45RO. No entanto, cabe ressaltar que estes últimos marcadores podem estar expressos também em outras células T recém-ativadas (Baecher-Allan et al., 2004; Jonuleit et al., 2001).

Mais recentemente, um novo fator de transcrição – FOXP-3 – foi detectado exclusivamente em células T reg, mas não em células T ativadas, podendo ser utilizado como marcador molecular para quantificação de células T reguladoras no sangue periférico, atualmente identificadas fenotipicamente como células CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ (Fontenot et al., 2005)

Embora a IL-2 desempenhe um papel importante no desenvolvimento de células T reg, as vias celulares através das quais esta citocina influencia a proliferação e funcionamento dessa população linfocitária ainda não foram totalmente esclarecidas. Há evidências de que ocorra sinalização preferencial da via JAK / STAT, o que poderia explicar diferentes efeitos da IL-2 sobre populações de células T reguladoras ou T efetoras (Zorn et al., 2006).

Estudos recentes têm demonstrado que a FOXP-3 desempenha um papel crítico nas funções reguladoras de linfócitos TCD4⁺CD25⁺, tanto em humanos como em modelos de experimentação (Fontenot et al., 2005; Zorn et al., 2006). Nestes, há evidências de que a IL-2 controle a homeostase de células T reg no sangue e em tecidos periféricos (Fontenot et al., 2005).

In vitro, a IL-2 aumenta a expressão de FOXP-3 em células TCD4⁺CD25⁺ purificadas, mas não em células TCD4⁺CD25⁻. Pelo fato de expressarem constitutivamente a unidade α (CD25) do complexo trimérico de alta afinidade para IL-2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$ c), as células T reg podem, presumivelmente, responder de modo fisiológico a baixas concentrações de IL-2 *in vivo* (Zorn et al., 2006).

Em humanos, estudos clínicos recentes em pacientes com aids (Sereti et al., 2005; Shah et al., 2006), câncer (Ahmadzadeh & Rosenberg, 2006; Cesana et al., 2006; Querfeld et al., 2007; Wei et al., 2007;) ou aids associado a câncer (Shah et al., 2006) demonstraram que o tratamento com IL-2 pode induzir a expansão de células T reg no sangue periférico.

Há fortes evidências de que se o linfócito TCD4⁺ não sensibilizado encontrar o antígeno durante interações cognitivas com linfócitos B na ausência de sinais co-estimuladores (via CD28/CD86), poderá secretar quantidades insuficientes de IL-2 e permanecer incapaz de estimular apropriadamente os linfócitos B via CD40L (Abbas et al., 2007).

Neste contexto, foi demonstrado que o mRNA para IL-2 estava extremamente reduzido em linfócitos de um grupo de pacientes com ICV e que estas células não proliferaram *in vitro*. Em vista destas observações, os autores levantaram a hipótese de que defeitos da produção de IL-2 possam desempenhar papel central no mecanismo desta imunodeficiência (Funauchi et al., 1995).

Também foi descrito que em alguns pacientes com ICV, a administração de IL-2 foi capaz de restaurar *in vitro* a resposta linfoproliferativa para o toxóide tetânico e para alguns mitógenos (Cunningham–Rundles et al., 2001) e de reconstituir a produção de anticorpos para antígenos como o *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (SAC) (Rump et al., 1992).

Tendo por base estes dados, foi sugerido que defeitos imunológicos de alguns indivíduos com ICV pudessem ser corrigidos pela administração de IL-2 *in vivo*. No entanto, até o momento atual, os estudos em pacientes com ICV relativos aos efeitos da IL-2 sobre o aumento da secreção de imunoglobulinas e produção de anticorpos *in vivo* são escassos e contraditórios. Dois grupos de pesquisadores propuseram esquemas

terapêuticos com administração adicional de IL-2 humana recombinante ou IL-2 purificada, associada à gamaglobulina humana intravenosa.

Em 1992, Cunningham–Rundles e colaboradores testaram esquema terapêutico de curta duração em quatro pacientes recebendo IL-2 humana recombinante associada ao polyetilenoglycol (PEG-IL-2), demonstrando pequena melhora clínica com restauração parcial da secreção de imunoglobulinas *in vitro*.

Posteriormente, os mesmos autores relataram uma paciente que apresentou aumento da resposta linfoproliferativa frente a mitógenos e antígenos específicos, além da elevação dos níveis séricos de IL-2 e de IgG até 12 semanas após o tratamento apenas com PEG-IL-2, mesmo após descontinuação do uso de gamaglobulina (Cunningham-Rundles et al., 1994). Neste estudo não foram avaliados os benefícios clínicos da terapêutica.

Durante estudo duplo-cego e cruzado, Rump e colaboradores (1997) administraram IL-2 humana purificada ou placebo pela via subcutânea, durante cinquenta e seis semanas, na ausência da reposição de gamaglobulina endovenosa, que só era administrada como medicação de resgate (300 mg/ kg/dia) quando os níveis da IgG sérica ficavam abaixo de 5 g/L. Também observaram diminuição dos quadros infecciosos, corroborando a hipótese de que os defeitos imunológicos de pacientes com ICV possam ser corrigidos pela administração de IL-2 *in vivo*.

Esses achados preliminares justificaram uma investigação mais detalhada do efeito da IL-2 sobre parâmetros clínicos e laboratoriais em

pacientes com ICV. Assim, Cunningham-Rundles e colaboradores (2001) testaram um esquema terapêutico utilizando PEG-IL-2 pela via subcutânea em doses baixas e durante tempo prolongado (12 a 18 meses) em 15 pacientes com ICV. Nesse estudo, foi observada melhora dos parâmetros laboratoriais, tais como resposta linfoproliferativa a mitógenos e antígenos e resposta de anticorpo ao fago Φ X 174, embora sem remissão significativa dos sintomas clínicos.

O tratamento convencional das imunodeficiências dos isótipos de IgG é a reposição regular de gamaglobulina, sendo que desde a década de 50 diversos preparados vêm sendo utilizados (Bonilla, 2007; Bonilla & Geha, 2006; Orange et al., 2006). Inicialmente, estas preparações foram administradas por via intramuscular, na dose de 100 mg/Kg /mês; atualmente, são utilizados preparados mais eficazes pela via intravenosa em doses que variam de 200 a 600 mg/kg/mês a cada 3 ou 4 semanas com o objetivo de manter níveis séricos de IgG maiores do que 500mg/dL. De um modo geral, estes níveis são alcançados três a seis meses após o início do tratamento (Bonilla, 2007; Bonilla et al., 2005; Orange et al., 2006).

No entanto, além de seu alto custo, estes preparados contribuem apenas parcialmente para a melhora clínica dos pacientes. Embora sejam efetivos na redução da gravidade e do número de episódios infecciosos de vias aéreas, a maioria dos indivíduos continua a apresentar sintomas, podendo evoluir para lesões estruturais dos sinos e pulmões (Ballou, 2002; Bonilla & Geha, 2004; Cunningham-Rundles & Bodian, 1999; Kokron et al., 2004).

Recentemente, em conseqüência de guerras e epidemias, houve uma queda significativa na produção de gamaglobulina humana, decorrente da redução do número de doadores em âmbito mundial. Somado a isso, tem havido também um maior consumo de imunoglobulina humana decorrente do aumento de suas indicações de uso, tais como sepse (elevada incidência em guerras), doenças auto-imunes, transplantes e algumas doenças alérgicas (Orange et al., 2006).

Assim, com o objetivo de testar novas terapêuticas potencialmente promissoras que possibilitem a redução do uso da gamaglobulina endovenosa humana, foi proposto um estudo terapêutico com IL-2 em pacientes com imunodeficiência comum variável e infecções de repetição.

2.0 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos terapêuticos da IL-2 recombinante em pacientes com imunodeficiência comum variável, recebendo ou não gamaglobulina EV, através de parâmetros clínicos e laboratoriais:

1. Frequência e gravidade dos processos infecciosos.
2. Quantificação dos níveis de imunoglobulinas séricas .
3. Resposta linfoproliferativa após estímulo inespecífico com mitógeno (PHA).
4. Imunofenotipagem de populações linfocitárias $CD3^+CD4^+CD8^+$ e $CD25^+$.

3.0 METODOLOGIA

3.1 Pacientes

Foram avaliados 55 pacientes com diagnóstico de ICV (33 do sexo masculino e 22 do feminino), segundo critérios definidos por grupo de especialistas em imunodeficiências primárias da World Health Organization (Notarangelo et al. 2005) e pelo Latin American Group for Primary Immunodeficiency Diseases – PAGID - (Leiva et al., 2007), com idades entre 19 e 66 anos, em acompanhamento entre 01 a 25 anos no Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP. Todos os pacientes encontravam-se sob reposição mensal de gamaglobulina endovenosa na dosagem de 400-600 mg/kg peso.

Inicialmente, foram pré-selecionados 28 pacientes que, apesar de estarem recebendo doses adequadas de imunoglobulina EV, continuavam a apresentar infecções crônicas ou recorrentes. Deste grupo, foram selecionados 12 pacientes que foram convidados a participar do protocolo de administração da IL-2 recombinante humana. Quatro deles aceitaram o tratamento proposto e oito concordaram em participar como grupo controle.

3.2 Desenho do estudo

A avaliação clínica dos pacientes compreendeu 3 fases: no primeiro período foi realizada análise retrospectiva dos 12 meses prévios à aplicação da IL-2r (período de “run in”), na vigência de reposição mensal de

gamaglobulina (400 mg/kg), com consulta ao prontuário eletrônico disponível no ambulatório do Serviço de Imunologia Clínica do HC-FMUSP; o segundo período compreendeu as 16 semanas correspondentes à aplicação da IL-2 com administração de gamaglobulina EV (400 mg/kg/peso) no primeiro mês e sob regime de resgate (níveis séricos de IgG < 400 mg/dL) nas 12 semanas subseqüentes; durante a terceira fase, os pacientes permaneceram em observação por mais 12 meses: no primeiro mês, com indicação de gamaglobulina EV de resgate e, a seguir, com reposição regular de gamaglobulina a cada 28 dias.

Durante o período de aplicação da IL-2r, os pacientes foram submetidos semanalmente a anamnese (anexo 1) e exame físico para avaliação das intercorrências clínicas.

Após o término da aplicação da IL-2r, os pacientes foram avaliados mensalmente no ambulatório de Imunodeficiências Primárias do HCFMUSP durante os 12 meses seguintes.

Foram coletadas amostras de sangue para as análises laboratoriais (resposta linfoproliferativa, populações linfocitárias e expressão do receptor para IL-2 (CD25) no início e ao término da administração de IL-2r. As dosagens de imunoglobulinas séricas e demais exames laboratoriais de rotina (enzimas hepáticas, uréia, creatinina) foram feitas mensalmente, imediatamente antes da administração de gamaglobulina durante a primeira e terceira fases do estudo e, quinzenalmente, durante a aplicação da IL-2r.

Este protocolo (nº 412/01) foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.3 Avaliação clínica

Previamente a cada administração de IL-2, foi aplicado um questionário com o objetivo de avaliar as condições clínicas de cada paciente e a ocorrência de reações adversas (anexo).

Para avaliação e quantificação das infecções foi adotada a tabela de “score” proposta por Rump e colaboradores(1997), com pontuação das infecções numa escala de 3 a 10 conforme sua gravidade (Tabela 1).

Também foi analisada a necessidade de antibioticoterapia baseada no isolamento de microrganismos em culturas e/ ou manifestações clínicas, assim como a necessidade de internação hospitalar durante o período do estudo.

Os processos infecciosos foram diagnosticados de acordo com os seguintes critérios:

Rinossinusite: Os sintomas de rinossinusite podem ser divididos em principais ou menores, que permitem o diagnóstico baseado na história do paciente e achados físicos e dispensam a necessidade de endoscopia nasal, estudos radiológicos ou cultura bacteriana.

O diagnóstico é estabelecido na presença de dois ou mais sintomas principais ou um principal e dois ou mais menores, ou secreção purulenta

ao exame clínico. A tomografia computadorizada realizada em plano coronal de 4 mm ou menos é considerada padrão para o diagnóstico radiológico.

A rinossinusite é definida como aguda recorrente na presença de 4 ou mais episódios com 7 dias de duração cada um no período de 12 meses, com resolução dos sintomas entre cada episódio. É definida como crônica quando os sintomas persistem por 12 semanas ou mais (Osguthorpe, 2001)

Pneumonias: A etiologia pode ser viral, bacteriana ou micótica. A classificação obedece a critérios variados como local de aquisição da pneumonia: na comunidade ou em hospitais, sendo que nas imunodeficiências de anticorpos os agentes mais comuns são o *Pneumococcus* e o *Haemophilus*.

O diagnóstico de pneumonia é essencialmente clínico, baseado na anamnese (febre de intensidade variável, tosse, adinamia, agitação), exame físico (palidez, febre, taquidispnéia, batimento de asas de nariz, dor torácica dependente da respiração, estertoração variada, presença de sopro brônquico, alterações do murmúrio vesicular, broncofonia aumentada, toxemia) e dados epidemiológicos.

A utilização de radiografia de tórax constitui método diagnóstico auxiliar de grande valia. A ultrassonografia pode ser útil na demonstração de derrames e septações; a tomografia computadorizada, embora útil, não é realizada de rotina.

O exame bacteriológico do escarro é pouco específico devido à contaminação das secreções das vias aéreas superiores; se utilizado, deve ser valorizado o achado de mais de 25 leucócitos por campo e de 10 ou mais células epiteliais por campo, que melhor reflete o acometimento das vias aéreas inferiores.

Outros exames podem ser usados, como a lavagem broncoalveolar por broncoscopia, que apresenta alta sensibilidade e especificidade, embora apresentando a desvantagem de ser um método invasivo (Gomes, 2000).

Diarréia: O diagnóstico é estabelecido pela anamnese (aumento do volume fecal, da consistência e freqüência em relação ao padrão habitual) corroborada por exame protoparasitológico e cultura de fezes para patógenos. Estudos mais invasivos são reservados para situações especiais como diagnóstico em pacientes imunocomprometidos, utilizando-se a retossigmoideoscopia com biópsia ou endoscopia alta com aspirado e biópsia, em casos em que o agente etiológico não tenha sido identificado pelo exame de fezes (Aranda-Michel & Giannella, 1999).

3.4 Critérios de exclusão para administração de IL-2r

Para participação no protocolo foram excluídas as seguintes condições: desnutrição grau 2 (IMC < 15) ou mais, diabetes, hipertensão arterial sistêmica, gestação, lactação, asma grave, tireoideopatias, nefropatias, cardiopatias, câncer, doenças auto-imunes, uso de drogas

imunossupressoras e/ou impossibilidade de comparecimento semanal ao hospital durante o período de administração da IL-2r.

3.5 Critérios de exclusão do protocolo

Os critérios para a exclusão do protocolo em andamento foram: presença de efeitos colaterais sistêmicos ou locais de moderados a graves associados à administração de IL-2r, como: arritmias cardíacas, alteração da função hepática, eritema, prurido importante e febre com calafrios.

3.6 Administração da IL-2 recombinante

A IL-2r (Proleukin® - aldesleukin - Chiron) foi administrada pela via subcutânea, alternadamente em membro superior direito ou esquerdo, em doses crescentes durante 16 semanas, segundo o cronograma do Quadro 1.

Quadro 1. Cronograma de administração de IL-2 recombinante em pacientes com imunodeficiência comum variável.

SEMANAS	IL-2 (s.c.)	GAMAGLOBULINA
1 ^a a 4 ^a	500.000 U/m ²	400 mg/kg/mês
5 ^a a 8 ^a	720.000 U/m ²	regime de resgate*
9 ^a a 16 ^a	1.000.000 U/m ²	regime de resgate*
16 ^a a 20 ^a	Sem administração	regime de resgate*

- administração de gamaglobulina EV na dose de 400 mg/kg na presença de valores de IgG sérica menores do que 400 mg/dL.

Após a aplicação, os pacientes permaneciam em observação durante 90 min, sob controle de sinais vitais (frequências cardíaca e respiratória, pressão arterial) e aferição de pico de fluxo expiratório (peak-flow).

3.7. Propriedades da IL-2r utilizada

A interleucina 2 recombinante humana (PROLEUKIN® – aldesleukin - Chiron) é uma proteína altamente purificada com peso molecular de 15.300 daltons. Esta linfocina é produzida através de tecnologia de DNA recombinante, utilizando-se uma cepa de E.coli contendo um análogo do gene da IL-2 humana, obtido através de técnicas de engenharia genética. O potencial biológico desta linfocina é determinado através de um ensaio de proliferação linfocitária e expressado em unidades internacionais UI, conforme normas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde.

Foi demonstrado que PROLEUKIN possui as mesmas características biológicas da IL-2 humana, tendo sido descrito *in vitro* as seguintes propriedades imunorregulatórias: aumento da atividade mitogênica e citotóxica de linfócitos; estimulação de linhagens de células humanas dependentes de IL-2; indução da atividade de células “natural killer” e produção de interferon-gama.

Estudos *in vivo* com esta linfocina demonstraram efeitos na ativação da imunidade celular (linfocitose, eosinofilia, trombocitopenia), bem como na indução da produção de citocinas (fator de necrose tumoral, IL-1 e interferon-gamma), sendo estes efeitos dose-dependentes. Experimentos *in*

vivo em evidenciaram inibição da atividade tumoral em murinos. Permanece desconhecido, entretanto, o mecanismo pelo qual PROLEUKIN é capaz de mediar atividade antitumoral em animais e humanos.

Sua farmacocinética caracteriza-se por altas concentrações plasmáticas após curto tempo de administração pela via endovenosa, rápida distribuição no espaço extravascular e bioatividade reduzida ou ausente após excreção renal.

Com relação à imunogenicidade, estudos em pacientes com carcinoma renal e melanoma metastáticos, tratados com PROLEUKIN pela via endovenosa, evidenciaram desenvolvimento de baixos títulos de anticorpos anti-PROLEUKIN, sendo seu significado clínico ainda desconhecido (http://www.rxlist.com/cgi/generic/aldesleukin_ids.htm).

3.8. Administração de gamaglobulina endovenosa

Imediatamente antes do início da administração da IL-2r os pacientes receberam infusão de gamaglobulina endovenosa e, a partir da quinta semana desta etapa do protocolo, a gamaglobulina passou a ser administrada apenas sob forma de resgate.

3.9. Exames laboratoriais

3.9.1 Dosagem de imunoglobulinas séricas (IgG, IgA e IgM).

Foi realizada por nefelometria no Laboratório Central do HC-FMUSP.

3.9.2 Resposta linfoproliferativa a mitógenos.

Foram colhidos 15 mL de sangue periférico em tubo heparinizado e as células mononucleares foram separadas através de gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia®, Suécia). Após a separação, a “nuvem” de células mononucleares foi retirada e lavada 3 vezes em meio RPMI 1640 (Sigma, EUA). Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em RPMI 1640, a uma concentração de 2×10^6 células/mL. A seguir, foram colocadas em triplicata em microplacas para cultura de 24 ou 96 poços (Costar, EUA). Em cada poço, foram colocados 200 μ L da suspensão celular em RPMI 1640, enriquecida com 10% de soro bovino fetal suplementado com HEPES 20mM, L-glutamina 2mM, penicilina G cristalina 100UI/mL e estreptomicina 100 μ g/mL, com ou sem estimulação mitogênica com fitohemaglutinina (PHA, SIGMA, EUA) na concentração de 5 μ g/mL previamente testada no laboratório (Benitz et al., 2004). As placas foram mantidas em estufa (Forma Scientific) a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, por um período de 72 horas. Doze a 16 horas antes do término do cultivo, as células em cultura foram pulsadas com timidina-triciada (Sigma, EUA) na concentração de 1 μ Ci/poço. Após o término do período de incubação, as culturas foram aspiradas com auxílio de um coletor automático (Titertek-cell Harvester, Flow Laboratories, EUA). A radioatividade incorporada foi medida em contador Beta (Beckman LSBI 50, EUA). Foram considerados normais os índices de proliferação maiores ou iguais a 20.

3.9.3 Imunofenotipagem de células TCD3⁺, TCD4⁺, TCD8⁺, BCD19⁺ e expressão do receptor para IL-2 (CD 25) em células mononucleares do sangue periférico, antes e após o tratamento com IL-2.

Foi realizada por citometria de fluxo por imunofluorescência utilizando um “fluorescence-activated cell sorter (FACSCalibur – BD)”. Para identificação das várias populações linfocitárias foram utilizados anticorpos monoclonais para CD3 (cy-chrome Pharmigen ref 555334), CD4(FITC Pharmigen ref 555346), CD8 (RPE Pharmigen ref 555367) e CD25 (FITC Pharmigen ref 555431). A expressão de CD25 foi analisada em linfócitos TCD3⁺, 18 horas após cultura de células mononucleares do sangue periférico com PHA.

Estes testes foram realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM 60) da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP.

4.0 RESULTADOS

4.1 Pacientes selecionados

Da coorte de 55 pacientes analisados, 12 preencheram os critérios para inclusão no estudo. Destes, apenas quatro (03 do sexo masculino e 01 do sexo feminino com média de idade de 26,25 anos) apresentavam disponibilidade para comparecimento semanal ao hospital, sendo selecionados para administração de IL-2 recombinante humana. A caracterização destes pacientes encontra-se no Quadro 2.

Os participantes do grupo de estudo foram totalmente aderentes ao protocolo, comparecendo semanalmente durante o período proposto (16 semanas) ao ambulatório do Serviço de Imunologia Clínica do HC-FMUSP para aplicação da IL-2 e coleta dos exames controles.

Os demais indivíduos selecionados (oito) concordaram em participar do estudo como pacientes controles com comparecimento mensal ao hospital para administração de gamaglobulina EV, coleta de sangue para dosagem de imunoglobulinas séricas e consulta médica. Eram três do sexo masculino e cinco do sexo feminino, com média de idade de 35,8 anos.

4.2 Efeitos adversos

Não foram observadas reações adversas graves, conforme descrição prévia na literatura (Quadro 3), que justificassem a suspensão do protocolo ou alteração da dosagem da medicação.

Conforme descrito no Quadro 4, o paciente 1 apresentou lesão nodular no local da aplicação (membro superior direito) na nona e décima segunda semanas e em membro superior esquerdo na décima semana; nas três ocasiões, as reações ocorreram 48 horas após a administração da IL-2r, com remissão após uso de anti-histamínicos. O paciente 4 apresentou prurido localizado imediatamente após a segunda aplicação da medicação e edema associado a hiperemia na décima primeira semana (48 horas após), com melhora espontânea.

4.3 Processos infecciosos

O número de infecções e o “score” de gravidade nos períodos pré-IL-2r, durante IL-2r e pós-IL-2r em pacientes com ICV submetidos ao tratamento e de pacientes controles estão relacionados no Quadro 5.

Durante análise dos pacientes submetidos ao tratamento, foi observada uma aparente redução do número total (70,4%) e da gravidade (65,9%) das infecções no período pós-IL-2r (08 infecções e “score” = 45) em comparação ao período anterior ao tratamento (27 infecções e “score” = 132).

Por outro lado, a análise do “score” total e do número de infecções dos pacientes-controle nos períodos correspondentes ao pré-IL-2r (110 e 22, respectivamente) e pós-IL-2r (69 e 16, respectivamente) demonstrou redução de 37,2% e 27,3% , respectivamente (Quadro 5 e Quadro 6).

O número de infecções e a gravidade das mesmas quantificada pelo “score” durante o uso da IL-2r (09 e 45, respectivamente) aparentemente

foram semelhantes aos observados durante o período pré-IL-2r (27 e 132, respectivamente), devendo aqui ser considerado que o tempo de administração da medicação foi de apenas 04 meses e o de “run in” de 12 meses (Quadro 5). Neste mesmo contexto, pode-se também inferir que houve redução dos mesmos parâmetros no período pós-IL-2r (08 e 45, respectivamente) em relação ao período de uso da medicação.

A análise individual dos dados evidenciou que em três dos pacientes submetidos ao tratamento houve redução do número e gravidade das infecções, principalmente durante os três primeiros meses subsequentes ao término da aplicação da IL-2r (Quadro 7).

Cabe ressaltar que ao término das 16 semanas da administração da IL-2r, os pacientes do grupo de estudo permaneceram sem receber gamaglobulina endovenosa por um período de 30 dias, não tendo apresentado intercorrências infecciosas nesse período. Oito semanas após o início da administração da IL-2r, os pacientes 1 e 4 apresentaram remissão de quadro diarréico crônico, que persistiu até o final do estudo.

O espectro das infecções foi similar entre os pacientes que receberam IL-2r e o grupo controle durante todas as etapas do trabalho (Quadro 8).

4.4 Níveis séricos de imunoglobulinas

Nos Gráficos 1, 2, 3 e 4 estão representados os níveis séricos de IgG dos pacientes submetidos ao tratamento com IL-2r durante as três etapas do

protocolo. As amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes da aplicação da gamaglobulina EV. Durante as 16 semanas nas quais os pacientes receberam a medicação em estudo, os níveis de IgG foram dosados a cada duas semanas e, em vigência de dosagem inferior a 400mg/dL, foi administrada gamaglobulina EV de resgate na dosagem de 400 mg/kg.

Aparentemente, não houve variação significativa dos níveis séricos de IgG no período de uso da IL-2r em relação aos períodos pré e pós-tratamento para todos os pacientes. O paciente 2 (Gráfico 2) recebeu gamaglobulina de resgate na oitava (IgG = 158 mg/dL) e décima segunda semanas (IgG = 373 mg/dL), voltando a receber esta medicação somente oito semanas após o término da administração da IL-2r (IgG = 408 mg/dL). O paciente 1 (Gráfico 1) e o paciente 4 (Gráfico 4) receberam resgate de gamaglobulina na décima sexta semana (IgG = 386 mg/dL e IgG = 214 mg/dL, respectivamente) e o paciente 3 (Gráfico 3) não necessitou de reposição durante o tratamento.

Também não houve variação dos níveis de IgG sérica nos pacientes do grupo-controle durante todo o estudo (Gráficos 5 e 6).

4.5 Resposta proliferativa de linfócitos

O tratamento com IL-2r resultou em diminuição substancial da resposta linfoproliferativa à PHA no paciente 1 (63,14%) e no paciente 2 (42,83%), embora ainda estivesse dentro dos valores normais do laboratório (índice de estimulação acima de 20). Por outro lado, o índice de estimulação

triplicou e atingiu valores acima do normal no paciente 3 ao término do tratamento com a IL-2r (Quadro 9).

4.6 Populações linfocitárias

Os valores de linfócitos CD4+, CD8+ e CD19+ permaneceram praticamente inalterados em todas as fases do estudo em todos os pacientes. O percentual de linfócitos T expressando o marcador de ativação CD25 triplicou ao final do tratamento com IL-2r nos pacientes 2 e 3 e aumentou cerca de 25% no paciente 4 (Quadro 10).

5.0 DISCUSSÃO

Este estudo envolveu, inicialmente, a análise retrospectiva dos pacientes dos grupos de estudo e controle durante o período dos doze meses prévios ao início da administração de IL-2r (período de “run in”). A seguir, compreendeu a fase de aplicação da medicação durante 16 semanas e, finalmente, uma terceira etapa com análise prospectiva dos pacientes durante os doze meses subseqüentes ao término da administração da IL-2r.

Em todas as fases do estudo foram analisados o número e a gravidade das infecções, bem como os seguintes parâmetros laboratoriais: dosagem periódica dos níveis de imunoglobulinas séricas, quantificação das populações linfocitárias T e B, resposta linfoproliferativa frente a estímulo inespecífico com mitógeno e expressão do receptor de IL-2 (CD25) em linfócitos TCD3⁺ após estímulo mitogênico.

Durante o processo de seleção para participação no protocolo foram excluídos pacientes com as seguintes condições: IMC inferior a 15 (desnutrição grau 2); infecções crônicas graves com contra-indicação da suspensão de gamaglobulina pelo risco de piora clínica; manifestações de auto-imunidade e/ou neoplasias. Assim, de um universo de 55 pacientes com ICV em seguimento regular no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica do HC-FMUSP, foram selecionados 12 pacientes, dos quais quatro concordaram em submeter-se ao tratamento com IL-2r e oito permaneceram como participantes do grupo-controle.

As justificativas de não adesão ao grupo de estudo foram basicamente a impossibilidade de comparecimento ao hospital durante 16 semanas consecutivas para aplicação do medicamento, em função de faltas ao trabalho e/ou receio de piora clínica decorrente da suspensão da reposição mensal de gamaglobulina.

Todos os pacientes tiveram ótima aderência ao tratamento, comparecendo ao ambulatório durante as dezesseis semanas e completando a aplicação da IL-2r conforme o cronograma proposto.

O esquema terapêutico utilizado demonstrou ser seguro, não tendo sido observados efeitos colaterais sistêmicos que justificassem a diminuição das doses ou suspensão do medicamento, tais como: vômitos, diarreia, fadiga, febre, mialgia, artrite, perda de peso, linfadenopatia, hepatopatia, hipertensão arterial sistêmica, hiperglicemia ou anafilaxia. Foram observados efeitos adversos localizados e de pouca intensidade (lesão nodular, hiperemia e prurido) em apenas dois pacientes (Quadro 4), que não constituíram indicações para a diminuição das doses ou suspensão do tratamento. A ausência de efeitos adversos moderados ou graves também foi relatada por Rump e colaboradores (1997) durante a administração subcutânea de IL-2 humana purificada em 10 pacientes com ICV, confirmando a segurança do tratamento por esta via observada no presente trabalho.

Por outro lado, efeitos adversos importantes na vigência de doses elevadas de PEG-IL-2, administrada pela via intravenosa, foram relatados em 5 pacientes com ICV (Cunningham-Rundles et al., 1992). Nesse estudo,

uma paciente com doença de Crohn associada à imunodeficiência foi excluída do protocolo por apresentar piora acentuada do quadro intestinal. Também foram observados febre, fadiga e mialgia em cerca de 50% das administrações de doses elevadas nos quatro pacientes que completaram o protocolo. Posteriormente, o mesmo grupo de investigadores utilizou a preparação por via subcutânea em outro grupo de pacientes com redução drástica dos efeitos adversos (Cunningham-Rundles et al., 2001).

A ICV é caracterizada pela falha na diferenciação de linfócitos B com conseqüente redução da secreção de imunoglobulinas e produção de anticorpos. No entanto, embora o linfócito B pareça ser a célula mais comprometida, têm sido descritos numerosos defeitos de linfócitos T (Bonilla & Geha, 2006).

Neste contexto, são citados: diminuição da resposta linfoproliferativa a mitógenos e antígenos; aumento de células T com função supressora (CD8) ou perda de sua função auxiliadora (CD4); comprometimento da resposta de células T a antígenos vacinais e/ou microorganismos ambientais; aumento das células T de memória (CD4 Ro+) e diminuição das células T não sensibilizadas (CD4 Ra+); defeito na expressão do CD40 ligante em células T; comprometimento da produção de IL-2 e da expressão de seu receptor CD25 na superfície de células T ativadas (Bonilla & Geha, 2006); diminuição de células T reguladoras (Fevang et al., 2007)

Isto sugere que a ICV possa resultar de falhas de vários componentes do sistema imunológico que levam a uma via final comum, ou seja, ao defeito da produção de anticorpos (Bonilla & Geha, 2006)

Independentemente da etiopatogênese da ICV, tem sido demonstrado que os linfócitos B de alguns pacientes são capazes de responder a vários fatores derivados de linfócitos T *in vitro*. Estas observações são sugestivas de que na realidade o defeito imunológico não seja intrínseco da célula B e que, hipoteticamente, possa ser corrigido também *in vivo*.

A IL-2 constitui uma citocina central para a regulação do crescimento, diferenciação e função de todas as populações de linfócitos T, além de exercer efeitos também sobre células NK. Adicionalmente, pode promover direta ou indiretamente o crescimento e diferenciação de linfócitos B ativados *in vitro* (Abbas et al., 2007).

Nos últimos anos, dois grupos de pesquisadores estudaram os efeitos da administração de IL-2 sobre parâmetros clínicos e laboratoriais em pacientes com ICV. De um modo geral, estes relatos evidenciaram principalmente modificações da resposta imunológica *in vitro* (Cunningham-Rundles et al., 1992; Cunningham-Rundles et al., 1994; Cunningham-Rundles et al., 2001) ou apenas a melhora do quadro clínico (Rump et al., 1997).

Neste estudo, aparentemente não houve restauração significativa dos níveis de IgG, IgA e IgM séricas durante o período de administração da IL-2r, assim como até um ano após o término do tratamento (Gráficos 1, 2, 3 e 4). As variações da IgG sérica foram similares nos pacientes tratados com IL-2r e nos indivíduos integrantes do grupo controle (Gráficos 5 e 6).

Estes dados estão de acordo com aqueles relatados durante e após a administração de PEG-IL-2 pela via subcutânea (Cunningham-Rundles et al. (2001) ou intravenosa (Cunningham-Rundles et al, 1992). Do mesmo modo, Rump et al. (1997) não observaram aumento dos níveis séricos de IgG durante e até seis meses após a administração de IL-2 purificada.

Em um único paciente, foi observado aumento da concentração de IgG sérica de até 4,2 vezes em relação aos níveis basais durante tratamento prolongado com PEG-IL-2 subcutânea, evidenciando a produção de imunoglobulina *in vivo* (Cunningham-Rundles et al., 1994).

Embora, de um modo geral, as casuísticas publicadas sejam pequenas, a análise conjunta dos trabalhos sugere que a IL-2, administrada sob a forma purificada (Rump et al., 1997) ou recombinante peguilada (Cunningham-Rundles et al., 2001), seja ineficaz para estimular o aumento da produção de IgG *in vivo* na maioria dos pacientes com ICV nos períodos de tempo estudados, o que está de acordo com os resultados obtidos nesta investigação.

Por outro lado, os efeitos da IL-2 sobre a produção de imunoglobulinas e anticorpos foram mais consistentes durante estudos realizados *in vitro*.

Assim, Cunningham-Rundles e colaboradores (1994) observaram aumento de 10 a 10.000 vezes na produção de IgG, IgA e IgM *in vitro* em uma paciente tratada com doses baixas PEG-IL-2 pela via subcutânea durante 16 meses. Adicionalmente, foram observados aumento dos níveis de anticorpos protetores para 10 de 12 sorotipos em resposta à vacina anti-

pneumocócica polissacarídica (não-conjugada) e persistência de anticorpos para antígenos toxóide e tetânico durante 4 meses após o término da administração da IL-2. Em outro estudo, doses baixas de PEG-IL-2 pela via subcutânea durante 12 a 18 meses foram capazes de aumentar a resposta de anticorpos para antígenos tetânico e cândida, assim como para um neo-antígeno (fago Øx174) (Cunningham-Rundles et al., 2001).

A análise conjunta destes resultados demonstra que a IL-2 é capaz de atuar na resposta imunológica de alguns pacientes com ICV, tanto em nível de linfócitos B como de linfócitos T, aumentando temporariamente a produção de imunoglobulinas e a síntese de anticorpos para antígenos polissacarídicos (T-independentes) e antígenos protéicos (T- dependentes) *in vitro*. Entretanto, deve ser enfatizado que em nenhum dos trabalhos acima relatados houve correlação convincente entre o aumento da resposta imunológica *in vitro* e a melhora clínica do paciente.

Além de estimular a proliferação celular, a IL-2 promove, indiretamente, a sobrevida de linfócitos T sensibilizados ativados que passam a produzir citocinas (IL-4 e a própria IL-2). Adicionalmente, promove aumento da sobrevida celular através do aumento da expressão da proteína intracitoplasmática Bcl-2, que protege da apoptose (Abbas et al., 2007).

De acordo com dados publicados anteriormente em pacientes com ICV (Cunningham-Rundles et al., 2001; Rump et al.,1997), neste trabalho também não foi evidenciado aumento da sobrevida celular pela administração de IL-2r, uma vez que os valores de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ permaneceram praticamente inalterados em todos os pacientes,

antes e após o tratamento. No entanto, estes achados contrastem com as observações em pacientes com aids, nos quais ocorreu aumento de células CD4⁺ e/ou células CD56⁺ após tratamento com IL-2 (Arno et al., 1999; Kovacs et al, 1995; Kovacs et al., 1996).

Por outro lado, o aumento do percentual de linfócitos T expressando o marcador de ativação CD25 evidenciado em três pacientes ao final do tratamento (Quadro 10) sugere que tenha ocorrido ativação de linfócitos T *in vivo*, possivelmente decorrente do efeito terapêutico da IL-2r. Estes dados contrastam com os resultados descritos por Cunningham-Rundles e colaboradores (1992), que não observaram alterações significativas desse marcador de ativação de linfócitos T em pacientes com ICV. Por outro lado, estão de acordo com o relato de um aumento aproximado de 25% do número de linfócitos T expressando CD25 depois do tratamento com IL-2 em pacientes com câncer (Lotze et al, 1987).

Embora a IL-2 desempenhe um papel importante no desenvolvimento e expansão de células T efectoras, estudos recentes têm sugerido que esta citocina também seja crítica para o estabelecimento e manutenção da tolerância imunológica, sendo que o principal mecanismo envolvido parece ser a geração e manutenção de células T reguladoras CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ (Nelson, 2004).

Assim, é possível que o aumento acentuado do percentual de linfócitos T expressando o marcador de ativação CD25 ao final do tratamento com IL-2r, observado nos pacientes 2 e 3 e, em menor proporção no paciente 4, seja parcialmente devido à geração de células T reguladoras.

Esta hipótese baseia-se no fato desta população celular expressar CD25 constitutivamente, podendo assim, presumivelmente, responder de modo fisiológico a baixas concentrações de IL-2 *in vivo*, conforme demonstrado recentemente em pacientes com aids (Sereti et al., 2005; Shah et al., 2006), câncer (Ahmadzadeh & Rosenberg, 2006;. Cesana et al., 2006; Querfeld et al., 2007; Wei et al., 2007;) ou aids associado a câncer (Shah et al., 2006), nos quais o tratamento com IL-2 r induziu a expansão de células T reg no sangue periférico. No entanto, para comprovação desta hipótese, são necessários estudos adicionais para avaliação da expressão de FoxP3 em células CD4⁺CD25⁺.

Ao contrário do esperado, foi observado que o tratamento com IL-2 r resultou em diminuição substancial da resposta linfoproliferativa à PHA no paciente 1 (63,14%) e no paciente 2 (42,83%) (Quadro 9). Não existe uma explicação clara para esta redução, embora a possibilidade de apoptose celular possa ser afastada pela observação de que as populações de células T e B permaneceram inalteradas durante todo o estudo (Quadro 10).

Redução da resposta proliferativa a mitógenos, principalmente à PHA, também foi relatada por Cunningham-Rundles et al. (1992) em pacientes com ICV após terapêutica com PEG-IL-2 pela via endovenosa durante curto período de tempo. Do mesmo modo, a administração parenteral de IL-2 suprimiu a resposta mitogênica em pacientes com câncer (Kradin et al., 1989).

Por outro lado, a resposta linfoproliferativa à PHA triplicou e atingiu valores acima do normal no paciente 3 ao término do tratamento com a IL-2r,

também na ausência de alterações das populações linfocitárias analisadas. Efeito similar foi observado em pacientes com ICV submetidos à PEG-IL-2 pela via subcutânea, nos quais ocorreu aumento da resposta a mitógenos 6 meses após o início do tratamento. (Cunningham-Rundles et al, 2001).

É altamente provável que a redução ou aumento da resposta proliferativa associada à IL-2 dependa da forma da IL-2 utilizada, dosagem, absorção, via de administração e, principalmente, tempo de tratamento. Neste contexto, cabe ressaltar que a conjugação da IL-2 recombinante ao polietilenoglicol duplica a vida-média desta citocina, diminui sua excreção renal, aumenta sua solubilidade e reduz sua imunogenicidade, embora mantendo as mesmas propriedades da IL-2 recombinante não peguilada (Cunningham-Rundles et al, 1992).

Neste estudo, a administração de IL-2r parece ter proporcionado efeito clínico benéfico durante os primeiros 12 meses consecutivos ao seu término, haja vista a aparente redução do número (70,4%) e da gravidade (65,9%) dos processos infecciosos em comparação ao período de “run in”. Reforçando esta hipótese, a análise dos mesmos parâmetros em pacientes do grupo-controle nos períodos correspondentes ao pré e pós-IL-2r demonstrou redução de apenas 27,3% e 37,2%, respectivamente (Quadro 7).

Efeito benéfico tardio “in vivo” similar ao relatado neste estudo também foi observado por Rump e colaboradores (1997) em 10 pacientes com ICV durante um período de 6 meses após o término do tratamento com IL-2 pela via subcutânea, mas não durante sua administração. É possível

que isto se deva aos períodos de tempo relativamente curtos durante os quais a IL-2 foi administrada nos dois estudos.

Do mesmo modo, este efeito tardio *in vivo* é compatível com o efeito obtido *in vitro* por Cunningham-Rundles e colaboradores (2001), que observaram melhora da resposta a mitógenos e à IL-2 seis meses após o início de tratamento com PEG-IL-2 administrada pela via subcutânea, enquanto a resposta a antígenos de tétano e cândida apresentou recuperação ainda mais lenta (até 12 meses após).

A análise comparativa dos benefícios terapêuticos da IL-2 r durante o período de sua administração (4 meses) em relação aos demais ficou prejudicada, podendo ser apenas inferida, visto que os períodos pré e pós-IL-2r foram três vezes maiores, abrangendo 12 meses de observação. Considerando-se esta ressalva, pode-se então inferir que também tenha ocorrido redução da frequência e gravidade das infecções no período pós-IL-2r em relação ao período de aplicação desta medicação (Quadro 7).

Neste estudo, foi observada melhora clínica mais acentuada durante o primeiro trimestre subsequente ao término do tratamento com IL-2r em três dos participantes do protocolo (Quadro 7). Cabe enfatizar que após o término das 16 semanas da administração da medicação, os pacientes do grupo de estudo permaneceram 30 dias adicionais sem receber gamablobulina endovenosa, durante o qual não apresentaram intercorrências infecciosas. Curiosamente, os pacientes 1 e 2 apresentaram melhora prolongada do quadro de diarreia crônica após a administração da

IL-2, o que também foi relatado por Cunningham-Rundles e colaboradores (1994) em um paciente tratado com PEG-IL-2.

A administração de IL-2r não interferiu no perfil das infecções observadas ao longo do estudo, uma vez que o espectro das mesmas foi similar entre os pacientes que receberam IL-2r e o grupo controle durante todas as etapas do trabalho (Quadro 8).

A análise individual dos casos demonstrou que o paciente 1 não obteve benefício clínico com o tratamento, permanecendo com elevada frequência de processos infecciosos, principalmente de vias aéreas superiores, necessitando internação hospitalar na 6ª semana após o término da IL-2r com diagnóstico de pneumonia comprovada radiologicamente (Quadro 7). É interessante notar que nesta paciente não alteração da proporção de células expressando o marcador de ativação CD25 após o término do tratamento. Inversamente, os demais pacientes apresentaram melhora clínica até o final do estudo, ao lado de aumento da proporção de células CD25⁺ no sangue periférico.

Estes dados permitem supor que a remissão de processos infecciosos em três pacientes com ICV tratados com IL-2 r foi parcialmente devida à ativação de células T e conseqüente melhora da imunidade celular.

Considerando-se o efeito da IL-2r sobre a redução do número e gravidade dos processos infecciosos, ao lado da diminuição atual da oferta e alto custo da imunoglobulina humana, é possível que a IL-2r possa ser utilizada como adjuvante no tratamento de alguns pacientes com imunodeficiência comum variável.

6.0 CONCLUSÕES

1. O esquema terapêutico utilizado demonstrou ser seguro, tendo sido observados apenas efeitos adversos localizados e de pouca intensidade que não constituíram indicações para a diminuição das doses ou suspensão da IL-2r.
2. Não foi observada restauração significativa dos níveis de IgG, IgA e IgM séricas durante o período de administração da IL-2r, assim como até um ano após o término do tratamento.
3. Não foi evidenciado aumento da sobrevida celular pela administração de IL-2r, uma vez que os valores de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ permaneceram praticamente inalterados em todos os pacientes, antes e após o tratamento.
4. O aumento do percentual de linfócitos T expressando o marcador de ativação CD25 ao final do tratamento sugere que tenha ocorrido ativação de linfócitos T *in vivo*, possivelmente decorrente do efeito terapêutico da IL-2r.
5. Houve redução aparente do número e gravidade das infecções durante os 12 meses subseqüentes ao término da IL-2r, principalmente no primeiro trimestre.
6. Foi observada relação entre melhora clínica e aumento da população de linfócitos CD25⁺, o que permite supor que a remissão de processos

infecciosos possa ter sido parcialmente devida à ativação de células T e conseqüente melhora da imunidade celular.

7. É provável que a IL-2r possa ser utilizada como terapêutica adjuvante em alguns pacientes com ICV que apresentam infecções recorrentes e má resposta terapêutica à imunoglobulina endovenosa.

7.0 ANEXOS

7.1 ANEXO I: FICHA DE SEGUIMENTO CLÍNICO AMBULATORIAL (pré-aplicação de IL-2r):

**AVALIAÇÃO PACIENTES ICV–
AMBULATÓRIO DE IMUNODEFICIÊNCIAS PRIMÁRIAS
ALERGIA / IMUNOLOGIA CLÍNICA – HC-FMUSP
(seguimento ambulatorial):**

Data : _____

1.0 - Identificação:

Nome: _____

2.0 - Internação: / / a / / / / a / /
 / / a / /
 / / a / / / / a / /

3.0 - Manifestações clínicas:

• Gerais:

- | | | |
|--|---|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> emagrecimento | <input type="checkbox"/> sudorese noturna | |
| <input type="checkbox"/> febre | <input type="checkbox"/> contínua | <input type="checkbox"/> intermitente |
| | <input type="checkbox"/> vespertina | |
| <input type="checkbox"/> adinamia | <input type="checkbox"/> perda de apetite | |

• Específicas:

■ Neurológicas:

- | | | |
|--|--|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> cefaléia | <input type="checkbox"/> síncope | <input type="checkbox"/> convulsões |
| <input type="checkbox"/> alterações equilíbrio | <input type="checkbox"/> déficit sensitivo | |
| <input type="checkbox"/> déficit motor | | |
| <input type="checkbox"/> afasias | | |
| <input type="checkbox"/> confusão mental | <input type="checkbox"/> torpor | <input type="checkbox"/> coma |

■ Respiratórias:

- | | | |
|---|------------------------------------|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> dispnéia | | |
| <input type="checkbox"/> tosse | <input type="checkbox"/> seca | <input type="checkbox"/> produtiva |
| <input type="checkbox"/> rinorréia | <input type="checkbox"/> purulenta | <input type="checkbox"/> hialina |
| <input type="checkbox"/> secreção pós-nasal | <input type="checkbox"/> otalgia | <input type="checkbox"/> dor facial |
| <input type="checkbox"/> congestão nasal | <input type="checkbox"/> halitose | |
| <input type="checkbox"/> hemoptóicos | | |

■ Gastrointestinais:

- | | | |
|--|---|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> náuseas | <input type="checkbox"/> vômitos | |
| <input type="checkbox"/> disfagia | <input type="checkbox"/> odinofagia | |
| <input type="checkbox"/> epigastralgia | <input type="checkbox"/> cólica abdominal | |
| <input type="checkbox"/> diarreia: | <input type="checkbox"/> cont. | <input type="checkbox"/> intermit. |
| | <input type="checkbox"/> líquida | <input type="checkbox"/> pastosa |
| <input type="checkbox"/> sangue | <input type="checkbox"/> muco | <input type="checkbox"/> restos alim. |
| <input type="checkbox"/> hematêmese | <input type="checkbox"/> melena | <input type="checkbox"/> enterorragia |

■ Osteoarticulares:

() artrites () artralguas

■ Outras: _____

4.0 - Exame físico:

Peso: _____ altura: _____ IMC atual: _____

() consciente () orientado
 () desorientação temporo-espacial () confusão mental
 () déficit motor () déficit sensitivo
 () torpor () coma () sinais meníngeos

() eupnéico () dispnéia () cianose
 () baquet. digital () musculat. acess. () batim. asa nasal

() alter. ausc. pulmonar
 () creptações () roncos () sibilos

() normotenso () hipertenso () hipotenso

() linfadenomegalias () abscessos

() lesões cutâneas (outras) () lesões mucosas

() icterícia

() hepatomegalia () esplenomegalia

() lesões uro-genitais

5.0 - Diagnósticos:

5.1 – Diagnóstico(s) inicial(is) : _____

5.2 – Evolução:

() tuberculose () pulmonar () SNC () ganglionar
 () disseminada

() micobacteriose atípica
 () neurotoxoplasmose () neurosífilis
 () neurocriptocose () citomegalovirose
 () sepse
 () meningite viral () meningite bacteriana
 () herpes-simples () herpes-zoster
 () pneumocistose () pneumonia bacteriana
 () pneumonia fúngica () otite média aguda
 () amigdalite bacteriana () conjuntivite
 () sinusopatia aguda () sinusopatia crônica
 () candidíase oral () candidíase esofageana
 () candidíase vaginal
 () abscessos cutâneos () abscesso pulmonar
 () erisipela () celulite

- () giardiase () outras parasit.
 () diarreia () isosporiase
 () criptosporidiose () infecção vias urinárias () outras
 () condiloma acuminado

● Doenças associadas:

- () asma brônquica () rinite
 () neoplasias
 () doenças auto-imunes
 () outras: _____

● Doenças secundárias:

- () HAS () diabete () derm. contato
 () hepatite B () hepatite C () outras

6.0 - Métodos diagnósticos:

- () alterações radiológicas (Rx) () tórax () abdome
 () seios da face
 () nasofibroscopia () mamografia
 () culturas: _____

- () escarro () exame direto - bacterioscópico
 () culturas

- () biópsias () ganglionar
 () pulmonar () broncoscopia () a céu aberto

- () lavado brônquico alveolar (LBA)
 () PPF () positivo () negativo
 () tomografia computadorizada () crânio () tórax
 () seios face () abdome

- () ressonância nuclear magnética () crânio
 () USG abdominal () USG pélvico
 () fundo-de-olho () normal () alterado () não realiz.
 () prick-test
 () teste contato

- () sorologias:

- | | | | |
|------------------|-------|-------|--------|
| () rubéola | () + | () - | () nr |
| () CMV | () + | () - | () nr |
| () toxoplasmose | () + | () - | () nr |
| () HCV | () + | () - | () nr |
| () HBV | () + | () - | () nr |
| () HAV | () + | () - | () nr |
| () HIV* | () + | () - | () nr |

* Carga viral (PCR): _____

7.0 - Terapêutica:

- Antibioticoterapia terapêutica:

Antibioticoterapia profilática:

8.0 – Gama-globulina:

Início: / / /

doses: _____

Última infusão : / / /

dose: _____

Total de infusões: _____

9.0 – IL2r:

Início: / / /

doses: _____

Última infusão : / / /

dose: _____

Total de infusões: _____

Gama-globulina - Reações adversas:

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> febre | <input type="checkbox"/> tremores |
| <input type="checkbox"/> calafrios | <input type="checkbox"/> mal estar geral |
| <input type="checkbox"/> náuseas | <input type="checkbox"/> vômitos |
| <input type="checkbox"/> cefaléia | <input type="checkbox"/> meningite asséptica |
| <input type="checkbox"/> dor abdominal | <input type="checkbox"/> lombalgia |
| <input type="checkbox"/> dispnéia | <input type="checkbox"/> broncoespasmo |
| <input type="checkbox"/> insuf. renal aguda | <input type="checkbox"/> alter. enzimas hepáticas |
| <input type="checkbox"/> arritmias | |

IL2r - Reações adversas:

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> febre | <input type="checkbox"/> tremores |
| <input type="checkbox"/> calafrios | <input type="checkbox"/> mal estar geral |
| <input type="checkbox"/> náuseas | <input type="checkbox"/> vômitos |
| <input type="checkbox"/> cefaléia | <input type="checkbox"/> meningite asséptica |
| <input type="checkbox"/> dor abdominal | <input type="checkbox"/> lombalgia |
| <input type="checkbox"/> dispnéia | <input type="checkbox"/> broncoespasmo |
| <input type="checkbox"/> insuf. renal aguda | <input type="checkbox"/> alter. enzimas hepáticas |
| <input type="checkbox"/> arritmias | |

10.0 – Complicações:

- bronquiectasias DPOC
 insuf. respirat. aguda
 internação em UTI
 ventilação mecânica
 drogas vasoativas

11.0 – Seguimento ambulatorial:

N° de consultas: _____

Trabalho/escola:

Consultas extras: ____/____

absenteísmo

ambulat.

PA (emergência)

licença médica : _____