Otávio Cabral Marques

ALTERAÇÕES GENÉTICO-MOLECULARES EM PACIENTES DEFICIENTES DE CD40L

São Paulo

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ALTERAÇÕES GENÉTICO-MOLECULARES EM PACIENTES DEFICIENTES DE CD40L

Otávio Cabral Marques

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2008

OTÁVIO CABRAL MARQUES

Alterações genético-moleculares em pacientes deficientes de CD40L

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Condino Neto

São Paulo

2008

"Aos meus amados pais Paulo e Suerleide; à minha grandiosa esposa Ana Lúcia; ao meu filho querido Gabriel; à minha irmã Paula; à minha avó Maria e minha tia Sônia; aos meus sogros Edson e Célia; aos meus primos Augusto, Magda e Cristiane; às minhas sobrinhas Maria Alice e Maria Fernanda; aos meus demais familiares; e ao meu orientador, pela confiança e respeito com que me acolheu em seu laboratório."

Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador pela confiança, compreensão, apoio, incentivo e ensinamentos em todos os momentos deste projeto;

À Dra. Cristina Weber Worm, Profa. Dra. Beatriz Costa Carvalho e Prof. Dr. Nelson Rosário Filho pela confiança e apoio ao projeto, seleção de pacientes, coleta de amostras e informações clínicas concedidas para o enriquecimento de nosso estudo;

Às técnicas Christina Arslanian e Jussara Rehder e aos colegas Josias Brito Frazão, Paulo Vitor Soeiro Pereira, Walmir Cutrin Aragão Filho, Angela Falcai, Paolo Errante, Edgar Borges de Oliveria Jr, Patrícia Macchiaverni, Eduardo Formighieri e Juliana Moreira pelos momentos que compartilhamos e pela ajuda constante;

À Dra Dora Lisa Friedlander Del Nero meus sinceros agradecimentos pelas valiosas críticas e sugestões durante redação desta dissertação;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro;

À Estatística Rosana D. Prisco, do Serviço de Informática do ICB, por ter revisado as análises estatísticas que realizamos;

À Profa Dra Gláucia Maria Machado-Santelli pelo auxílio na interpretação e revisão dos experimentos de microscopia confocal;

Aos professores José Alexandre Marzagão Barbuto, Beatriz Costa Carvalho e Lourdes Issac pelas valiosas críticas e sugestões por ocasião do Exame de Qualificação;

Aos professores Sonia Jancar, Eliana Faquin, Neils Olsen, Gustavo Amarante e Eduardo Gorab pelos ensinamentos e momentos de reflexão nas disciplinas que cursei no programa de imunologia;

Às colegas do laboratório de imunologia das mucosas Elaine, Rosana, Leuridã, Simone, Paltrícia Palmeira, pelo apoio constante.

RESUMO

Marques OC. Alterações genético-moleculares em pacientes deficientes de CD40L [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

A deficiência de CD40 Ligante (CD40L) ou síndrome de Hiper-IgM ligada ao X (X-HIGM) é considerada uma imunodeficiência primária combinada de células T e B. O CD40L é expresso na superfície de linfócitos T ativados e interage com o CD40 expresso na superfície de linfócitos B, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e neutrófilos. A interação CD40L-CD40 transmite sinais que induzem ativação, diferenciação e proliferação celular. Nosso objetivo foi analisar as alterações genético-moleculares da molécula CD40L que acometeram indivíduos de 5 famílias brasileiras, ocasionando X-HIGM. Genotipamos 25 indivíduos, sendo 6 pacientes com X-HIGM, 13 parentes relacionados heterozigotos e 6 homozigotos sadios. Dentre os pacientes com X-HIGM dois eram de origem caucasóide e 4 eram mestiços. A idade dos pacientes variou de 2 a 20 anos e o quadro clínico de infecções de repetição teve início em média nos primeiros 4 meses de vida. As principais infecções recorrentes manifestadas pelos pacientes foram pneumonia e otite. O paciente TB apresentou blastomicose, observação original nesta imunodeficiência. A análise genético-molecular foi heterogênea. No paciente TB foi detectado um defeito de *splicing* levando a deleção do exon 3 (r.345_402del do gene CD40L *(CD40LG)* no paciente FS uma nova substituição *missense* g.11856 G>C (c.476 G>C, pW140C), no paciente KC uma substituição *nonsense* g.11855 G>A (c.475G>A, p. W140X), e nos pacientes CH, FE e VIC uma deleção g. 3074_3077delTAGA, levando a alteração no processamento do RNA. A fenotipagem dos leucócitos demonstrou que a contagem de linfócitos T auxiliares ($CD3^+CD4^+$), linfócitos citotóxicos

($CD3^+CD8^+$), linfócitos B ($CD19^+CD40^+$) e linfócitos T ativados ($CD3^+CD69^+$) dos pacientes foram similares aos controles sadios. Contudo, foi observada uma redução significativa nos níveis de expressão de CD40L na superfície de linfócitos $CD3^+$ e $CD4^+$ dos pacientes. A análise dos linfócitos T por microscopia confocal revelou que as células dos homozigotos com expressão residual do CD40L em sua superfície também apresentam redução na densidade da expressão da molécula CD3, sugerindo a necessidade da integridade molecular do CD40L para a expressão normal do CD3. Concluímos que mutações no CD40L que levam à síndrome de X-HIGM são heterogêneas e a análise genético-molecular permitiu um diagnóstico preciso tornando possível o aconselhamento genético e a triagem dos recém-nascidos das famílias avaliadas.

Palavras-chave: CD40 Ligante; Imunodeficiências Primárias; Defeito genético-molecular.

ABSTRACT

Marques OC. Molecular genetic defects in CD40L-deficient patients [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

CD40-Ligand (CD40L) deficiency or X linked Hyper-IgM syndrome (X-HIGM) is considered a T and B cell combined primary immunodeficiency. CD40L is expressed on the cell surface of activated T lymphocytes and interacts with CD40, expressed on the surface of B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, endothelial cells, and neutrophils. The CD40L-CD40 interaction induces activation, differentiation, and cell proliferation. Our aim was to analyze the molecular-genetic alterations of CD40L molecule affecting individuals of 5 Brazilian families, leading to X-HIGM. We genotyped 25 individuals, whom 6 were X-HIGM patients, 13 were heterozygote related patients, and 6 were healthy homozygotes. Within the patients with X-HIGM, two of them were of caucasoid origin and four were "mestiços". The patients' age ranged from 2 to 20 years and their recurrent infections started in average during their first 4 months of life. The main recurrent infections were pneumonia and otitis. The patient TB presented blastomycosis, a unique observation in this immunodeficiency. The molecular-genetic analysis revealed heterogeneity. TB patient presented a splicing defect causing a deletion of exon 3 (r.345_402del) of CD40L gene (CD40LG). Patient FS presented a new missense mutation g.11856 G>C (c.476 G>C, pW140C). Patient KC presented a nonsense substitution g.11855 G>A (c.475G>A, p. W140X). Patients CH, VIC, and FE presented a deletion g. 3074_3077delTAGA, causing an alteration on RNA processing. The leukocytes fenotyping demonstrated that T helper lymphocytes ($CD3^+CD4^+$), T cytotoxic lymphocytes ($CD3^+CD8^+$), B lymphocytes

($CD19^+CD40^+$), and T activated ($CD3^+CD69^+$) cell counts of patients were similar to healthy controls. However it was observed a significant reduction of CD40L expression on cell surface patients' $CD3^+$ and $CD4^+$ lymphocytes. The T lymphocyte confocal microscopy analysis revealed that homozygotes with residual expression of CD40L in their surface also presented a reduction on the density of CD3 molecule expression, suggesting the need of molecular integrity of CD40L for normal CD3 expression. We conclude that mutations on CD40L leading to X-HIGM syndrome are heterogeneous and the molecular-genetic analysis allowed a precise diagnosis making possible the genetic counseling and newborn screening of the involved families.

Key words: CD40 Ligand; Primary Immunodeficiency; molecular-genetic defects.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Interação entre o CD40 e o CD40L e seu papel na regulação da resposta imune 21

Figura 02. Células que expressam o CD40 e o CD40L 24

Figura 03. Localização e estrutura do CD40L 27

Figura 04. Primeiro e segundo sinais importantes para a ativação do linfócito T 30

Figura 05. A interação CD40L-CD40 induz a expressão de IL-12 pelas células dendríticas 32

Figura 06. Importância da interação CD40-CD40L para a atividade microbicida dos macrófagos 34

Figura 07. Papel do CD40L solúvel na produção de ânion superóxido pelos neutrófilos. 35

Figura 08. Troca de classe de Imunoglobulinas 39

Figura 09. Fluxograma 46

Figura 10. Heredogramas das famílias dos pacientes estudados 52

Figura 11. Valores absolutos de imunoglobulinas dos pacientes deficientes de CD40L 53

Figura 12. Regiões do RNAm do CD40L analisadas 62

Figura 13. Alteração na corrida eletroforética do produto de PCR do paciente TB 68

Figura 14. Análise do *CD40LG* do paciente FS 69

Figura 15. Análise do *CD40LG* do paciente KC 70

Figura 16. Análise do *CD40LG* do paciente CH 71

Figura 17. Análise do *CD40LG* do paciente FE 73

Figura 18. Análise do *CD40LG* do paciente VIC 74

Figura 19. Análise estrutural dos transcritos do CD40L 76

Figura 20. Deleção do exon 3 do RNAm (r.345_402del) encontrada no paciente TB. 77

Figura 21. Cromatograma demonstrando a mutação c.476 G>C no paciente FS. 78

Figura 22. Cromatograma demonstrando a mutação c.475 G>A no paciente KC 79

Figura 23. Fenotipagem dos linfócitos T $CD3^+CD4^+$ 80

Figura 24. Fenotipagem dos linfócitos T $CD3^+CD8^+$ 81

Figura 25. Fenotipagem dos linfócitos B $CD19^+CD40^+$ 82

Figura 26. Fenotipagem dos linfócitos T $CD3^+CD40L^+$ 83

Figura 27. Expressão das moléculas CD3 e do CD4 na superfície dos linfócitos T pré e pós-ativação com PMA e Ionomicina 86

Figura 28. Microscopia confocal dos linfócitos T $CD3^+CD40L^+$ 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Freqüência dos defeitos que afetam moléculas envolvidas na troca de classe de Imunoglobulinas 41

Tabela 02. Lista de pacientes cujo histórico clínico correspondeu aos critérios sugestivos de deficiência de CD40L 48

Tabela 03. Idade atual, idade do diagnóstico e idade de início dos primeiros sintomas dos pacientes deficientes de CD40L. 49

Tabela 04. Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR e no seqüenciamento do *CD40LG*. 56

Tabela 05. Relação dos pares de primers utilizados na reação de RT-PCR quantitativo-relativo 63

Tabela 06. Anticorpos utilizados na fenotipagem dos linfócitos. 65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

1.1 *Interação CD40L-CD40: dados históricos* 22

1.2 *Estrutura CD40L: do gene à proteína* 25

1.3 *Interação CD40-CD40L e sua influência na resposta imunológica* 28

1.3.1 Linfócitos T 28

1.3.2 Células dendríticas (DC) 31

1.3.3 Fagócitos 33

1.3.4 *Imunidade humoral dependente de linfócitos T* 36

1.4 *Defeitos na troca de classe de Imunoglobulinas* 40

2 OBJETIVOS 44

2.1 *Objetivo Geral* 44

2.2 *Objetivos Específicos* 44

3 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS 45

3.1 *Fluxograma* 45

3.2 *Critérios de inclusão* 47

3.3 *Deficiência de CD40L: Idade de início dos primeiros sintomas, idade do diagnóstico, idade atual dos pacientes* 48

3.4 *Perfil clínico dos Pacientes deficientes de CD40L* 49

3.4.1 *Paciente TB* 49

3.4.2 *Paciente FS* 49

3.4.3 *Paciente KC* 50

3.4.4 *Paciente CH* 50

3.4.5 *Paciente FE* 51

3.4.6 *Paciente VIC* 51

3.5 *Heredograma das famílias estudadas* 51

3.6 *Níveis séricos de Imunoglobulinas* 53

3.7 *Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMC)* 54

3.8 *Transformação dos linfócitos B* 54

3.9 *Extração do DNAg* 55

3.10 *Amplificações dos 5 exons do CD40LG e regiões de "splice"* 56

3.11 *Seqüenciamento do gene CD40L (CD40LG)* 58

3.12 *Ativação dos Linfócitos T* 59

3.13 *Extração do RNA total* 59

3.14 *Reação de transcrição reversa* 61

3.15 *Análise estrutural do RNAm que codifica a molécula CD40L* 61

3.16 *Análise dos valores relativos de linfócitos* $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD19^+CD40^+$, $CD3^+CD69^+$ *e* $CD3^+CD40L^+$ 64

3.17 *Análise da expressão do CD40L por Microscopia confocal* 65

3.18 *Análise estatística* 66

4 RESULTADOS 67

4.1 *Seqüenciamento do gene CD40L (CD40LG)* 67

4.1.1 *Paciente TB* 68

4.1.2 *Paciente FS* 69

4.1.3 *Paciente KC* 70

4.1.4 *Paciente CH* 71

4.1.5 *Paciente FE* 72

4.1.6 *Paciente VIC* 74

4.2 *Análise estrutural dos RNAm produzidos pelo CD40LG* 75

4.2.1 *RT-PCR* 75

4.2.2 *Seqüenciamento do cDNA dos pacientes deficientes de CD40L* 77

4.2.2.1 *Paciente TB* 77

4.2.2.2 *Paciente FS* 78

4.2.2.3 *Paciente KC* 79

4.2.2.4 *Pacientes CH, VIC e FE* 79

4.3 *Fenotipagem dos linfócitos* 80

4.3.1 *Fenotipagem dos linfócitos* $CD3^+CD4^+$ 80

4.3.2 *Fenotipagem dos linfócitos* $CD3^+CD8^+$ 81

4.3.3 *Fenotipagem dos linfócitos CD19^{+}CD40^{+}* 82

4.3.4 *Fenotipagem dos linfócitos CD3^{+}CD40L^{+}* 83

4.4 *Microscopia confocal dos linfócitos T CD3+CD40L+* 89

5 DISCUSSÃO 90

6 CONCLUSÕES 102

6. 1 *Perspectivas futuras* 103

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 104

1 INTRODUÇÃO

A interação CD40L-CD40 exerce papel central na regulação de vários aspectos da resposta imunológica, tais como ativação e diferenciação dos linfócitos T (Grewal et al., 1995), desenvolvimento de linfócitos T regulatórios (Treg) (Guiducci et al., 2005), apresentação antigênica pelas células dendríticas (Caux et al., 1994), ativação da resposta imune celular (Harmsen, 1995), e resposta imune humoral (Fuleihan et al., 1993) **(Figura 01)**.

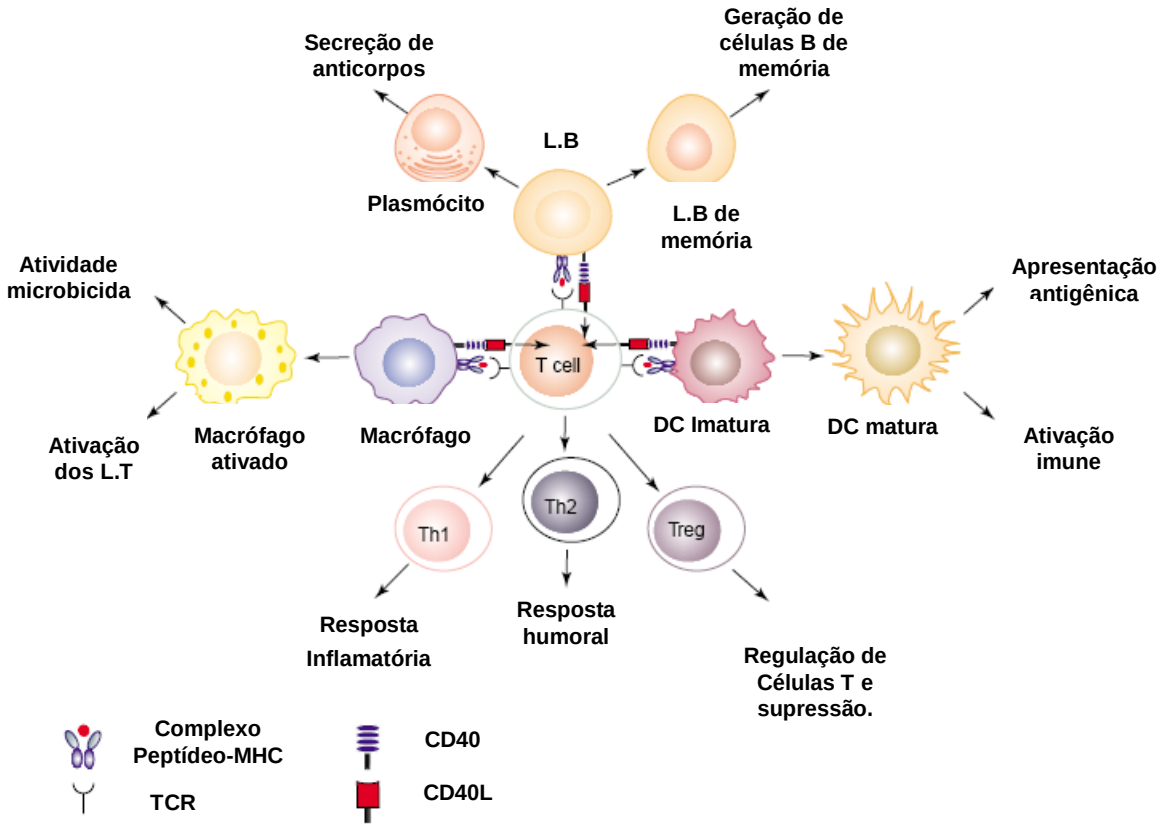


Figura 01. Interação entre o CD40 e o CD40L e seu papel na regulação da resposta imune. Linfócitos TCD4⁺ (LT) expressando o CD40L interagem com CD40 expresso nas células B, macrófagos ou células dendríticas (DC) induzindo a ativação, diferenciação e função efetora dessas células. Esta interação é importante para a diferenciação de subpopulações de linfócitos T (Th1, Th2 e Treg). *TCR,* Receptor de célula T.

Fonte: Adaptado de Mathur et al., 2006.

1.1 *Interação CD40L-CD40: dados históricos*

A molécula CD40 foi descrita pela primeira vez como um antígeno expresso em células de carcinomas de bexiga (Koho et al., 1984). Quatro anos depois utilizando anticorpos anti-CD40, Gordon e colaboradores (1988) observaram que o CD40 era importante para a proliferação dos linfócitos B e Hirohata e colaborados (1988) demonstraram que linfócitos T ativados eram capazes induzir a proliferação dos linfócitos B, a troca de classe de imunoglobulinas e a secreção de anticorpos.

Utilizando uma molécula construída a partir da associação da porção extracelular do CD40 com uma cadeia constante de uma imunoglobulina (CD40-Ig), Noelle e colaboradores (1992) demonstraram que o CD40-Ig era capaz de se ligar a uma glicoproteína de 39-kDa, que foi denominada de gp39 importante para a ativação dos linfócitos B.

Armitage e colaboradores (1992) descobriram em camundongos o gene que codificava a gp39 e o denominaram de CD40 ligante (CD40L). No mesmo ano, foi descoberta a proteína homóloga ao CD40L em humanos, identificada por meio de anticorpos monoclonais, capazes de inibir a capacidade dos linfócitos T ativados de induzir a ativação dos linfócitos B (Lederman et al., 1992a), enquanto outros três grupos de forma independente identificaram o gene que codificava o CD40L (Graf et al., 1992; Hollenbaugh et al., 1992; Lederman et al., 1992b).

Em 1993, outros cinco grupos independentes demonstraram que mutações no gene CD40L (*CD40LG*) eram responsáveis por uma imunodeficiência caracterizada por falhas na troca do isotipo de imunoglobuina (Ig) M (IgM) para os demais isotipos IgG, IgA e IgE (Aruffo et al., 1993; Korthauer et al., 1993; Di Santo et al., 1993; Allen et al., 1993; Fuleihan et al., 1993). Esta imunodeficiência foi originalmente considerada uma imunodeficiência primária humoral, denominada síndrome de Hiper-IgM ligada ao X (X-HIGM). Nesta mesma época a

expressão do CD40 foi detectada em várias outras células **(Figura 02),** tais como superfície dos linfócitos T (Were et al., 1991; Indzhiia et al., 1992), em basófilos (Valent et al., 1990), em progenitores mielóides (Saeland et al., 1992),em eosinófilos (Ohkawara et al., 1996), em monócitos (Alderson et al., 1993), macrófagos (MØ) (Kennedy et al., 1996), em células dendríticas (DC) (Freudenthal e Steinman., 1990), em células epiteliais tímicas (Galy e Spits, 1992), em células endoteliais (Karmann et al., 1995), em fibroblastos (Fries et al., 1995), em células do músculo liso (Lazaar et al., 1998), em queratinócitos (Gaspari et al., 1996), e neutrófilos (Khan et al., 2006).

A molécula CD40L foi inicialmente identificada na superfície de Linfócitos T $CD4^+$. Posteriormente, foi detectada em várias outras células **(Figura 02)** tais como linfócitos $CD8^+$ (Roy et al., 1993; Paganelli et al., 1995; Sad et al., 1997), basófilos (Gauchat et al., 1993), monócitos (Cock et al., 1993), mastócitos (Gauchat et al., 1993), linfócitos B (Grammer et al., 1995) eosinófilo (Gauchat et al., 1995), células exterminadoras naturais (NK) (Carbone et al., 1996), células dendríticas (Pinchuk et al., 1996), macrófagos (Mach et al., 1997), células endoteliais e células do músculo liso (Mach et al., 1997), plaquetas (Henn et al., 1998) e células epiteliais (Gaweco et al., 1999).

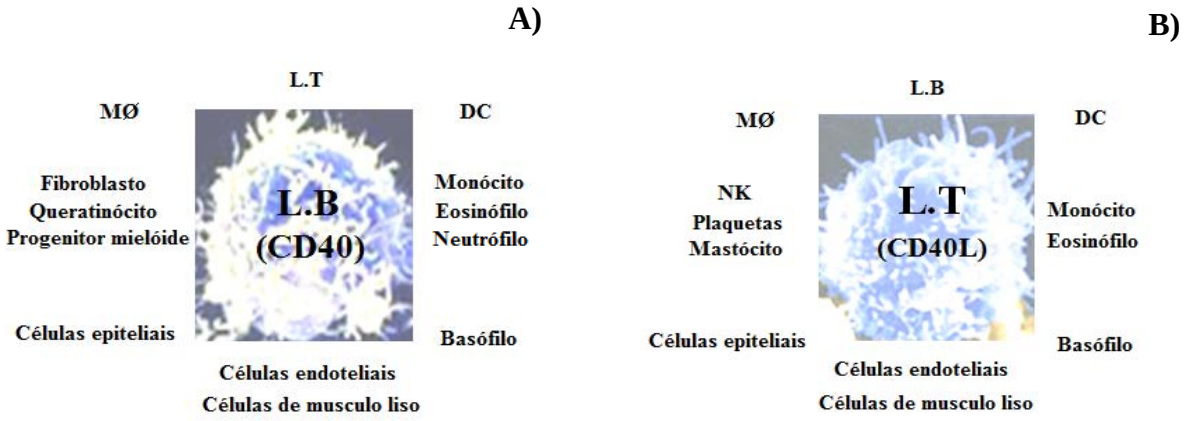


Figura 02. Células que expressam o CD40 e o CD40L. (A) No centro a imagem encontra-se o Linfócito B (LB), a célula do sistema imunológico em que a expressão do CD40 foi primeiramente detectada. Circundando o L.B encontra-se o nome das demais células em que a a expressão de CD40 foi subseqüentemente encontrada. (B) No centro a imagem encontra-se o Linfócito T (LT), a primeira célula em que a expressão CD40L foi detectada. Circundando o LT encontra-se o nome das demais células em que a expressão do CD40L foi posteriormente encontrada. *MØ*, macrófago. *DC*, célula dendrítica.

Fonte: Adaptado de: www.sbi.org.br/sbinarede/SBInarede52/index.html

Após essas descobertas, a inibição da interação CD40L-CD40 com anticorpos anti-CD40L e/ou anti-CD40 e o desenvolvimento de camundongos geneticamente deficientes de CD40L ou CD40, permitiu avançar o conhecimento sobre as implicações desta interação, demonstrando sua importância para a resposta imonológica celular (Cosyns et al., 1998; Hayashi et al., 1999; Marriot et al., 1999; Wiley e Harmsen, 1995; Kamanaka et al., 1996), resposta inflamatória (Kiener et al., 1995) e contra tumores (Mackey et al., 1997). Além disso, estabeleceu-se a associação entre níveis elevados da expressão do CD40 e do CD40L e a patogenia de doenças de ordem inflamatória e auto-imune, tais como, esclerose múltipla (Gerritse et al., 1996), na doença do enxerto-versus-hospedeiro (Larsen et al., 1996), aterosclerose (Mach et al., 1998), doença inflamatória intestinal (Liu et al., 1999) e doença de Alzheimer (Calingasan et al., 2002). Em razão disso, muitos

pesquisadores têm investigado a modulação da interação CD40-CD40L, para fins terapêuticos.

Com a identificação de fenótipos e defeitos associados à interação dos linfócitos T e B, T e células dendríticas, T e fagócitos, a imunodeficiência primária inicialmente denominada de síndrome de Hiper-IgM ligada ao X, passou a ser também denominada deficiência de CD40L e foi reclassificada como uma imunodeficiência combinada de linfócitos T e B (Geha et al., 2007).

No ano de 2003 Brodeur e colaboradores demonstraram que a ativação dos linfócitos B, via CD40, não era estritamente dependente do CD40L. A proteína ligante do C4b (C4BP), uma molécula regulatória da via clássica do complemento, também pode ligar-se ao CD40 expresso na superfície dos linfócitos B, ativá-los e induzí-los a trocar de classe de imunoglobulinas.

Recentemente revelou-se que o CD40L também pode mediar o processo inflamatório, independentemente do CD40, ao interagir com o receptor de integrina MAC-1 (CD11b/CD18) expresso em monócitos e macrófagos (Zirlik et al., 2007).

1.2 *Estrutura do CD40L: do gene à proteína*

Nossos milhares de genes estão armazenados nas moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA) que em conjunto com nucleoproteínas formam os nossos cromossomos. O controle exercido pelo DNA sobre a produção de proteínas é indireto. No núcleo das células, o DNA transmite suas informações genéticas para o ácido ribonucléico (RNA) e esse por sua vez, após sofrer o processo de “splicing” (clivagem interna dos transcritos primários para a excisão dos introns seguida da união dos exons), é transportado para o citoplasma, onde codifica a produção de proteínas (Watson et al., 2006).

O gene CD40L (*CD40LG*) está localizado no cromossomo X na posição Xq26.3 (Notarangelo et al., 1996). Este gene possui 5 exons e 4 introns perfazendo um total de mais de 12 Kilo Bases (Villa et al., 1994) **(Figura 03a)** O *CD40LG* codifica uma proteína transmembrana de 39 kDa composta por 261 aminoácidos pertencente a superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) (Hollenbaugh et al., 1992).

O exon 1 do *CD40LG* codifica o primeiro aminoácido da proteína CD40L até o aminoácido de número 52, o exon 2 até o 96, o exon 3 até o 115, o exon 4 até 136 e o exon 5 até o aminoácido 261, que corresponde ao término da proteína **(Figura 03b)** (Villa et al., 1994). Os 261 aminoácidos que compõem o CD40L estão distribuídos numa região intracelular (IC) formada pelos aminoácidos número 1 ao 23, seguida da região transmembrana (TM) composta pelos aminoácidos 23 ao 47 e pela região extracelular (EC) composta pelos aminoácidos de número 47 ao 261. Entre os aminoácido 123 e 261 da proteína CD40L localiza-se o domínio que possui homologia ao fator de necrose tumoral TNF (TNFH).

A proteína CD40L também pode ser encontrada numa forma solúvel (sCD40L) formada a partir da clivagem da forma transmembrana. Esta clivagem gera uma molécula solúvel de 18 kDa com os 148 últimos aminoácidos do CD40L, que por conservar o domínio TNFH intacto mantêm a capacidade de ligar-se ao CD40 (Graf et al., 1995).

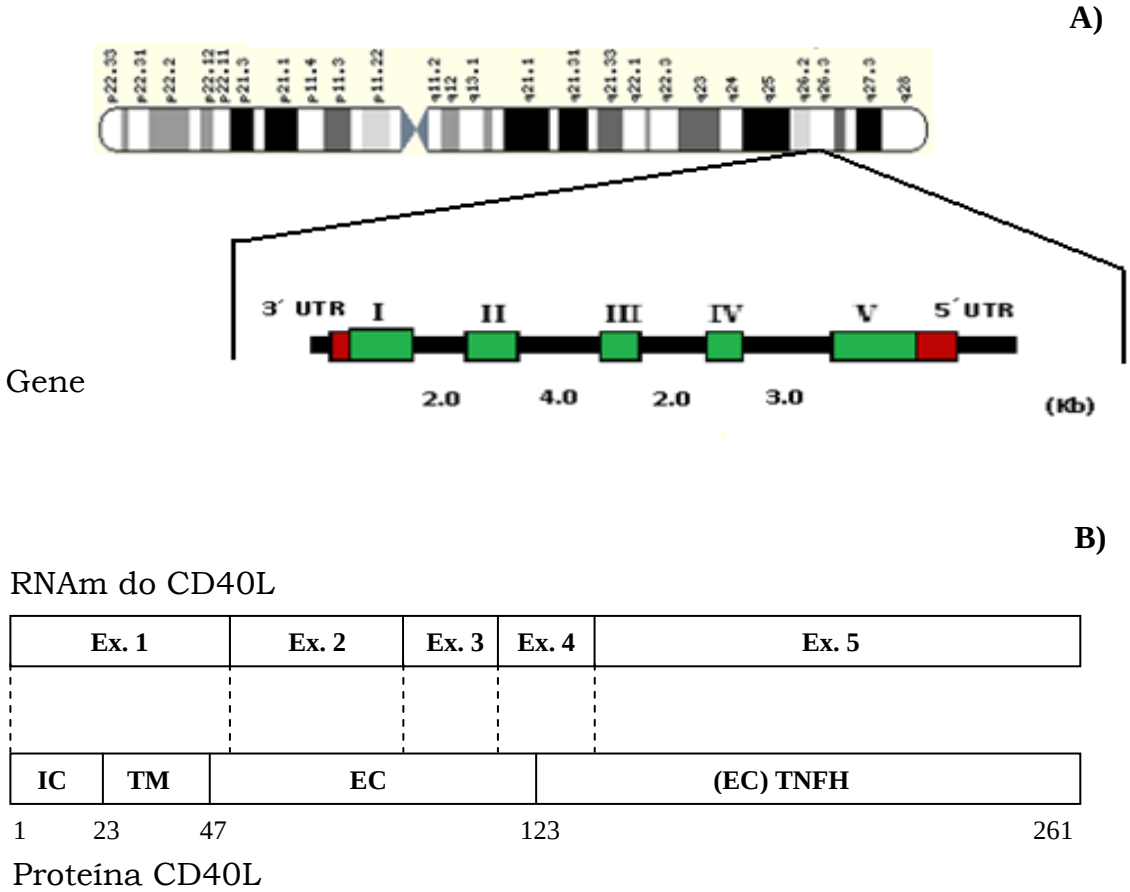


Figura 03. Localização e estrutura do CD40L. **(A)** O *CD40LG* humano localiza-se na região cromossômica Xq26.3. Este gene consiste de 5 exons (verde) e quatro introns (preto). Abaixo de cada intron está demonstrado o número de bases de cada um deles. Em vermelho, antecedendo o exon I, localiza-se a região 3' UTR (do inglês, untranslated region) e após o exon 5 a região 5' UTR **(B)** A barra superior representa o RNAm do CD40L formado após a transcrição do *CD40LG*. A barra inferior, representa os domínios da proteína CD40L. As linhas tracejadas demonstram cada uma das porções da proteína CD40L que os exons do RNAm e o CD40LG codificam. O exon I codifica a região intracelular (IM), transmembrana (TM) e o início da porção extracelular (EC). Já os exons II-V codificam toda a região extracelular (EC) da proteína CD40L onde localiza-se o domínio TNFH**.**

Fonte: Adaptado de (http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=cd40lg)

1.3 *Interação CD40L-CD40 e sua influência na resposta imunológica*

1.3.1 Linfócitos T

Nos linfócitos, a expressão do CD40L é regulada positivamente após o reconhecimento do antígeno pelo complexo TCR (receptor de células T) (Nusslein et al., 1996) e em seguida a interação entre o CD28 expresso na superfície dos linfócitos T com as moléculas co-estimulatórias da família B7, estabilizam a expressão do CD40L pelos linfócitos (Johnson-Leger et al., 1998). Fisiologicamente citocinas pró-inflamatórias tais como a interleucina-1 (IL-1), IL-4, o fator de necrose tumoral-α (TNF-α) (Armitage et al., 1992; Gauchat et al., 1993; Mach et al., 1997) e a própria ligação com o CD40 (Pinchuck et al., 1996) também aumentam a expressão do CD40L, ao passo que o fator de crescimento transformador-β inibe a expressão do CD40L (Roy et al., 1993).

Quando linfócitos T (LT) interagem com células apresentadoras de antígenos (APC), reconhecem o antígeno e a região polimórfica das moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), através do receptor de células T (TCR) (Clevers et al., 1988) **(Figura 04)**. Essa região de contato entre o linfócito T e a APC é denominada sinapse imunológica (Krummel e Allison, 1995; Monks et al., 1998; Grakoui et al., 1999). As moléculas CD4 e CD8 agem como co-receptores reconhecendo as regiões não polimórficas das moléculas codificadas pelos genes do MHC de classe I e classe II, respectivamente. Após o reconhecimento do antígeno, as moléculas CD3 e cadeias Zeta medeiam a transdução do primeiro sinal necessário à ativação dos LT (Allison et al., 1987).

O segundo sinal importante para a ativação dos linfócitos T é proveniente das moléculas co-estimulatórias CD28 e CD40L que interagem, respectivamente, com as moléculas B.7 e CD40, expressas na superfície das APCs, o que resulta na co-estimulação dos linfócitos T e

contribui para a expansão clonal dos linfócitos T virgens (Walunas et al., 1996; Griggs et al., 1996) **(Figura 04)**.

Na superfície dos linfócitos T virgens o CD40L é expresso constitutivamente em níveis baixos. Após o primeiro sinal de ativação os níveis de expressão do CD40L aumentam significativamente (Roy et al., 1993; Lesly et al., 2006). Uma vez ativado, o linfócito T e a APC iniciam a reorganização do citoesqueleto. Esta alteração do citoesqueleto é fundamental para a estabilização da interação linfócito T-APC e conseqüente proliferação dos linfócitos T e sua diferenciação (Rothoeft et al., 2006). Esta estimulação culmina com a expressão de fatores de transcrição importantes, tais como o fator nuclear κapa B (NF κB), o fator nuclear de linfócitos T ativados (NFAT), e a proteína de ativação-1 (AP-1) (Francis et al., 1995; Lai e TAN et al., 1994) (http://www.biocarta.com/genes/index.asp) necessários à diferenciação e desenvolvimento da função efetora dos linfócitos T **(Figura 04)**.

A interação entre o CD40L expresso na superfície dos Linfócitos $TCD4^+$, com o CD40 expresso na superfície das APCs, seja de linfócitos B, macrófagos ou células dendríticas, emite sinais de "feedback" positivo, resultando tanto na ativação e diferenciação das APCs, como na potencialização da ativação dos linfócitos T e conseqüente proliferação e diferenciação dos mesmos (Caux et al., 1994; Grewal et al., 1995; Harmsen et al., 1995; Fuleihan et al., 1995; Guiducci et al., 2005).

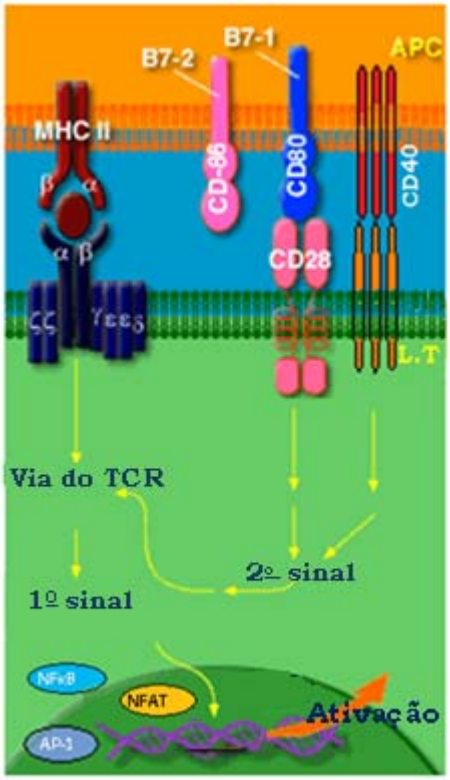


Figura 04. Primeiro e segundo sinais importantes para a ativação do linfócito T CD4+. O primeiro sinal é emitido pelo reconhecimento do antígeno pelo complexo TCR. Em seguida o linfócito T aumenta os níveis de expressão do CD40L. Em sinergismo com o CD28, o CD40L emite o segundo sinal importante para a plena ativação do linfócito T. Estes eventos culminam com a ativação de fatores de transcrição que atuarão na diferenciação e proliferação celular. *NF-κb,* fator nuclear κB; *NFAT*, fator nuclear de linfócitos T ativados, AP-1 proteína de ativação-1.

Fonte: Adaptado de (http://www.biocarta.com/genes/index.asp). Acessado em: 17/06/2008

1.3.2 *Células Dendríticas*

As células dendríticas (DC) exercem um importante papel na resposta imunológica contra infecções associando a imunidade inata e a adaptativa. DC imaturas capturam o antígeno e então migram para os linfonodos onde apresentam os antígenos aos linfócitos T nas regiões paracorticais. Essas células são encontradas em vários tecidos e órgãos do corpo (Banchereau et al., 2000).

A interação CD40-CD40L é fundamental para que macrófagos e células dendríticas produzam o fator de necrose tumoral-α (TNF- α) e a interleucina-12 (IL-12) que são citocinas pró-inflamatórias e indutoras de produção de interferon-γ (IFN-γ) pelos linfócitos T (Chan et al., 1991; Trinchieri, 1994; Shu et al., 1995). Em sinergismo com o IFN-γ, a interação CD40-CD40L é essencial para o desenvolvimento das DC, promovendo o aumento da expressão das moléculas B7-1 e B7-2 e moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) (Caux et al., 1994; Banchereau et al., 2000) **(Figura 05)**.

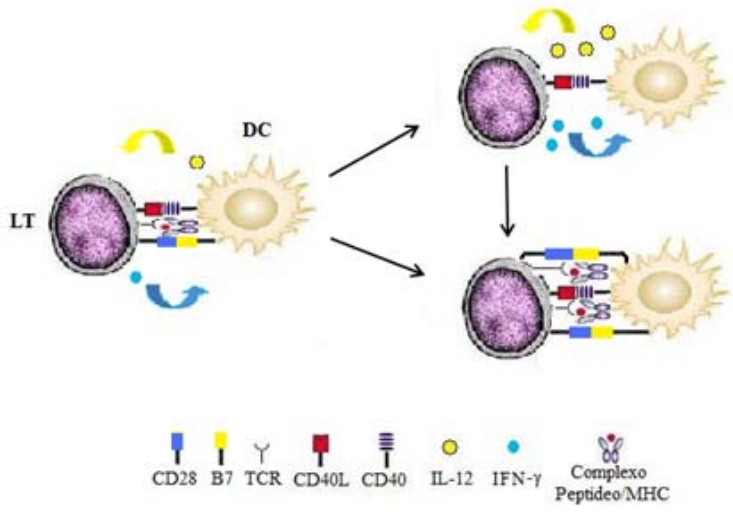


Figura 05. A interação CD40L-CD40 induz a expressão de IL-12 pelas células dendríticas (DC). Por sua vez a IL-12 induz os linfócitos T (LT) a secretarem IFN-γ que potencializa a expressão das moléculas co-estimulatórias B7-1 e B7-2 e moléculas do MHC de classe II. *IL-12*, interleucina-12; *IFN-γ,* interferon-γ; *MHC,* complexo principal de histocompatibilidade; TCR; receptor de células T.

Fonte: adaptado de (www.msd-brazil.com/.../mm_sec16_167.html; Mathur et al., 2006.)

Células dendríticas de pacientes deficientes de CD40 após serem estimuladas com CD40L ou LPS e IFN-γ secretaram baixas quantidades de IL-12 e altos níveis de IL-10 (Fontana et al., 2003) demonstrando o papel crítico da interação CD40-CD40L no balanço da produção de IL-10 e IL-12. A IL-10 é uma citocina que regula negativamente a resposta das células dendríticas.

Outro importante papel da interação CD40-CD40L para a ativação das células dendríticas foi demonstrado por Fugita e colaboradores (2001), os quais demonstraram que esta interação aumenta a capacidade migratória das células dendríticas para os linfonodos drenantes e a capacidade das células dendríticas de ativar os linfócitos T.

As células dendríticas além de expressarem o CD40, também expressam o CD40L. Pinchuk e colaboradores (1996) demonstraram que o CD40L, expresso pelas DC, é funcional e capaz de induzir a produção

de IgA e IgG pelos linfócitos B. Esses pesquisadores sugeriram que a troca de classe de imunoglobulina também pode ser induzida pelas células dendríticas.

1.3.3 *Fagócitos*

Os macrófagos, fagócitos mononucleares multivalentes com papel central na inflamação, apresentação antigênica e destruição de patógenos intracelulares, são células localizadas em diferentes tecidos. Após serem ativados com CD40L, os macrófagos, produzem várias citocinas pró-inflamatórias como: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF-α (Kiener et al., 1995; Mach et al., 1999).

O TNF-α apresenta funções imunomodulatórias (Schulze-Osthoff et al., 1992; Chensue et al., 1988) e pró-inflamatórias (Chensue et al., 1988; Azzawi e Hasleton, 1999). Uma dessas funções é a estimulação da produção de ânion superóxido (Dri et al., 1999; Werling et al., 2004) que é potencializada na presença de IFN-γ (Cassatella et al., 1985; Newburger et al., 1991; Condino-Neto et al., 1998). O ânion superóxido é crucial para a atividade microbicida dos macrófagos.

A IL-12 estimula o linfócito T a produzir IFN-γ que é um ativador dos macrófago e estimula a formação dos fagolisossomos (Crevel et al., 2002) e ativação do sistema NADPH oxidase aumentando a capacidade microbicida dos macrófagos ((Newburger e Ezekowitz, 1988; Murray, 1993; Murray et al., 1995) **(Figura 06)**.

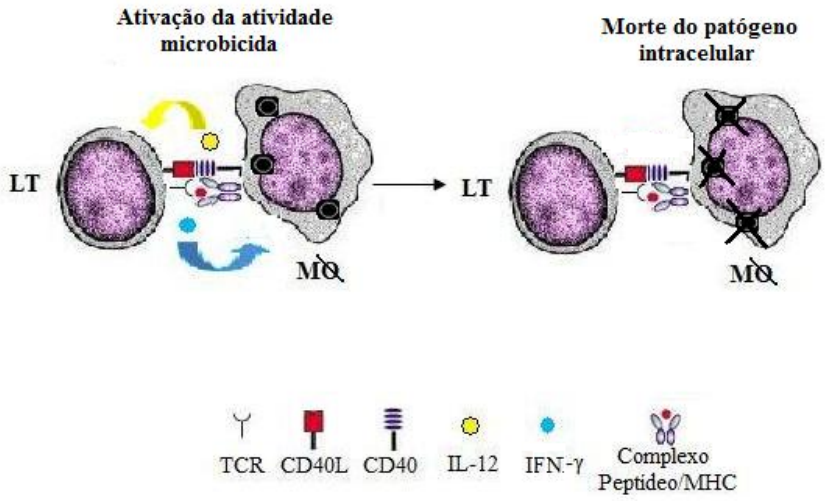


Figura 06. Importância da interação CD40-CD40L para a atividade microbicida dos macrófagos. Após interagirem com os linfócitos T (LT), os macrófagos produzem IL-12, a qual por sua vez induz os linfócitos T a produzirem IFN-γ, aumentado a capacidade microbicida dos macrófagos. *IL-12*, interleucina-12; *IFN-γ,* interferon-γ; *MHC,* complexo principal de histocompatibilidade; *MØ*, Macrófago; *TCR,* recptor de células T.

Fonte: Adaptado de: (www.msd-brazil.com/.../mm_sec16_167.html; Mathur et al., 2006).

Recentemente foi demonstrado que os neutrófilos, fagócitos polimorfonucleares (PMNs) fundamentais para resposta imune inata, expressam o CD40 em sua superfície (Khan et al., 2006). Vanichakarn e colaboradores (2008) demonstraram que o CD40 expresso na superfície dos neutrófilos, ao ser ativado pelo CD40L solúvel produzido por plaquetas, estimula a produção de ânion superóxido (Vanichakarn et al 2008) **(Figura 07)**. Por sua vez, o ânion superóxido produzido pelos neutrófilos, ativa as plaquetas a produzirem mais CD40L solúvel **(Figura 07)**. A inibição da interação CD40L-CD40 com anticorpos anti-CD40L, reduz consideravelmente a produção de ânion superóxido pelos neutrófilos (Vanichakarn et al., 2008).

Vanichakarn e colaboradores (2008) também demonstraram que a ativação dos neutrófilos com formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), induz a formação de conjugados entre plaquetas e neutrófilos. Este processo é mediado pelas moléculas de adesão P-selectina expresso na superfície das plaquetas e a glicoproteína ligante-1 da P-selectina (PSGL-1) expressa na superfície dos neutrófilos.

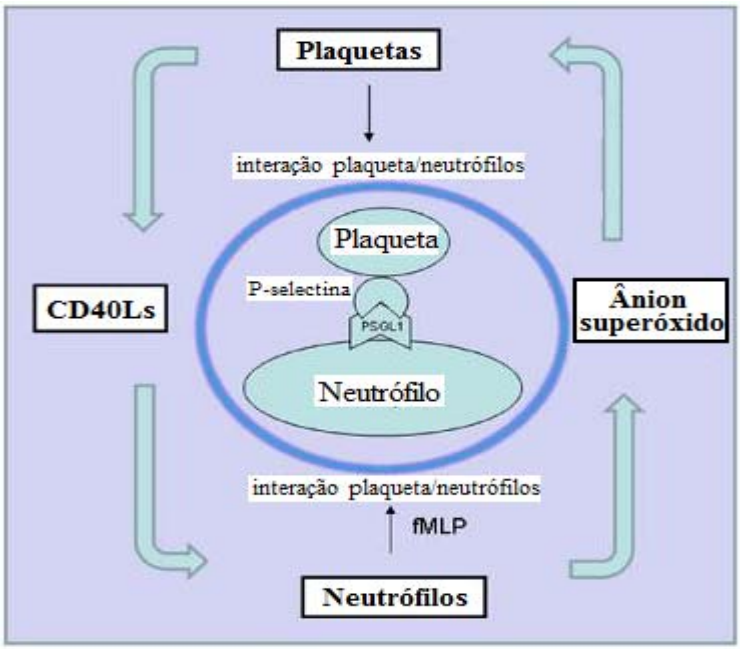


Figura 07. Papel do CD40L solúvel na produção de ânion superóxido pelos neutrófilos. Estimulação das plaquetas e dos neutrófilos gera "feed-back" positivos que potencializam a ativação dessas duas células. *CD40Ls*, CD40L solúvel; formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)

Fonte: Adaptado de: (Vanichakarn et al 2008).

Os reativos intermediários do oxigênio, tais como o ânion superóxido, tiveram sua relevância clínica reconhecida ao se demonstrar que fagócitos de pacientes com a imunodeficiência primária, doença granulomatosa crônica (DGC), apresentavam atividade microbicida defeituosa, resultado da baixa produção de ânion superóxido, como conseqüência de mutações que afetam componentes do sistema NADPH oxidase (Holmes et al., 1966; Holmes et al., 1967).

1.3.4 *Imunidade humoral dependente de linfócitos T*

Após seu amadurecimento na medula óssea, os linfócitos B virgens, migram para os órgãos linfóides periféricos, onde podem ser estimulados a produzirem anticorpos de diferentes classes de forma timo-dependente (TD) ou timo-independente (TI) (Liu et al., 1989; Berek et al., 1991; Kuppers et al., 1993; Rajewsky et al., 1996; Jabara et al., 2001).

A interação CD40-CD40L auxilia a expansão clonal dos linfócitos B, inibe sua apoptose nos centros germinativos (Holder et al., 1992; Stavnezer, 1996; Snapper et al., 1997), aumenta os níveis de expressão das moléculas de adesão (Barret et al., 1991; Stout e Suttles, 1996;) e moléculas co-estimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2).

Quando os linfócitos T auxiliares CD4+ ativados se ligam aos linfócitos B, a interação CD40L-CD40 induz a associação de proteínas citosólicas denominadas fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs), ao domínio citoplasmático do CD40 (Hu et al., 1994). Os TRAFs recrutados para o CD40 iniciam cascatas enzimáticas que resultam na translocação do fator nuclear κB (NF-κB) para o núcleo do linfócito B. O NF-κB está presente no citoplasma do linfócito associado aos inbidores do κB (IκBs), que bloqueiam a entrada do NF-κB no núcleo. Após a ativação celular ocorre a fosforilação dos IκBs, por um complexo enzimático conhecido como IκB cinases (IKK), que possui uma subunidade reguladora conhecida como inibidor do κB cinase γ (IKK- γ) ou modulador essencial do fator nuclear κB (NEMO) (Israel et al., 2000). Em seguida ocorre a ubiquitinação dos IκBs e conseqüente degradação desses inibidores no proteassomo, permitindo a translocação do NF-κB para o núcleo do linfócito B (Berberich et al., 1994; Ghosh et al., 1994; Maniatis et al., 1999). Esses eventos resultam na ativação dos linfócitos B.

Dois genes expressos nos linfócitos B, ativados pela interação CD40L-CD40, são fundamentais para a troca de classe de imunoglobulinas, a citidina desaminase induzida por ativação (AID) (Muramatsu et al., 1999a) e a uracil *N*-glicosilase (UNG) (Kvaloy et al., 2001).

A importância da interação CD40-CD40L para a troca de classe de imunoglobulina foi definitivamente determinada, quando estudiosos demonstraram que mutações no gene CD40L (*CD40LG*) são responsáveis por falhas na troca de classe do isotipo de IgM para os demais isotipos IgG, IgA e IgE (Aruffo et al., 1993; Korthauer et al., 1993; Di Santo et al., 1993; Allen et al., 1993; Fuleihan et al., 1993).

Nas respostas primárias de anticorpos os produtos codificados pelos segmentos VDJ, são reunidos a cadeia pesada μ, codificada pelo gene Cμ, para a síntese da IgM. O gene Cμ é ativado por um promotor localizado após os segmentos VDJ, denominado Eμ. Durante a troca de classe de imunoglobulinas, o gene Cμ e o Cδ são deletados e o linfócito B passa a expressar diferentes genes (Cγ, Cα ou Cε) que codificam regiões constantes das cadeias pesadas das imunoglobulinas IgG, IgA ou IgE, respectivamente (Honjo et al., 2000; Manis et al., 2002). Cada gene C é precedido por seqüências de DNA especializadas, denominadas regiões de "switch" (S). Após a ativação do linfócito B pela interação CD40-CD40L e por citocinas, a seqüência de DNA localizada entre duas diferentes regiões S é deletada e os segmentos VDJ são justapostos a um dos diferentes genes C **(Figura 08a)**. Como resultado os segmentos gênicos VDJ são justapostos com um diferente gene C (Rothman et al., 1989; Stavnezer, 2000) efetivando a troca de classe da imunoglobulina. Ao final deste processo, é produzida uma imunoglobulina com diferente região constante da cadeia pesada, porém com os mesmos segmentos VDJ.

Dois genes expressos nos linfócitos B, ativados pela interação CD40L-CD40, são fundamentais para a troca de classe de

imunoglobulinas, a citidina desaminase induzida por ativação (AID) (Muramatsu et al., 1999a) e a uracil *N*-glicosilase (UNG) (Kvaloy et al., 2001). Pacientes deficientes de AID (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000) e UNG (Imai et al., 2003) apresentam importantes falhas na troca de isotipos de imunoglobulinas.

O papel da AID consiste na desaminação das citosinas nas regiões S do DNA, convertendo as citosinas em uracil, criando por conseqüência, resíduos não pareados de Guanina-Uracila no DNA (Chaudhuri et al., 2004). Após este evento, a UNG remove os resíduos de uracil gerados, formando pontos de quebra numa das fitas do DNA (Kavli et al., 2005). Em seguida, endonucleases geram pontos de cortes, onde a AID e a UNG atuarão, gerando regiões onde as 2 fitas do DNA serão cortadas (Schrader et al., 2005) **(Figura 08b)**. Enzimas de reparo atuarão nos pontos de quebra do DNA e efetuarão a junção de um dos exons Cγ ou Cα ou Cε aos exons VDJ, concluindo a formação de um novo isotipo de imunoglobulina (Petersen et al., 2001).

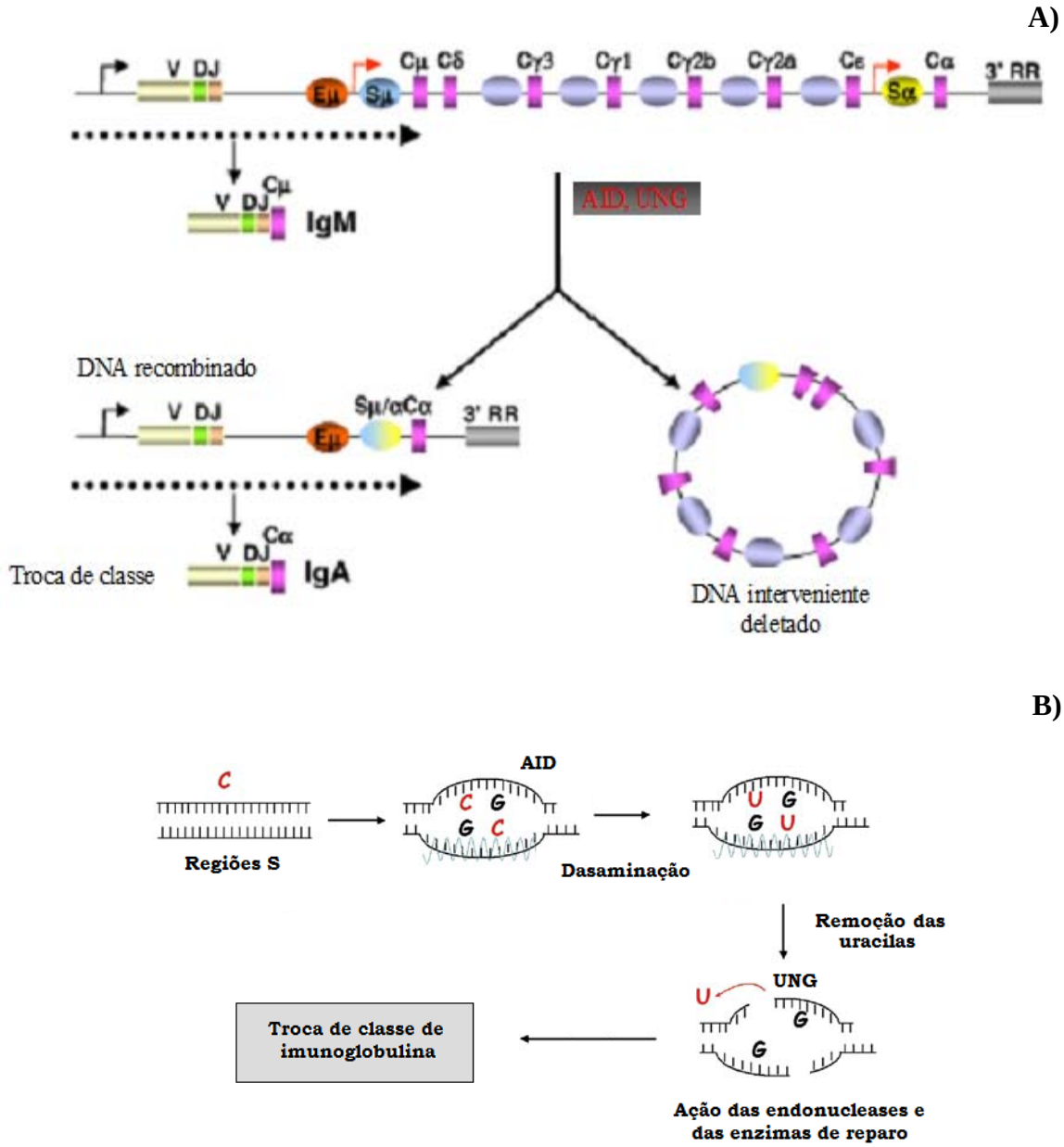


Figura 08. Troca de classe de Imunoglobulinas. (A) Nas respostas primárias de linfócitos B os produtos codificados pelos segmentos gênicos VDJ são ligados ao gene Cμ para que ocorra a síntese da IgM. A transcrição desta região inicia-se após á ativação do promotor denominado Eμ. Após a ativação do linfócito B o DNA entre duas diferentes regiões S é deletado e os segmentos VDJ são justapostos com um dos diferentes gene C. Este evento de recombinação é mediado pela AID e pela UNG. Ao final deste processo uma imunoglobulina com diferente região constante da cadeia pesada, porém com os mesmos segmentos VDJ é produzida. (B) O papel da AID e da UNG na troca de classe de imunoglobulina está representado. *C,* citosina, *G,* guanina, *U,* uracila; *AID,* desaminase induzida pela ativação; *UNG,* uracil *N*-glicosilase; *Regiões S,* regiões de "switch" (S)

Fonte: Adaptado de Edry e Melamed 2007; Notarangelo et al., 2006.

A troca de classe das imunoglobulinas também pode ocorrer na ausência da interação CD40L-CD40 e de centro germinativo. Quantidades significativas de IgA e IgE estão presentes no soro de alguns pacientes deficientes de CD40L (Life et al., 1994) e alguns mecanismos que geram a troca de classes T independentes já foram determinados. Glicoproteínas virais e polissacarídeos bacterianos podem estimular os linfócitos B a produzirem IgG e IgA na ausência de CD40L (Mond et al., 1995; Vos et al., 2000; Szomolanyi et al., 2001).

Na zona marginal (MZ) do baço ou na lâmina própria intestinal, o estimulador do linfócito B (BlyS), expresso na superfície dos linfócitos B e o fator de ativação de célula B (BAFF), expresso na superfície das células dendríticas ativadas, interagem, resultando na troca de classe de anticorpos T-independentes (Litinskiy et al., 2002).

A proteína ligante do C4b (C4BP), um componente regulatório da via clássica do complemento, pode ligar-se diretamente ao domínio extracelular do CD40 nos linfócitos B humanos num sítio que difere do CD40L (Brodeur et al., 2003) e induzir a proliferação dos linfócitos B, a expressão das moléculas co-estimulatórias B7 e em sinergismo com a IL-4 induzir a troca de classe de IgM para IgE. Além disso, foi demonstrado que o C4BP colocaliza-se com os linfócitos B nas amígdalas humanas. Estes dados são muito interessantes, pois sugerem uma nova interface entre o sistema complemento e ativação dos linfócitos B.

1.4. *Defeitos na troca de classe de Imunoglobulinas (Ig)*

Várias imunodeficiências primárias apresentam falhas na troca de isotipo de imunoglobulinas. Dentre elas, temos aquelas causadas por mutações no CD40L (Aruffo et al., 1993; Korthauer et al., 1993; Di Santo et al., 1993; Allen et al., 1993; Fuleihan et al., 1993), na AID (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000), no CD40 (Ferrari et al., 2001), na UNG

(Imai et al., 2003), no NEMO (Jain et al., 2001) e no inibidor do κB-α (IκBα) (Courtois et al., 2003). As freqüências desses defeitos nos indivíduos acometidos por falhas na troca de classe de imunoglobulina estão descritas na **Tabela 01**.

Tabela 01. Freqüência dos defeitos que afetam moléculas envolvidas na troca de classe de Imunoglobulinas.

Molécula	CD40L	AID	CD40	UNG	NEMO	IκBα
Freqüência	72%	24%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%

AID, desaminase de ativação induzida; *UNG*, Uracil *N*-glicosilase; *NEMO*, modulador essencial do fator nuclear κB; *IκBα*, inibidor do κB-α

Fonte: http://bioinf.uta.fi/base_root/

Essas imunodeficiências coletivamente são chamadas de Síndrome da Hiper IgM (HIGM), pelo fato dos pacientes acometidos com esses defeitos, apresentarem níveis normais ou elevados de IgM, associados com níveis normais ou diminuídos de IgG e IgA (Notarangelo et al., 1992). A HIGM foi descrita pela primeira vez por Burtin (1961) e por Rosen e colaboradores (1961). Inicialmente observou-se que a HIGM acometia apenas indivíduos do sexo masculino, na forma de uma herança recessiva ligada ao cromossomo X (Krantman et al., 1980; Notarangelo et al., 1991). A ocorrência dessa síndrome em pacientes do sexo feminino sem história de doença na família sugeriu a existência de um padrão de herança autossômica em alguns casos (Stieham e Fudenberg, 1966b; Pascual-Salcedo et al., 1983)

Dentre os diferentes tipos de HIGM, a deficiência de CD40L foi a primeira a ser descoberta, sendo a mais freqüente entre os indivíduos afetados. A deficiência de CD40L é uma imunodeficiência combinada de linfócitos T e B (Geha et al., 2007) rara com freqüência estimada em 1/1.000.000 nascimentos (http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/), sendo causada por mutações no *CD40LG*.

Entre as características clínicas e laboratoriais que os indivíduos deficientes de CD40L manifestam, encontramos neutropenias, neoplasias, enfermidades hepáticas e respiratórias responsáveis pela alta morbidade e mortalidade destes pacientes (Levy et al., 1997). Manifestações auto-imunes são observadas em 20% dos pacientes com deficiência de CD40L (Notarangelo et al., 1992), e incluem trombocitopenia, artrite e doença inflamatória intestinal (Levy et al., 1997).

Em alguns pacientes as mutações no CD40L são associadas com um curso clínico menos severo da doença, sendo consideradas como mutações moderadas (Danielian et al., 2007). Essas mutações não geram a perda total da ligação ao CD40, mas apenas diminuem a afinidade da ligação ao CD40 (Seyama et al., 1998). Nesses pacientes os primeiros sintomas da deficiência de CD40L podem iniciar tardiamente e não manifestam pneumonia causada por *Pneumocystis jiroveci.*

Nos casos estudados até o momento, a maior porcentagem das mutações encontradas na molécula CD40L foi do tipo "missense" (30%) seguidas de mutações "nonsense" (22%), deleções (16%), inserções (13%), mutações em sítios de "splice" (19%) (http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/). As mutações podem ser encontradas ao longo de todo CD40LG, mas os estudos mostram que a maioria das mutações localizam-se dentro do exon 5 (Erdós et al., 2008).

As deficiências de AID e UNG são clinicamente idênticas e caracterizam-se por linfadenopatia, infecções do trato digestório e respiratório (Revy et al., 2000; Imai et al., 2003) causadas apenas por patógenos extracelulares (Quartier et al., 2004). Esta é uma diferença marcante que distingue defeitos na AID e na UNG, dos pacientes deficientes de CD40L, já que estes últimos apresentam suscetibilidade tanto a patógenos extracelulares como intracelulares. Como esperado, os

pacientes deficientes de CD40 apresentam um fenótipo similar ao dos deficientes de CD40L (Ferrari et al., 2001).

Já os pacientes com HIGM causada por defeitos no NEMO e no IκBα (Jain et al., 2001; Courtois et al., 2003) apresentam fenótipo bem distinto caracterizado por infecções bacterianas recorrentes de início precoce na infância, sendo as infecções oportunistas menos comuns (Simonte e Cunninghan-Rundles, 2003). Em alguns pacientes esta falha implica na presença de dentes incisivos cônicos e hipodontia, ao passo que outros desenvolvem osteopetrose, linfoedema e o fenótipo de displasia ectodérmica anidrótica. A abrangência das infecções e dos defeitos na produção de anticorpos são heterogêneas. O fato do NF-κB ser encontrado no citoplasma de várias células, indica que defeitos nesta molécula podem afetar vários tecidos.

Considerando a heterogeneidade clínica e genética dos pacicentes portadores da HIGM, o estudo molecular e genético é importante para a definição do diagnóstico diferencial, delineamento terapêutico, aconselhamento genético e prognóstico dos casos. O diagnóstico molecular, ainda no início da vida dos pacientes com HIGM é de fundamental importância para o adequado tratamento dos portadores desta síndrome, diminuindo a taxa de mortalidade e melhorando sua qualidade de vida (Érdos et al., 2008). Além disso, a identificação de mecanismos genético-moleculares defeituosos contribui para o entendimento da resposta imune humana e sua suscetibilidade a infecções.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Identificar e analisar as alterações genético-moleculares de pacientes com X-HIGM, cuja história clínica e familiar sugerem alterações na molécula CD40L.

2.2 *Objetivos Específicos*

1) Analisar os valores relativos das populações de linfócitos $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD19^+CD40^+$, $CD3^+CD69^+$, $CD3^+CD40L^+$ e $CD4^+CD40L^+$ nas células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) por meio de citometria de fluxo;

2) Analisar a densidade de expressão do CD40L na superfície dos linfócitos T $CD3^+$ por meio de microscopia confocal;

3) Investigar mutações no *CD40LG* dos pacientes por meio do seqüenciamento do DNA genômico (DNAg), cuja expressão da proteína CD40L apresentou-se alterada na citometria de fluxo;

4) Após a identificação das mutações nos pacientes, investigar pontualmente através do seqüenciamento do DNAg, as familiares portadoras do alelo mutado;

5) Analisar por meio da técnica de transcrição reversa acoplada com a reação da polimerase em cadeia (RT-PCR) e por sequenciamento, a estrutura dos transcritos dos pacientes com alterações no CD40L;

6) Analisar genótipo e fenótipo.

3 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Fluxograma*

Foram selecionados para esta etapa inicial do projeto, pacientes com HIGM cuja história clínica, exames laboratoriais e radiológicos, segundo os critérios de Geha e colaboradores (2007), sugerem deficiência de CD40L.

Após firmarem termo de consentimento informado, coletamos uma amostra de sangue dos pacientes em condições clínicas estáveis e seguimos o fluxograma demonstrado na **Figura 09**.

Os leucócitos do sangue periférico foram separados para as análises de citometria de fluxo, imortalização de linfócitos B, obtenção de DNAg e RNAm. Os pacientes que apresentaram redução na expressão do CD40L passaram diretamente para a etapa de investigação genético-molecular, por meio do seqüenciamento do *CD40LG,* análise da expressão gênica e avaliação da expressão do CD40L na superfície de linfócitos $CD3^+$ por microscopia confocal.

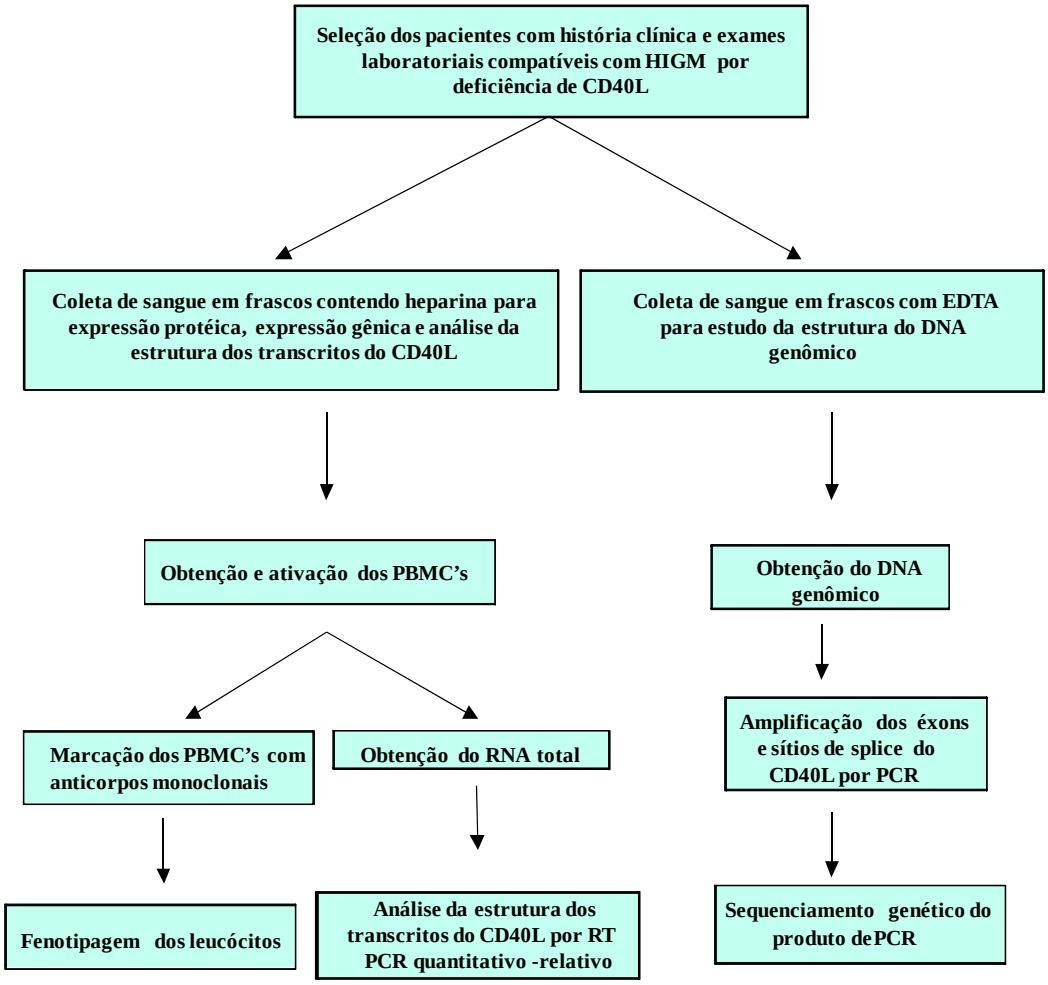


Figura 09. Fluxograma . Inicialmente foram selecionados os pacientes com sinais de deficiência de CD40L. Posteriormente coletou-se o sangue dos pacientes e dos controles para a fenotipagem dos leucócitos por citometria de fluxo e microscopia confocal, análise das anomalias na estrutura do DNA, e avaliação da expressão gênica e estrutura dos transcritos.

3.2. *Critérios de inclusão*

Participaram deste estudo 24 indivíduos pertencentes a cinco famílias distintas, sendo 6 pacientes (2 caucasóides e 4 mestiços) e 18 parentes relacionados. As famílias foram encaminhadas por médicos do Grupo Brasileiro de Imunodeficiências (www.bragid.org.br), com histórico de infecções de repetição e níveis normais ou elevados do isotipo IgM, associados com baixos níveis e/ou deficiência de IgG, IgA e IgE.

Na admissão ao estudo, os pacientes com HIGM, responderam a um questionário padrão onde constavam os antecedentes pessoais, enfocando principalmente processos infecciosos, doenças auto-imunes, neoplasias e antecedentes familiares. O perfil clínico de cada paciente foi analisado detalhadamente. Os pacientes e seus familiares receberam uma explicação detalhada sobre o plano de pesquisa do projeto e o termo de consentimento informativo foi assinado pelos pais dos pacientes.

Os critérios de inclusão para este estudo foram aqueles descritos pelo Comitê de Classificação das Imunodeficiências Primárias da União Internacional de Imunologia (Geha et al., 2007) sugestivos de deficiência de CD40L. Os critérios são:

1. Valores normais de linfócitos T na corrente sanguínea;
2. Valores normais ou elevados de IgM sérica associada a diminuição dos demais isotipos;
3. Características associadas: neutropenia, trombocitopenia, anemia hemolítica, doença hepática ou do trato biliar e infecções por patógenos intracelulares oportunistas;
4. Herança genética ligada ao cromossomo X.

Em nosso estudo, os pacientes cujo histórico clínico correspondeu aos critérios sugestivos de deficiência de CD40L sugerido por Geha e colaboradores (2007), estão descritos na **Tabela 02**.

Tabela 02. Lista de pacientes cujo histórico clínico correspondeu aos critérios sugestivos de deficiência de CD40L

Pacientes	Contagem de Linfócitos T	IgM (níveis séricos)	Características Associadas	Herança ligada ao X
TB	Normal	Elevado	*Pneumocystis jiroveci*	+
FS	Normal	Elevado	Neutropenia	+
KC	Normal	Normal	Neutropenia	+
CH	Normal	Normal	*Pneumocystis jiroveci*	+
VIC	Normal	Normal	*Pneumonia* (AE ?)	+
FE	Normal	Elevado	*Pneumonia* (AE ?)	+

+, presente; *AE ?* Agente etiológico desconhecido.

3.3. *Deficiência de CD40L: Idade de início dos primeiros sintomas, idade do diagnóstico, idade atual dos pacientes*

A faixa etária do grupo de pacientes no início do projeto variou de 2 anos a 20 anos, com idade média de 9 anos e 6 meses. A idade de manifestação dos primeiros sintomas da deficiência de CD40L nestes pacientes variou de 3 meses a 7 meses, com média de 5 meses. Já o estabelecimento do diagnóstico de HIGM variou de 5 meses a 8 anos, com média de 2 anos e 6 meses **(Tabela 03)**.

Tabela 03. Idade atual, idade do diagnóstico e idade de início dos primeiros sintomas dos pacientes deficientes de CD40L.

n=6	Média	Mínimo	Máximo
Início do projeto	9 anos e 6 meses	2 anos	20 anos
n **Início dos 1º sintomas**	5 meses	3 meses	*7 meses*
Diagnóstico	2 anos e 6 meses	5 meses	8 anos

n, número de pacientes.

3.4 *Perfil clínico dos pacientes deficientes de CD40L*

3.4.1 Paciente TB

Médica Responsável: Profa. Dra. Beatriz Costa Carvalho; Estado: SP. Nascido em 1993, filho de pais não consangüíneos. Aos 6 meses necessitou internação por apresentar pneumonia causada por *Pneumocystis jiroveci.* Posteriormente apresentou quadros recorrentes de otite, pneumonia, sinusite e estomatite. A partir dos 8 anos apresentou quadros recorrentes de urticária e hipertrofia das amígdalas. Aos 11 anos apresentou episódios de hipertermia prolongados (até 15 dias), adenomegalia submandibular e cervical, hepatomegalia e esplenomegalia. Feito neste período a biópsia do linfonodo mediastinal a qual revelou presença do fungo *Paracoccidiodes braziliensis.*

3.4.2 Paciente FS

Médico Responsável: Prof. Dr.Nelson Rosario Filho; Estado: PR. Nascido em 1997, filho de pais não consangüíneos, desde os primeiros meses de vida até o início deste projeto desenvolveu 4 otites, duas pneumonias, 6 amigdalites e quadros de infecção urinária recorrentes. Seus exames laboratoriais detectaram neutropenia.

3.4.3 Paciente KC

Médica Responsável: Dra. Cristina Weber Worm; Estado: RS. Nascido em 2003, filho de pais não consangüíneos. Desde os primeiros meses de vida apresentou vômitos freqüentes, quadros febris de repetição, faringites e laringites, duas pneumonias, sendo a primeira aos 6 meses e a segunda com um ano e 4 meses. A partir de um ano e 8 meses desenvolveu otite média aguda e infecções de vias aéreas de repetição com resposta inadequada à antibioticoterapia instituída. Um ano depois, manifestou várias ulcerações orais de repetição, sendo constatada neutropenia. Aos 3 anos apresentou quadros de linfonodomegalia, hepatoesplenomegalia, ulcerações na faringe e diarréia com fezes sanguinolentas.

3.4.4 Paciente CH

Médica Responsável: Dra. Cristina Weber Worm; Estado: RS. Nascido em 2006, filho de pais não consangüíneos. Foi avaliado aos 7 meses de idade com quadro de infecção respiratória com evolução para insuficiência respiratória aguda, hipoxemia grave e sepse. No ano de 2007 o paciente desenvolveu pneumonia por *Pneumocystis jiroveci,* febre recorrente, sendo identificadas hifas no exame micológico de urina necessitando antifúngico sistêmico.

3.4.5. Paciente FE

Médica Responsável: Dra. Cristina Weber Worm; Estado: RS. Nascido em 1997, filho de pais não consangüíneos, aos 5 meses de idade necessitou internação por um episódio de pneumonia associado à insuficiência respiratória. A partir deste período até o início do projeto desenvolveu 11 pneumonias, 11 otites e sinusite crônica.

3.4.6. Paciente VIC

Médica Responsável: Dra. Cristina Weber Worm; Estado: RS. Nascido em 2005, filho de pais não consangüíneos, primo do paciente FE, desenvolveu no terceiro mês de vida bronquiolite e pneumonia, sendo hospitalizado por 2 meses. Desde o quinto mês de vida até o início do projeto desenvolveu crises convulsivas recorrentes. Aos 9 meses desenvolveu otite média aguda. Com três anos de idade apresentou mais um episódio de otite média aguda e pneumonias de repetição.

3.5 *Heredogramas das famílias estudadas*

Com exceção do paciente FS, o heredograma familiar dos demais pacientes**,** sugeriu a existência de imunodeficiência primária ligada ao cromossomo X **(Figura 10)**.

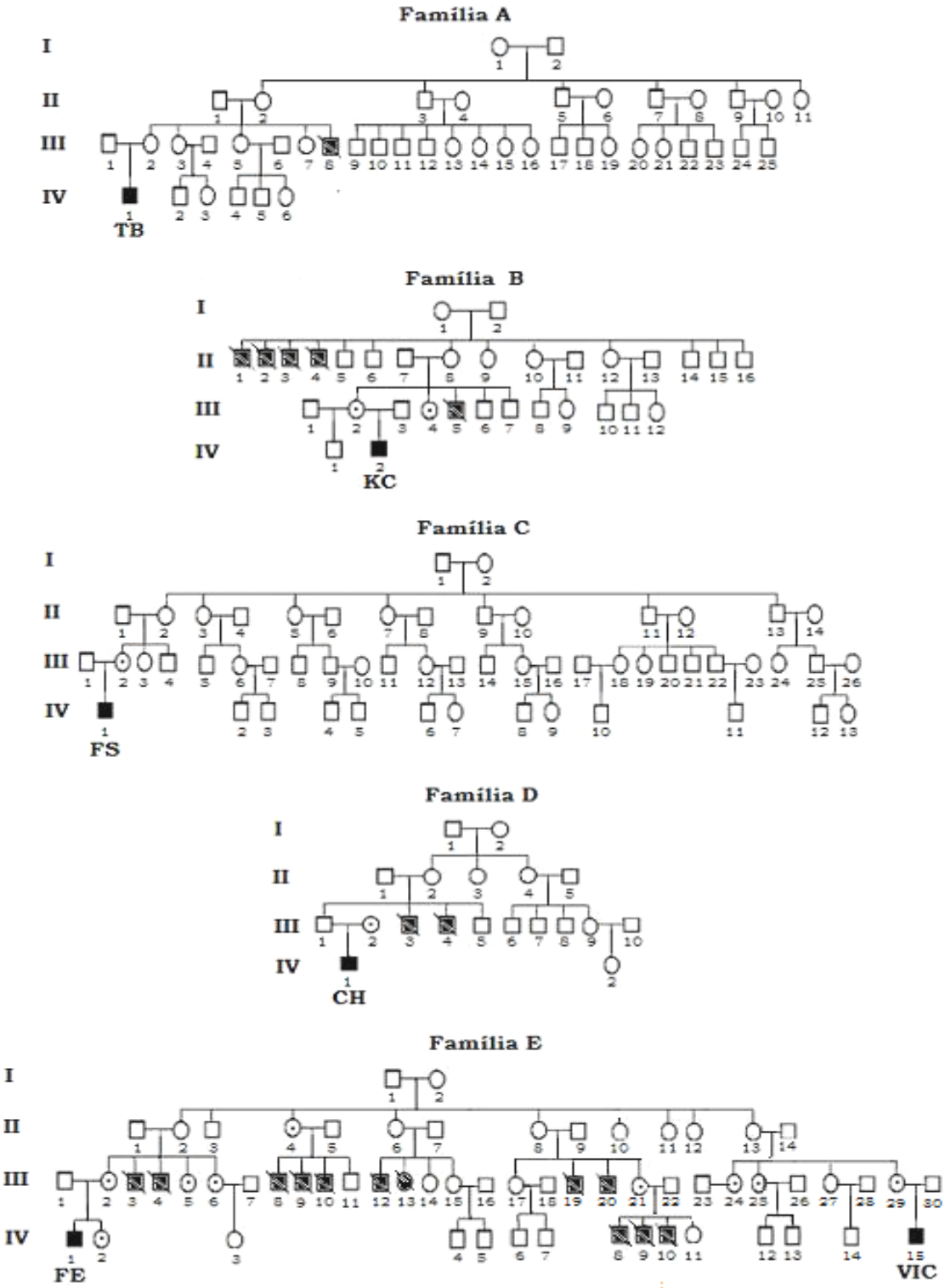


Figura 10. Heredogramas dos pacientes deficientes de CD40L. Com exceção do paciente FS, os heredogramas dos demais pacientes apresentaram indícios de imunodeficiência primária ligada ao cromossomo X.

3.6 *Níveis séricos de Imunoglobulinas*

Os níveis séricos de imunoglobulinas dos pacientes deficientes de CD40L estão representados no gráfico abaixo. Pode-se observar que os pacientes FS, TB e FE apresentaram níveis de IgM iguais ou superiores ao percentil 97, ao passo que os pacientes CH, KC e VIC apresentaram níveis próximos ao percentil 3 (**Figura 11A**). Todos os pacientes apresentaram níveis séricos de IgG inferiores ao percentil 3 (**Figura 11B**) e com exceção do paciente VIC que apresentou nível sérico de IgA igual ao percentil 50, todos os demais apresentaram níveis de IgA inferiores ao percentil 3.

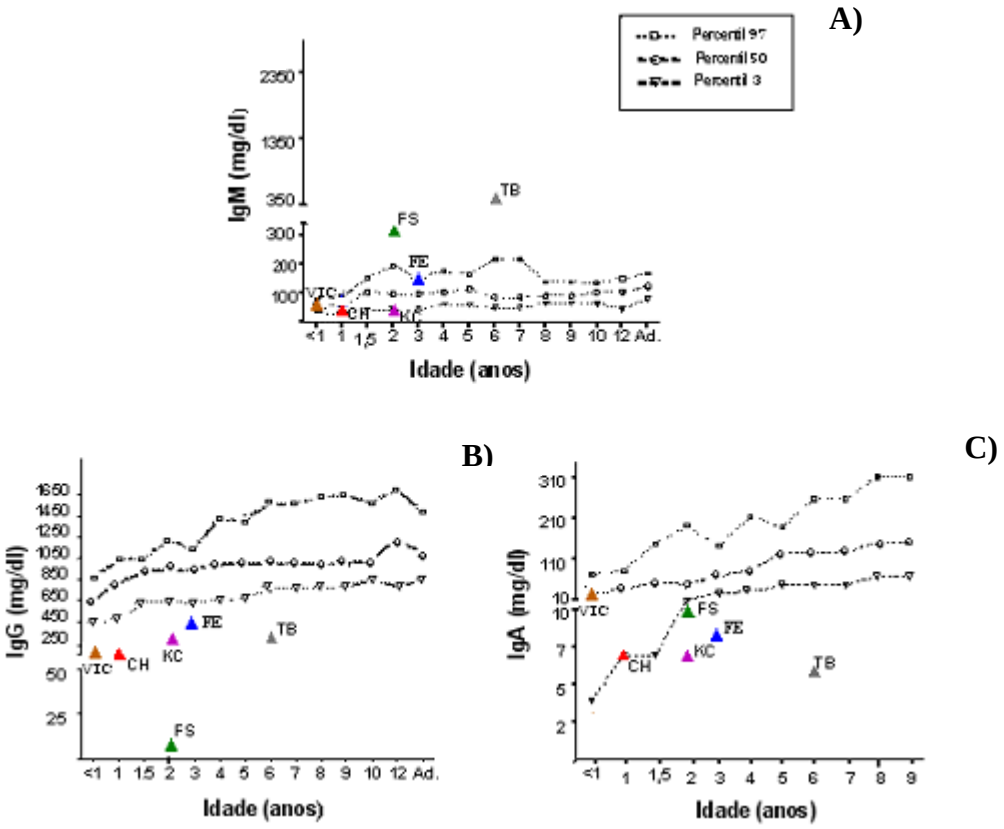


Figura 11. Valores absolutos de imunoglobulinas dos pacientes deficientes de CD40L. Os níveis séricos de imunoglobulinas dos 6 pacientes foram comparados aos valores de referência normais para a população brasileira, demonstrados nos percentis 3, 50 e 97, adaptado de (Fujimura, 1991)

3.7 *Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)*

A coleta de sangue dos pacientes sempre ocorreu em condições clínicas estáveis. O sangue periférico dos pacientes deficientes de CD40L e dos voluntários sadios foi coletado em frascos de polipropileno estéreis contendo heparina. O EDTA não pode ser utilizado como anticoagulante para coletas em que as PBMCs seriam ativadas com a ionomicina, pois este inibe sua ação ativadora, resultando em baixos níveis de expressão de CD40L (O'Gorman et al., 1997).

A seguir, o sangue coletado foi diluído volume/volume em solução salina tamponada (PBS) (NaCl 0,14 M; Na2PO4 0,01 M; pH 7,2) estéril. A seguir, 20 ml do sangue já diluído foram adicionados vagarosamente em tubo de polipropileno estéril contendo 10 ml de Ficoll-Hypaque. Esta mistura foi centrifugada a 400 x g, por 20 minutos, a 20 ^{o}C, e a interface contendo a camada de PBMC foi coletada e transferida para novos frascos de 50 ml de polipropileno estéreis. Os frascos foram completados com PBS até atingirem 50 ml para lavagem da suspensão celular e as amostras foram centrifugadas a 400 x g, por 10 minutos, a 20 ^{o}C. Este procedimento foi repetido mais uma vez e as células mononucleares foram quantificadas numa câmera de Neubauer, sendo a viabilidade celular verificada pela utilização de Trypan blue . O mesmo procedimento foi seguido para coleta de sangue dos familiares.

3.8 *Transformação dos linfócitos B*

Linfócitos B dos pacientes e familiares foram transformados/imortalizados com vírus Epstein Barr (EBV) (Condino-Neto e Newburger, 1998) para servirem como fonte de células que serão utilizadas em estudos futuros e como fonte de ácidos nucléicos, evitando-se repetidas coletas de sangue dos pacientes. O protocolo de transformação consistiu primeiramente na preparação do Vírus Epstein

Barr (EBV) a partir do sobrenadante da cultura de células B95-8 (cultivadas durante 7 dias, a 37 °C, à 5% de CO_2, com viabilidade de 80%, numa concentração celular média de 5 x 10^5 cel/ml). Após a preparação do sobrenadante rico em EBV, as PBMCs dos pacientes foram separadas por centrifugação, do sangue total em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque. Em seguida, visando-se a infecção das células B com o EBV, 10^7 PBMC foram ressuspendidas em 2,0 ml de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 20% de soro bovino fetal e receberam 200 µl de sobrenadante rico em EBV e em seguida, incubadas a 37 °C em 5% de CO_2 por três semanas. A cada dois ou três dias as células eram nutridas com meio RPMI, até obtermos um bom crescimento celular. A seguir alíquotas de 10 x 10^6 de linfócitos B imortalizados foram criopreservados em nitrogênio líquido.

3.9 *Extração do DNAg*

Para detectarmos os defeitos genéticos de cada paciente, amostras de DNA genômico (DNAg) foram extraídas das PBMCs. O DNAg de cada paciente foi extraído utilizando o kit WizardTM Genomic DNA Purification. Em microtubos de 1,5 ml contendo 300 µl de sangue, foram adicionados 900 µl de solução de lise celular misturando-se o conteúdo do tubo por inversão e a seguir as amostras foram incubadas em temperatura ambiente durante 10 minutos. Subseqüentemente, as amostras foram centrifugadas a 15000 x g durante 30 segundos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300µl de solução de lise nucléica e 100 µl de solução para precipitação protéica. O conteúdo do tubo foi homogeneizado durante 20 segundos no vórtex. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15000 x g durante 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 ml. O DNAg foi precipitado em 300 µl de isopropanol absoluto e a amostra centrifugada a 15000 x g durante 1 minuto. Após descartar o

sobrenadante, o DNAg foi lavado com 300µl de etanol 70% centrifugando as amostras a 15000 x g por 5 minutos. A seguir o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo o DNAg foram mantidos em temperatura ambiente durante 10 minutos para a evaporação do etanol residual. Após este período, o DNA foi reidratado em 30 a 150 µl de solução de reidratação e incubado em banho maria durante uma hora a 65 ºC. Após esta etapa, o DNA foi armazenado a -20 ºC até a sua utilização.

A quantidade e qualidade do DNAg foram aferidas no espectofotômetro DU 70 no comprimento de onda de 280 nm e 260 nm (Beckman, Fullerton, CA). Após a leitura no espectrofotômetro a integridade do DNAg foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA corados com brometo de etídio, sendo comparada com um padrão de massa molecular conhecido.

3.10 *Amplificações dos 5 exons do CD40LG e regiões de Splice*

Após a extração do DNA genômico, os 5 éxons que codificam a molécula CD40L e as regiões de "splice", foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Numa reação de 25 µl foram adicionados: 100-200 ng de DNA, 2,5 µl de cada par de oligonucleotídeos apropriados a 0,5 mM, 0,2 µl de dNTP à 25 mM, 2,5 µl de tampão à 10 mM (Tris cloreto-buffer) (pH 8.3), 1,25 µl de $MgCl_2$ à 50 mM e 0,3 µl de Taq polimerase [5 U] (Invitrogen) e a solução foi completada para o volume total de 25 µl com água MilliQ ultrapura – q.s.p. Os oligonucleotídeos para amplificação das regiões de interesse do *CD40LG* estão especificados na **Tabela 04**.

Tabela 04. Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR e no seqüenciamento do *CD40LG*.

Exon	Primer	Seqüência (5'- 3')	T.A.	Produto(pb)
1	Foward Reverse	ccagaagataccatttc aaggcttgtggttcatct	52 ºC	208
2	Foward Reverse	agctgtattctccttccgaatgac cagtttcccgatctagca	52 ºC	255
3	Foward Reverse	agcccctgtcaaaatgac cctgatgcaacaacactg	52 ºC	207
4	Foward Reverse	atgagaccgatggaaacagc cagattgcattccacctcct	60 ºC	481
5	Foward Reverse	caagtctctgaaatatgctccaa ccataaggaggatcctagggtta	60 ºC	427

"Foward", amplificação no sentido 5'-3'; "*Reverse*", amplificação no sentido 3'-5'; *pb*, pares de bases; *T.A,* temperatura de anelamento

As condições da reação foram de 2 minutos a 95 °C, então 35 ciclos de 45 segundos a 95 °C para desnaturação do DNAg, 30 segundos para anelamento dos "primers" e 45 segundos a 72 °C para extensão dos segmentos de interesse e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. A reação de PCR foi realizada no termociclador M*astercycler gradient* (Eppendorf). Os "primers" para amplificação dos exons foram construídos com auxílio do programa OligoPerfect™ Designer (http://www.invitrogen.com).

Os produtos amplificados foram analisados após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA corados com brometo de etídio e os produtos gerados foram comparados com um padrão de massa molecular conhecido.

3.11 *Seqüenciamento do gene CD40L (CD40LG)*

Após as amplificações dos exons e sítios de "splice", investigamos as mutações subjacentes pela análise do DNA genômico através da técnica de seqüenciamento genético para identificarmos as alterações responsáveis pelo fenótipo da deficiência de CD40L nos pacientes. Após identificação da mutação no paciente, também verificamos o *status* de portadora das mães e demais familiares do sexo feminino, que conseguimos entrar em contato, permitindo assim um aconselhamento genético das famílias estudadas.

No Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, os produtos de PCR foram purificados com o Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) conforme as instruções do fabricante e as reações de seqüenciamento realizadas com o kit DYEnamic ET Dye Terminator utilizando o MegaBACE 1000**,** um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia GE Healthcare. As reações de seqüenciamento foram realizadas com 4 µL de DYEnamic ET Terminator reagent premix, 0,6 µL concentrado a 5µM dos mesmos "primers" utilizados na reação de PCR, 40 ng do produto de PCR além de 10 µL de água MilliQ ultrapura – q.s.p. As condições da reação de seqüenciamento foram de 95 °C durante 20 segundos, seguidos de 15 segundos à temperatura especifica de cada "primer" **(Tabela 03)** à 60°C durante 1 minuto. Estas etapas foram repetidas em 30 ciclos.

No nosso laboratório, as seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados de registros de mutações para a síndrome de Hiper-IgM ligada ao X (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneseqview?db=core;gene=ENSG00000102245) e a descrição das mudanças de seqüências seguiram a nomenclatura do banco de dados de registros de mutações para a síndrome de Hiper-IgM ligada ao X, que estão de acordo com a

normatização estabelecida pela "Human Genome Variation Society" (http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/; http://www.hgvs.org/rec.html)

3.12 *Ativação dos Linfócitos T*

Visando a avaliação da expressão protéica do CD40L e da expressão gênica do CD40L, alíquotas de PBMC contendo 1,0 x 10^6 células/100 µl de meio RPMI 1640, foram ativadas com Forbol Miristato Acetato (PMA, 15 ng/ml) e ionóforo de cálcio (Ionomicina, 300 ng/ml) durante 5 horas em placas de cultura de 96 poços com fundo redondo.

Para a avaliação da expressão protéica e gênica do CD40L, o sangue dos pacientes e controles foi coletado em tubos contendo heparina. O EDTA não pode ser utilizado, pois interfere com a função ativadora da Ionomicina, resultando em baixos níveis de expressão do CD40L (O'Gorman *et al.*, 1997).

3.13 *Extração do RNA total*

O RNA total das células foi preparado utilizando-se o kit TRIzol Reagent (Life Thechnologies). Esta técnica baseia-se num procedimento que mantém a integridade do RNA, enquanto ocorre a lise celular que, combinada com a adição de clorofórmio, permite a separação do RNA na fase aquosa. O RNA é recuperado após precipitação com álcool isopropílico (Chomczynski e Sacchi, 1987).

Após ativação das PBMC, conforme descrito no item 3.12, uma suspensão de 10-15 x 10^6 células foi disposta em tubos eppendorf livres de RNAse. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 30°C, para obtenção das células. A solução de TRIzol, no volume de 1ml, foi adicionada ao "pellet" e homogeneizado para provocar a lise das células e foi incubada por 5 minutos na temperatura de 30 °C e recebeu 0,2 ml de

clorofórmio para cada ml de TRIzol. Após nova homogeneização vigorosa por 15 segundos e incubação por 3 minutos a 30 °C, a amostra foi centrifugada durante 15 minutos a 12000 x g a 4 °C. No término da centrifugação formaram-se 3 fases na solução. A fase aquosa (superior) foi cuidadosamente retirada e transferida para um novo tubo eppendorf livre de RNAse e foi adicionado 0,5 ml de álcool isopropílico para cada 1ml de TRIzol adicionado no início do experimento. Em seguida, a solução foi incubada por 10 minutos na temperatura de 30 ºC e, após centrifugação por 10 minutos em 12000 g na temperatura de 4 °C, o RNA ficou precipitado no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e ao "pellet" de RNA foi adicionado 1 ml de etanol 75%, sendo a solução novamente centrifugada durante 5 minutos a 7500 x g. Após a retirada cuidadosa do etanol por aspiração, os tubos contendo o RNA total foram armazenados durante 5 a 10 minutos em temperatura ambiente, dentro do fluxo laminar, para a evaporação do etanol residual. O RNA foi ressuspendido em 15-50 µl de água MilliQ ultrapura, tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 1:10.000.

A quantidade e qualidade do RNA extraído foram aferidas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 280 nm e 260 nm, utilizando-se o espectrofotômetro DU 70 (Beckman, Fullerton, CA). Após a leitura no espectrofotômetro a integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA corado com brometo de etídio, comparando-se o padrão de corrida eletroforética do RNA extraído com um padrão de massa molecular conhecido. As amostras de RNA foram armazenadas a –80 °C para posterior utilização.

3.14 *Reação de transcrição reversa*

O RNA total extraído das células foi submetido à transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit Superscript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Dois microgramas da amostra de RNA total foram adicionados a um microtubo eppendorf livre de RNAse com capacidade de 0,2 ml numa solução contendo 50µM de oligo (dT) "primer" e a solução foi completada para um total de 12µl com água DEPC 1:10.000. O oligo (dT) hibridiza na cauda 3' poli (A) presente no RNA mensageiro maduro em que o processo de "Splice" já foi realizado. Assim utilizamos para as análises apenas RNAm já processados.

A seguir, este primeiro microtubo foi incubado durante 5 minutos a 65 °C. Após a incubação com as amostras no termociclador a 4 °C, acrescentou-se a cada microtubo contendo o RNA total, oligo (dT) e água DEPC, uma solução total de 8 µl contendo 2 µl de dNTP (2,5 mM de dATP, dCTP, dTTP, dGTP cada), 4 µl de tampão RT (Tris-HCl 10mM (pH 8,3), KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1mM) e 1 µl (5U) da enzima transcriptase reversa. A seguir, no termociclador, as amostras foram incubadas durante 60 minutos numa temperatura de 42 °C. Após o término, as amostras foram aquecidas por 10 minutos a 92 °C para inativar a enzima transcriptase reversa e o cDNA produzido foi congelado a –20 °C para uso posterior.

3.15 *Análise estrutural do RNAm que codifica a molécula CD40L*

Utilizamos a técnica da transcrição reversa acoplada com a reação de polimerase em cadeia, comumente chamada de RT-PCR (do inglês, "Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction") para análise das estruturas dos transcritos de CD40L produzidos pelos pacientes.

A reação de RT-PCR combina a síntese do cDNA, à partir de amostras de RNA, seguido do PCR sendo um método rápido e sensível para análise estrutural dos transcritos produzidos.

Pelo fato de termos detectado diferentes mutações nos pacientes deficientes de CD40L, analisamos a estrutura das diferentes regiões dos transcritos de CD40L produzidos **(Figura 12)**. O par de "primers" (P.1-3) foi construído para amplificar desde o início do exon 1 ao final do éxon 3, o segundo par (P.2-5) para amplificar desde a metade do exon 2 ao início do exon 5, já o terceiro par de primers foi construído para amplificar desde o final do éxon 4 ao final do exon 5. Combinamos o "primer" P.1-3 "forward" que anela no início do exon com o "primer" 4-Fim "reverse" para amplificarmos os cinco exons do CD40L para análise do transcrito total e posteriormente seqüenciá-lo. Denominamos essa combinação de "primer" "forward" e "reverse" de P.1-Fim.

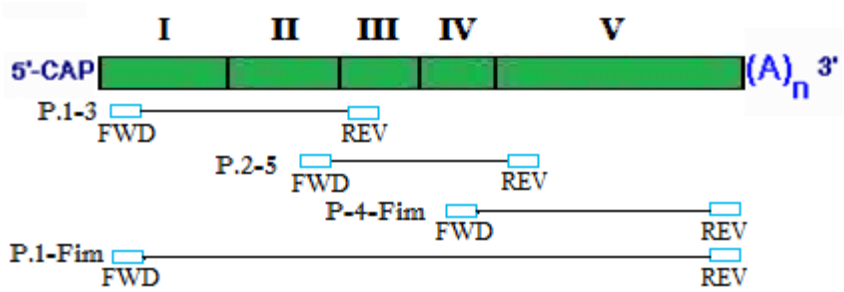


Figura 12. Regiões do RNAm do CD40L que foram analisadas. Representação esquemática dos fragmentos do RNAm analisadas por RT-PCR quantitativo-relativo e por PCR em tempo Real. I, exon 1; II, exon 2; III, exon 3; IV exon 4; V, exon 5; FWD, "Forward"; REV, "Reverse"; P.1-3, "primer" 1 ao 3; "primer" 2 ao 5; "primer" 4 ao fim;

A reação de RT-PCR foi realizada utilizando um volume final de 25 µl, com 2 µl de DNA, e 2,5 µl de cada par de oligonucleotídeos apropriados à [0,5 mM]**(Tabela 5)**, 0,2 µl à [25 mM] de dNTP, 10 mM Tris cloreto (buffer) (pH8.3), 1,25 µl de 50mM $MgCl_2$ e 0,3 µl de Taq

polimerase [5 U] (Invitrogen) no termociclador M*astercycler gradient* (Eppendorf).

Para controle da integridade do cDNA produzido utilizamos um par de "primer" para análise dos transcritos da β-actina que é um controle interno de expressão gênica não variável.

Os produtos amplificados foram analisados após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA corados com brometo de etídio.

Tabela 05. Relação dos pares de primers utilizados na reação de RT-PCR quantitativo-relativo

Regiões	Primer	Seqüência (5'- 3')	T.A.	Produto (pb)
Exons 1 ao 3	Foward Reverse	accaaacttctccccgatct gctgttttctttcttcgtctcc	60 °C	314
Exons 2 ao início do 5	Foward Reverse	tgcaacacaggagaaagatcc ccattttccagggttaccaag	60 °C	260
Exons 4 ao final do RNAm	Foward Reverse	tgaggccagcagtaaaacaac ctcacttggcttggatcagtc	60 °C	360
Exons 1 ao final do RNAm	Foward Reverse	accaaacttctccccgatct ctcacttggcttggatcagtc	60 °C	726
β-actina	Foward Reverse	gtgggcatgggtcagaag ggccatctcttgctcgaa	56 °C	552

T.A, temperatura de anelamento; *pb*, pares de base.

O seqüenciamento e posterior analise do cDNA foi realizado conforme descrito no item 3.11, porém os primers utilizados foram os do par P.1-Fim.

3.16 *Análise dos valores relativos de linfócitos $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD19^+CD40^+$, $CD3^+CD69^+$, $CD3^+CD40L^+$ e $CD4^+CD40L^+$.*

Os valores relativos das populações de linfócitos $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD19^+CD40^+$, foram analisados *ex vivo* sem necessidade de prévia ativação, ao passo que a análise dos linfócitos $CD3^+CD69^+$, $CD3^+CD40L^+$ e $CD4^+CD40L^+$ foi feita após ativação celular conforme descrito no item 3.12 (O'Gorman *et al.*, 1997). As condições próprias de estimulação foram controladas incluindo na análise a expressão da molécula CD69, um marcador expresso na superfície de linfócitos T ativados.

Para a avaliação das populações de linfócitos $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD19^+CD40^+$ e dos linfócitos $CD3^+CD40L^+$ ou $CD4^+CD40L^+$ não ativados, 4 alíquotas de PBMC contendo 10^6 células/100 µl de meio RPMI foram transferidas para 4 tubos contendo os seguintes anticorpos monoclonais: Tubo 1, controle isotípico apropriado para servir como controle para discriminar a florescência positiva da negativa; Tubo 2, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8; tubo 3, anti-CD19 e anti-CD40; tubo 4, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD40L.

Para a avaliação dos linfócitos $CD3^+CD40L^+$ ou $CD4^+CD40L^+$, após a ativação celular, 4 alíquotas de PBMC contendo 10^6 células/100 µl de meio RPMI foram transferidas para 4 tubos contendo os seguintes anticorpos monoclonais: Tubo 1, controle isotípico apropriado para servir como controle para discriminar a florescência positiva da negativa; Tubo 2, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD69; tubo 3 e tubo 4, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD40L. Os fluorocromos conjugados aos anticorpos monoclonais estão descritos na **Tabela 06**.

Tabela 06. Anticorpos utilizados na fenotipagem dos linfócitos.

Anticorpos	**anti-CD3**	**anti-CD4**	**anti-CD8**	**anti-CD19**	**anti-CD40**	**anti-CD69**	**Anti-CD40L**
Fluoroc.	FITC, PE-Cy5	FITC, PE-y5	PE	PE	FITC	PE	PE

Fluoroc, fluorocromo; *PE*, ficoeritrina; *FITC*, isicianato de fluoresceína; *PE-Cy5* ficoeritrina-Cy5.

Em seguida os 8 tubos foram incubados durante 30 minutos à 4 ºC protegidos da luz para a ligação dos anticorpos aos receptores. A seguir, as suspensões celulares incubadas com os anticorpos, foram lavadas duas vezes adicionando 1 ml PBS nos tubos e centrifugando-os 800 x g (2800 RPM) por 5 minutos. A seguir as células foram ressuspendidas e fixadas em 0,3 ml de PBS + 1% de paraformoldeído para leitura no citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) onde foram analisadas 20.000 células, utilizando como parâmetros: FSC-H (do inglês, forward scatter) correspondendo ao tamanho celular e SSC-H (do inglês, side scatter) correspondendo a granulosidade celular. Após a construção de um "gate" selecionando os linfócitos, os parâmetros FL1 x FL2, FL1 x FL3 e FL2 x FL3 foram analisados neste "gate" de linfócitos.

3.17 *Análise da expressão do CD40L por Microscopia confocal*

Após a fenotipagem dos leucócitos analisada no citômetro de fluxo, 10^5 células contidas na suspensão celular dos tubos de FACS 3 e 4 descritos no item 2.16 (marcados com anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD40L) foram transferidas para 2 microtubos contendo 10 µl de gel mount (Vectashield), para a conservação da fluorescência dos anticorpos. A seguir, as lâminas foram montadas e no dia seguinte analisadas por microscopia confocal. As imagens fluorescentes foram

obtidas conforme descrito por Oliveira e Machado-Santelli (2001) através do microscópio confocal de varredura a laser (CLSM-confocal laser sanning microscope) com lasers de argônio (488 nm) hélio-neon 1 (543 nm) e hélio-neon 2 (633 nm) conectado com um microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axiovert 100 M). Utilizamos o software "3D Zeiss LSM 510" para a reconstrução das imagens das células em três dimensões (3D) nos permitindo uma visualização espacial do CD40L e do CD3.

3.18 *Análise estatística*

Para compararmos as diferenças nos níveis relativos de expressão dos marcadores celulares entre o grupo de pacientes deficientes de CD40L e o grupo de indivíduos controle, utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney. As diferenças entre ranks foram consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$. Para análise dos dados, utilizamos alfa de 0,05 ou 5% do nível de rejeição da hipótese de nulidade (Bhattacharyya e Johnson, 1977). O software utilizado para análise estatística foi GraphPrism 5.

4 RESULTADOS

4.1 *Seqüenciamento do gene CD40L (CD40LG)*

Os indivíduos deficientes de CD40L possuem mutações distribuídas em diferentes regiões do *CD40LG*. Foram documentadas mais de 100 diferentes tipos de mutações (http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/), resultando numa inabilidade das células T para expressarem níveis normais de moléculas do CD40L. Tais mutações são heterogêneas (Notarangelo et al., 1996).

4.1.1 *Paciente TB*

Os produtos de PCR dos exons 1, 2, 4 e 5 gerados a partir do DNAg do paciente TB foram seqüenciados como descrito nos materiais e métodos. Nenhuma alteração foi encontrada quando comparamos as seqüências do paciente TB com o banco de dados de registros de mutações para a síndrome de Hiper-IgM ligada ao cromossomo X (deficiência de CD40L). Contudo o exon 3 do paciente não pode ser seqüenciado devido ao padrão alterado apresentado na corrida eletroforética, demonstrando sinais de fragmentação do amplicom e de bandas adicionais. Este padrão alterado repetiu-se mesmo após novas coletas e extrações de DNAg do paciente TB **(Figura 13)**.

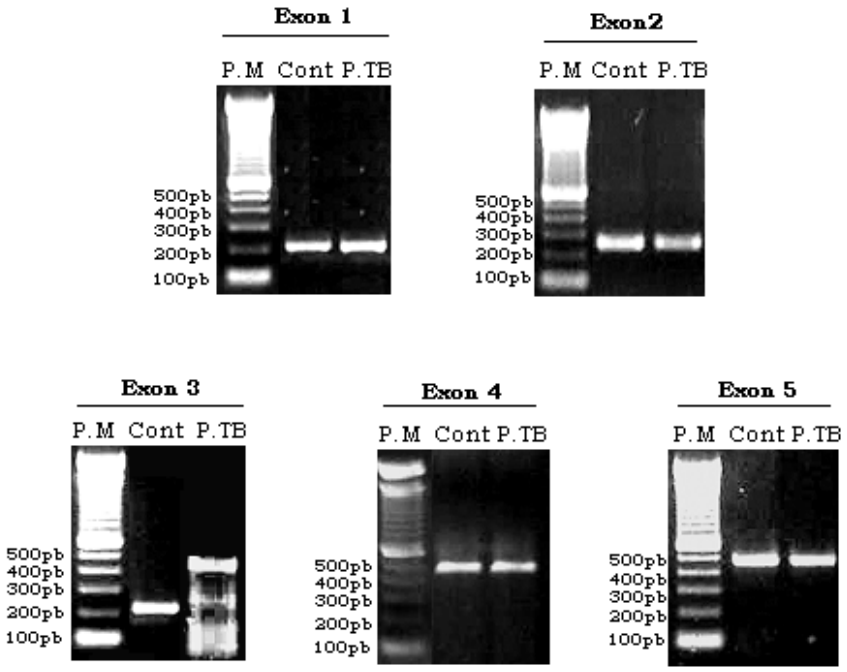


Figura 13. Alteração na corrida eletroforética do produto de PCR do exon 3 do gene CD40L gerado a partir de DNAg do paciente TB. Pode-se observar a fragmentação do produto de PCR do exon 3 e as bandas adicionais. Nenhuma alteração foi encontrada na reação de PCR e no seqüenciamento dos exons 1, 2, 4 e 5. *Cont,* controle; *P.TB*, paciente TB, *PM*, peso molecular.

4.1.2 *Paciente FS*

O paciente FS demonstrou uma nova substituição *missense* na base de número 11856 do DNA genômico gerada pela troca de uma guanina por uma citosina (g.11856 G>C) no exon 5 do *CD40LG* **(Figura 14)**. Esta mutação tem como conseqüência a substituição de um aminoácido triptofano, por uma cisteína na proteína CD40L. Na mãe do paciente foi detectada uma mutação g.11856:G>A em heterozigoze, ficando com o diagnóstico de portadora da mutação. Já a tia do paciente FS, representada na árvore genealógica da família como o individuo de número III.3, não é portadora da mutação **(Figuras 10 e 14)**

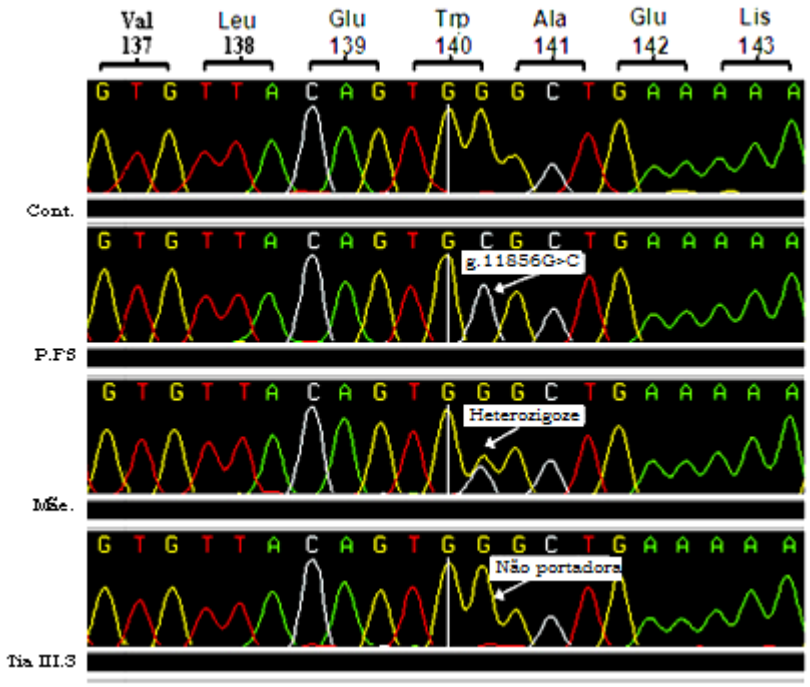


Figura 14. Análise do *CD40LG* do paciente FS**.** Detectamos uma substituição *missense* na base de número 11856 do DNA genômico (g.11856 G>C) no exon 5 do *CD40LG* (g.11856:G>A). Sua mãe foi detectada como portadora da mutação g.11856:G>A em heterozigoze e sua tia representada na árvore genealógica da família do paciente FS **(Figura 2)** como o individuo de número III.3 não é portadora da mutação. Na parte superior da figura estão representados a seqüência dos números dos códons e os respectivos aminoácidos por eles codificados. *Val*, Valina; *Leu,* Leucina; *Glu,* Ácido Glutâmico, *Trp*, Triptofano; *Ala,* Alanina; *Lis,* Lisina; *Cont,* controle; *Mãe*, mãe do paciente; *Tia*, tia do paciente FS.

4.1.3 *Paciente KC*

A análise do *CD40LG* revelou que o paciente KC possui uma mutação *nonsense* na base de número 11855 do DNA genômico gerada pela troca de uma guanina por uma adenina (g.11855:G>A) **(Figura 15)**. Esta mutação já foi previamente descrita na literatura (Korthäuer et al., 1993; Iseki et al., 1994; Macchi et al., 1995; Seyama et al., 1996 Nonoyama et al., 1997; Seyama et al., 1998). Esta mutação gera um código de parada prematuro no exon 5. A análise do DNAg da mãe e da tia do paciente, representadas na árvore genealógica da família do paciente KC **(Figura 10)**, respectivamente como indivíduos de número III.2 e III.4 foram detectadas como portadoras da mutação em heterozigoze **(Figura 15)**.

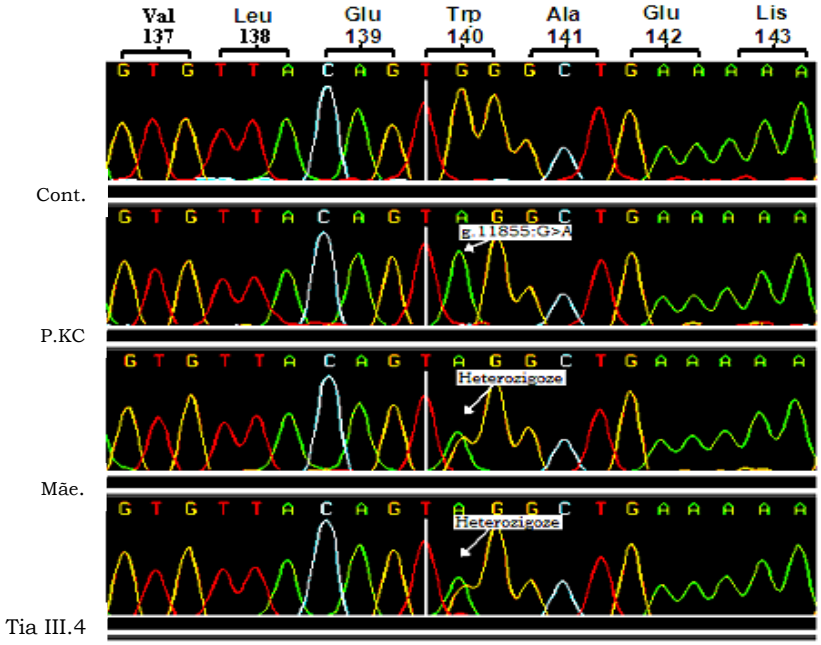


Figura 15. Análise do *CD40LG* do paciente KC. Detectamos a mutação *nonsense* g.11855 G>A no éxon 5 do *CD40LG* no DNAg do paciente KC. Sua mãe e sua tia representadas na árvore genealógica da família do paciente KC **(Figura 2)** como os indivíduos de número III.2 e III.4 respectivamente, foram detectadas como portadoras da mutação em heterozigoze. Na parte superior da figura estão representados a seqüência dos números dos códons e os respectivos aminoácidos por eles codificados. *Val*, Valina; *Leu,* Leucina; *Glu,* Ácido Glutâmico, *Trp*, Triptofano; *Ala,* Alanina; *Lis,* Lisina. *Tia*, tia do paciente FS; *Cont*, controle; P.KC, paciente KC, *Mãe*, mãe do paciente KC; *Tia*, tia do paciente KC;

4.1.4 *Paciente CH*

A análise do *CD40LG* demonstrou que o paciente CH possui uma deleção das bases 3074 à 3077 no DNAg. (g.3074_3077delTAGA) previamente descrita na literatura (Gilmour et al., 2003) afetando o sítio de "Splice" e a primeira base do exon 2 do *CD40LG* **(Figura 16)**. A mãe do paciente FS demonstrou ser portadora da mutação em heterozigoze. Os indivíduos III.9 e IV.2 não são portadores **(Figuras 10 e 16)**.

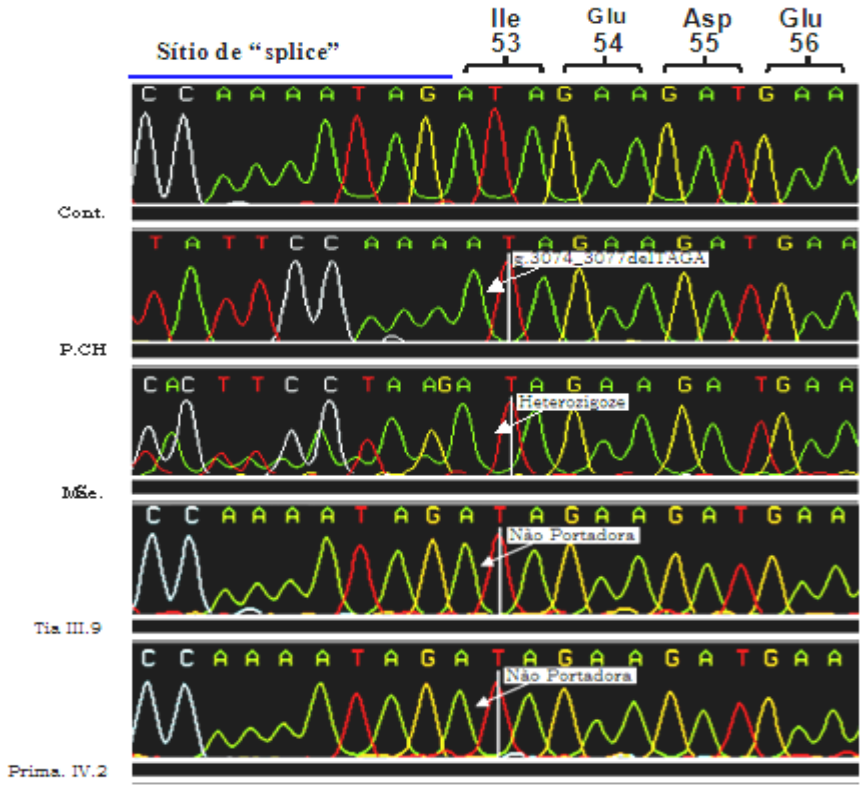


Figura 16. Análise do *CD40LG* do paciente CH. Detectamos a presença da deleção das bases 3074 à 3077 do DNAg (g. 3074_3077delTAGA) afetando o sítio de "*splice*" e a primeira base do exon 2 do CD40L. A mãe do paciente foi detectada como portadora da mutação em heterozigoze. A barra em azul na parte superior da figura destaca a seqüência do sítio de Splice seguido dos números dos códons e os respectivos aminoácidos por eles codificados. *Ile,* Isoleucina; *Glu,* ácido glutâmico; *Asp,* Ácido aspártico; *Cont,* controle; *Mãe*, mãe do paciente; *Tia*, do paciente. *Prima,* prima do paciente.

4.1.5 *Paciente FE*

A análise do *CD40LG* também demonstrou que paciente FE possui a deleção g. 3074_3077delTAGA **(Figura 17)**. A mãe do paciente FS e os indivíduos II.4,III.5, III.6, III.21 e IV.2 foram detectados como portadores da mutação em heterozigoze. Ao passo que os indivíduos III.14 e IV.3 não possuem o alelo mutado. **(Figuras 10 e 17)**.

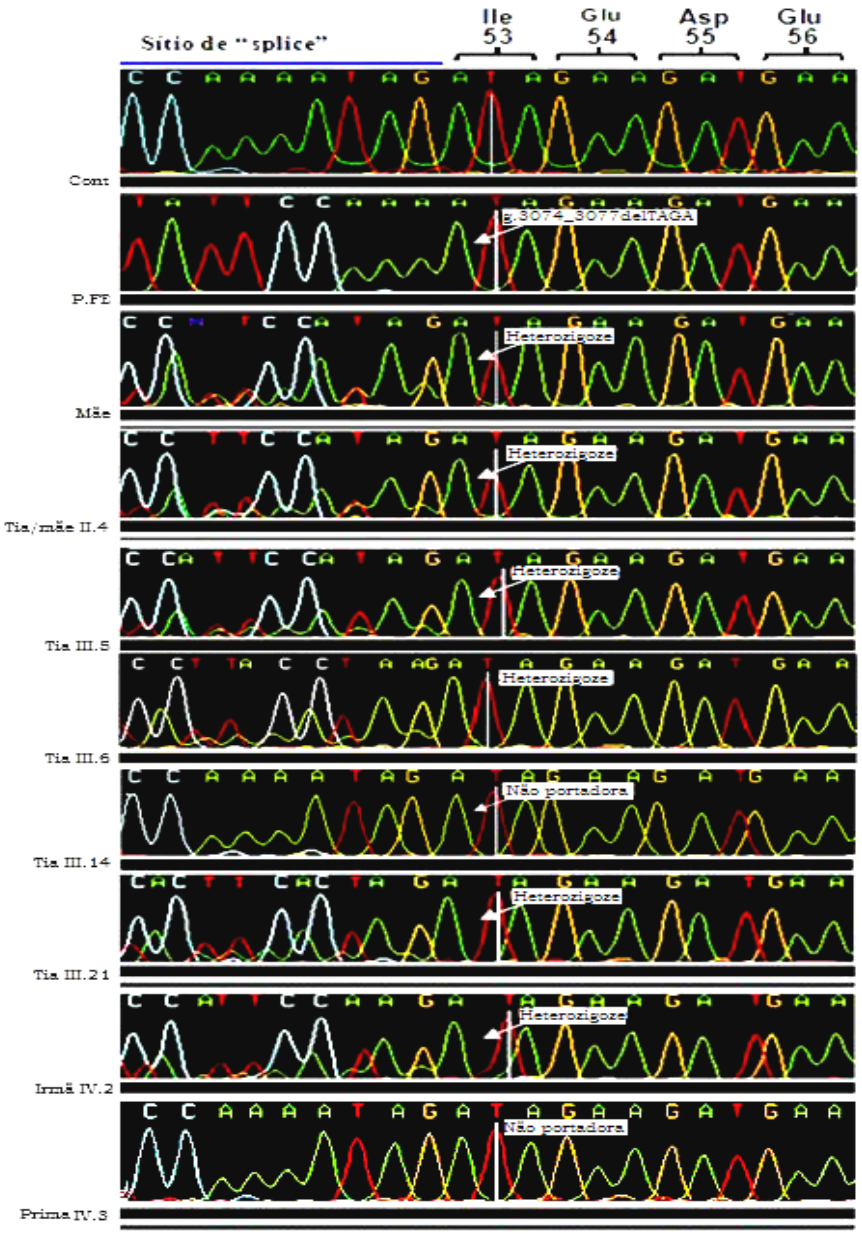


Figura 17. Análise do *CD40LG* do paciente FE. Presença da deleção g. 3074_3077delTAGA no DNAg do paciente FE do *CD40LG*. A mãe do paciente e os indivíduos II.4,III.5, III.6, III.21 e IV.2 **(Figura 2)** são heterozigotos ao passo que os indivíduos III.14 e IV.3 não portam a mutação. A barra em azul na parte superior da figura destaca a seqüência do sítio de *Splice* seguido dos números dos códons e os respectivos aminoácidos por eles codificados. *Ile,* Isoleucina; *Glu,* ácido glutâmico; *Asp,* Ácido aspártico; *Cont,* controle; *Mãe*, mãe do paciente; *Irmã*, do paciente; *Tia*, do paciente; *P/mãe*, prima da mãe do paciente; *T/mãe,* tia da mãe do paciente. *Mãe*, mãe do paciente; *Tia*, do paciente.

4.1.6 *Paciente VIC*

O paciente VIC é primo do paciente FE **(Figura 10)**. Ao analisarmos o *CD40LG* do paciente VIC também detectamos a presença da deleção das bases 3074 à 3077 no DNAg (g. 3074_3077delTAGA) afetando o sítio de "splice" e a primeira base do exon 2 do *CD40LG* **(Figura 18)**. A mãe do paciente e os indivíduos III.24 e III.25 foram detectadas como portadoras da mutação em heterozigoze. Esta condição foi excluída no indivíduo III.27 **(Figuras 10 e 18)**.

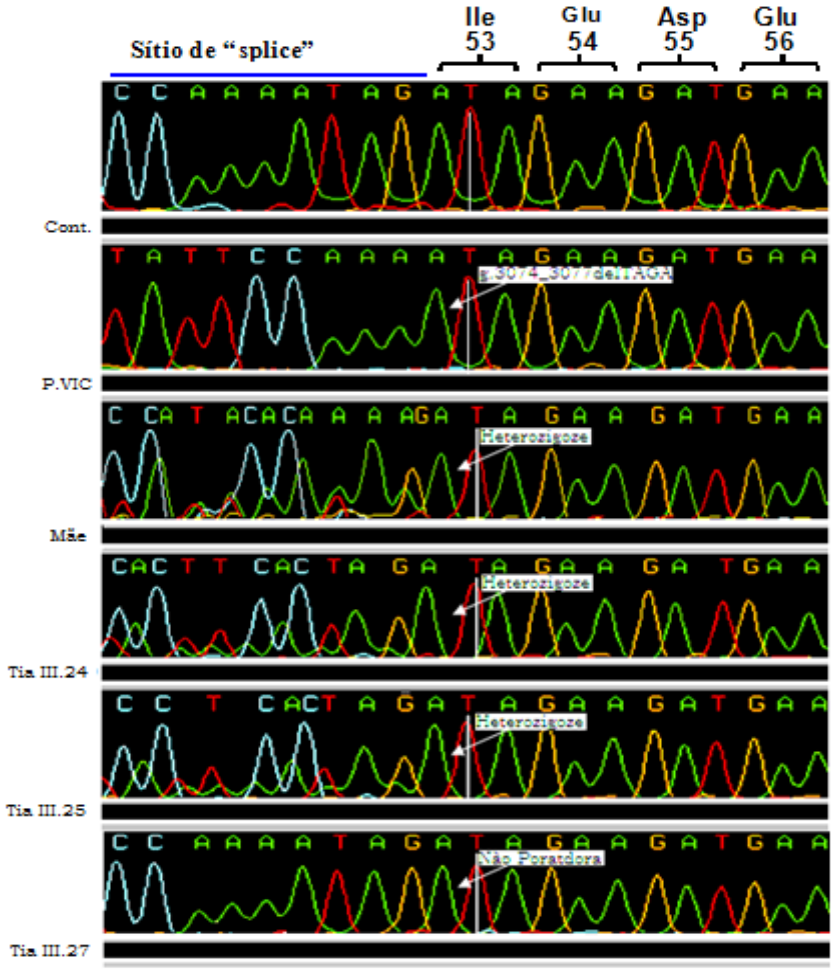


Figura 18. Análise do *CD40LG* do paciente VIC primo do paciente FE. Detectamos a presença da deleção das bases 3074 à 3077 do DNAg (g. 3074_3077delTAGA) afetando o sítio de "*splice*" e a primeira base do exon 2 do *CD40LG* no paciente VIC. A mãe do paciente e os indivíduos III.24 e III.25 foram detectadas como portadora da mutação em heterozigoze ao passo que a III.27 não. *Cont*, controle; *Mãe*, mãe do paciente; *Tia*, do paciente.

4.2 *Análise estrutural dos RNAm produzidos pelo CD40LG*

4.2.1 *RT-PCR*

Confirmando as alterações encontradas no DNAg dos pacientes, notamos a presença de transcritos alternativos do RNAm do paciente TB quando o cDNA foi amplificado com o par de "primers" P 1-3 **(Figura 19b)**. Também verificamos bandas de tamanho reduzido quando o cDNA foi amplificado com os pares de primers 2-5 e 1-fim, sugerindo uma grande deleção do éxon 3 ou a perda do exon 3 do *CD40LG* durante o processamento do pré-RNAm do CD40L.

Percebe-se que a deleção no sítio de "splice" g. 3074_3077 del TAGA encontrada no DNAg dos pacientes CH, FE e VIC gera 2 RNAm maduros **(Figura 19b)** como conseqüência de "splice" alternativo, demonstrado pelas 2 bandas geradas quando cDNA do CD40L foi amplificado com os pares de "primers" P.1-3 e P.1-5. Como esperado, nenhum fragmento adicional foi encontrado, quando utilizamos os pares de "primers" P.2-5 e P.4-fim que anelam após o sítio receptor do "splice" do intron 1 onde localiza-se a mutação g. 3074_3077 del TAGA nesses 3 pacientes. **(Figura 19b)**. Na segunda etapa deste projeto seqüenciaremos estes 2 produtos de "splice" alternativos para caracterização mais precisa do processamento do RNAm.

Com relação ao paciente KC portador da mutação g.11855 G>A e o paciente FS portador da mutação g.11856 G>C, nenhuma alteração foi detectada na corrida eletroforética após amplificação do cDNA com os quatro pares de "primers" utilizados **(Figura 19b)**.

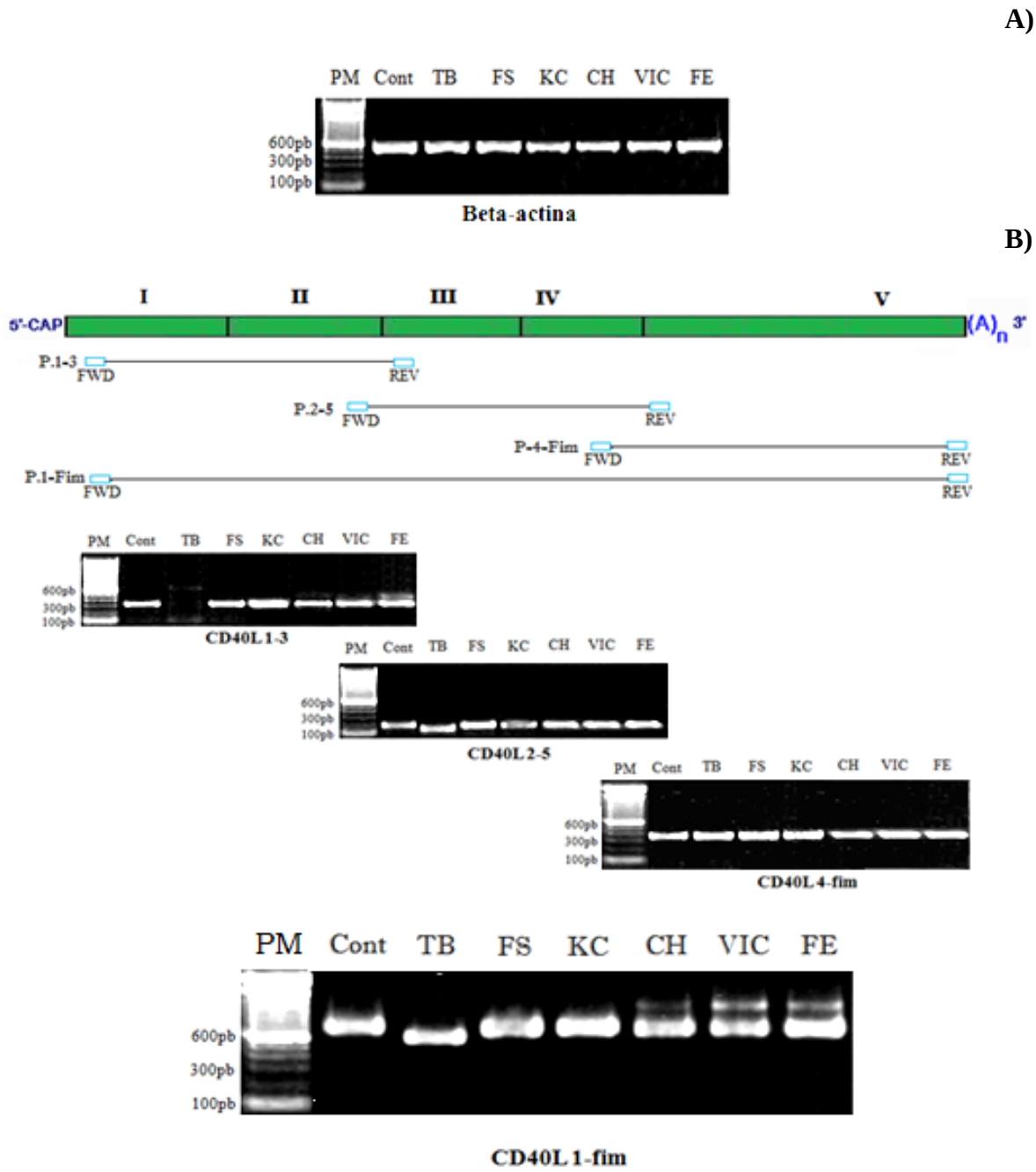


Figura 19. Análise estrutural dos transcritos do CD40L. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio após a reação de RT-PCR. **(A) T**ranscritos da β-actina utilizados como controles internos de expressão gênica. **(B)** No topo e em verde RNAm do CD40L já processado com seus 5 exons e os pares de primers utilizados na análise estrutural dos transcritos do CD40L. De cima para baixo, os três primeiros géis de agarose correspondem aos fragmentos do RNAm do CD40L gerados após amplificação com os pares de "primers" P.1-3, P.2-5, P4-fim respectivamente. O quarto gel de agarose, de cima para baixo, corresponde aos transcritos dos 5 exons do CD40L amplificados com o par de "primer" P.1-fim. *Cont,* controle; *PM,* Peso molecular.

4.2.2 *Seqüenciamento do cDNA dos pacientes deficientes de CD40L*

Os produtos da amplificação do cDNA dos pacientes deficientes de CD40L, gerados à partir da reação de RT-PCR com o par de primers P.1-fim, foram seqüenciados.

4.2.2.1 *Paciente TB*

O seqüenciamento do cDNA do paciente TB produzido, demonstrou a deleção do exon 3 no RNAm (r.345_402del). Notamos que subseqüentemente ao exon 2 está a seqüência do exon 4 **(Figura 20)**. Este fato pode ser devido a defeitos no processamento do pré-RNAm.

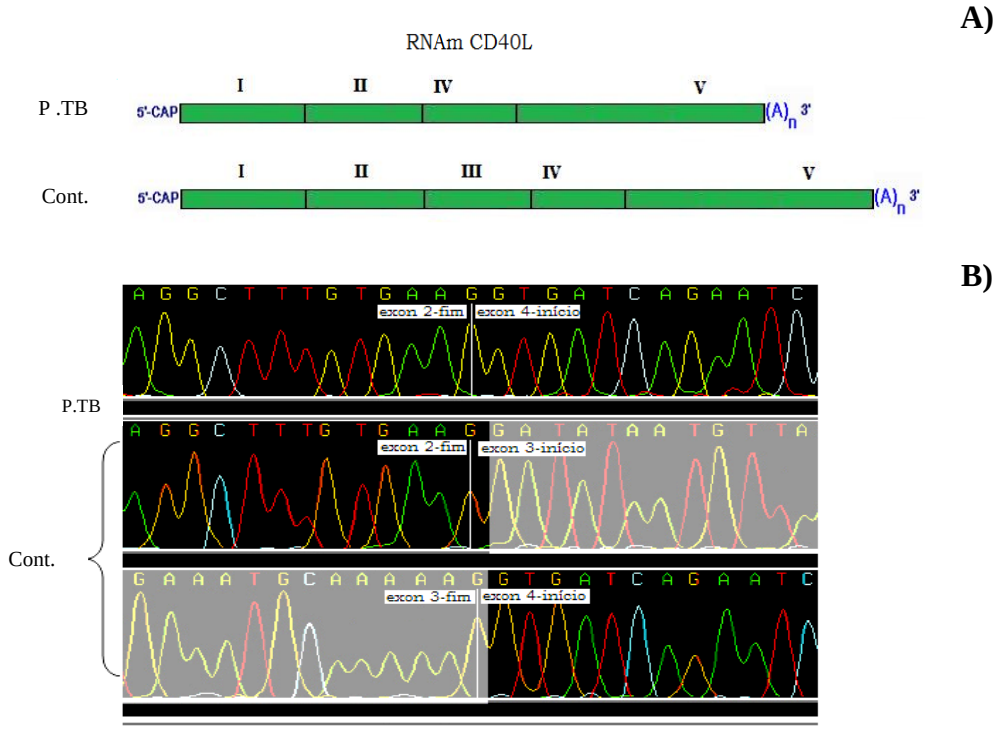


Figura 20. Deleção do exon 3 do RNAm (r.345_402del) no paciente TB. **(A)** Diagrama demonstrando a deleção do éxon 3 no RNAm do paciente TB. O RNAm na imagem superior representa o RNAm que codifica o CD40L do paciente TB com a ausência do exon 3. A imagem inferior representa o RNAm do controle. **(B)** O cromatograma superior do paciente TH demonstra a seqüência do cDNA com a ausência do exon3. Nota-se que subseqüente ao exon 2 está a seqüência do exon 4. No cromatograma inferior está representado a seqüência do controle. Após o éxon 2 percebe-se a presença do exon 3 e subseqüente o exon 4. Devido ao grande número de bases presente no exon 3, apenas os fragmentos iniciais e finais do éxon 3 estão representados. *Cont,* controle;

4.2.2.2 *Paciente FS*

O seqüenciamento do cDNA do CD40L do paciente FS, com o par de primers P.1-fim, confirmou a presença da troca de uma guanina (G) por uma citosina (C) na base de número 476 do DNA complementar (c.476 G>C) **(Figura 21)**. Esta alteração corresponde a mutação g.11856:G>C encontrada no DNAg, confirmando a mutação encontrada.

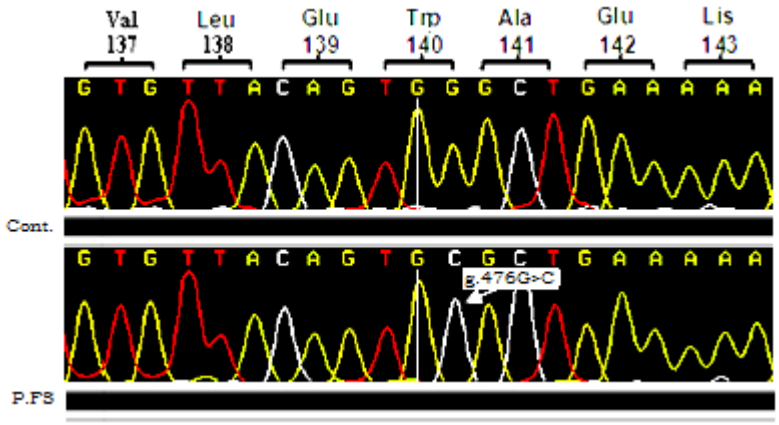


Figura 21. Cromatograma demonstrando a mutação c.476 G>C no paciente FS. Detectou-se troca de uma guanina (G) por uma adenina (C) na base de número 476 do DNA complementar (c.476G>C) do paciente FS confirmando a alteração g.11856G>C encontrada no DNAg. *Val*, Valina; *Leu,* Leucina; *Glu,* Ácido Glutâmico, *Trp*, Triptofano; *Ala,* Alanina; *Lis,* Lisina; *Cont,* controle;

4.2.2.3 *Paciente KC*

Após o seqüenciamento do cDNA do CD40L com o par de "primers" P.1-fim, detectamos a presença da troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) na base de número 475 do DNA complementar (c.475G>A). Esta alteração corresponde a mutação (g.11855G>A) do paciente KC confirmando a alteração g.11855G>A encontrada no DNAg **(Figura 22)**.

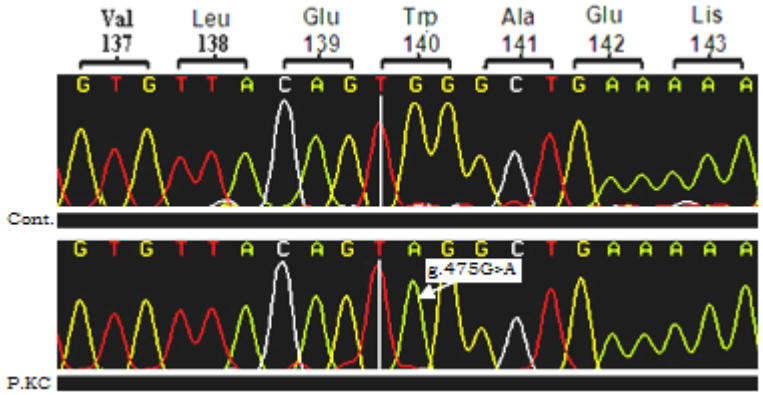


Figura 22. Cromatograma demonstrando a mutação c.475 G>A no paciente KC. Presença da troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) na base de número 475 do DNA complementar (c.475G>A) do paciente KC confirmando a alteração g.11855G>A encontrada no DNAg. *Val,* Valina; *Leu,* Leucina; *Glu,* Ácido Glutâmico, *Trp,* Triptofano; *Ala,* Alanina; *Lis,* Lisina; *Cont,* controle.

4.2.2.4. *Pacientes CH, VIC e FE*

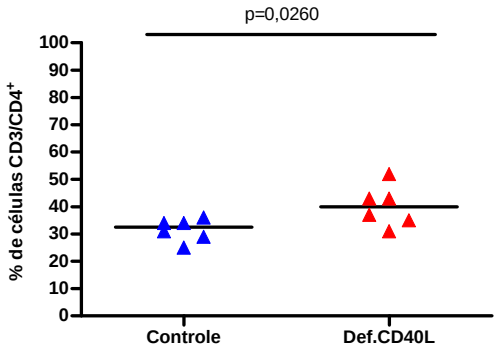
Os pacientes CH, VIC e FE portadores da deleção g. 3074_3077delTAGA no DNAg, apresentaram transcritos alternativos, gerados quando o cDNA foi amplificado com o par de "primer" P1-fim (Figura 10). A natureza dos transcritos alternativos e processamento do RNAm serão analisados na segunda etapa deste projeto.

4.3 *Fenotipagem dos linfócitos*

4.3.1 *Fenotipagem dos linfócitos CD3⁺CD4⁺*

Os valores relativos dos linfócitos T CD3⁺CD4⁺ dos pacientes foram significativamente mais altos quando comparados com os controles sadios (p=0,0260, n=6 , Teste de Mann-Whitney) **(Figura 23)**.

A)



B)

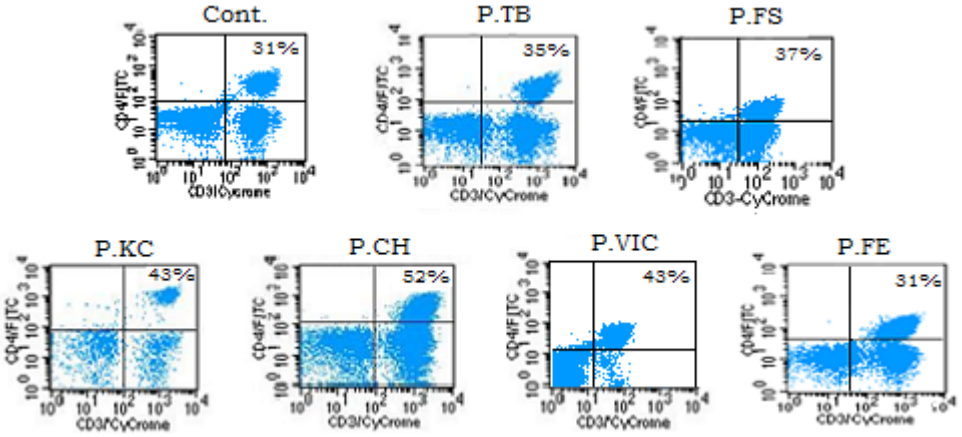
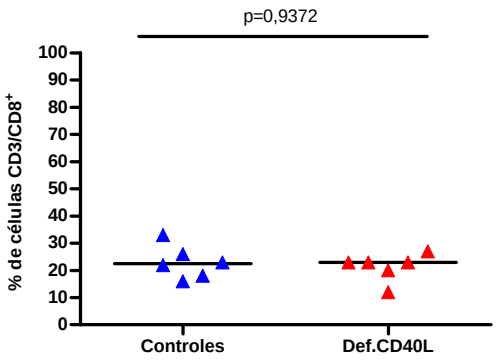


Figura 23. Fenotipagem dos linfócitos T CD3⁺CD4⁺ dos pacientes deficientes de CD40L. **(A)** Gráfico dos valores relativos da subpopulação de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ dos pacientes deficientes de CD40L comparado com o grupo de controles sadios. **(A) "**Dot plot" para a marcação de linfócitos CD3⁺CD4⁺ dos pacientes deficientes de CD40L realizados a partir do "gate" na população de linfócitos. A barra horizontal entre os pacientes e controles indica a mediana de cada grupo. O "dot plot" de cada paciente apresentado é representativo de dois experimentos independentes (p=0,0260, n=6 , Teste de Mann-Whitney).

4.3.2 *Fenotipagem dos linfócitos CD3⁺CD8⁺*

Com relação à contagem de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ dos pacientes deficientes de CD40L e do grupo de controles sadios, não encontramos diferença estatisticamente significativa **(Figura 24)**.

A)



B)

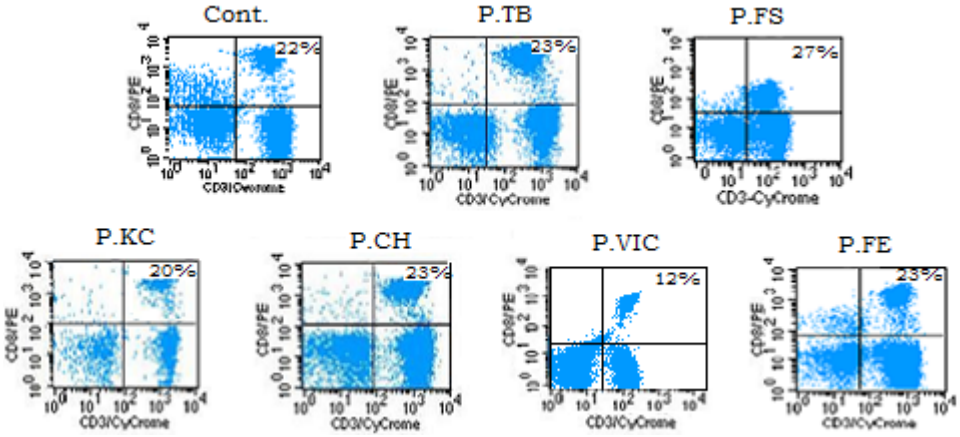


Figura 24. Fenotipagem dos linfócitos T CD3⁺CD8⁺ dos pacientes deficientes de CD40L. **(A)** Gráfico dos valores da subpopulação de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ dos pacientes deficientes de CD40L. **(A)** **"**Dot plot" para a marcação de linfócitos CD3⁺CD8⁺ dos pacientes deficientes de CD40L realizados a partir do "gate" da população de linfócitos. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre pacientes e controles. As barras horizontais entre os pacientes e controles indicam a mediana de cada grupo. O "dot plot" de cada paciente apresentado é representativo de dois experimentos independentes (p=0,9372, n=6 , Teste de Mann-Whitney).

4.3.3 *Fenotipagem dos linfócitos CD19⁺CD40⁺*

A contagem dos linfócitos CD19⁺CD40⁺ não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes e controles sadios **(Figura 25)**.

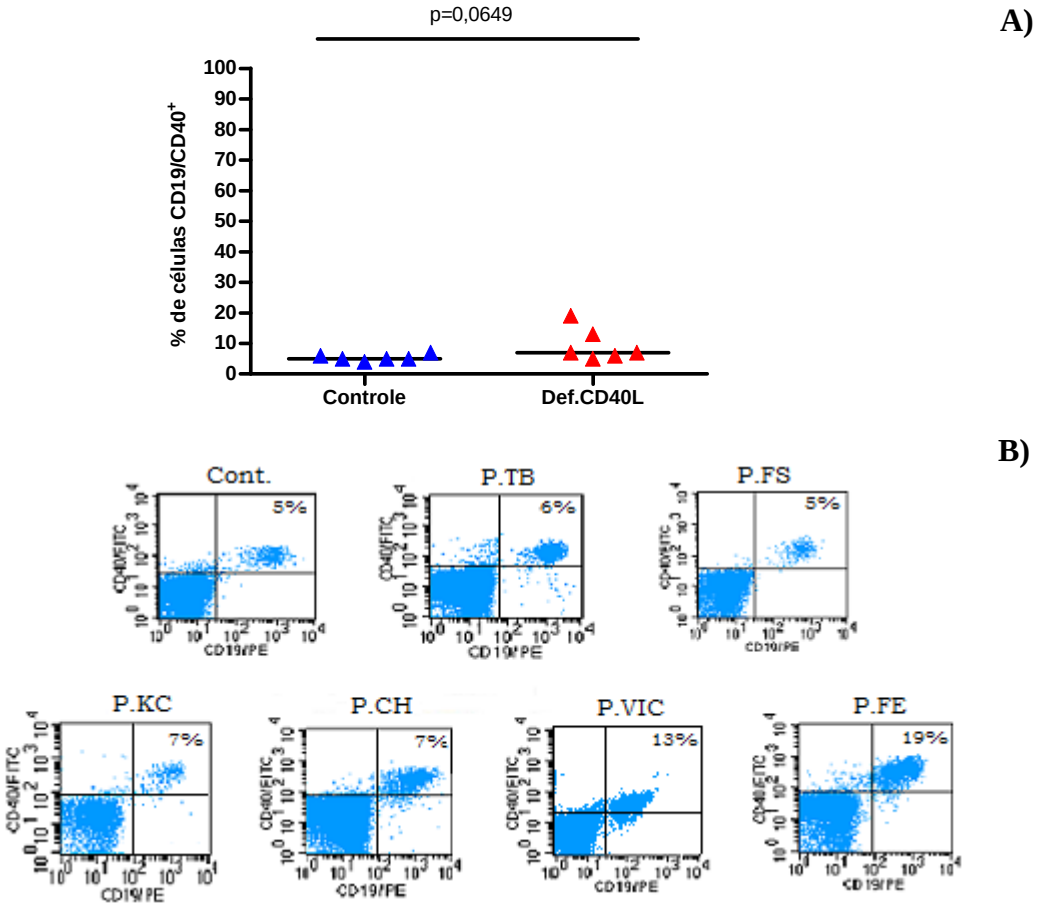


Figura 25. Fenotipagem dos linfócitos B CD19⁺CD40⁺ dos pacientes deficientes de CD40L. **(A)** Gráfico dos valores relativos da subpopulação de linfócitos B CD19⁺CD40⁺ dos pacientes deficientes de CD40L. **(B)** **"**Dot plot" para a marcação de linfócitos CD19⁺CD40⁺ dos pacientes deficientes de CD40L realizados a partir do "gate" da população de linfócitos. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes e controles. A barra horizontal entre os pacientes e controles indica a mediana de cada grupo. O "dot plot" de cada paciente apresentado é representativo de dois experimentos independentes (p=0,0649, n=6 , Teste de Mann-Whitney).

4.3.4 *Fenotipagem dos linfócitos CD3⁺CD40L⁺*

Pelo fato dos linfócitos CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ expressarem o CD40L (Roy et al., 1993), analisamos a expressão do CD40L na superfície dos linfócitos CD3⁺ totais dos pacientes deficientes do *CD40LG* e em separado na superfície dos linfócitos CD4⁺. Incluímos em nossa análise a expressão da molécula CD69, que é um marcador de ativação de linfócitos T, para controlar as condições apropriadas de estimulação.

Observamos uma diminuição estatisticamente significativa, nos níveis de expressão do CD69 na superfície dos linfócitos CD3⁺ dos pacientes quando comparados aos controles (p=0,0260, n=6 , Teste de Mann-Whitney) **(Figura 26A)**.

Também verificamos redução significativa na expressão do CD40L na superfície dos linfócitos TCD3⁺ e TCD4⁺ ativados dos pacientes comparados aos controles (p=0,0022, n=6 , Teste de Mann-Whitney) **(Figuras 26B, 26C)**.

A)

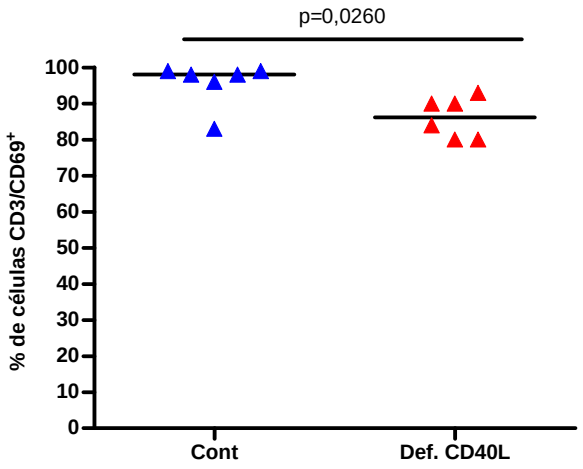


Figura 26. Expressão do CD40L na superfície dos linfócitos T CD3⁺CD40L⁺ e CD4⁺CD40L⁺. **(A)** A expressão de CD69 foi utilizada como controle de ativação. As barras horizontais entre os pacientes e os controles indicam a mediana de cada grupo. (n=6 , Teste de Mann-Whitney) (continua).

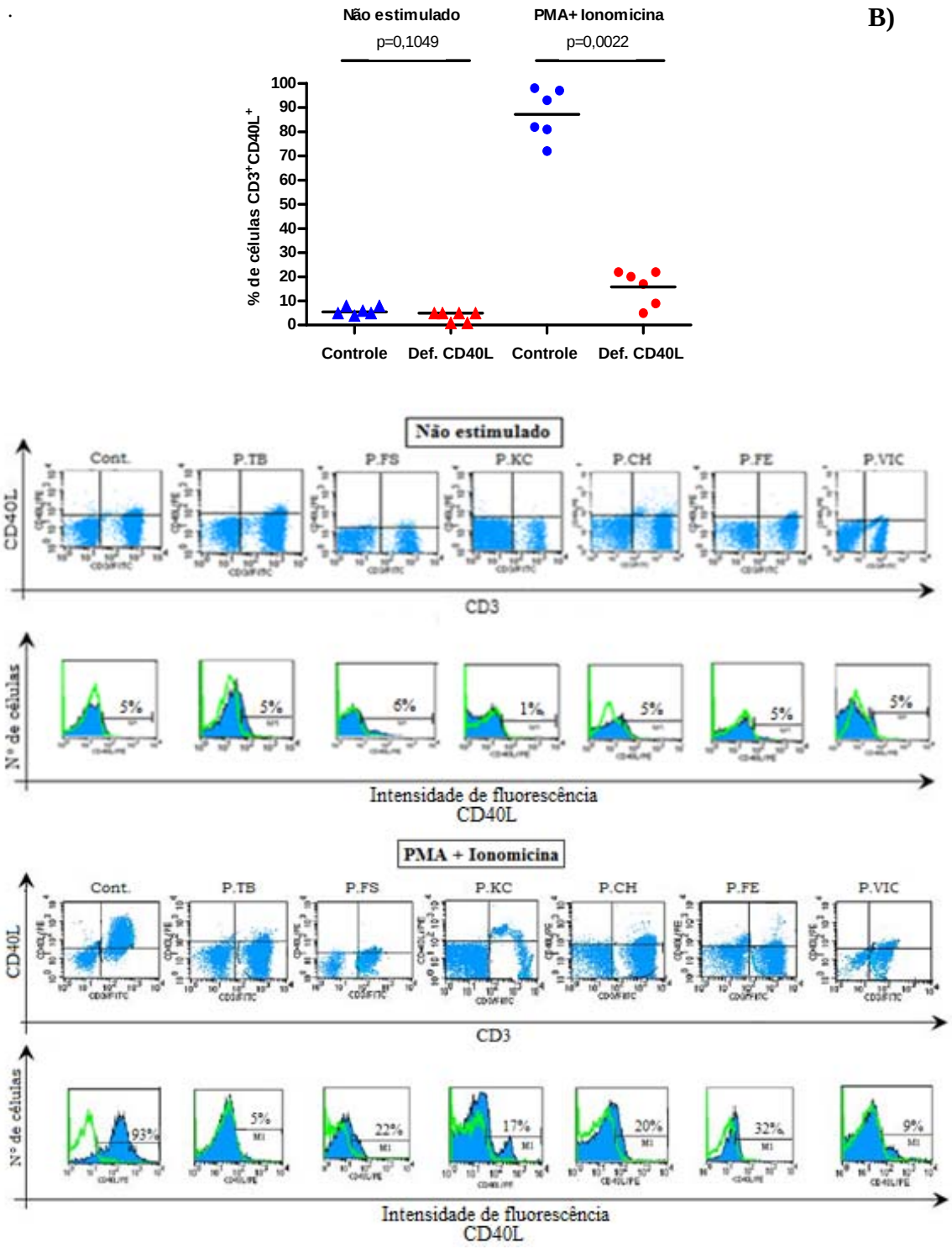


Figura 26. Expressão do CD40L na superfície dos linfócitos T $CD3^+CD40L^+$ e $CD4^+CD40L^+$. **(B)** No gráfico as barras horizontais entre os pacientes e os controles indicam a mediana de cada grupo (n=6 , Teste de Mann-Whitney). "Dot plot" e histogramas demonstrando os valores relativos da população de linfócitos $CD3^+CD40L^+$ pré e pós- ativação. Nos histogramas a linha em verde representa o controle isotípico e em azul estão representadas as amostras de células marcadas com anti-CD40L-PE (continua).

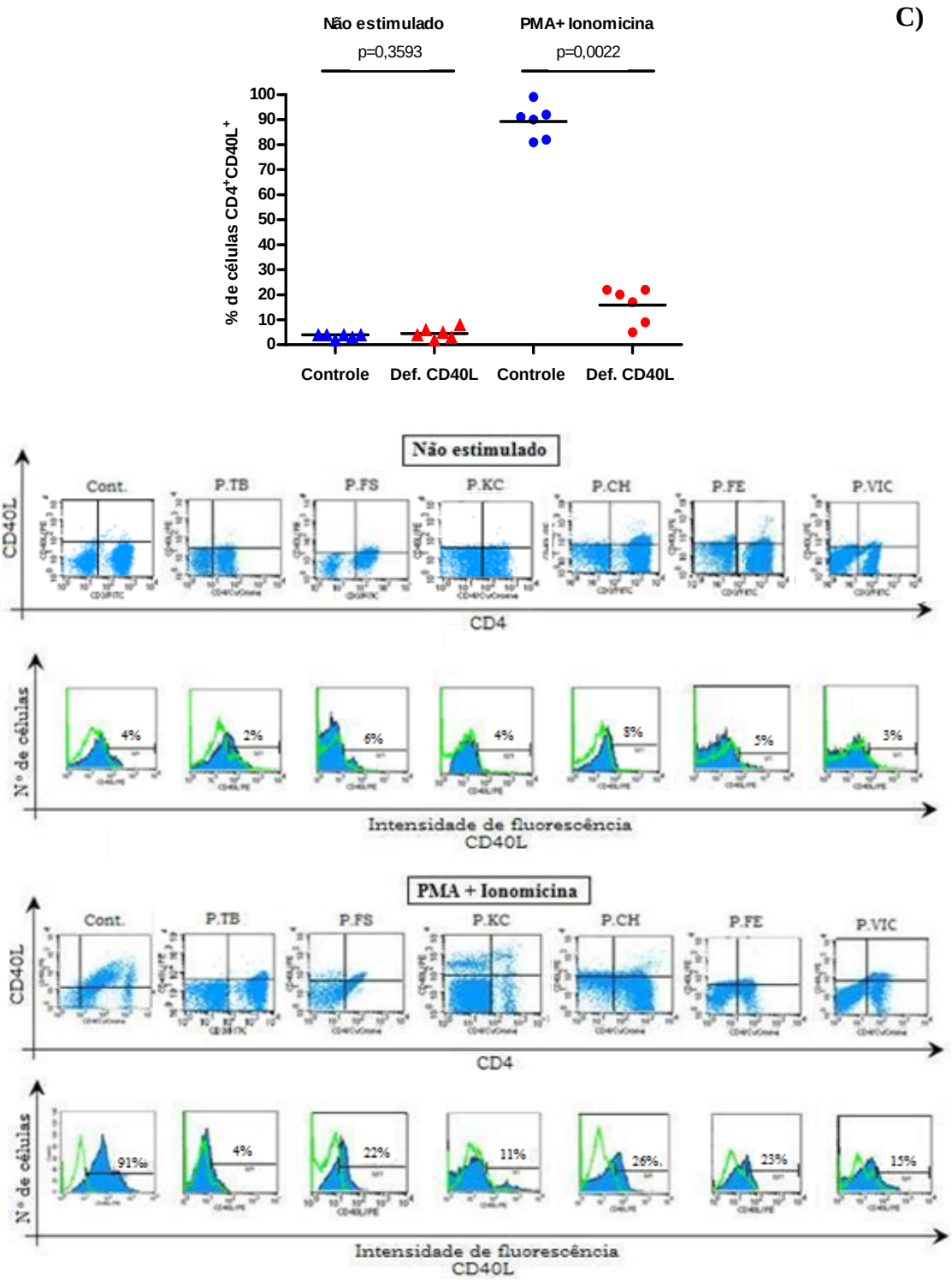


Figura 26. Expressão do CD40L na superfície dos linfócitos T CD3+CD40L+ e CD4+CD40L+. **(C)** No gráfico as barras horizontais entre os pacientes e os controles indicam a mediana de cada grupo (n=6 , Teste de Mann-Whitney). "Dot plot" e histogramas demonstrando os valores relativos da população de linfócitos linfócitos CD4+CD40L+ pré e pós- ativação. Nos histogramas a linha em verde representa o controle isotípico e em azul estão representadas as amostras de células marcadas com anti-CD40L-PE. Os dados das figuras **A**, **B** e **C** apresentados são representativos de 2 experimentos independentes.

Além de apresentarem valores relativos de linfócitos $CD3^+CD40L^+$reduzidos na população de PBMC, detectamos pela microscopia confocal (demonstrado no próximo item), que os linfócitos T ativados dos pacientes deficientes de CD40L, também apresentam uma redução na densidade das moléculas CD3 e CD40L na superfície dos linfócitos T $CD3^+CD40L^+$. Por este motivo e por não termos detectado alteração nos valores relativos de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ não estimulados, decidimos avaliar individualmente a expressão do CD3 e do CD4 na superfície dos linfócitos T após 5 horas de ativação com PMA e Ionomicina. Não detectamos diferença estatística quando comparamos o grupo de paciente e controles. Contudo, percebemos após a estimulação, que os pacientes TB e KC apresentaram uma evidente diminuição nos valores relativos de linfócitos $CD3^+$ associada a níveis normais de linfócitos T $CD4^+$ **(Figura 27)**.

A)

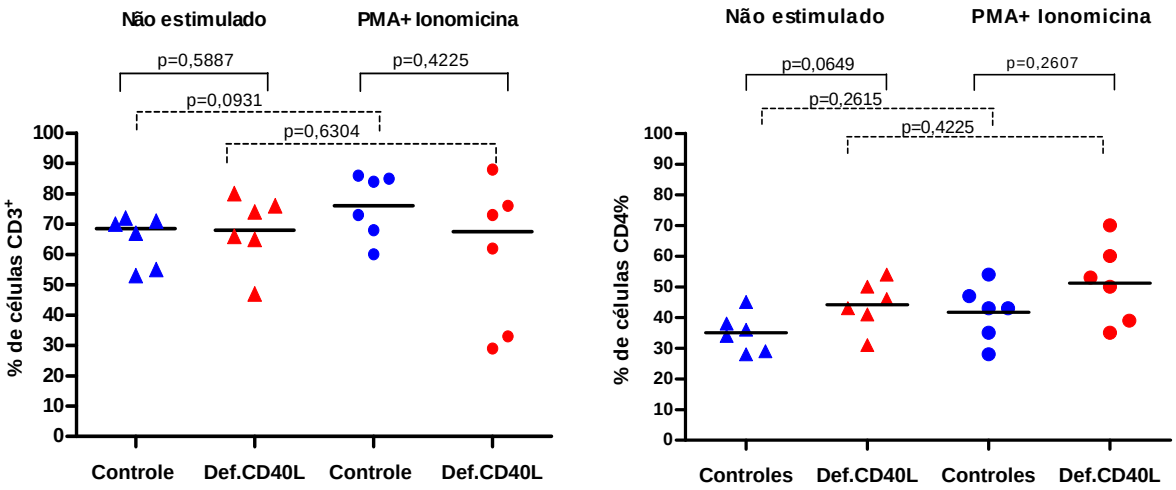


Figura 27. Expressão das moléculas CD3 e do CD4 na superfície dos linfócitos T pré e pós-ativação com PMA e Ionomicina **(A)** Gráfico dos valores relativos dos linfócitos $CD3^+$ e $CD4^+$ pré e pós ativação. As barras horizontais entre os pacientes e os controles indicam a mediana de cada grupo. O valor de p, correspondente a cada experimento, está demonstrado acima dos gráficos (n=6 , Teste de Mann-Whitney) (continua).

.

B)

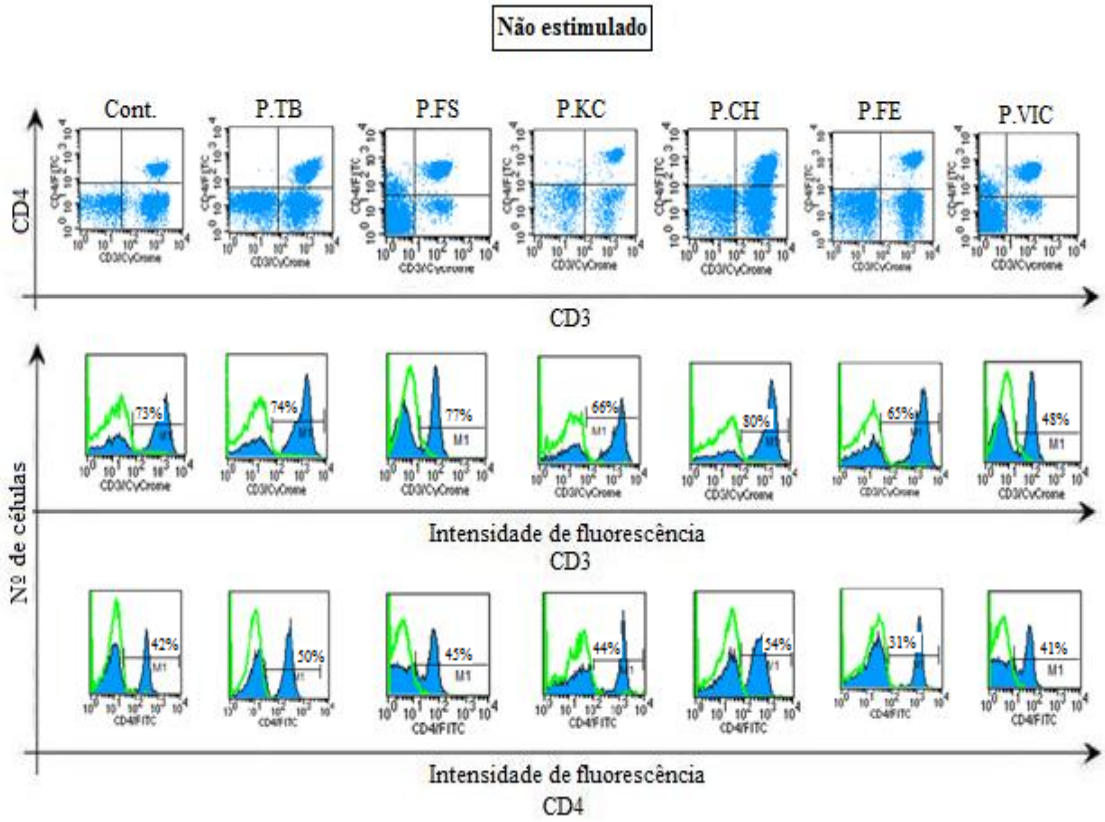


Figura 27. Expressão das moléculas CD3 e do CD4 na superfície dos linfócitos T pré e pós-ativação com PMA e Ionomicina **(B)** "Dot plot" e histogramas demonstrando os valores relativos da população de linfócitos CD3+ e linfócitos CD4+ não estimulados. Nos histogramas a linha em verde representa o controle isotípico e em azul estão representadas as amostras de células marcadas com anti-CD3 e anti-CD4. (continua).

C)

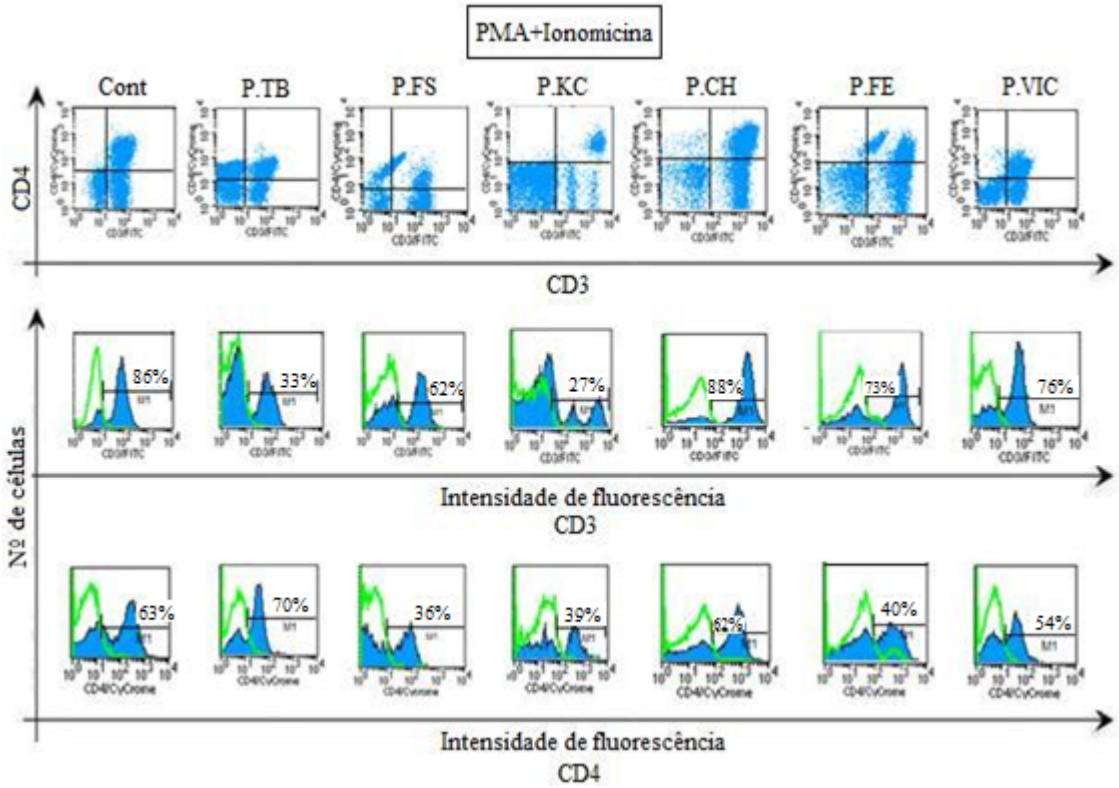


Figura 27. Expressão das moléculas CD3 e do CD4 na superfície dos linfócitos T pré e pós-ativação com PMA e Ionomicina **(C)** **"**Dot plot" e histogramas demonstrando os valores relativos da população de linfócitos $CD3^+$ e linfócitos $CD4^+$ após cinco horas de ativação com PMA e Ionomicina. Nos histogramas a linha em verde representa o controle isotípico e em azul estão representadas as amostras de células marcadas com anti-CD3 e anti-CD4. Os dados apresentados nas figuras **A**, **B** e **C** são representativos de 2 experimentos independentes.

4.4 *Microscopia confocal dos linfócitos T CD3⁺CD40L⁺*

A análise molecular de marcadores celulares por microscopia confocal é uma ferramenta extremamente útil para o entendimento dos fenômenos imunológicos. Realizamos a análise da expressão do CD40L na superfície (membrana plasmática) de células CD3 positivas. Notamos que os linfócitos T CD40L⁺ dos pacientes apresentaram redução na densidade do CD40L na membrana plasmática. Ainda percebemos que esses linfócitos expressando o CD40L mutado também apresentaram uma redução na densidade da molécula CD3 e que essas duas moléculas colocalizam-se na membrana plasmática do linfócito **(Figura 28)**.

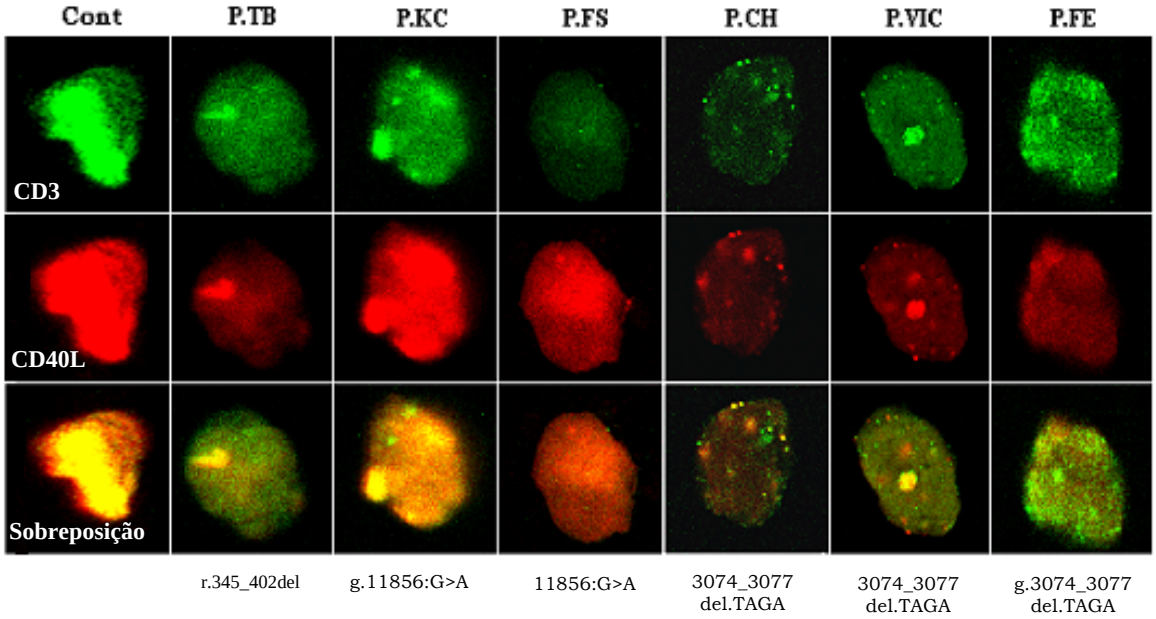


Figura 28. Microscopia confocal dos linfócitos T CD3⁺CD40L⁺ dos pacientes deficientes de CD40L. De cima para baixo está demonstrado: em verde a expressão do CD3 marcado com anti-CD3-FITC; em vermelho a expressão do CD40L marcado com anti-CD40L-PE; em amarelo a sobreposição do CD3 e do CD40L, demonstrando uma colocalização dessas duas moléculas. Nota-se a redução da densidade da expressão do CD40L bem como do CD3. As imagens apresentadas de cada paciente são representativas de 2 experimentos independentes. Abaixo de cada imagem está descrita a mutação que cada um dos pacientes é portador.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo determinamos as bases genético-moleculares da deficiência de CD40L em 6 pacientes brasileiros com HIGM ligada ao X, pertencentes a 5 famílias não relacionadas, e investigamos o *status* de portadora do alelo mutado em 18 mulheres destas famílias. Com essas avaliações foi possível uma redefinição do tratamento de cada um desses pacientes, o aconselhamento genético dos demais membros das famílias estudadas e a triagem dos futuros recém-nascidos destas famílias.

No ano de 1993 cinco grupos de pesquisadores demonstraram que mutações no *CD40LG* eram responsáveis por uma imunodeficiência caracterizada por falhas na troca de classe do isotipo IgM para os demais isotipos IgG, IgA e IgE (Aruffo et al., 1993; Korthauer et al., 1993; Di Santo et al., 1993; Allen et al., 1993; Fuleihan et al., 1993). Detectamos mutações heterogêneas no *CD40LG,* sendo uma *nonsense*, uma *missense*, três deleções gerando falhas no processamento do RNAm e um defeito de "splice" resultando na deleção do exon 3 do RNAm.

Analisamos conjuntamente as alterações na estrutura do DNA genômico, no RNAm e na expressão da proteína CD40L. As células vivas dependem do funcionamento correto de milhares de genes, e cada um deles pode ser danificado por uma mutação nos diversos sítios da seqüência que codifica as proteínas (exons), nas regiões flanqueadoras desses exons, regiões de processamento do RNAm (sítios de "splice"), ou nas regiões que promovem a expressão gênica (promotores). Mães heterozigotas, para um determinado alelo mutado, apresentam 50% de chance de transmitir esse alelo a seus descendentes através do processo de meiose.

Os pacientes brasileiros com a síndrome de HIGM vivem num meio ambiente diverso, distinto dos padrões do hemisfério norte, estando sujeitos à exposição a diferentes antígenos microbianos e patógenos

característicos de regiões tropicais, além de serem expostos precocemente a um protocolo de imunizações que inclui microrganismos vivos, potencialmente patogênicos para eles. Não há conhecimento detalhado sobre as possíveis repercussões que tais práticas induzem nestes pacientes e quais padrões de mutações levam a síndrome de HIGM em pacientes nesta população brasileira, amplamente miscigenada Destacamos o encontro do paciente TB com deficiência do CD40L e infecção pelo *Paracoccidiodes braziliensis*, fato inédito na literatura.

Considerando a heterogeneidade clínica e genética desses pacientes, o estudo molecular foi fundamental para a realização do diagnóstico diferencial, delineamento terapêutico, aconselhamento genético e prognóstico dos casos. Além disso, a identificação de mecanismos genético-moleculares defeituosos, contribuirá para o avanço do conhecimento sobre a resposta imune humana e sua suscetibilidade às infecções, área considerada estratégica no campo da biomedicina.

Sem a análise genético-molecular, muitos pacientes com deficiência de CD40L, são freqüentemente acompanhados como tendo imunodeficiência comum variável (CVID), uma vez que nem todos os pacientes deficientes de CD40L apresentam níveis elevados de IgM (Prasad et al., 2005). Três dos pacientes que estudamos apresentaram níveis de IgM no percentil 3 e tinham sido diagnosticados como portadores de CVID. O diagnóstico genético-molecular permitiu a confirmação da deficiência de CD40L nesses pacientes.

Segundo informações do banco de dados de registros de mutações para a X-HIGM, a maior porcentagem das mutações encontrada na molécula CD40L são mutações *missense* (30%) seguidas de mutações *nonsense* (22%), deleções (16%), inserções (13%) e mutações em sítios de "splice" (19%) (http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/). Contudo, este perfil de mutações pode variar em diferentes grupos étnicos (Érdos et al., 2008). Recentemente foi descrito um paciente com inserção de um elemento

AluYb8 no exon 1 do *CD40LG* (Apoil et al., 2007) e outro indivíduo com uma mutação na região promotora do *CD40LG* (Van et al., 2007).

Duas das mutações identificadas foram localizadas no códon 140 do *CD40LG*. Estes dados corroboram a informação de que este códon é um "hotspot" de mutações no CD40L (Notarangelo e Peitsch, 1996; Nonoyama et al., 1997; Prasad et al., 2005). O códon 140 abrange as bases 11854, 11855 e 11856.

O paciente KC apresentou a troca de uma guanina por uma adenina na base de número 11855 do DNA (g.11855:G>A) correspondendo a base de número 475 do RNAm (c.475G>A) sendo esta uma mutação descrita na literatura (Korthäuer et al., 1993; Iseki et al., 1994; Macchi et al., 1995; Seyama et al., 1996; Nonoyama et al., 1997; Seyama et al., 1998). Esta substituição resulta num código de parada prematuro no início do éxon 5 do *CD40LG* (p.W140X) gerando uma proteína com ausência do domínio TNFH. A ausência deste domínio implica em falhas na ligação ao CD40, resultando numa resposta imune deficiente, responsável pelas infecções de repetição manifestadas pelo paciente KC.

O paciente FS demonstrou a alteração no códon 140 g.11856 G>C, que no cDNA corresponde a base de número 476 (c.475G>A), sendo esta uma mutação não descrita na literatura. Essa substituição gera a troca de um triptofano por uma cisteína na posição 140 da proteína CD40L. Já foram descritos na literatura (Nonoyama et al., 1997; Garber et al., 1999;; Prasad et al., 2005) dois pacientes com mutação *missense* na base 11856 do DNA genômico. Diferentemente do paciente FS, esses pacientes apresentaram a troca de uma guanina por uma timina (g.11856G>A). Essas duas mutações resultaram na troca de um triptofano por uma cisteína fato que também ocorreu com o paciente FS (p. W140C), pois os códons UGU e UGC geram o mesmo aminoácido (cisteína) devido ao código genético ser degenerado.

O triptofano (W) é um aminoácido aromático apolar. Na posição 140 da proteína CD40L, o triptofano forma várias interações hidrofóbicas essenciais a estrutura do CD40L. Já a cisteína é um aminoácido não aromático e polar. A troca do triptofano por uma cisteína na posição 140 da proteína CD40L implica na desestabilização estrutural do CD40L (Thusberg e Vihinen, 2007). Desde os primeiros meses de vida até o momento, o paciente FS apresentou vários episódios de neutropenia, acompanhados de otites, pneumonias, amigdalites e quadros de infecção urinária recorrentes.

As análises do *CD40LG* dos pacientes CH, FE e VIC revelaram a deleção das bases 3074 a 3077 do DNAg (g. 3074_3077delTAGA) previamente descrita na literatura (Gilmour et al., 2003). Esta deleção se localiza na região aceptora do sítio de "splice" do intron 1. A seqüência de nucleotídeos desta região é aatagATAGAAAG (as letras minúsculas indicam a região aceptora do "splice" do intron 1 e as letras em maiúsculo indicam a seqüência do exon 2). Para correlacionarmos a alteração que encontramos no *CD40LG* destes pacientes com o fenótipo por eles desenvolvido, necessitamos analisar a estrutura do RNAm.

A análise do RNAm do CD40L foi uma ferramenta importante no entendimento das alterações que afetaram o *CD40LG* dos pacientes. O RNA mensageiro que codifica o CD40L passa a ser detectado após 1 hora de estímulo e atinge níveis máximos após 3 horas (Roy et al., 1998). Após a ativação *in vitro* dos PBMC dos pacientes deficientes de CD40L, realizamos a transcrição reversa do RNAm que codifica a proteína CD40L, gerando seu cDNA.

Toda a região codificadora do RNAm do CD40L dos pacientes foi analisada. As alterações encontradas no DNAg dos pacientes KC e FS foram confirmadas e nos casos dos pacientes CH, VIC e FE demonstramos os defeitos no RNAm destes pacientes, o que nos permitiu esclarecer o fenótipo por eles desenvolvido.

No caso do paciente TB, não foi possível o seqüenciamento do éxon 3 do *CD40LG,* devido ao padrão de fragmentação e de bandas adicionais geradas após a reação de PCR. A análise do RNAm através da técnica de RT-PCR nos permitiu identificar as bases genéticas que geraram sua suscetibilidade às infecções típicas de pacientes com defeitos na troca de classe de imunoglobulinas e bem como as infecções por patógenos intracelulares como *Pneumocystis jiroveci* e *Paracoccidiodes braziliensis. Pneumocystis jiroveci* é um patógeno freqüentemente encontrado em nesses pacientes, porém não encontramos na literatura relato de infecções causadas por *Paracoccidiodes braziliensis* em pacientes deficientes de CD40L, sendo este o primeiro caso a ser relatado na literatura. Iseki e colaboradores (1994) descreveram um paciente com deficiência de CD40L que desenvolveu infecção por *Cryptococcus.*

Na análise dos transcritos do CD40L do paciente TB, observamos tamanho reduzido dos RNAm produzidos, o que sugeriu a existência de uma grande deleção no RNAm. Quando seqüenciamos o cDNA do CD40L do paciente TB detectamos a deleção correspondente a todo o éxon 3 (mutação r.345_402del). Este defeito pode ser conseqüência de alguma alteração no sítio de "splice" do exon 3. Alterações nos sítios de "splice" podem desencadear a perda do reconhecimento do sítio de "splice" pelo spliceossomo (complexo de proteínas responsável pelo "splice") gerando RNAm alternativos ou RNAs com a ausência do exon flanqueado pelo sítio alterado.

Atualmente investigamos as regiões adjacentes ao exon 3 para determinarmos a alteração no DNAg do paciente TB. Não encontramos nos bancos de dados de mutações da X-HIGM, nenhum registro de defeito de "splice" que resulte na deleção do exon 3 no RNAm (http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/index.php?content=pub/ IDbases).

Pelo fato da deficiência de CD40L ser uma doença ligada ao cromossomo X, as portadoras em heterozigoze do alelo mutado possuem

50% de chance de transmití-lo aos seus descendentes. Identificar essas portadoras é fundamental para o aconselhamento genético das famílias. Nossas análises revelaram que as mães dos pacientes KC, FS, CH, VIC e FE são portadoras do alelo mutado em heterozigoze. Também encontramos em mais 8 outras mulheres a condição de portadoras do alelo mutado em heterozigoze e outras 6 foram identificadas como não portadoras.

A fenotipagem dos leucócitos dos pacientes deficientes de CD40L não revelou redução dos valores relativos das células $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$. Nossos dados estão de acordo com outros estudos que demonstraram que pacientes deficientes de CD40L não apresentam redução nos níveis normais de linfócitos T na circulação sanguínea (Jain et al., 1999; Ferrari et al., 2001). Ao contrário encontramos um aumento estatisticamente significativo nos valores relativos dos linfócitos $CD3^+CD4^+$. Leucocitose por linfócitos $CD3^+CD4^+$ é relatada em alguns pacientes deficientes de CD40L (Erdós et al., 2008) fato que pode ser hipoteticamente explicado por algum mecanismo compensatório dos linfócitos dos pacientes deficientes de CD40L que não conseguem exercer sua função eficientemente. Contudo este mecanismo ainda não foi estudado. Por outro lado, alguns pacientes deficientes de CD40L apresentam níveis reduzidos de linfócitos T $CD3^+CD4+$ e $CD3^+CD8^+$ de memória (Jain et al., 1999).

Devido ao fato de pacientes deficientes de CD40 manifestarem um fenótipo similar aos pacientes deficientes de CD40L (Ferrari et al., 2001), analisamos a expressão do CD40 na superfície dos linfócitos B $CD19^+$ para podermos excluir a possibilidade de falhas na molécula CD40. Não encontramos diferença estatística entre os níveis dos linfócitos B $CD19^+CD40^+$ dos pacientes quando comparados com os controles. Esses dados são condizentes com a literatura, em que não são observadas

falhas na expressão do CD40 em pacientes deficientes de CD40L (Lee et al., 2005).

Utilizamos a expressão do CD69 como um marcador de ativação recente de linfócitos para podermos controlar de ativação dos linfócitos T antes de analisarmos a expressão do CD40L por citometria de fluxo e microscopia confocal. Verificamos que os pacientes deficientes de CD40L apresentaram uma redução nos níveis do CD69, estatisticamente significativa quando comparados com os controles sadios, contudo os valores de expressão do CD69 estavam dentro dos valores considerados como normais na literatura (Erdós et al., 2008).

A expressão do CD40L na superfície dos linfócitos T ativados com PMA e ionomicina pode ser detectada por citometria de fluxo após 3 horas de ativação e atinge valores máximos de expressão após 6 horas de estímulo (Roy et al., 1993). Neste estudo, a avaliação da expressão da proteína CD40L na superfície das células $CD3^+$ demonstrou uma redução significativa nos níveis de CD40L quando comparados com os níveis de expressão dos controles. Este fato confirma a importância desta técnica como uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de pacientes deficientes de CD40L (O'Gorman et al., 1997).

Após serem produzidas, as proteínas sofrem modificações pós-traducionais no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Alterações genéticas como mutações, podem gerar proteínas danificadas, mal dobradas ou desestruturadas e proteínas citosólicas, quando perdem sua conformação funcional por alterações genéticas, são degradadas nos proteassomas gerando polipeptídeos de vida curta que muitas vezes não chegam a ser exportados para o exterior das células (Watson et al., 2006).

Ao analisarmos a densidade e a estrutura da expressão do CD40L na superfície dos linfócitos T, observamos que células $CD3^+CD40L^+$ dos pacientes apresentavam uma redução na densidade do CD40L na

membrana plasmática. Ainda observamos que esses linfócitos expressando o CD40L mutado, também apresentavam uma redução na densidade da molécula CD3 e que estas duas moléculas colocalizavam-se na superfície dos linfócitos T. Como não encontramos diferenças nos níveis relativos de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ hipotetizamos que o CD40L tenha que estar íntegro para que o CD3 possa ser expresso numa densidade normal na superfície dos linfócitos e que na ausência do CD40L o CD3 possa ser expresso normalmente. Também aventamos a possibilidade do CD40L ser co-expresso com o complexo CD3, porém não achamos na literatura estudos que abordem a co-expressão das moléculas CD3 e CD40L. Nossos experimentos de citometria de fluxo não apontam diferenças importantes na contagem relativa de células CD3 e CD4 dos pacientes, antes e após ativação. Contudo nos chamou atenção, o fato de dois pacientes apresentarem queda dramática na contagem relativa de CD3 após ativação, o que aliado à observação da microscopia confocal, aponta um indício que alguma inter-relação entre CD3 e CD40L possa existir, o que será investigado na próxima etapa do projeto.

A co-expressão de alguns receptores ocorre em linfócitos T. Em células T maduras, o TCR associa-se ao CD3 e às cadeias zeta no retículo endoplasmático e em seguida essas moléculas são enviadas para o complexo de Golgi. Posteriormente os três componentes do complexo TCR (TCR, CD3 e cadeias zeta) são co-expressos na superfície celular dos linfócitos T (Geisler, 1992).

Utilizando células deficientes de CD3, pesquisadores demonstraram que mutações na molécula CD3 resultam na ausência da expressão do TCR na superfície dos linfócitos T (Geisler, 1992; Buferne et al., 1992). A importância da integridade do CD40L para a expressão do complexo TCR ainda não foi investigada.

Dando continuidade a este estudo investigaremos a expressão do complexo TCR como um todo, neste grupo de pacientes deficientes de

CD40L e sua relação com a expressão do CD40L mutado na superfície dos linfócitos T, bem como outros aspectos funcionais da imunidade celular ainda pouco explorados em pacientes deficientes de CD40L.

Quando foi demonstrado que mutações no *CD40LG* (Aruffo et al., 1993; Korthauer et al., 1993; Di Santo et al., 1993; Allen et al., 1993; Fuleihan et al., 1993) eram responsáveis por uma imunodeficiência caracterizada por falhas na troca de classe isotipo de IgM para os demais isotipos de IgG, IgA e IgE, as pesquisas sobre a importância da interação entre o CD40L e o CD40 concentraram-se na imunidade humoral T-dependente.

Nos anos seguintes, estudos com camundongos demonstraram que a interação CD40-CD40L participa da resposta imune celular pois, alguns patógenos intracelulares, tais como, *Pneumocistis jrovecii* (Wiley e Harmsen, 1995) *Leishmania major* (Kamanaka et al., 1996)*Cryptosporidium parvum* (Levy et al., 1997), *Mycobacterium avium* (Hayashi et al., 1999), *Salmonella dublin* (Marriot et al., 1999), *Candida albicans* (Netea et al., 2002) para serem debelados requeriam a integridade desta interação.

Dois dos pacientes que estudamos desenvolveram pneumonia causada por *Pneumocistis jirovecii* fato freqüente em pacientes deficientes de CD40L (Levy et al., 1997). Contudo, nenhum dos pacientes analisados, desenvolveram complicações hepáticas causadas pelo *Cryptosporidium parvum.* A suscetibilidade a infecções causadas por patógenos intracelulares distingue o fenótipo dos pacientes deficientes de CD40L dos fenótipos desenvolvidos pelos pacientes deficientes de AID e UNG que apresentam suscetibilidade apenas a infecções causadas por patógenos extracelulares (Ferrari et al., 2001; Imai et al., 2003). Esta característica deve-se ao fato da AID e UNG serem codificadas por dois genes expressos exclusivamente em linfócitos B localizados nos centros germinativos. Como a AID e a UNG agem especificamente na troca de

classe de imunoglobulina e no processo de maturação da afinidade dos anticorpos (hipermutação somática) a resposta imune celular não é comprometida (Muramatsu et al., 2000; Di Noia e Neuberger, 2002). Como conseqüência o fenótipo dos pacientes deficientes de AID e UNG não é tão grave quanto o fenótipo apresentado pelos pacientes deficientes de CD40L.

Estes dados reforçam o papel da interação CD40L-CD40 na ativação dos fagócitos. Os macrófagos, após serem ativados com CD40L, liberam várias citocinas pró-inflamatórias como: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α (Kiener et al., 1995; Mach et al., 1999). Já nos neutrófilos, a ligação do CD40L solúvel ao CD40 expresso na superfície dos neutrófilos, resulta na produção de ânion superóxido (Vanichakarn et al., 2008) essencial para a destruição do patógeno fagocitado.

O reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos T fornece o primeiro sinal necessário à ativação dos linfócitos T. O segundo sinal necessário à ativação é emitido a partir das interações entre moléculas co-estimulatórias, tais como, CD28, expresso pelas células T e as moléculas da família B7 (B7-1 e B7-2), expressas pelas APC's e pelo CD40L, também expresso na superfície das células T ativadas e o CD40 expresso pelas APCs (Griggs et al., 1996; Krummel e Allison, 1995; Walunas et al., 1996; Vita et al., 1998). Neste contexto a interação CD40-CD40L é fundamental para estimulação do eixo IFN-γ/IL-12 necessários à ativação dos macrófagos e das células dendríticas (Caux et al., 1994; Grewal et al., 1996). Desta forma a suscetibilidade a infecções por patógenos intracelulares, pode ser explicada, pelo fato de pacientes deficientes de CD40L apresentarem falhas ao estimular as células apresentadoras de antígenos a produzirem IL-12 e TNF-α e conseqüentemente os linfócitos T produzirem baixos níveis de IFN-γ (Jain et al., 1999).

Além disso, durante a organização da sinapse imunológica, a reorientação do citoesqueleto e o tempo de duração da interação entre linfócito T e célula dendrítica dependem da interação CD28-B7 e CD40L-CD40 (Rothoeft et al., 2006). Falhas nessas interações redundam na diminuição da polarização do citoesqueleto e conseqüente falhas na formação da sinapse. Como ocorre redução na duração da interação entre as células dendríticas e os linfócitos T, aparecerão falhas na ativação dos linfócitos.

A interação CD40L-CD40 é fundamental para a ativação das células dendríticas por aumentar a capacidade migratória das células dendríticas para os linfonodos drenantes, a capacidade de ativar os linfócitos T (Fugita et al., 2001), permitindo uma eficiente conecção entre a imunidade inata e adaptativa (Banchereau et al., 2000; Mellman e Steinman, 2001).

O fenótipo de células dendríticas maduras capazes de exercer eficientemente suas funções, é caracterizado pela elevada expressão de moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, dos marcadores de ativação CD83 e da capacidade de secretar altos níveis de IL-12 (Cella et al., 1997). Células dendríticas de pacientes deficientes de CD40, quando comparadas com indivíduos sadios após estimulação com CD40L solúvel, apresentaram um fenótipo imaturo, secretaram baixos níveis de IL-12, gerando por conseqüência, níveis reduzidos de linfócitos T secretores de IFN-γ (Fontana et al., 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho foram fundamentais, pois permitiram a equipe médica que atende cada uma das famílias, fazer um aconselhamento genético preciso e triar os futuros recém-nascidos profilaticamente antes do desenvolvimento dos primeiros sintomas da deficiência de CD40L.

Por fim, destacamos as observações científicas originais decorrentes deste estudo até o momento: encontramos o paciente TB com deficiência de CD40L por deleção do exon 3 do *CD40LG* e infecção *Paracoccidiodes braziliensis*, dois aspectos inéditos na literatura presentes no mesmo caso (a mutação e o tipo de infecção); o paciente FS com a mutação g.11856 G>C, inédita no *CD40LG* e a co-localização do CD40L com o CD3 como sugerido pelos estudos de microscopia confocal. Esses mecanismos serão investigados em detalhe na próxima etapa do projeto. A avaliação das bases genético-moleculares da deficiência de CD40L neste grupo de pacientes nos permitirá desenvolver estudos funcionais da resposta imune que requerem a integridade da interação CD40-CD40L.

6 CONCLUSÕES

1. As mutações observadas no gene do CD40L foram heterogêneas. Constatamos uma mutação *nonsense*, uma *missense*, três deleções gerando falhas no processamento do RNAm e um defeito de *splice* gerando a deleção do exon 3 do RNAm. Duas dessas mutações são inéditas na literatura.

2. A análise genético-molecular permitiu um diagnóstico preciso dos pacientes deficientes de CD40L, tornando possível o aconselhamento genético e a triagem dos recém-nascidos nas famílias estudadas.

3. A citometria de fluxo demonstrou ser uma importante técnica na triagem e diagnóstico de pacientes deficientes de *CD40LG*;

4. A microscopia confocal permitiu a análise da densidade de expressão das moléculas CD40L e CD3 e sua co-localização nos linfócitos T;

5. Devido ao pequeno número de deficientes de CD40L que estudamos e a heterogeneidade genotípica e fenotípica dos mesmos, nenhuma correlação genótipo-fenótipo pode ser estabelecida. Contudo, destacamos o achado do primeiro caso de blastomicose num paciente com síndrome de X-HIGM.

6.1 Perspectivas futuras

Pacientes com X-HIGM apresentam infecções de repetição por patógenos extra- e intracelulares, incluindo *Staphylococcus, Streptococcus, Pneumocystis, Criptosporidium, Micobacterias, e Paracoccideoides* como encontrado nesta pesquisa. A despeito da reposição de imunoglobulinas intravenosas, muitos pacientes com deficiência de CD40L continuam a apresentar infecções recorrentes e via de regra por patógenos intracelulares.

Conforme abordado na introdução deste estudo, a interação CD40L-CD40 é crítica para o "switch" na síntese de imunoglobulinas, havendo a troca de isotipos IgM para as outras classes de imunoglobulinas. Além disto, a interação CD40L-CD40 também é importante para a ativação de fagócitos (monócitos/macrófagos e neutrófilos) além de apresentação antigênica e atividade linfoproliferativa.

Nossa hipótese é que os pacientes com X-HIGM apresentem função fagocítica deficiente , assim como apresentação antigênica inadequada, mecanismos que agravam sua imunodeficiência e contribuem para sua suscetibilidade às infecções.

Considerando o exposto, realizaremos uma série de estudos que visam investigar a função fagocítica, apresentação antigênica e ativação de células T neste grupo de pacientes com HIGM.

Temos a esperança que tais estudos desvendem mecanismos imunopatológicos ainda não descritos e contribuam para o avanço do conhecimento sobre essas imunodeficiências permitindo conceber novas estratégias terapêuticas para este grupo de pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. J Exp Med. 1993;178:669-74.

Allen R, Armitage R, Conley M, Rosenblatt H, Jenkins N, Copeland N, Bedell M, Edelhoff S, Disteche C, Simoneaux D. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. Science. 1993;259:990-3.

Allison JP, Lanier LL. Structure, function, and serology of the T-cell antigen receptor complex. Annu Rev Immunol. 1987;5:503-40.

Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR, Clark EA, Smith CA, Grabstein KH, Cosman M, Spriggs MK. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. Nature. 1992; 357:80-2.

Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, Bajorath J, Grosmaire LS, Stenkamp R, Neubauer M, et al. The CD40 lligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. Cell. 1993;72:291-300.

Azzawi M, Hasleton P. Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and 2 heart disease. Cardiovasc Res. 1992; 43: 850-9.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2000;18:767-811.

Barrett TB, Shu G, Clark EA. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. J Immunol. 1991;146(6):1722-9.

Berberich L, Shu G, ClarK EA. Cross linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-Kappa B. J Immunol 1994;153:4357-67.

Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. Cell. 1991;67:1121–9.

* De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2004 May 06].

Bhattacharyya GK, Johnson RA. Nonparametric inference. In: Bhattacharyya GK, Johnson RA, editors. Statistical Concepts and Methods. Singapore: John Wiley & Sons; 1977. p. 505.

Brodeur SR, Angelini F, Bacharier LB, Blom AM, Mizoguchi E, Fujiwara H, Plebani A, Notarangelo LD, Dahlback B, Tsitsikov E, Geha RS. C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor. Immunity. 2003;18:837-48.

Buferne M, Luton F, Letourneur F, Hoeveler A, Couez D, Barad M, Malissen B, Schmitt-Verhulst AM, Boyer C. Role of CD3 delta in surface expression of the TCR/CD3 complex and in activation for killing analyzed with a CD3 delta-negative cytotoxic T lymphocyte variant. J Immunol. 1992;48:657-64.

Burtin P. An example of atypical agammaglobulinemia a case of severe hypogammaglobulinemia with increase of the beta-2 macroglobulin. Rev Fr Etud Clin Biol. 1961;6:286-9.

Calingasan NY, Erdely HA, Altar CA. Identification of CD40 ligand in Alzheimer's disease and in animal models of Alzheimer's disease and brain injury. Neurobiol Aging. 2002;23:31-9.

Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S, et al. A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. J Exp Med. 1997;185:2053–60.

Cassatella MA, Della BV, Berton G, Rossi F. Activation by gamma interferon of human macrophage capability to produce toxic oxygen molecules is accompanied by decreased Km of the superoxide-generating NADPH oxidase. Biochem Biophys Res Commun. 1985;132: 908-14.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J Exp Med. 1994;180:1263-72.

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. Curr Opin Immunol. 1997;9:10-6.

Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospísil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. J Exp Med. 1991; 173:869-79.

Chaudhuri J, Khuong C, Alt FW. Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. Nature. 2004;430:992-8.

Chensue SW, Remick DG, Shmyr-Forsch C, Beals TF, Kunkel SL. Immunohistochemical demonstration of cytoplasmic and membrane-associated tumor necrosis factor in murine macrophages. Am J Pathol. 1988;133:564-72.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987;1:156-9.

Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. Annu Rev Immunol. 1988;6:629-62.

Cocks BG, Waal Malefyt R de, Galizzi JP, Vries JE de, Aversa G. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. Int Immunol. 1993;5:657–63.

Condino-Neto A e Newburger P. NADPH Oxidase Activity and Cytochrome b_{558} Content of Human Epstein-Barr-Virus-Transformed B Lymphocytes Correlate with Expression of Genes encoding Components of the Oxidase System. Arch Biochem Biophys. 1998;360:158-64.

Condino-Neto A, Whitney C, Newburger PE. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. J Immunol. 1998;161:4960-7.

Cosyns M, Tsirkin S, Jones M, Flavell R, Kikutani H, Hayward AR. Requirementof CD40-CD40 ligand interection for elimination of Cryptosporidium parvun from mice. Infect Immun. 1998;66:603-7.

Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, Döffinger R, Cancrini C, Bonnet M, Puel A, Chable-Bessia C, Yamaoka S, Feinberg J, Dupuis-Girod S, Bodemer C, Livadiotti S, Novelli F, Rossi P, Fischer A, Israël A, Munnich A, Le Deist F, Casanova JL. A hypermorphic IκBα mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. J Clin Invest. 2003;112:1108–15.

Danielian S, Oleastro M, Eva Rivas M, Cantisano C, Zelazko M.Clinical follow-up of 11 Argentinian CD40L-deficient patients with 7 unique mutations including the so-called "milder" mutants. J Clin Immunol. 2007;27:455-9.

Di Noia J, Neuberger M. Altering the pathway of immunoglobulin hypermutationby inhibiting uracil-DNA glycosylase. Nature. 2002;419: 43-8.

Di Santo J, Bonnefoy J, Gauchat J, Fischer A, Basile G. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Nature. 1993;361:541-3.

Dri P, Haas E, Cramer R, Menegazzi R, Gasparini C, Martinelli R, Scheurich P, Patriarca P. Role of the 75-kDa TNF receptor in TNF-induced activation of neutrophil respiratory burst. J Immunol. 1999;162: 460-6

Erdós M, Lakos G, Derfalvi B, Notarangelo LD, Durandy A, Maródi L. Molecular genetic analysis of Hungarian patients with the hyper-immunoglobulin M syndrome. Mol Immunol. 2008;45:278–82.

Ferrari S, Giliani S, Insalaco A, Al-Ghonaium A, Soresina A, Loubser M, Avanzini MA, Marconi M, Badolato R, Ugazio A, Levy Y, Catalan N, Durandy A, Tbakhi A, Notarangelo LD, Plebani A. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. Proc Natl Acad Sci. 2001;98:12614-9.

Fontana S, Moratto D, Mangal S, De Francesco M, Vermi W, Ferrari S, Facchetti F, Kutukculer N, Fiorini C, Duse M, Das PK, Notarangelo LD, Plebani A, Badolato R. Functional defects of dendritc cells in patients with CD40-deficiency. Blood. 2003;102:4099-106.

Francis DA, Karras JG, Ke XY, Sen R, Rothstein TL. Induction of the transcription factors NF-kappa B, AP-1 and NF-AT during B cell stimulation through the CD40 receptor. Int Immunol. 1995;7:151-61.

Freitas V, Rangel M, Bisson L, Jaeger R, Machado-Santelli G. The geodiamolide H, derived from brazilian sponge Geodia corticostylifera, regulates actin cytoskeleton, migration and invasion of breast cancer cells cultured in three-dimensional environment. J Cell Physiol. 2008;216:583-94.

Freudenthal PS, Steinman RM. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. Proc Natl. Acad Sci. 1990;87:7698–702.

Fries KM, Sempowski GD, Gaspari AA, Blieden T, Looney RJ and Phipps RP.CD40 expression by human fibroblasts. Clin Immunol Immunopathol. 1996;77:42–51.

Fujimura M. Níveis séricos das subclasses de imunoglobulina G em crianças normais e nefróticas [Tese (Doutorado)]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1991.

Fuleihan R, Ahern D, Geha RS. Expression of the CD40 ligand in T lymphocytes and induction of IgE isotype switching. Int Arch Allergy Immunol. 1995;107:43-4.

Fuleihan R, Ramesh N, Loh R, Jabara H, Rosen RS, Chatila T, Fu SM, Stamenkovic I, Geha RS. Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:2170-3.

Galy AH, Spits. HCD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. J. Immunol.1992;149:775–782.

Garber E, Su L, Ehrenfels B, Karpusas M, Hsu YM. CD154 variants associated with hyper-IgM syndrome can form oligomers and trigger CD40-mediated signals. J Biol Chem. 1999;274:33545-50.

Gauchat JF, Henchoz S, Fattah D, Mazzei G, Aubry JP, Jomotte T, Dash L, Page K, Solari R, Aldebert D. CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. Eur J Immunol. 1995;25:863-5.

Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, Aubry JP, Brunner T, Blasey H, Life P, Talabot D, Flores-Romo L, Thompson J, Kishi K, Butterfield J, Dahinden C, Bonnefoy JY. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. Nature.1993;365:340–3.

Gaweco AS, Wiesner RH, Yong S, Krom R, Porayko M, Chejfec G et al. CD40L (CD154) expression in human liver allografts during chronic ductopenic rejection. Liver Transplant Surg. 1999;5:1–7.

Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley E, Fischer A, Hammarstrom L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck JM, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. Primary immunodeficiency diseases:P An update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. J Allergy Clin Immunol. 2007;12:776-94.

Geisler C. Failure to synthesize the CD3-γ chain Consequences for TCell Antigen Receptor Assembly, Processing and Expression. J Immunol. 1992;148:2437-45.

Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, Claassen E. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic

encephalomyelitis and multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93:2499-504.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-κB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol. 1998;16: 225–260.

Gilmour KC, Walshe D, Heath S, Monaghan G, Loughlin S, Lester T, Norbury G, Cale CM. Immunological and genetic analysis of 65 patients with a clinical suspicion of X linked hyper-IgM. Mol Pathol. 2003;56:256-62.

Gordon J, Millsum MJ, Guy GR, Ledbetter JA. Resting B lymphocytes can be triggered directly through the CDw40 (Bp50) antigen. A comparison with IL-4-mediated signaling. J Immunol. 1988;140:1425-30.

Graf D, Korthäuer U, Mages HW, Senger G, Kroczek RA. Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. Eur J Immunol. 1992;22:3191-4.

Graf D, Muller S, Korthauer U, Kooten C van, Weise C and Kroczek RA. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. Eur J Immunol. 1995;25:1749–54.

Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. Science. 1999;Jul 9;285:221-7.

Grammer AC, Bergman MC, Miura Y, Fujita K, Davis LS, Lipsky PE. The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses. J Immunol. 1995;154:4996-5010.

Grewal I, Foellmer H, Grewal K, Xu J, Hardardottir F, Baron J, Janeway C, Flavell R. Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. Science. 1996;273:1864-7.

Grewal IS, Xu J, Flavell RA. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. Nature. 1995;378:617-20.

Griggs N, Agersborg S, Noelle R, Ledbetter J, Linsley P, Tung K. The relative contribution of the CD28 and gp39 costimulatory pathways in the clonal expansion and pathogenic acquisition of self-reactive T cells. J Exp Med. 1996;183:801-10.

Harmsen AG, Chen W, Gigliotti F. Active immunity to Pneumocystis carinii reinfection in T-cell-depleted mice. Infect Immun. 1995;63:2391-5.

Hayashi T, Rao S, Meylan P, Kornbluth R, Catanzaro A. Role of CD40 ligand in Mycobacterium avium infection. Infect Immun 1999;67:3558-65.

Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczek RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature. 1998;391:591-4.

Hirohata S, Jelinek D, Lipsky PE. T-cell dependent activation of B cell proliferation and differentiation by immobilized monoclonal antibodies to CD3. J Immunol. 1988;140:3736–44.

Holder MJ, Liu YJ, Defrance T, Flores-Romo L, MacLennan IC, Gordon J. Growth factor requirements for the stimulation of germinal center B cells: evidence for an IL-2-dependent pathway of development. Int Immunol. 1991;3:1243-51.

Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD, Chalupny NJ, Braesch-Andersen S, Noelle RJ, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. EMBO J. 1992;11:4313–21.

Holmes B, Page A, Good R. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. J Clin Invest. 1967;46:1422-32.

Holmes, B, Quie, P, Windhorst D, Good A. Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. Lancet. 1966;1:1225-8.

Hu HM, O'Rourke K, Boguski MS, Dixit VM. A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. J Biol Chem. 1994;269: 30069-72.

Imai K, Catalan N, Plebani A, Marodi L, Sanal O, Kumaki S, Nagendran V, Wood P, Glastre C, Sarrot-Reynauld F, Hermine O, Forveille M, Revy P, Fischer A, Durandy A. Hyper-IgM syndrome type 4 with a B lymphocyte-intrinsic seletive deficiency in Ig class-switch recombination. J Clin Invest. 2003;12:136-42.

Indzhiia LV, Yakovleva LA, Overbaugh J, Licciardi KA, Chikobava MG, Klotz IN et al. Baboon T cell lymphomas expressing the B cell-associated surface proteins CD40 and Bgp95. J Clin Immunol. 1992;12:225–36.

Iseki M, Anzo M, Yamashita N, Matsuo N. Hyper-IgM immunodeficiency with disseminated cryptococcosis. Acta Paediatr. 1994;83:780-2.

Israel A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-κB? Trends Cell Biol. 2000;10:129–33.

Jabara HH, Brodeur SR, Geha RS. Glucocorticoids upregulate CD40 ligand expression and induce CD40L-dependent immunoglobulin isotype switching. J Clin Invest. 2001;107:371-8.

Jain A, Atkinson T, Lipsky P, Slater J, Nelson D, Strober W. Defects of T-cell effector function and post-thymic maturation in X-linked hyper-IgM syndrome. J Clin Invest. 1999;103:1151-8.

Jain A, Ma CA, Liu S, Brown M, Cohen J, Strober W. Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohydrotic ectodermal dysplasia. Nat Immunol. 2001;2:223-38.

Johnson-Leger C, Christensen J and Klaus GG. CD28 co-stimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells. Int Immunol. 1998;10:1083–91.

Kamanaka M, Yu P, Yasui T, Yoshida K, Kawabe T, Horii T, Kishimoto T, Kikutani H. Protective role of CD40 in Leishmania major infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. Immunity. 1996;4:275-81.

Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:4342-6.

Kavli B, Andersen S, Otterlei M, Liabakk NB, Imai K, Fischer A, et al. B cells from hyper-IgM patients carrying UNG mutations lack ability to remove uracil from ssDNA and have elevated genomic uracil. J Exp Med. 2005;201:2011-21.

Kennedy MK, Picha KS, Fanslow WC, Grabstein KH, Alderson MR, Clifford KN et al. CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages. Eur J Immunol. 1996;26:370–8.

Khan SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, et al. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusionrelated acute lung injury. Blood. 2006;108:2455−62.

Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. J Immunol. 1995;155: 4917-25.

Koho H, Paulie S, Ben-Aissa H, Jónsdóttir I, Hansson Y, Lundblad ML, Perlmann P. Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. I. Determination of the selectivity of six antibodies by cell ELISA and immunofluorescence. Cancer Immunol Immunother. 1984;17:165-72.

Korthäuer U, Graf D, Mages H, Brière F, Padayachee M, Malcolm S, Ugazio A, Notarangelo L, Levinsky R, Kroczek R. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Nature. 1993;11:539-41.

Krantman HJ, Stiehm ER, Stevens RH, Saxon A, Seger RC. Abnormal B cell differentiation and variable increased T cell supression in immunodeficiency with hyper-IgM. Clin Exp Immunol. 1980;40:147-56.

Krummel M, Allison J. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. J Exp Med. 1995;182:459-65.

Kuppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky, K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. EMBO J. 1993;12:4955–67.

Kvaloy K, Nilsen H, Steinsbekk KS, Nedal A, Monterotti B, Akbari M, Krokan HE. Sequence variation in the human uracil-DNA glycosylase (UNG) gene. Mutat Res. 2001;461:325-38.

Lai JH, Tan TH. CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I kappa B alpha which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin. J Biol Chem. 1994;269:30077-80.

Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. Nature.1996;381:434–8.

Lazaar AL, Amrani Y, Hsu J, Panettieri RA Jr, Fanslow WC, Albelda SM, Puré E. CD40-mediated signal transduction in human airway smooth muscle. J Immunol. 1998;161:3120–7.

Lederman S, Yellin MJ, Inghirami G, Lee JJ, Knowles DM, Chess L. Molecular interactions mediating T–B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell- B-cell-activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help. J Immunol. 1992a;149:3817–26.

Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L. Identification of a novel surface protein on activated CD4þ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). J Exp Med 1992b;175:1091–101.

Lee W, Torgerson T, Schumacher M, Yel L, Zhu Q, Ochs HD. Molecular analysis of a large cohort of patients with the hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome. Blood. 2005;105:1881-90.

Lesley R, Kelly LM, Xu Y, Cyster JG. Naive CD4 T cells constitutively express CD40L and augment autoreactive B cell survival. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006. 103:10717-22.

Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P, Resnick I, Fasth A, Baer M, Gomez L, Sanders EA, Tabone MD, Plantaz D, Etzioni A, Monafo V, Abinun M, Hammarstrom L, Abrahamsen T, Jones A, Finn A, Klemola T, DeVries E, Sanal O, Peitsch MC, Notarangelo LD.. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM sidrome. J Pediatr. 1997; 131:47-54.

Life P, Gauchat JF, Schnuriger V, Estoppey S, Mazzei G, Durandy A, Fischer A, Bonnefoy JY. T cell clones from an X-linked hyper-immunoglobulin (IgM) patient induce IgE synthesis in vitro despite expression of nonfunctional CD40 ligand. J Exp Med. 1994;180:1775–84.

Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. DCs induce CD40 independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. Nat Immunol. 2002;3:822-9.

Liu Z, Colpaert S, D'Haens GR, Kasran A, de Boer M, Rutgeerts P, Geboes K, Ceuppens JL. Hyperexpression of CD40 ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production. J Immunol. 1999;163:4049-57.

Liu, YJ, Joshua, DE, Williams, GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan I. C., Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. Nature. 1989.342:929–31.

Macchi P, Villa A, Strina D, Sacco MG, Morali F, Brugnoni D, Giliani S, Mantuano E, Fasth A, Andersson B, et al. Characterization of nine novel mutations in the CD40 ligand gene in patients with X-linked hyper IgM syndrome of various ancestry. Am J Hum Genet. 1995;56:898-906.

Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. Nature. 1998;Jul 9;394:200-3.

Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:1931-6.

Mackey MF, Gunn JR, Ting PP, Kikutani H, Dranoff G, Noelle RJ, Barth RJ Jr. Protective immunity induced by tumor vaccines requires interaction between CD40 and its ligand, CD154. Cancer Res. 1997; 1;57:2569-74.

Maniatis T. A ubiquitin ligase complex essential for the NF-κB,Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. Genes Dev. 1999;13:505–10.

Manis JP, Tian, M, Alt, FW. Mechanism and control of class-switch recombination. Trends Immunol. 2002;23:31–9.

Marriott I, Hammond TG, Thomas EK, Bost KL. Salmonella efficiently enter and survive within cultured CD11c+ dendritic cells initiating cytokine expression. Eur J Immunol. 1999; 29:1107-15.

Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell. 2001;106:255-8.

Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell independent antigens type 2. Annu Rev Immunol. 1995;13:655–92.

Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. Nature.1998; 395:82-86.

Muramatsu M, Notarangelo LD, Kinoshita K, Honjo T, Fischer A, Durandy A. Activation induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autossomal recessive form of the hyper- IgM syndrome (HIGM2). Cell. 2000;102:565-75.

Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO, Honjo T. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. J Biol Chem. 1999;274: 18470-6.

Murray HW. Cytokines as antimicrobial therapy for the T cell-deficient patient: prospects for treatment of nonviral opportunistic infections. Clin Infect Dis. 1993;2: 407-13.

Murray, HW, Hariprashad J, Aguero B, Arakawa T, Yeganegi H. Antimicrobial response of a T cell-deficient host to cytokine therapy: effect of interferon-gamma in experimental visceral leishmaniasis in nude mice. J Infect Dis. 1995;171:1309-16.

Netea M, Meer J, Verschueren I, Kullberg B. CD40/Cd40 ligand interactions in the host defense against disseminated Cândida albicans

infection: the role of macrophage-derived nitric oxide. Eur J Immunol. 2002;32:1455-63.

Newburger PE, Ezekowitz RA. Cellular and molecular effects of recombinant interferon gamma in chronic granulomatous disease. Hematol Oncol Clin North Am. 1988; 2: 267-76.

Newburger, P. E., Dai, Q., Whitney, C. In vitro regulation of human phagocyte cytochrome b heavy and light chain gene expression by bacterial lipopolysaccharide and recombinant human cytokines. J Biol Chem. 1991;266:16171-7.

Noelle RJ, Roy M, ShepherdDM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. A 39 kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. Proc Natl Acad Sci USA.1992;89:6550–54.

Nonoyama S, Shimadzu M, Toru H, Seyama K, Nunoi H, Neubauer M, Yata J, Och HD. Mutations of the CD40 ligand gene in 13 Japanese patients with X-linked hyper-IgM syndrome. Hum Genet. 1997;99:624-7.

Notarangelo LD, Duse M, Ugazio A. Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). Immunodeficiency Rev. 1992;3:101-21.

Notarangelo LD, Paroli O, Albertini A, Duse M, Mazzolari E, Plebani A, et al. Analysis of X-chromossome inactivation in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1): evidence for involvement of different hematopietic cell lineages. Hum Genet. 1991;8:103-34.

Notarangelo LD, Peitsch MC. CD40Lbase: a database of CD40L gene mutations causing X linked hyper IgM syndrome. Immunol Today. 1996;17: 511-6.

Nusslein HG, Frosch KH, Woith W, Lane P, Kalden JR and Manger B. Increase of intracellular calcium is the essential signal for the expression of CD40 ligand. Eur J Immunol. 1996;26:846–50.

O'Gorman MR, Zaas D, Paniagua M, Corrochano V, Scholl PR, Pachman LM. Development of a Rapid Whole Blood Flow Cytometry Procedure for the Diagnosis of X-Linked Hyper-IgM Syndrome Patients and Carriers. Clin Immunol. 1997;5:172-81.

Ohkawara Y, Lim KG, Xing Z, Glibetic M, Nakano K, Dolovich J, et al. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. J Clin Invest. 1996;97:1761–6.

Oliveira R, Machado-Santelli G. Cytoskeletal and nuclear alterations in human lung tumor cells: a confocal microscope study. Histochem Cell Biol. 2001;115:403–11.

Paganelli R, Scala E, Ansotegui IJ, Ausiello CM, Halapi E, Fanales-Belasio E, et al. CD8+ T lymphocytes provide helper activity for IgE synthesis in human immunodeficiency virus-infected patients with hyper- IgE. J Exp Med. 1995;181:423–28.

Pascual-Salcedo D, de la Concha EG, Garcia-Rodriguez MC, Zabay JM, Sainz T, Fontan G. Cellular basis of hyper IgM immunodeficiency. J Clin Lab Immunol. 1983;10:29-34.

Petersen S, Casellas R, Reina-San-Martin B, Chen HT, Difilippantonio MJ, Wilson PC, et al. AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. Nature. 2001;414:660-5.

Pinchuk LM, Klaus SJ, Magaletti DM, Pinchuk GV, Norsen JP, Clark EA. Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. J Immunol. 1996;157:4363–70.

Prasad M, Velickovic M, Weston SA, Benson E. Mutational screening of the CD40 ligand (CD40L) gene in patients with X linked hyper-IgM syndrome (XHIM) and determination of carrier status in female relatives. J Clin Pathol. 2005; 58:90-92.

Quartier P, Bustamante J, Sanal O, Plebani A, Debre M, Deville A, Litzman J, Levy J, Fermand JP, Lane P, Horneff G, Aksu G, Yalcin I, Davies G, Tezcan I, Ersoy F, Catalan N, Imai K, Fischer A, Durandy A. Clinical, immunologic and genetic analisys of 29 patients with autosomal recessive hyper-IgM symdrome due to Activation-Induced Cytidine Deaminase deficiency. Clin Immunol. 2004;110:22-9.

Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. Nature 1996. 381:751–8.

Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, et al. Activation induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autossomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). Cell. 2000; 102:565-75.

Rosen FS, Kevy SV, Merler E, Janeway CA, Gitlin D. Recurent bacterial infections and dysgammaglobulinemia: deficiency of 7S gammaglobulins in the presenceof elevated 19S gammaglobulins. Pediatrics. 1961;28: 182-95.

Rothman P, Li SC, Alt FW. The molecular events in heavy chain class-switching. Semin Immunol. 1989; Sep;1(1):65-77.

Rothoeft T, Balkow S, Krummen M, Beissert S, Varga G, Loser K, Oberbanscheidt P, Boom FV, Grabbe S. Structure and duration of contact between dendritic cells and T cells are controlled by T cell activation state. Eur J Immunol. 2006;36:3105-17.

Roy M, Waldschmidt T, Aruffo A, Ledbetter J, Noelle R. The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells. J Immunol. 1993;151:2497–510.

Sad S, Krishnan L, Bleackley RC, Kagi D, Hengartner H, Mosmann TR. Cytotoxicity and weak CD40 ligand expression of CD8+ type 2 cytotoxic T cells restricts their potential B cell helper activity. Eur J Immunol. 1997;27:914–22.

Saeland S, Duvert V, Caux C, Pandrau D, Farve C, Valle A, et al. Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34+ hematopoietic cells. Exp Hematol. 1990;20:24–33.

Schrader CE, Linehan EK, Mochegova SN, Woodland RT, Stavnezer J. Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. J Exp Med. 2005;202:561-8.

Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. J Biol Chem. 1992; 267: 5317-23.

Seyama K, Kira S, Ishidoh K, Souma S, Miyakawa T, Kominami E. Genomic structure and PCR-SSCP analysis of the human CD40 ligand gene: its application to prenatal screening for X-linked hyper-IgM syndrome. Hum Genet. 1996;97:180-5.

Seyama K, Nonoyama S, Gangsaas I, Hollenbaugh D, Pabst HF, Aruffo A, Ochs HD. Mutations of the CD40 ligand gene and its effect on CD40 ligand expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome. Blood. 1998;92:2421-34.

Shu U, Kiniwa M, Wu CY, Maliszewski C, Vezzio N, Hakimi J, Gately M, Delespesse G. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. Eur J Immunol. 1995; Apr;25:1125-8.

Simonte P, Cunninghan-Rundles C. Update on primary Immunodeficiency: Defects of Lynphocytes. Clin Immunol. 2003;109: 109-18.

Snapper CM, Marcu KB, Zelazowski P. The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility". Immunity. 1997;6(3):217-23.

Stavnezer J. Molecular processes that regulate class switching. Curr Top Microbiol Immunol. 2000;245:127-68.

Stieham ER, Fudenberg HH. Clinical and immunologic features of dysgammaglobulinemia Type I: report of a case diagnosed in the first year of life. Am J Med. 1966;40:805-15.

Stout RD, Suttles J. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. Immunol Today. 1996;17:487-92.

Szomolanyi-Tsuda E, Brien JD, Dorgan JE, Garcea RL, Woodland RT, Welsh RM. Antiviral T-cell-independent type 2 antibody responses induced in vivo in the absence of T and NK cells. Virology. 2001;280:160–8.

Thusberg J, Vihinen M. The structural basis of hyper IgM deficiency - CD40L mutations. Protein Eng Des Sel. 2007;20:133-41.

Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. Blood. 1994;84:4008-27.

Valent P, Majdic O, Maurer D, Bodger M, Muhm M and Bettelheim P. Further characterization of surface membrane structures expressed on human basophils and mast cells. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1990; 91:198–203.

Vanichakarn P, Blair P, Wu C, Freedman J, Chakrabarti S. Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation. Thrombosis Res. 2008; In press.

Villa A, Notarangelo LD, Di Santo JP, Macchi PP, Strina D, Frattini A, Lucchini F, Patrosso CM, Giliani S, Mantuano E, Agosti S, Nocera G, Kroczek RA, Fisher A Ugazio AG, Basile GDS, Vezzoni . Organization of the human CD40L gene: implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:2110-4.

Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. Immunol Rev. 2000;176:154–70.

Walunas T, Bakker C, Bluestone J. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. J Exp Med. 1996;183:2541-50.

Ware CF, Crowe PD, Vanarsdale TL, Andrews JL, Grayson MH, Jerzy R, Smith CA, Goodwin RG. Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes: differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. J Immunol. 1991;147:4229–38.

Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R. Biologia Molecular do Gene. 5. ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2006.

Werling, D, Hope, JC, Howard CJ, Jungi TW. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. Immunology. 2004;111:41-52.

Wiley J, Harmsen A. CD40 ligand is required for resolution of Pneumocystis carinii pneumonia in mice. J Immunol. 1995;155:3525-29.

Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, Ahrens I, Ernst S, Bassler N, Missiou A, Patko Z, Aikawa M, Schönbeck U, Bode C, Libby P, Peter K. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. Circulation. 2007; Mar 27;115:1571-80.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo