

JULIETA GENRE

Avaliação da população de linfócitos CD4⁺ com potencial regulador em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável e Deficiência Seletiva de Imunoglobulina A

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

SÃO PAULO
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JULIETA GENRE

Avaliação da população de linfócitos CD4⁺ com potencial regulador em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável e Deficiência Seletiva de Imunoglobulina A

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Luiz Vicente Rizzo

SÃO PAULO
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Genre, Julieta.

Avaliação da população de linfócitos CD4⁺ com potencial regulador em pacientes com imunodeficiência comum variável e deficiência seletiva de imunoglobulina A / Julieta Genre. -- São Paulo, 2010.

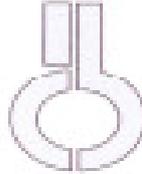
Orientador: Luiz Vicente Rizzo.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunodeficiências.

Versão do título para o Inglês: Evaluation of the population of CD4⁺ lymphocytes with regulatory properties in patients with common variable immunodeficiency and selective immunoglobulin A deficiency.

Descritores: 1. Imunodeficiência comum variável 2. Deficiência seletiva de imunoglobulina 3. Auto-imunidade 4. Atoalias 5. Células T reguladoras 6. Foxp3 I. Rizzo, Luiz Vicente II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/88/8073/2010



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cap. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7133 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail:icb@icb.usp.br

São Paulo, 30 de maio de 2005.

PARECER 651/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua quinquagésima quinta reunião, realizada no dia 25-maio-2005, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Caracterização de mecanismos reguladores em pacientes com deficiência seletiva de IgA e pacientes com imunodeficiência comum e variável*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**, com as recomendações que sejam feitas revisões no português e descrever melhor as deficiências.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilma. Sra.
JULIETA GENRE
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Meus mais profundos agradecimentos...

Ao Prof. Luiz Vicente Rizzo, por ter me dado a oportunidade de realizar meu doutorado sob a sua orientação e pela confiança no meu trabalho. Obrigada pela paciência e por ter sempre tempo para conversar comigo.

Às Doutoras Cristina Kokron e Myrthes-Toledo Barros, que acompanharam cuidadosamente os pacientes envolvidos neste estudo e forneceram os dados clínicos, fazendo possível a realização deste trabalho.

Aos enfermeiros Serafim Fidalgo e Rosana Vieira Coutinho, por realizar responsavelmente a coletas das amostras dos pacientes.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Jean, Eliana, Wesley, Alessandra, Natália, Tatiana, Rafael, Luiz e Thais, por toda a ajuda recebida, carinho e lindos momentos compartilhados durante estes cinco anos.

Aos meus grandes amigos Ângela, Paulo, Walmir, Gisele e Laudicéia. Não tenho palavras para agradecer toda a ajuda brindada. Obrigada pela lealdade e por estarem sempre presentes!

Aos meus amigos "Físicos" Mario, Milton e Ivan, pela extraordinária companhia nas sextas-feiras "gastronômico-éticas".

À Chris, por ter sido mais do que uma colega de laboratório. Seu apoio foi fundamental, sem ele eu não teria conseguido chegar até aqui. Adoro você!

Aos Prof. Antonio Condino Neto e Niels Olsen Câmara Saraiva, por manter as portas de seus laboratórios sempre abertas e pelas valiosas contribuições ao meu aprendizado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunologia Humana, Ângela, Paulo, Éric, Walmir, Otávio, Josias, Edgar, Marília, Luis "Mateu", Patricia e Stefanie, por terem me acolhido em todos os momentos em que precisei e pela amizade.

À Dra. Megan Levings, pelo entusiasmo com o qual me recebeu em seu laboratório. Conhecer-la foi sem dúvida uma experiência essencial para o meu amadurecimento científico e pessoal.

À Jana, Shawn, Jessy, Rosita, Alicia, Scott e Higs por terem sido mais que colegas de laboratório, pelas discussões científicas, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao Ronaldo, meu grande amor. Você transformou a minha vida e deu asas aos meus sonhos. Não imagino a minha vida sem você do meu lado...

Aos meus pais, Norberto e Estela, e à minha querida irmã, Fernanda, pois, apesar da distância, sempre estão presentes em todos os momentos importantes da minha vida.

Ao Prof. Gustavo Amarante-Mendes, por toda a ajuda brindada e pela amizade.

À Áurea, Otacílio, Milton e Roberto, pelos sorrisos de todas as manhãs e cafezinhos gostosos que espantaram o meu sono.

Aos coordenadores da pós-graduação, por me permitirem realizar a defesa desta tese na data prevista.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela eficiência dos seus serviços e excelente tratamento dado aos alunos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de Doutorado.

“... Cambia lo superficial, cambia también lo profundo,
cambia el modo de pensar, cambia todo en este mundo...
...Lo que cambió ayer tendrá que cambiar mañana,
así como cambio yo en esta tierra lejana...”

Mercedes Sosa

RESUMO

GENRE, J. Avaliação da população de linfócitos CD4⁺ com potencial regulador em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável e Deficiência Seletiva de Imunoglobulina A. p115. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A Imunodeficiência Comum Variável (ICV) e a Deficiência Seletiva de Imunoglobulina A (DIgA) são as imunodeficiências primárias humorais de maior frequência na população mundial. Ambas as doenças são caracterizadas pela ausência ou redução significativa de imunoglobulinas no soro. Embora diversas anormalidades imunológicas tenham sido associadas a estas doenças, nenhuma hipótese unificadora a respeito das bases moleculares da ICV e DIgA foi proposta até o presente momento, sendo que o único defeito comum a todos os pacientes é a falha na diferenciação de células B em plasmócitos e conseqüente secreção de anticorpos. A hipogamaglobulinemia explica a conseqüente maior susceptibilidade a infecções recorrentes dos tratos respiratórios e gastrointestinais causada por patógenos capsulados. No entanto, as causas do surgimento de outros sintomas tão importantes quanto estes, principalmente doenças auto-imunes e atopias, são pouco compreendidas. Embora fundamentalmente caracterizada pela hipogamaglobulinemia, acredita-se que a ICV possa estar associada ao repertório de células T, uma vez que foram descritos defeitos relacionados a esta população linfocitária. Foi sugerida a existência de uma etiologia comum para ICV e DIgA, representando a ICV o estágio final de evolução de uma deficiência humoral progressiva. Devido à alta incidência de auto-imunidade e alergia em pacientes com ICV e DIgA, a investigação da população de células T reguladoras em pacientes com estas patologias foi considerada de interesse. No presente trabalho, visamos analisar por citometria de fluxo a população de linfócitos CD4⁺ com potencial regulador em pacientes com ICV e DIgA, para avaliar se defeitos quantitativos nesta população poderia explicar a alta incidência de doenças auto-imunes ou alérgicas associadas a estas imunodeficiências. Indivíduos com ICV apresentaram frequências reduzidas de células CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ circulantes no sangue, principalmente os pacientes com doença auto-imune. A intensidade de fluorescência média (IFM) de Foxp3 na população CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ mostrou uma estratificação dos pacientes em função da presença ou ausência de auto-imunidade, o que poderia ter um valor diagnóstico. No entanto, a mesma

análise em relação à presença ou ausência de atopias não mostrou diferenças estatisticamente significativas. Esses dados foram confirmados por PCR em tempo real. De maneira similar à ICV, a avaliação das populações $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ e $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ em indivíduos com DIgA mostraram-se reduzidas, mesmo não havendo diferenças na porcentagem de células $Foxp3^+$ nem na IFM de $Foxp3$ nessas populações em relação aos indivíduos controles. Não foram observadas diferenças em relação a estes parâmetros quando os pacientes foram avaliados em função da presença ou ausência de doenças auto-imunes ou atópicas. Finalmente, a avaliação da produção de citocinas do perfil Th2 das células mononucleares do sangue de pacientes com ICV e DIgA pelo método ELISA mostrou correlação com o estado hipogamaglobulinêmico.

Palavras-chave: Imunodeficiência Comum Variável. Deficiência Seletiva de Imunoglobulina A. Auto-imunidade. Atopias. Células T reguladoras. $Foxp3$.

ABSTRACT

GENRE, J. Evaluation of the population of CD4⁺ lymphocytes in patients with Common Variable Immunodeficiency and Selective Immunoglobulin A Deficiency. p115. Thesis (Ph.D. in Immunology) – Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

Common Variable Immunodeficiency (CVID) and Selective Immunoglobulin A Deficiency (IgAD) are humoral primary immunodeficiencies with the highest incidence in the population. Both diseases are characterized by the absence or significant reduction of serum immunoglobulins. Although several immunological abnormalities have been associated with these diseases, no unifying hypothesis regarding the molecular basis of CVID and IgAD have been proposed to date, and the only defect common to all patients is a failure in differentiation of B cells into plasma cells and subsequent secretion of antibodies. The hypogammaglobulinemia explains the increased susceptibility to infections of the respiratory and gastrointestinal tracts caused by encapsulated pathogens. However, the causes of the emergence of other symptoms, especially autoimmune diseases and atopy are poorly understood. Although mainly characterized by hypogammaglobulinemia, it is believed that CVID can be associated with the repertoire of T cells, since defects in this population have been reported. Noteworthy, it was suggested the existence of a common etiology for CVID and IgAD, representing CVID the final stage of a progressive humoral immunodeficiency. Due to the high incidence of autoimmunity and allergy in patients with CVID and IgAD, the investigation of the population of regulatory T cells in patients with these disorders was considered of interest. In this work, we analyzed by flow cytometry the population of CD4⁺ lymphocytes with regulatory potential in patients with CVID and IgAD, to assess if quantitative defects in this regulatory population could explain the high incidence of autoimmune diseases or atopy associated with these immunodeficiencies. Individuals with CVID showed decreased frequencies of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ circulating in the blood, especially patients with autoimmune disease. The mean fluorescence intensity (MFI) of Foxp3 in the CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ population showed a stratification of patients according to presence or absence of autoimmunity, which could have a diagnostic value. However, the same analysis for the presence or absence of atopic diseases showed no statistically significant differences. These data were confirmed by real time PCR. Similarly to the CVID, CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺CD127^{low} populations in individuals with IgAD were

reduced, even no differences in the percentage of Foxp3⁺ cells nor in the MFI of Foxp3 in these populations were seen compared to controls. In addition, there were no differences in these parameters when patients were analyzed according to the presence or absence of autoimmune disease or atopy. Finally, the evaluation of Th2 cytokine production by peripheral mononuclear cells of patients with CVID and IgAD by ELISA correlated with the hypogammaglobulinic state of those individuals.

Keywords: Common Variable Immunodeficiency. Selective IgA Deficiency. Autoimmunity. Atopy. Regulatory T cells. Foxp3.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – “Allophycocyanin”

APRIL - “A proliferation-inducing ligand”

BAFF - “B cell-activating factor of the TNF family-“

BAFFR - “B cell-activating factor receptor”

BCMA - “B cell maturation protein A”

BLIMP - “B-lymphocyte-induced maturation protein 1”

CD127 - Cadeia alfa do receptor da interleucina-7

CD - “Cluster of differentiation”

CD127^{low} - baixa expressão do marcador CD127

CD25 – Cadeia alfa do receptor da interleucina-2

CD25^{high} – alta expressão do marcador CD25

DAI - Doença auto-imune

DlgA - Deficiência Seletiva de Imunoglobulina A

DNAc - Ácido desoxirribonucléico complementar

ELISA - “Enzyme-linked immunosorbent assay”

FITC – “Fluorescein isothiocyanate”

Foxp3 - “Forkhead Box P3”

ICOS - “Inducible costimulator”

ICV - Imunodeficiência Comum Variável

IFM - intensidade de fluorescência média

IgA - Imunoglobulina A

IgD - Imunoglobulina D

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

Igs - Imunoglobulinas

IL- Interleucina

IPEX – “Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome”

IVIg - Imunoglobulina endovenosa

LES – Lupus Eritematoso Sistêmico

mAc- Anticorpo monoclonal

NK - “Natural Killer”

PBMC - Células mononucleares do sangue

PE - “Phycoerythrin”

PerCP - “Peridinin chlorophyll protein”

RNA_m - Ácido ribonucléico mensageiro

TACI - “Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor”

Th1 - Linfócito T auxiliar tipo 1

Th2 - Linfócito T auxiliar tipo 2

TNF - “Tumor necrosis factor”

TRECs – Círculos excisados do receptor de células T

Tregs - Célula T reguladoras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégias de análise por citometria de fluxo das diferentes populações linfocitárias em indivíduos controles e pacientes com ICV e DIgA.....	50
Figura 2. Estratégias de análise por citometria de fluxo das populações linfocitárias com potencial regulador em indivíduos controles e paciente com ICV e DIgA.....	52
Figura 3. Freqüência das diferentes subpopulações linfocitárias no sangue de indivíduos controles e pacientes com ICV.....	58
Figura 4. Avaliação por citometria de fluxo da população linfocitária CD4 ⁺ CD25 ^{HIGH} Foxp3 ⁺ em indivíduos controles e pacientes com ICV, com ou sem doença auto-imune.....	61
Figura 5. Avaliação por citometria de fluxo da população linfocitária CD4 ⁺ CD25 ^{HIGH} Foxp3 ⁺ em indivíduos controles e pacientes com ICV, com ou sem sintomas alérgicos.....	62
Figura 6. Análise dos níveis de expressão do RNAm em indivíduos controles e pacientes com ICV de <i>FOXP3</i> por PCR em tempo real.....	64
Figura 7. Análise da produção de citocinas em indivíduos controles e pacientes com ICV através do método ELISA.....	65
Figura 8. Freqüência das diferentes subpopulações linfocitárias no sangue de indivíduos controles e pacientes com DIgA.....	67
Figura 9. Avaliação por citometria de fluxo da população linfocitária CD4 ⁺ CD25 ^{HIGH} Foxp3 ⁺ em indivíduos controles e pacientes com DIgA, com ou sem doença auto-imune.....	69
Figura 10. Avaliação por citometria de fluxo da população linfocitária CD4 ⁺ CD25 ^{HIGH} Foxp3 ⁺ em indivíduos controles e pacientes com DIgA, com ou sem atopia.....	70
Figura 11. Análise da população linfocitária CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{Low} em indivíduos controles e pacientes com DIgA, com ou sem doença auto-imune.....	73
Figura 12. Análise da população linfocitária CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{Low} em indivíduos controles e pacientes com DIgA, com ou sem atopia.....	75
Figura 13. Análise da produção de citocinas em indivíduos controles e pacientes com DIgA através do método ELISA.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis normais de referência de Imunoglobulinas conforme estabelecido pela Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....	39
Tabela 2 - Características gerais dos grupos de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) e Controles recrutados para o estudo.....	39
Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) recrutados para o estudo.....	40
Tabela 4 - Características gerais dos grupos de pacientes com Deficiência Seletiva de IgA (DIgA) e Controles recrutados para o estudo.....	42
Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes com Deficiência Seletiva de IgA (DIgA) recrutados para o estudo.....	43
Tabela 6 - Painéis de anticorpos monoclonais utilizados para avaliação das diferentes populações linfocitárias através de citometria de fluxo.	47
Tabela 7 - Níveis normais de referência de marcadores das diferentes populações linfocitárias conforme estabelecido pela Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 SISTEMA IMUNE E IMUNODEFICIÊNCIAS.....	19
1.2 IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL.....	19
1.3 DEFICIÊNCIA SELETIVA DE IMUNOGLOBULINA A.....	28
1.4 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA.....	32
1.5 ICV, DIgA E TREGS	35
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVOS GERAIS	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 PACIENTES.....	38
3.1.1 Critérios para o diagnóstico de infecções de repetição	44
3.1.2 Critérios para o diagnóstico de doença atópica	44
3.1.3 Critérios para o diagnóstico de doença auto-imune	45
3.2 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE VENOSO.....	45
3.3 MARCAÇÃO COM ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	46
3.4 PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DAS DIFERENTES POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	47
3.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS ATRAVÉS DO MÉTODO ELISA.....	53
3.6 EXTRAÇÃO DE RNAm.....	54
3.7 SÍNTESE DO DNAc COM ELIMINAÇÃO DO DNA CONTAMINANTE.....	54
3.8 PCR EM TEMPO REAL DO GENE FOXP3.....	55
3.9 ESTATÍSTICA.....	55
3.10 LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO DOS EXPERIMENTOS.....	55
4 RESULTADOS	57
4.1 IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL.....	57

4.1.1	<i>Freqüência das diferentes subpopulações linfocitárias no sangue de pacientes com ICV.....</i>	57
4.1.2	<i>Freqüência de células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ em pacientes com ICV.....</i>	59
4.1.3	<i>Intensidade de fluorescência média de Foxp3 na população CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ em pacientes com ICV.....</i>	63
4.1.4	<i>Expressão do transcrito do gene FOXP3 em células mononucleares do sangue de pacientes com ICV.....</i>	63
4.1.5	<i>Avaliação da produção de citocinas pelas células mononucleares do sangue de pacientes com ICV.....</i>	64
4.2	DEFICIÊNCIA SELETIVA DE IMUNOGLOBULINA A	66
4.2.1	<i>Freqüência das diferentes subpopulações linfocitárias no sangue de pacientes com DlgA.....</i>	66
4.2.2	<i>Freqüência de células CD4⁺CD25^{High}Foxp3⁺ em pacientes com DlgA.....</i>	68
4.2.3	<i>Intensidade de fluorescência média de Foxp3 na população CD4⁺CD25^{High}Foxp3⁺ em pacientes com DlgA.....</i>	71
4.2.4	<i>Freqüência de células CD4⁺CD25⁺CD127^{Low} em pacientes com DlgA.....</i>	71
4.2.5	<i>Intensidade de fluorescência média de Foxp3 na população CD4⁺CD25⁺CD127^{Low} em pacientes com DlgA.....</i>	76
4.2.6	<i>Freqüência de células Foxp3⁺ na população CD4⁺CD25⁺CD127^{Low} em pacientes com DlgA.....</i>	76
4.2.7	<i>Avaliação da produção de citocinas pelas células mononucleares do sangue de pacientes com DlgA.....</i>	76
5	DISCUSSÃO.....	79
6	CONCLUSÕES.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	ANEXOS.....	108
	ANEXO A – Artigo publicado.....	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA IMUNE E IMUNODEFICIÊNCIAS

A integridade do sistema imune é essencial para a defesa contra microorganismos infecciosos e seus produtos tóxicos e a conseqüente sobrevivência do indivíduo. Dessa maneira, defeitos em um ou mais componentes do sistema imune podem conduzir ao surgimento de doenças muito graves, usualmente fatais. Estas desordens do sistema imunológico são amplamente classificadas em duas categorias: 1) As imunodeficiências primárias ou congênitas, que são conseqüência de defeitos nos genes que dão origem aos diversos componentes do sistema imune, e 2) As imunodeficiências secundárias ou adquiridas, que se desenvolvem como resultado de má nutrição, câncer, tratamento com drogas imunossupressoras e infecção das células do sistema imune (ABBAS, A. K. *et al.*, 2000).

Dentro da categoria das imunodeficiências primárias, a expressão anormal de mais de 120 genes têm sido correlacionada com aproximadamente 150 doenças, afetando diferentes componentes da imunidade inata e adaptativa, tais como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, proteínas do complemento, células *natural killers* (NK) e linfócitos (GEHA, R. S. *et al.*, 2007). O estudo das bases genético-moleculares das imunodeficiências primárias, além de ter contribuído para uma melhor compreensão do funcionamento do sistema imune, permite um diagnóstico mais preciso dos indivíduos afetados e possibilita a investigação de novas estratégias de tratamento como a terapia gênica.

As imunodeficiências primárias nas quais a função linfocitária está comprometida podem ser classificadas em três categorias: a) imunodeficiências humorais, nas quais o defeito imunológico afeta seletivamente a produção de anticorpos enquanto que a imunidade mediada por células se encontra intacta; b) deficiências celulares, nas quais a produção de anticorpos é normal e os mecanismos celulares efetores se encontram comprometidos; e c) imunodeficiências combinadas, nas quais ambos os mecanismos da imunidade específica encontram-se afetados (BONILLA, F. A. e GEHA, R. S., 2003).

Como grupo, as deficiências de anticorpos representam o tipo de imunodeficiência primária mais freqüentemente diagnosticado, correspondendo a 65% dos casos. O espectro

de deficiência de anticorpos é amplo podendo, em alguns casos, haver desde uma ausência total de células B e redução severa de imunoglobulinas no soro até deficiência de uma subclasse de anticorpo em particular (BALLOW, M., 2002).

1.2 IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL

Dentre as imunodeficiências primárias caracterizadas pela deficiência de anticorpos se destaca a Imunodeficiência Comum Variável (ICV) caracterizada por uma falha na diferenciação dos linfócitos B em células plasmáticas, o que resulta na presença de níveis séricos reduzidos de imunoglobulinas (Igs) (SANFORD, J. P. *et al.*, 1954; ROSECAN, M. *et al.*, 1955; WALL, R. L. e SASLAW, S., 1955; VASCONCELOS, D. M AND DUARTE, A.J, 1989). No entanto, esta doença apresenta manifestações clínicas muito variadas, motivo pelo qual a ICV é considerada por alguns médicos como uma síndrome cuja principal característica é a hipogamaglobulinemia (KAINULAINEN, L *et al.*, 2001).

A ICV é a imunodeficiência primária humoral sintomática mais freqüentemente diagnosticada, com uma incidência que varia de 1 em 10.000 até 1 em 2.000,000 indivíduos dependendo do estudo (CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2001a; KAINULAINEN, L *et al.*, 2001; SNELLER, M. C., 2001). Esta imunodeficiência tem surgimento na infância ou adulto jovem, mesmo que possa ter uma manifestação mais tardia (ROSEN, SF; WEDGWOOD, R.J.P; EIBL, M.M; FISCHER, A; AIUTI, F; NOTARANGELO, L, 1997; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999; KOKRON, C. M. *et al.*, 2004) e apresenta um padrão de distribuição predominantemente esporádico, embora em 20% dos casos seja observada herança autossômica dominante (NIJENHUIS, T. *et al.*, 2001). A ICV afeta em igual proporção indivíduos do sexo masculino e feminino, embora as mulheres apresentem sintomas clínicos da doença mais tardiamente que os homens. No entanto, a taxa de sobrevivência dos indivíduos afetados após 20 anos do diagnóstico de ICV é semelhante, sendo de 64% para os homens e 67% para as mulheres (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999).

Em 1953, foi descrito o primeiro caso de ICV (JANEWAY, C. A. *et al.*, 1953) e, embora diversas anormalidades imunológicas associadas com esta doença tenham sido descritas na literatura, nenhuma hipótese unificadora a respeito das bases moleculares da ICV foi proposta até o presente momento. Sendo assim, o diagnóstico da ICV é estabelecido após histórico de infecções sinopulmonares piogênicas recidivantes e quando houver uma

marcada diminuição de ao menos dois tipos de imunoglobulinas séricas, geralmente Imunoglobulina G (IgG) e Imunoglobulina A (IgA) ou Imunoglobulina M (IgM), de acordo com a faixa etária. São critérios adicionais a ausência ou baixa produção de isohemaglutininas e diminuição da capacidade de produção de anticorpos específicos após vacinação ou exposição natural a um agente infeccioso (SAIKI, O. *et al.*, 1982; BRYANT, A. *et al.*, 1990; CONLEY, M. E. *et al.*, 1999; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999).

Na maioria dos casos, uma vez estabelecida a doença, é irreversível e os pacientes não apresentam grandes flutuações nos níveis de imunoglobulinas no soro. No entanto, há relatos de cura espontânea nos quais pacientes com hipogamaglobulinemia profunda reverteram esta condição, podendo os níveis de imunoglobulina permanecer dentro dos valores normais permanente ou temporariamente (SEGGEV, J. S., 1991; SELIGMANN, M. *et al.*, 1991; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999). Além disso, foram descritos casos de indivíduos com deficiência de IgA que evoluíram para deficiência de outros isotipos (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999). Com isso, foi sugerido que a ICV poderia ser o resultado de um defeito genético reversível.

O diagnóstico da ICV também depende da exclusão de outras síndromes conhecidas com quadro de hipogamaglobulinemia, como a Agamaglobulinemia ligada ao X (XLA), Síndrome da hiper-IgM (HIGM), doença linfoproliferativa ligada ao X (Síndrome de Duncan), linfomas, leucemia e Síndrome de *Good* ou até um prolongamento da imunodeficiência fisiológica da infância (CONLEY, M. E. *et al.*, 1999; KOKRON, C. M. *et al.*, 2004). Além disso, alguns pacientes com ICV desenvolvem sintomas da doença mais tardiamente sendo também necessária a exclusão de fatores ambientais capazes de induzir a hipogamaglobulinemia nesses indivíduos, como por exemplo, o uso de medicamentos (SPICKETT, G. P., 2001). Portanto, o diagnóstico da ICV esta baseado na exclusão de outras doenças bem definidas, não havendo uma definição imunológica operacional única para ICV.

As manifestações clínicas mais comuns da ICV e outras deficiências de anticorpos são as infecções sinopulmonares recorrentes, geralmente ocasionadas por bactérias encapsuladas, como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* (KOKRON, C. M. *et al.*, 2004). Nesses pacientes também são freqüentes as manifestações gastrointestinais, podendo estas ser de origem infecciosa, envolvendo agentes bacterianos, virais e protozoários. A diarréia crônica com conseqüente perda de peso é muito comum entre pacientes com ICV, sendo na maioria dos casos causada por

infecção por *Giardia*. Além disso, também foram observados muitos casos de estrogiloidíase e infecção por *E. coli*. Ainda, condições inflamatórias como a Doença de *Crohn* também foram descritas nesses pacientes (KOKRON, C. M. *et al.*, 2004).

Fora os agentes citados, infecções fúngicas por *Cryptococcus neoformans*, e protozoários como *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium spp.*, têm sido observadas em pacientes com ICV. Soma-se a esta variedade de patógenos inúmeros vírus como Herpes-vírus, *Epstein-Barr* e Citomegalovírus (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999; KOKRON, C. M. *et al.*, 2004).

Além disso, complicações não infecciosas foram diagnosticadas em pacientes com ICV. Tem sido observado um aumento da susceptibilidade a câncer (principalmente linfomas) e diferentes apresentações clínicas de proliferação linfóide benigna, incluindo adenopatias, esplenomegalia e infiltração granulomatosa ou linfocítica dos pulmões, gânglios linfáticos ou outros lugares (KOKRON, C. M. *et al.*, 2004). Ainda, aproximadamente 10% dos pacientes com ICV desenvolvem sintomas de asma e rinite de maneira semelhante à observada nos indivíduos atópicos, porém sem a presença de imunoglobulina E (IgE) específica (BONILLA, F. A. e GEHA, R. S., 2003). Além disso, por razões desconhecidas, indivíduos com ICV também manifestam uma variedade de desordens auto-imunes, incluindo anemia hemolítica auto-imune, trombocitopenia auto-imune, artrite reumatóide, doenças intestinais inflamatórias, artrite reumatóide juvenil, cirrose biliar, alopecia, lúpus eritematoso sistêmico, vasculite, diabetes *mellitus* insulino-dependente, doença celíaca, síndrome de *Guillain-Barré*, *miastenia gravis* e tireoidite auto-imune, entre outras (LOPES-DA-SILVA, S. e RIZZO, L. V., 2008).

Uma vez estabelecida a doença, os sintomas clínicos associados tendem a se agravar e a base para o tratamento de pacientes com ICV é a substituição intravenosa de gamaglobulinas (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. *et al.*, 1984; LEE, M. L. *et al.*, 1997). Normalmente, a gamaglobulina intravenosa (IVIG) é aplicada uma ou duas vezes por mês numa dose de 400-600 mg/Kg de peso corporal visando manter os níveis sanguíneos de imunoglobulinas acima de 400 mg/dL (KOKRON, C. M. *et al.*, 2004). Este tratamento, embora não seja suficiente para minimizar os diversos sintomas associados à ICV, tem demonstrado ser eficaz para reduzir a frequência de certas infecções nesses pacientes. Ainda que a IVIG evita o uso de antibióticos como medida profilática, os pacientes necessitam de doses maiores de antibióticos e períodos de tratamento mais longos para a resolução de quadros

infeciosos (SPICKETT, G. P., 2001). É importante salientar que mesmo com acompanhamento adequado e terapia de substituição intravenosa de imunoglobulinas, os pacientes com ICV ainda apresentam uma taxa de mortalidade que supera a da população normal (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999).

A ICV é considerada uma síndrome imunológica complexa devido às amplas manifestações clínicas observadas nos pacientes. A produção de imunoglobulinas é o resultado final de uma série de eventos nos quais participam elementos tanto da imunidade inata quanto da adaptativa. Desta forma, a hipogamaglobulinemia observada em ICV pode ser conseqüência de uma grande variedade de defeitos moleculares que podem resultar em falhas desde a apresentação do antígeno até a secreção das imunoglobulinas, conduzindo à alteração na concentração de anticorpos no sangue. Apesar da intensa investigação relacionada a esta doença desde a sua descoberta, o único defeito comum a todos os pacientes é a falha na diferenciação de células B em plasmócitos e conseqüente secreção de anticorpos. Poucos defeitos genéticos foram especificamente associados a esta doença e múltiplas anormalidades em quase todos os outros componentes do sistema imune tem sido descritas. Embora a etiologia da ICV continue sendo uma incógnita, a identificação destas alterações tem contribuído para um melhor entendimento da fisiopatologia da doença, permitido uma melhor classificação dos pacientes em subgrupos mais homogêneos para o seu estudo, diagnóstico e prognose.

Diversos estudos sugerem que defeitos na imunidade inata podem, em alguns casos, ser responsáveis pelo fenótipo de ICV. Foram relatados casos da doença apresentando profundas alterações na distribuição dos diferentes subtipos de células dendríticas no sangue assim como perturbações na diferenciação, maturação e função destas células, com expressão de níveis reduzidos de moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e HLA-DR, críticas para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (VIALARD, J. F. *et al.*, 2005). Ainda, defeitos na sinalização da via TLR9 em células dendríticas e linfócitos B também têm sido reportados. Uma vez que há participação das células dendríticas na ativação e proliferação das células T, estes defeitos podem, conseqüentemente, comprometer a maturação e função dos linfócitos B (YU, J. E. *et al.*, 2009).

Além disso, alguns indivíduos afetados apresentaram uma população de monócitos cronicamente ativados, os quais produziam grandes quantidades de interleucina-12, polarizando a resposta imune para um perfil Th1. Com isso, houve inibição da produção de

citocinas do perfil Th2, essenciais para a diferenciação terminal de linfócitos B e troca de classes de imunoglobulinas (BAYRY, J. *et al.*, 2005). Por outro lado, certos estudos indicam que indivíduos com ICV apresentam alterações do sistema do complemento, como a diminuição da ativação da via clássica, a qual depende de complexos antígeno-anticorpo, e também da via das lectinas (FEVANG, B. *et al.*, 2005). Ainda, os pacientes podem apresentar números reduzidos de células NK. Embora não tenha sido observada uma correlação entre o número diminuído desta população e a clínica desses pacientes, esta deficiência poderia estar relacionada com a incidência aumentada de tumores malignos, uma vez que as células NK são capazes de reconhecer e eliminar células tumorais ou infectadas por vírus (BAYRY, J. *et al.*, 2005).

O número de células B em pacientes com ICV é altamente variável. Embora em 12% dos casos não haja células B detectáveis, em 12% esta população encontra-se reduzida, enquanto que em 54% dos casos estas células estão dentro do intervalo de normalidade, 19% têm proporção ligeiramente maior (17-24%) e 5% têm número excessivamente maior (CHAPEL, H. e CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2009). Os pacientes que apresentam números baixos desta população de linfócitos desenvolvem uma doença progressiva com a pior prognose (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999). Isso reflete a potencial variedade de defeitos nas células B que podem estar envolvidos na patogênese desta doença.

A existência de porcentagens normais de linfócitos B maduros no sangue da maioria dos pacientes com ICV, e o fato de que eles preservam a capacidade de produzir anticorpos *in vitro*, enquanto esses pacientes são hipogamaglobulinêmicos *in vivo*, sugerem a existência de defeitos afetando estágios tardios da diferenciação desses linfócitos em células secretoras de anticorpos nesses indivíduos (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999). Talvez as células B possam não estar recebendo sinais apropriados para realizar troca de classes de Igs e maturação por afinidade, e interações celulares perturbadas nos centros germinais podem estar envolvidas na patogênese da doença (BAYRY, J. *et al.*, 2005).

Um estudo de plasmócitos obtidos de biopsias de indivíduos com ICV mostrou que nos linfonodos de alguns pacientes não havia populações de células B em estado avançado de diferenciação, as quais expressam baixos níveis de Blimp-1 (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*) e altos níveis de Sindecana (Blimp^{low}/Sindecana-1^{high}). No entanto, nesses mesmos indivíduos foi observado um elevado número de células precursoras de

plasmócitos (Blimp-1⁺/Syndecan-1⁻)(TAUBENHEIM, N. *et al.*, 2005). Isso sugere que em alguns casos de ICV, a hipogamaglobulinemia poderia ser consequência de um bloqueio da diferenciação terminal destas células.

Alem disso, observou-se em alguns pacientes uma diminuição do número de células B de memória CD27⁺IgM⁻IgD⁻ circulantes o que pode contribuir para o desenvolvimento da doença (WARNATZ, K. *et al.*, 2002; BAYRY, J. *et al.*, 2005). Estas células representam uma população de linfócitos B que dispõem de um repertório de anticorpos pré-diversificados para eliminar bactérias encapsuladas de forma independente dos linfócitos T. Assim, pacientes com poucos linfócitos B de memória CD27⁺ IgM⁻ IgD⁻ apresentam uma alta incidência de infecções por *Streptococcus pneumoniae*, resultando em dano pulmonar progressivo (BAYRY, J. *et al.*, 2005). Foi descrita uma expressão reduzida de CD27 e seu ligante CD70 em indivíduos com ICV. Considerando a importante participação destas moléculas na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, esses defeitos podem contribuir para a hipogamaglobulinemia observada nesses pacientes (BROUET, J. C. *et al.*, 2000).

Além do CD27, os linfócitos B expressam outros receptores da família TNF (*tumor necrosis factor receptor*), tais como BAFFR (*B cell-activating factor receptor*), TACI (*transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor*) e BCMA (*B cell maturation protein A*). Estes receptores têm em comum os ligantes BAFF (*B cell-activating factor of the TNF family*) e APRIL (*A proliferation-inducing ligand*), encontrados em células dendríticas e macrófagos, sendo esta interação essencial para a sobrevivência e diferenciação dos linfócitos B, recombinação somática e troca de isótipo.

Observou-se em modelos murinos que defeitos no gene que codifica BAFFR resultam em um fenótipo similar ao observado em indivíduos com ICV, sendo sugerido que este receptor poderia ser responsável pela deficiência humoral nesta doença. Embora o seqüenciamento do gene BAFFR em pacientes com ICV revelou três novas variantes, as mesmas também se encontram presentes em indivíduos saudáveis e não afetam a expressão protéica de BAFFR, sendo sugerido que estas mutações seriam variantes polimórficas do gene (LOSI, C. G. *et al.*, 2005).

Por outro lado, mutações no gene TACI (TNFRSF13B) foram descritas em alguns indivíduos com ICV. No entanto, existem vários polimorfismos em TNFRSF13B alguns dos quais também são encontrados em estado heterozigoto em indivíduos sem deficiência de anticorpos (SALZER, U. *et al.*, 2005). Mutações neste gene foram associadas com o aumento

do risco de desenvolvimento de auto-imunidade e hiperplasia linfóide em pacientes com ICV (CHAPEL, H. e CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2009). No entanto, ainda é desconhecido se estas mutações estariam envolvidas na diferenciação de células plasmáticas.

Mutações no gene CD19 também foram observadas como responsáveis pelo fenótipo de ICV em alguns casos (VAN ZELM, M. C. *et al.*, 2006). A deficiência desta proteína bloqueia a sinalização necessária para o desenvolvimento dos linfócitos B, sua ativação e proliferação. De maneira interessante, a deficiência de CD19 em camundongos resulta em hipogamaglobulinemia e defeito na formação dos centros germinativos (CASTIGLI, E. e GEHA, R. S., 2006).

A produção e secreção de imunoglobulinas de alta afinidade por linfócitos B de memória e plasmócitos dependem do processo de hipermutação somática, uma acumulação de mutações pontuais na região variável das imunoglobulinas que ocorre nos centros germinativos dos órgãos linfóides secundários após o reconhecimento de antígenos específicos. Em alguns pacientes com ICV a hipermutação somática nos segmentos variáveis tanto das cadeias pesadas (BONHOMME, D. *et al.*, 2000) como das cadeias leves (ANDERSEN, P. *et al.*, 2005) se encontra reduzida em relação a indivíduos saudáveis.

Todos esses estudos genéticos de moléculas que regulam a ativação e diferenciação terminal dos linfócitos B em plasmócitos têm demonstrando que as bases genéticas da ICV são altamente variáveis e indicam que determinadas mutações em genes não redundantes podem resultar em células B incapazes de produzir anticorpos. No entanto, em mais de 90% dos casos de ICV nenhum defeito genético foi identificado (BACCHELLI, C. *et al.*, 2007).

Embora fundamentalmente caracterizada pela hipogamaglobulinemia, acredita-se que a ICV possa estar associada ao repertório de células T, uma vez que a imunidade celular também se encontra alterada em alguns pacientes. Apesar de serem descritos somente em estudos mais recentes, casos de disfunção dos linfócitos T podem acometer até 50% dos pacientes com ICV (KONDRATENKO, I. *et al.*, 1997; SNELLER, M. C., 2001). Considerando que os linfócitos T interagem com as células B e outras células apresentadoras de antígenos, provendo sinais que regulam a atividade destas células, é possível que as causas da hipogamaglobulinemia em ICV possam ser também decorrentes de defeitos primários nas células T.

Entre as anormalidades relacionadas às células T encontradas em indivíduos com ICV, destacam-se a timopoiese defeituosa, expressão diminuída de moléculas de membrana

(CD40L, L-Selectina), alteração na produção de citocinas, incluindo IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ (SNELLER, M. C. e STROBER, W., 1990), baixa resposta proliferativa a mitógenos e antígenos (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999), aumento de apoptose (DI RENZO, M. *et al.*, 2001) e geração reduzida de células T de memória antígeno-específicas (STAGG, A. J. *et al.*, 1994; KONDRATENKO, I. *et al.*, 1997; SNELLER, M. C., 2001). Alguns indivíduos com ICV apresentam alterações no número absoluto de linfócitos T devido, em grande parte, à redução dos números de células CD4⁺, sendo as células T *naive*, com fenótipo CD4⁺CD45RA⁺ as principais responsáveis por esse quadro. Esse cenário complexo de deficiência de células T provavelmente tem um papel importante, influenciando a evolução clínica dos pacientes com ICV. Neste sentido, foi relatado que a existência de células T com grande comprometimento funcional no momento do diagnóstico, está associada com uma morte mais precoce do paciente (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999).

Em alguns indivíduos, a interação entre linfócitos T e B nos centros germinativos pode estar comprometida, o que interfere nos processos de hipermutação somática, troca de classes de imunoglobulinas e diferenciação dos linfócitos B em células plasmáticas ou de memória (SALZER, U. *et al.*, 2005). É sabido que a falta de co-estimulação conduz a uma proliferação celular deficiente e anergia, assim o comprometimento de moléculas com esta co-estimuladoras em indivíduos com ICV chamou a atenção. Além de defeitos nas moléculas CD80 e CD86, alguns casos de ICV encontram-se associados a defeitos na molécula CD28, co-estimuladora de linfócitos T, a qual é expressa constitutivamente na membrana celular (DI RENZO, M. *et al.*, 2000). Esta proteína, através da interação com seus ligantes B7-1 e B7-2, induz a proliferação da célula T, aumentando a produção da citocina IL-2 e expressão de CD40L.

Recentemente, também foram descritos alguns casos de ICV nos quais foram encontradas mutações no gene ICOS (*inducible costimulator*) que também pertence à família CD28. ICOS encontra-se na membrana dos linfócitos T e interage com o seu ligante B7H (ICOSL), constitutivamente expresso nos linfócitos B e macrófagos (BEIER, K. C. *et al.*, 2000), induzindo a expressão de CD40L e promovendo a troca de isótipos e a diferenciação terminal dos linfócitos B de memória ou plasmócitos (SALZER, U. *et al.*, 2004). Mutações em ICOS têm sido encontradas em 1% dos pacientes com ICV, sendo que nestes indivíduos há um defeito na formação de centros germinativos e resposta humoral comprometida (GRIMBACHER, B. *et al.*, 2003).

Embora os defeitos nas células T afetem a grande maioria dos pacientes, as classificações propostas para ICV são baseadas apenas nas características funcionais ou fenotípicas das células B (BRYANT, A. *et al.*, 1990; WARNATZ, K. *et al.*, 2002; PIQUERAS, B. *et al.*, 2003). No entanto, um estudo recente propõe a classificação desses indivíduos em função do número de células T CD4⁺ *naive* (GIOVANNETTI, A. *et al.*, 2007). Um grupo seria caracterizado pela redução acentuada das células T CD4⁺ *naive*, ativação, proliferação e apoptose massiva de células T, e clinicamente associado a uma imunodeficiência grave, geralmente com esplenomegalia. Um segundo grupo seria caracterizado pela alteração menos proeminente das células T CD4⁺ e CD8⁺, podendo apresentar esplenomegalia moderada. Finalmente, o terceiro grupo de pacientes com ICV seria caracterizado por anormalidades nas células T CD8, permanecendo as células T CD4 *naive* dentro dos valores normais e apresentando sintomas clínicos menos severos e esplenomegalia leve ou ausente.

Os níveis de células T CD4⁺ *naive* foram significativamente associados à classificação de Warnatz *et al.* (WARNATZ, K. *et al.*, 2002), a qual está baseada em marcadores fenotípicos de maturação das células B. mesmo que não tenha sido observada uma correlação exata os três grupos desta classificação com aqueles estabelecidos em função das células T, há uma tendência a uma associação entre o número reduzido de células B de memória e uma maior linfopenia de células T CD4⁺ *naive* (GIOVANNETTI, A. *et al.*, 2007).

1.3 DEFICIÊNCIA SELETIVA DE IMUNOGLOBULINA A

A Deficiência Seletiva de Imunoglobulina A (DIgA) é considerada a imunodeficiência primária de maior frequência. A incidência da doença depende da etnia, variando de 1:143 na península arábica (AL-ATTAS, R. A. e RAHI, A. H., 1998) a 1:965 no Brasil (CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. *et al.*, 1989). Ainda, a incidência é menor na população asiática (KANO, T. *et al.*, 1986; FENG, L., 1992).

O diagnóstico da DIgA depende da medição da concentração de IgA no soro. Esta imunodeficiência é definida como uma diminuição ou ausência de IgA sérica na presença de níveis normais de IgG e IgM em indivíduos com mais de 4 anos de idade, nos quais outras causas de hipogammaglobulinemia foram excluídas (CONLEY, M. E. *et al.*, 1999; GEHA, R. S. *et al.*, 2007). Em geral, o nível de IgA sérica inferior a 7 mg/dL é considerado como

deficiência seletiva de IgA, pois esta concentração é o menor limite de detecção estabelecido pela maioria dos laboratórios. Quando o nível sérico desta imunoglobulina é maior do que 7 mg/dL mas dois desvios-padrão abaixo do normal para a idade, a condição pode ser denominada deficiência parcial de IgA, o que é bastante comum (YEL, L., 2010). No entanto, o diagnóstico não considera a medição da concentração de IgA secretora. Portanto, é possível que os indivíduos com diagnóstico de DIgA possam ter alguma IgA nas mucosas, suficiente para fornecer alguma função protetora. Além disso, na maioria dos pacientes com DIgA, aparentemente como um mecanismo compensatório, a produção de IgM secretora é aumentado (BRANDTZAEG, P. *et al.*, 1987). No entanto, também existem alguns pacientes com DIgA que não exibem aumento compensatório de IgM secretora (MELLANDER, L. *et al.*, 1986).

A IgA é o mais abundante isótipo produzido no corpo e o segundo dominante na circulação sanguínea após IgG. Ele pode ser encontrado tanto na forma de monômero como polímero, sendo a IgA circulante na forma monomérica, enquanto que a IgA secretora nas mucosas respiratória, intestinal e genitourinárias é dimérica (CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2001b; WOOF, J. M. e KERR, M. A., 2004). Em humanos há duas subclasses de IgA, IgA1 e IgA2, cujas cadeias pesadas são codificadas pelos genes $\alpha 1$ e $\alpha 2$ no cromossomo 14 (KERR, M. A., 1990). A principal diferença estrutural entre elas é que a IgA2 tem uma região de dobradiça menor que pode tornar este isótipo mais resistente as proteases bacterianas na luz dos tratos gastrointestinal ou respiratório (CORTHESEY, B., 2007).

A função dos níveis séricos de IgA na resposta imune sistêmica ainda não foi claramente compreendida já que a IgA na circulação não participa da ativação da via clássica do complemento. No entanto, pode ter um papel importante na ativação do sistema fagocítico por meio dos receptores FcR α (KERR, M. A., 1990; MONTEIRO, R. C. *et al.*, 1990; WOOF, J. M. e KERR, M. A., 2004). Tem sido proposto que a IgA sérica se liga a esses receptores em monócitos e granulócitos e dessa maneira, complexos imune formados por antígenos e IgA são apurados da circulação pelo sistema fagocitário sem ativação do sistema complemento e sem causar inflamação (CONLEY, M. E. e DELACROIX, D. L., 1987).

Mais de 95% da IgA secretada é produzida localmente. No sistema gastrointestinal, as placas de Peyer ou folículos linfóides isolados podem ser sítios para a produção local desta imunoglobulina por mecanismos dependentes e independentes das células T (CERUTTI, A. e RESCIGNO, M., 2008; SUZUKI, K. e FAGARASAN, S., 2009). Ainda, células do

epitélio intestinal, células dendríticas e células do estroma também podem estar contribuindo para a produção local T – independente de IgA através da secreção de citocinas e outros fatores solúveis tais como BAFF e APRIL (FAGARASAN, S. *et al.*; FAGARASAN, S., 2008).

Em pacientes com DIgA, constatou-se a falha na maturação das células B para produzir IgA (WANG, Z. *et al.*, 1999; CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2001b). O defeito parece envolver as células-tronco, pois a DIgA pode ser transferida por transplante de medula óssea (HAMMARSTROM, L. *et al.*, 1985). Os genes da região constante $\alpha 1$ e $\alpha 2$ são geralmente normais, exceto em raros casos descritos de deleções do gene da cadeia pesada envolvendo diversos segmentos do cromossomo 14 (SUZUKI, H. *et al.*, 2009). Na DIgA, as células B expressam esta imunoglobulina na membrana, no entanto, estas são de fenótipo imaturo, com a co-expressão de IgM e IgD, e não podem desenvolver-se plenamente em células plasmáticas produtoras de IgA (CONLEY, M. E. e COOPER, M. D., 1981). Além de um defeito intrínseco nas células B, disfunções das células T têm sido relatadas na DIgA, tais como a produção reduzida de IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TGF- β e, mais recentemente, IL-21 (RAMSAY, A. J. *et al.*, 1994; CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2001b; BORTE, S. *et al.*, 2009).

A existência de susceptibilidade genética na DIgA não é bem definida. A história genealógica desses pacientes não mostra um claro padrão de herança, sendo registrados casos de transmissão esporádica, autossômica recessiva e autossômica dominante nessas famílias (HAMMARSTROM, L. *et al.*, 2000). Tendo em conta a variação nos padrões de herança e a falta de identificação do defeito genético primário, é provável que a DIgA represente um grupo heterogêneo de anormalidades genéticas, como sugerido para ICV. Neste sentido, mutações no gene TACI foram encontradas tanto no subgrupo de pacientes com DIgA bem como ICV (CASTIGLI, E. *et al.*, 2005). No entanto, é controverso se as mutações em TACI têm uma relação de causa e efeito nessas doenças (CASTIGLI, E. *et al.*, 2005; PAN-HAMMARSTROM, Q. *et al.*, 2007). Mais ainda, é conhecido que a DIgA pode progredir para a ICV, suportando a noção de que a DIgA e a ICV constituam espectros da mesma doença.

Pacientes com DIgA têm tendência a desenvolver infecções sinopulmonares e gastrointestinais, além de outros distúrbios mais graves tais como alergias, doenças auto-imunes e neoplasias. Infecções recorrentes do sistema respiratório são a manifestação mais comum em indivíduos com deficiência de IgA (CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2001b), sendo na

sua maioria causadas pelas bactérias *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. De maneira similar ao observado em ICV, alguns pacientes com DIgA podem desenvolver bronquiectasia secundária à infecções recorrentes ou crônicas (CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2001b).

Nesses pacientes também são freqüentes as infecções e distúrbios do trato gastrointestinal. Giardíase, má absorção, intolerância à lactose, doença celíaca, colite ulcerativa, hiperplasia nodular linfóide e proliferação maligna estão entre as manifestações associadas (HAMMARSTROM, L. *et al.*, 2000; CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2001b).

Desordens alérgicas também parecem ser comuns em pacientes com DIgA (CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2001b) tendo uma incidência de 48 a 58%, dependendo do estudo (JACOB, C. M. *et al.*, 2008), embora mais recente as manifestações alérgicas, incluindo asma, dermatite atópica, rinite alérgica, conjuntivite, urticária, alergia a medicamentos e alergia alimentar foram observadas em 84% dos pacientes com esta imunodeficiência (AGHAMOHAMMADI, A. *et al.*, 2009).

As doenças auto-imunes estão entre as manifestações clínicas mais importantes na DIgA, perdendo apenas para as infecções. Auto-anticorpos podem ser detectados nestes pacientes, mesmo sem evidências clínicas da doença. A condição auto-imune mais comum observada nestes pacientes é a trombocitopênica idiopática púrpura, seguida da anemia hemolítica, artrite reumatóide juvenil, tireoidite e lúpus eritematoso sistêmico (CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2001b; JACOB, C. M. *et al.*, 2008),

Doenças malignas têm sido relatadas em indivíduos com DIgA, especialmente em indivíduos de idade avançada, sendo geralmente adenocarcinoma de estômago e linfomas (CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2001b; JACOB, C. M. *et al.*, 2008).

Apesar do papel crítico da IgA secretada na proteção das mucosas, surpreendentemente 85-90% dos indivíduos com deficiência de IgA são assintomáticos. Portanto, a DIgA deve ser considerada em pacientes com infecções respiratórias e gastrointestinais recorrentes, alergias e doenças auto-imunes. A avaliação imunológica da DIgA é também justificada em caso de anafilaxia secundária a uma transfusão sanguínea, doença celíaca e história familiar de DIgA e/ou ICV. Os pacientes com DIgA que são diagnosticados por acaso e que não têm qualquer sintoma da doença não necessitam de nenhum tratamento. No entanto, ter consciência da condição médica é de

primordial importância, particularmente para evitar uma reação anafilática potencial secundária à transfusão de sangue (YEL, L.; 2010).

O prognóstico de pacientes com DIgA é bom, se esta não estiver associada a outras doenças. A DIgA nas crianças pode se resolver com o passar do tempo. No entanto, é também conhecido que a deficiência de IgA pode evoluir para ICV, que tem um resultado menos favorável. Portanto, um paciente com deficiência de IgA, uma vez identificado, mereceria um acompanhamento clínico e imunológico regular (YEL, L.; 2010).

Em resumo, embora a deficiência de IgA seja a imunodeficiência primária mais comum, sua base genética continua por ser definida, e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese da doença precisam ser esclarecidos.

1.4 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA

Uma das maiores descobertas da imunologia foi realizada em 1966 por Claman et al. (CLAMAN, H. N. *et al.*, 1966) que mostraram que a cooperação entre duas populações diferentes de linfócitos, uma originada na medula óssea e outra derivada do timo, era necessária para a produção de anticorpos. Os linfócitos derivados do timo, denominados células T, foram definidos como células que respondem a estímulos mitogênicos, proliferando e produzindo proteínas. Já os linfócitos provenientes da medula óssea foram identificados como células B, produtoras de anticorpos. Como as células T demonstraram ser necessárias para a indução das respostas imunológicas, era crítico definir se esta mesma população linfocitária também seria capaz de inibir tais respostas, e foi investigando-se sua participação no estabelecimento e manutenção do estado de tolerância imunológica. Assim, foram desenvolvidos dois tipos de abordagens experimentais em modelos animais, com manipulação das células T para induzir ou eliminar o estado de tolerância.

Em 1960, numa época na qual ainda não havia sido claramente demonstrada a função imunológica do timo, Nishizuka e Sakakura conduziram experimentos com camundongos timectomizados no terceiro dia de vida (NISHIZUKA, Y. e SAKAKURA, T., 1969). Eles observaram que as fêmeas apresentavam um desenvolvimento defeituoso das glândulas mamárias e eram estéreis, devido à destruição dos seus ovários. De forma surpreendente, estes órgãos se mantinham intactos quando a timectomia era realizada após o sétimo dia de vida e a doença no ovário era prevenida por um transplante de timo. Dessa

maneira, surgiu a possibilidade de que o mecanismo patológico nos ovários fosse devido não à falta de hormônio sexual, supostamente secretado pelo timo, e sim devido à inflamação auto-imune. Estas observações permitiram o estabelecimento da hipótese de que certos linfócitos produzidos no timo a partir do terceiro dia de vida seriam capazes de prevenir o surgimento de doenças auto-imunes em camundongos.

Posteriormente, um importante experimento realizado por Gershon e Kondo em 1970 teve como objetivo estudar os efeitos de células derivadas do timo que haviam sido transferidas a camundongos após a imunização dos mesmos com antígenos estranhos (GERSHON, R. K. e KONDO, K., 1970; 1971). Nesses experimentos foi observado que os linfócitos que foram isolados do timo se mostravam capazes de inibir a cooperação entre células T e B, bem como a produção de anticorpos contra os antígenos estranhos introduzidos, demonstrando que a indução tanto da resposta imune, como da tolerância, requeria a cooperação de células T derivadas do timo. Um ano depois estes pesquisadores demonstraram que a transferência de linfócitos provenientes do baço de camundongos tolerizados a camundongos atímicos era capaz de induzir o mesmo fenômeno de tolerância nos recipientes (GERSHON, R. K. e KONDO, K., 1971). Esse fenômeno foi denominado “tolerância infecciosa” e os linfócitos responsáveis por esta tolerância de “células T supressoras”(GERSHON, R. K. *et al.*, 1972).

Estas duas experiências, entre outras realizadas posteriormente, estabeleceram o conceito de que uma população de células T tem o potencial de suprimir respostas imunes contra antígenos próprios ou estranhos. Desta maneira, diversos grupos de pesquisa tentaram caracterizar melhor esta população linfocitária dotada de propriedades supressoras. No entanto, foi na década de 80 que duas grandes descobertas e um fiasco científico minimizaram a importância da contribuição das células T supressoras no fenômeno de tolerância imunológica. A primeira das descobertas foi a da deleção clonal no timo das células T auto-reativas, demonstrada por Kappler em 1987 (KAPPLER, J. W. *et al.*, 1987). Conseqüentemente, o papel fundamental do timo na prevenção da auto-imunidade foi diretamente vinculado ao fenômeno de deleção clonal. Posteriormente, Mosman e Coffman introduziram o conceito de dicotomia de células T auxiliares tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), sendo que as células com perfil Th1 são capazes de secretar citocinas que inibem a função de células com perfil Th2 e vice-versa (MOSMANN, T. R. e COFFMAN, R. L., 1989). Assim, ficou estabelecido que a tolerância periférica era devida a um balanço entre as células Th1 e

Th2 e não à ação de uma população específica de linfócitos T com propriedades supressoras. Finalmente, foi inicialmente assumido que o mecanismo de inibição das células T supressoras sobre outras células era devido à produção de um fator solúvel denominado proteína I-J, produzido por um locus I-J localizado entre I-A e I-E. Porém, quando foi seqüenciado o ácido desoxirribonucléico do complexo principal de histocompatibilidade murino, foi evidente que esse locus não existia (TADA, T. *et al.*, 1976).

Apesar das convincentes experiências de Nishizuka e Sakakura e Gershon e Kondo, o conceito de células T supressoras permaneceu um tabu por um período de aproximadamente quinze anos até a publicação de dois trabalhos que conduziram ao ressurgimento desta população linfocitária. Em 1995, *Sakaguchi* e colaboradores demonstraram que uma população de células T CD4⁺ que expressam a cadeia alfa do receptor da interleucina-2 (CD25) e que representa de 5-10% das células T CD4⁺, podia prevenir o surgimento de doenças auto-imunes em camundongos (SAKAGUCHI, S. *et al.*, 1995). Eles mostraram que a timectomia no dia 3 era suficiente para eliminar as células CD4⁺CD25⁺ da periferia. Em 1998, os grupos de Sakaguchi e *Shevach* deram um passo à frente realizando ensaios *in vitro* da função supressora destas células (TAKAHASHI, T. *et al.*, 1998; THORNTON, A. M. *et al.*, 2004). Eles demonstraram que esta população linfocitária tornava-se anérgica após estimulação, e podia suprimir a proliferação e produção de IL-2 pelas células T CD4⁺ ativadas, de uma maneira dependente de contato. A caracterização de CD25 como um marcador de superfície confiável e a possibilidade de avaliar a função desta população *in vitro* definitivamente trouxeram de volta o interesse pelas células T supressoras, as quais passaram a ser denominadas células T reguladoras (Tregs).

Paralelamente, em 2001 diversos grupos confirmaram a presença de células CD4⁺CD25⁺ com potencial regulador em seres humanos, demonstrando-se que em doadores saudáveis, 1-2% das células T CD4⁺ que expressam altos níveis de CD25 (CD25^{High}) apresentam capacidade supressora *in vitro* (BAECHER-ALLAN, C. *et al.*, 2001; DIECKMANN, D. *et al.*, 2001; JONULEIT, H. *et al.*, 2001; LEVINGS, M. K. *et al.*, 2001; TAAMS, L. S. *et al.*, 2001). No entanto, ficava evidente que a expressão de CD25 não seria o marcador mais conveniente para identificar Tregs humanas, principalmente nos casos de doenças inflamatórias nas quais também são encontradas células T ativadas que expressam CD25. A partir desse momento, diversas pesquisas foram realizadas à procura de marcadores

específicos que permitissem uma melhor identificação fenotípica e purificação desta população.

Em 1982, Powell e colaboradores descreveram o primeiro caso de uma síndrome chamada IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy X-linked syndrome*) caracterizada clinicamente pelo surgimento de doenças auto-imunes e inflamatórias multi-sistêmicas (POWELL, B. R. *et al.*, 1982), e em 1991 foi descrito o equivalente murino de IPEX, chamado *Scurfy* (GODFREY, V. L. *et al.*, 1991). Posteriormente, três grupos independentes demonstraram que em ambos os casos, esta síndrome era resultado da deficiência na expressão do fator de transcrição Foxp3 (*Forkhead Box protein 3*) (BENNETT, C. L. *et al.*, 2001; BRUNKOW, M. E. *et al.*, 2001; WILDIN, R. S. *et al.*, 2001) e, em 2003, foi demonstrado que a expressão desta proteína era requerida para o desenvolvimento e função das Tregs (FONTENOT, J. D. *et al.*, 2003; HORI, S. *et al.*, 2003; KHATTRI, R. *et al.*, 2003). Entretanto, apesar do Foxp3 ser considerado um ótimo marcador para identificação de Tregs murinas, ele continuava apresentando limitações para o estudo de Tregs humanas, devido ao fato de que células recentemente ativadas também expressam esta proteína (GAVIN, M. A. *et al.*, 2006; ALLAN, S. E. *et al.*, 2007). Nos últimos anos, inúmeros estudos foram realizados na tentativa de identificar novos marcadores para o estudo desta população em seres humanos. Infelizmente, apesar dos esforços de diversos grupos de pesquisa, o mecanismo através do qual as células Tregs suprimem as respostas imunes permanece desconhecido e ainda não foram identificadas moléculas exclusivas desta população linfocitária.

Apesar disso, nos últimos anos tem sido observado que as Tregs regulam um amplo espectro de respostas imunes fisiológicas e patológicas tais como processos infecciosos, câncer, transplante, alergia e doenças auto-imunes ou inflamatórias. Desta forma, é cada vez mais evidente que a manipulação de Tregs pode representar uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de diversas doenças (MCHUGH, R. S. e SHEVACH, E. M., 2002).

1.5 ICV, DIgA E TREGS

Há na literatura casos descritos nos quais foi observada a coexistência de ICV e DIgA em famílias e também indivíduos que apresentam DIgA e que posteriormente evoluem para ICV (ESPANOL, T. *et al.*, 1996). Por esse motivo, alguns pesquisadores sugeriram que poderia existir uma etiologia comum para essas duas doenças, representando a ICV o estágio final de

evolução de uma deficiência humoral progressiva (SPICKETT, G. P., 2001; AGHAMOHAMMADI, A. *et al.*, 2008). Ainda, associações entre DIgA e ICV com alguns haplótipos do complexo principal de histocompatibilidade de classe I, II e III têm sido propostas (VAN THIEL, D. H. *et al.*, 1977; SCHROEDER, H. W., JR. *et al.*, 1998). Além disso, em indivíduos com ICV ou DIgA sintomáticos a ausência ou redução significativa de imunoglobulinas no soro explica a conseqüente maior susceptibilidade dos mesmos a infecções recorrentes dos tratos respiratórios e gastrointestinais causada por patógenos capsulados (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999; KOKRON, C. M. *et al.*, 2004). No entanto, as causas do surgimento de outros sintomas tão importantes quanto estes, particularmente de doenças auto-imunes e atopias, são pouco compreendidas.

Conseqüentemente, devido à mencionada alta incidência de auto-imunidade e alergia em pacientes com ICV e DIgA, a investigação sobre a população de células T reguladoras em pacientes com estas patogenias é de grande interesse. No presente trabalho, visamos analisar a população de linfócitos CD4⁺ com potencial regulador em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável e Deficiência Seletiva de IgA buscando avaliar se defeitos quantitativos nesta população poderiam explicar a alta incidência de doenças auto-imunes ou alérgicas associadas a estas imunodeficiências.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a população de linfócitos CD4⁺ com potencial regulador em pacientes com ICV e DIgA, com o objetivo de identificar defeitos quantitativos nestas células que poderiam ser responsáveis pela alta incidência de auto-imunidade ou alergia associadas a estas imunodeficiências.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar a frequência de linfócitos CD4⁺CD25^{High}Foxp3⁺ com potencial regulador através de citometria de fluxo, em pacientes com ICV com ou sem auto-imunidade ou alergia;
- ❖ Avaliar a frequência de linfócitos CD4⁺CD25^{High}Foxp3⁺ com potencial regulador através de citometria de fluxo, em pacientes com DIgA com ou sem auto-imunidade ou alergia;
- ❖ Avaliar a frequência de linfócitos CD4⁺CD25⁺CD127^{Low} com potencial regulador através de citometria de fluxo, em pacientes com DIgA com e sem auto-imunidade ou alergia;
- ❖ Avaliar a expressão gênica de *FOXP3* através de PCR em tempo real em células mononucleares do sangue de pacientes com ICV com ou sem auto-imunidade ou alergia;
- ❖ Avaliar o perfil de produção de citocinas em pacientes com ICV e DIgA e sua correlação com o estado hipogamaglobulinêmico.

3 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Foram incluídos neste estudo pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) e Deficiência Seletiva de Imunoglobulina A (DIgA), estando os critérios clínicos e laboratoriais utilizados no diagnóstico de acordo com aqueles estabelecidos pelo Grupo Pan-americano de Imunodeficiências (PAGID) e pela Sociedade Européia de Imunodeficiências (ESID) (CONLEY, M. E. *et al.*, 1999). Os pacientes se encontram em acompanhamento na Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), e a seleção dos mesmos foi realizada sob a responsabilidade dos médicos Luiz Vicente Rizzo, Cristina Kokron e Myrthes Toledo Barros. Foram estudados 33 indivíduos diagnosticados com ICV que apresentavam sinais e sintomas relevantes de imunodeficiência e valores séricos de imunoglobulinas IgG, IgA e IgM dois desvios-padrões abaixo dos níveis normais de acordo com a faixa etária (Tabelas 1-3). Critérios adicionais incluem ausência ou baixa produção de isohemaglutininas, resposta deficiente a vacinação, e exclusão de outras causas de hipogammaglobulinemia. Pacientes que apresentaram níveis de IgG reduzidos, mas IgA normal, que cumpriram as outras condições foram diagnosticados com ICV quando apresentaram sintomas compatíveis com a doença. Simultaneamente, foram recrutados para o nosso estudo 15 indivíduos com DIgA com valores séricos de IgA abaixo de 7 mg/dL e valores de IgG e IgM normais (Tabelas 4 e 5). O grupo de pacientes com ICV foi constituído por 16 mulheres e 17 homens e o grupo de pacientes com DIgA por 4 homens e 11 mulheres, dentro de uma faixa etária entre 18 e 74 anos (Tabelas 2 e 4).

Tabela 1 - Níveis normais de referência de Imunoglobulinas conforme estabelecido pela Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Isotipo	Valores de referência (mg/mL)
IgG	680-1600
IgA	60-336
IgM	88-375

Tabela 2 - Características gerais dos grupos de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) e Controles recrutados para o estudo.

Indivíduos	Controles	ICV
n	30	33
Sexo		
Feminino	14	16
Masculino	16	17
Idade (anos)	18-50	18-74
Característica Clínicas		
Sem auto-imunidade		22
Com auto-imunidade		11
Anemia hemolítica		2
Anemia perniciosa		1
Vitiligo		4
Gastrite atrófica		1
Psoríase		1
Doença celíaca		1
Hipotireoidismo		1
Síndrome de Sjögren		1
Sem alergia		16
Com alergia		17
Rinite		17
Asma		3

Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes com imunodeficiência Comum Variável (ICV) recrutados para o estudo. Concentração de imunoglobulinas (Igs) em ng/mL. Contagem de linfócitos T CD4⁺ (Valores normais de referência 500-1666 células/mm³). ND (não disponível)

Paciente	Sexo	Idade	Alergia	Auto-imunidade	PRE			2009			
					IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	T CD4 ⁺
ICV#1	m	60	Rinite/Dermatite de Contacto	Febre Reumática	391	28	55	487	32	80	451
ICV#2	f	26	Rinite		73	<5	<9	403	4	4	534
ICV#3	f	58	Rinite		229	11	17	466	4	4	482
ICV#4	f	44	Rinite		124	5	4	537	4	4	577
ICV#5	m	33		AHAI	429	40	<4	351	13,73	4	466
ICV#6	f	61	Rinite		250	<22	<7	753	4	5	756
ICV#7	f	33	Rinite		18	3	4	592	4	4	884
ICV#8	m	28	Rinite/Dermatite de Contacto		ND	ND	ND	ND	ND	ND	417
ICV#9	m	18			138	6	11	324	4	4	514
ICV#10	m	19			66	2	1	676	4	4	462
ICV#11	m	52			435	23	1	410	8	4	380
ICV#12	m	19		Anemia Perniciosa	554	4	6	647	11	4	584
ICV#13	m	33	Rinite/asma		ND	ND	ND	ND	ND	ND	735
ICV#14	f	43	Rinite		150	4	ND	644	4	4	749
ICV#15	m	29	Rinite		1	6	1	498	4	4	683
ICV#16	s/d	70		Vitiligo	193	<4	<4	430	4	4	332
ICV#17	f	70			457	129	28	580	29	90	787
ICV#18	m	74		Gastrite atrofica	324	8	13	669	4	19	383
ICV#19	m	59	Rinite	Vitiligo	96	25	31	446	4	4	450
ICV#20	m	48	Rinite	Vitiligo	173	17	ND	703	17	4	486
ICV#21	f	29	Rinite	Psoríase	191	8	11	689	7	4	352
ICV#22	f	23			53	<4	22	550	4	4	672

Continua

Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes com imunodeficiência Comum Variável (ICV) recrutados para o estudo. Concentração de imunoglobulinas (lg) em ng/ml...Contagem de linfócitos T CD4* (valores normais de referência 600-1666 células/mm³). ND (não disponível)

Paciente	Sexo	Idade	Alergia	Auto-Imunidade	PRE	2009
ICV023	m	23	Rinite		4	11
ICV024	f	40	Rinite/asma		88	11
ICV025	f	24	Rinite		115	26
ICV026	f	45			228	14
ICV027	f	43	Rinite/asma	AHAJ/SSJ	125	8
ICV028	f	33			38	ND
ICV029	f	21			273	16
ICV030	m	24		Vitiligo	480	18
ICV031	m	28		Doença celíaca	216	7
ICV032	m	35			19	1
ICV033	m	28			33	11

Condição

Tabela 4 - Características gerais dos grupos de pacientes com Deficiência Seletiva de IgA (DIgA) e Controles recrutados para o estudo. (TG+: Anti-tiroglobulina; TPO+: Tirofosfatase, FAN+: fator anti-nuclear)

Indivíduos	Controles	DIgA
n	13	15
Sexo		
Feminino	7	11
Masculino	6	4
Idade (anos)	18-50	20-56
Característica Clínicas		
Sem auto-imunidade		6
Com auto-imunidade		9
Doença celíaca		4
Hipotireoidismo		2
Anti-TG+		2
Anti-TPO+		2
FAN +		4
Artrite reumatóide Juvenil		1
Doença de Behçet		1
Sem alergia		7
Com alergia		8
Rinite		5
Asma		3
Dermatite de contato		2
Urticária		1

Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes com Deficiência Seletiva de IgA (DSIgA) recrutados para o estudo. Concentração de imunoglobulinas (Ig) em ng/mL. Contagem de linfócitos T CD4⁺ (Valores normais de referência 600-1.666 células/mm³). ND (não disponível)

Paciente	Sexo	Idade	Alergia	Auto-Imunidade	PRE			2009				
					IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgE	T CD4 ⁺
DlgA#1	f	56		Doença celíaca	1998	88	3	1666	80	4	6	878
DlgA#2	f	20	Asma/Rinite		1891	142	7	1806	121	4	75	1075
DlgA#3	m	27		Doença celíaca	2372	76	7	1713	95	4	305	584
DlgA#4	f	30	Asma/Rinite		1410	184	32	1410	184	32	ND	1109
DlgA#5	f	31	Asma/Rinite		2000	61	39	1716	59	10	121	924
DlgA#6	f	37	Dermatite contato	Doença de Behçet	2486	206	11	1976	155	4	5	834
DlgA#7	f	34		FAN+, Anti-TG+, Doença Celíaca	1842	172	4	1173	152	4	85	847
DlgA#8	f	50	Rinite	Anti-TPO+	1068	17	54	684	84	4	<5	809
DlgA#9	f	22	Rinite	Doença celíaca, Anti-TG+	1448	151	<4	1274	138	<4	14	500
DlgA#10	f	49	Urticária	Hipotiroidismo e	1520	1304	4	1747	1311	4	10	361
DlgA#11	f	42	Dermatite de contato	hipoparatiroidismo secundário	1698	100	1	1218	109	1	14	1159
DlgA#12	m	22		FAN +	1448	151	<4	1274	138	<4	14	500
DlgA#13	f	30		Artrite Reumatóide Juvenil	1520	1304	4	1747	1311	4	7	361
DlgA#14	m	43			1698	100	1	1218	109	1	14	1159
DlgA#15	m	24			1210	96	6	1210	96	6	ND	ND

A coleta do sangue ocorreu após o preenchimento do consentimento informativo por escrito sempre em pacientes sem infecções, imediatamente antes dos mesmos receberem o tratamento terapêutico com imunoglobulina endovenosa. Na admissão, os pacientes com ICV e DlgA responderam a um questionário padrão onde constam os antecedentes pessoais, descrevendo principalmente processos infecciosos, doenças atópicas, doenças auto-imunes, neoplasias e antecedentes familiares. Foram excluídos do estudo pacientes gestantes, em utilização de medicamentos causadores de imunodeficiência humoral ou com histórico de exposição prévia aos mesmos, com infecção bacteriana ou viral no momento da coleta do sangue e pacientes menores de 18 anos de idade.

Para fins de comparação, foram incluídos no estudo 43 controles saudáveis de idade aproximada à dos pacientes, sendo 21 homens e 22 mulheres, sem história de ICV , DlgA, doença auto-imune, alergia ou em uso de qualquer medicamento (Tabelas 1 e 3).

Todos os procedimentos aqui descritos não ultrapassaram os limites de risco mínimo de acordo com a regulamentação para pesquisa com seres humanos do Conselho Nacional de Saúde.

3.1.1 Critérios para o diagnóstico de infecções de repetição

Para o diagnóstico de infecções de repetição, todos os indivíduos foram interrogados sobre a idade de início e frequência das infecções e resposta a antibióticoterapia, acompanhado isto de exame físico e laboratorial.

3.1.2 Critérios para o diagnóstico de doença atópica

Para o diagnóstico de doença atópica foram avaliados os sintomas clínicos sugestivos de asma, rinite e/ou outras alergias. Através de anamnese foi determinada a idade de início, fatores desencadeantes, frequência das crises, características da moradia e trabalho, medicações utilizadas e antecedentes familiares, acompanhado isto de exame físico, laboratorial e do teste Prick.

3.1.3 Critérios para o diagnóstico de doença auto-imune

O diagnóstico de auto-imunidade foi realizado seguindo os critérios clínicos e laboratoriais estabelecidos para cada tipo de doença apresentada pelos pacientes. Anemia hemolítica: resultado positivo no teste de Coombs. Febre reumática: cardite e artrite exacerbada após infecção com estreptococos. Anemia perniciosa: histologia característica da mucosa intestinal. Vitiligo: aparência clínica característica. Gastrite atrófica: biopsia gástrica. Psoríase: biopsia de pele. Doença celíaca: biopsia de duodeno e dosagem de anticorpos anti-transglutaminase (TG) e anti-endomíseo (EMA). Síndrome de Sjögren: teste de Schirmer e biopsia de glândulas salivares. Hipotireoidismo e hipoparatiroidismo: dosagem dos hormônios tireóides TSH, T3, T4, TPO. Artrite Reumatóide Juvenil: conforme critérios internacionais. Doença de Behçet: aspectos dermatológicos característicos.

3.2 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE VENOSO

Foram isoladas células mononucleares do sangue (PBMC) venoso usando um gradiente de centrifugação de IsoLymph (Gallard-Schlesinger Industries, Carle Place, NY, USA) de acordo com a instrução do fabricante: 20 mL de sangue total diluído v/v em PBS foram adicionados a 20 mL de IsoLymph formando-se duas fases. Após centrifugação a 2200 rpm à 20 °C por 20 minutos foi gerado um gradiente do qual foi colhida a fase intermediária contendo as células mononucleares. As células foram transferidas para um tubo novo, ressuspendidas para 50 mL de PBS 1X e centrifugadas à 250 g a 10 °C por 10 minutos. O precipitado celular foi lavado seqüencialmente duas vezes nas mesmas condições de centrifugação descritas acima. As células obtidas foram mantidas em meio DMEM (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA) contendo 5% de soro humano AB⁺ (Hyclone) e o número de células adquiridas foi determinado após coloração com *Azul de Trypan* (Cambrex Bio Science) e contagem em Câmara de Neubauer.

No caso das amostras de pacientes com DlgA e respectivos controles, bem como para as amostras de pacientes com ICV a serem utilizadas para dosagem de citocinas, as células obtidas foram ressuspendidas em meio de congelamento (90% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de DMSO) obtendo-se um volume final de 1×10^7 células por criotubo. Os mesmos foram

colocados em caixas “*strataCooler*” e mantidos em freezer -80 °C por 3 dias seguido de transferência para o tanque de nitrogênio líquido.

3.3 MARCAÇÃO COM ANTICORPOS MONOCLONAIS

Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade dos ensaios e validar dos resultados, foi realizada a titulação de todos os anticorpos monoclonais (mAc) utilizados no estudo. Após a titulação dos mesmos, foi realizada a padronização dos painéis com diferentes marcadores em indivíduos controle para posterior avaliação dos mesmos em pacientes.

Para realizar uma avaliação de marcadores de superfície em células de pacientes e indivíduos controle, suspensões celulares de 1×10^6 células foram colocadas em placas de 96 poços com fundo V, ajustando o volume final de cada poço até 200 uL com tampão de FACS (PBS suplementado com 1% de soro humano AB⁺) Após centrifugação à 2200 rpm a 4 °C por 5 minutos, cada precipitado foi ressuspensão em 50 uL de tampão de FACS e as células foram incubadas com um mix de mAc específicos para marcadores de superfície por 30 minutos a 4 °C protegidas da luz (Tabela 6). A seguir, as células foram lavadas adicionando-se a cada poço 150 uL de tampão de FACS seguido de centrifugação a 2200 rpm a 4 °C por 5 minutos.

Para a realização da marcação intracelular da proteína Foxp3, as células foram fixadas com 100 uL de tampão de fixação (1:4) (*eBiosciences, San Diego, CA, EUA*) por 30 minutos protegidas da luz à 4 °C seguindo-se à lavagem com 100 uL de tampão de FACS e centrifugação nas condições citadas acima. Após uma segunda lavagem com 200 uL de tampão de permeabilização 1X e as células foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente (TA) em 50 uL do PBS suplementado com 2% soro de rato seguido de incubação com o anticorpo intracelular anti-Foxp3 conjugado com o fluorocromo APC, por 30 minutos à TA protegidos da luz. Finalmente, as células foram lavadas duas vezes com 150 uL de tampão de FACS e ressuspensas em 300 uL para posterior leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur ou FACSCanto (*Benton & Dickinson, Mountai View, CA, EUA*). Controles negativos e isotípicos apropriados foram utilizados em cada experimento para descartar marcação inespecífica.

Tabela 6 - Painéis de anticorpos monoclonais utilizados para avaliação das diferentes populações linfocitárias através de citometria de fluxo. FITC (fluoresceína), PE (Ficoeritrina), PerCP (Proteína Peridinin- clorofila), APC (Alloficocianina)

Painel de anticorpos monoclonais	Fluorocromos
CD3/CD4/CD8	PercP/FITC/PE
CD3/CD19	FITC/PE
CD4/CD25/Foxp3	FITC/PE/APC
CD4/CD25/CD127/Foxp3	PercP/FITC/PE/APC

3.4 PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE DAS DIFERENTES POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO.

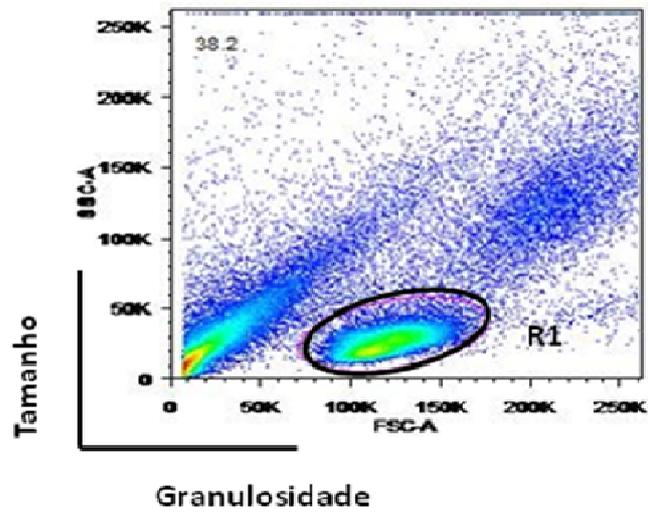
Para a análise das amostras foi utilizado o programa *FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA)*. A análise foi restrita a população de linfócitos (Região 1) através das propriedades de tamanho (*forwardscatter*- FSC) e granulosidade (*sidescatter*-SSC-H) destas células. A partir da região 1 (R1) (Figura 1A), foram realizados outros citogramas com diferentes combinações de anticorpos (Tabela 6) com a finalidade de avaliar a porcentagem relativa das subpopulações de linfócitos T e B bem como a caracterização e quantificação da população de linfócitos T com potencial regulador.

Para realizar a quantificação das subpopulações de linfócitos, foram estabelecidos as regiões de células T CD3⁺ (Região 2= R2) e B CD19⁺ (Região 3=R3) (Figura 1B) baseados na expressão mutuamente excludente destes marcadores dentro da população de linfócitos totais (R1). Da mesma maneira, dentro da população R2, foram estabelecidas as regiões de células CD3⁺CD4⁺ (Região 4= R4) e CD3⁺CD8⁺ (Região 5=R5) (Figura 1C).

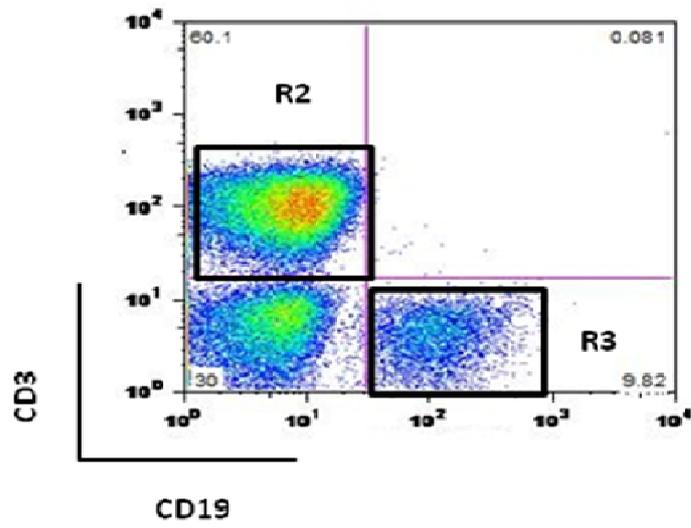
Posteriormente, para realizar a caracterização fenotípica e quantificação da população de células T CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ ou CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW} foram adquiridos 50.000 eventos da população de células T CD4⁺, sendo desta vez a região estabelecida conforme a expressão deste marcador e o parâmetro FSC (R4) (Figura 2A). A seguir, de acordo com a expressão dos marcadores CD25 e Foxp3, foi estabelecida a subpopulação de linfócitos T CD25^{HIGH}Foxp3⁺ (R6) (Figura 2B) e avaliada a sua frequência, assim como também a intensidade de fluorescência média (IFM) de Foxp3 nessa população. Em uma abordagem analítica diferente, foi avaliada dentro de R4 a frequência de células T CD25⁺CD127^{LOW} (R7)

(Figura 2C), bem como a porcentagem de células Foxp3⁺ e a intensidade de fluorescência média de Foxp3 nessa população.

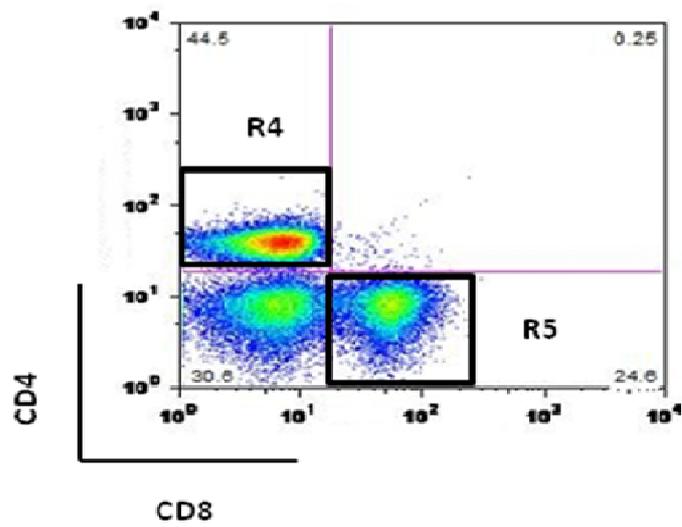
Figura 1. Estratégias de análise por citometria de fluxo das diferentes populações linfocitárias em indivíduos controles e pacientes com ICV e DlgA. A) população de linfócitos (R1) através das propriedades de tamanho e granulosidade destas células. B) População de linfócitos T CD3⁺(R2) e B CD19⁺ (R3). C) População de linfócitos T CD4⁺ (R4) e CD8⁺ (R5).



A

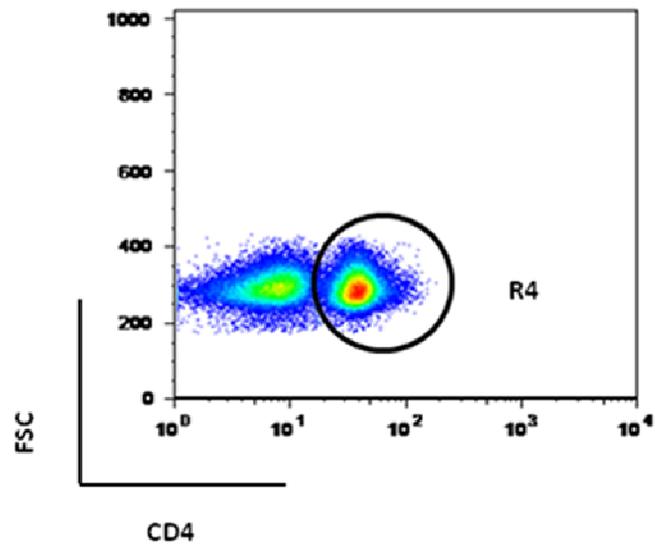


B

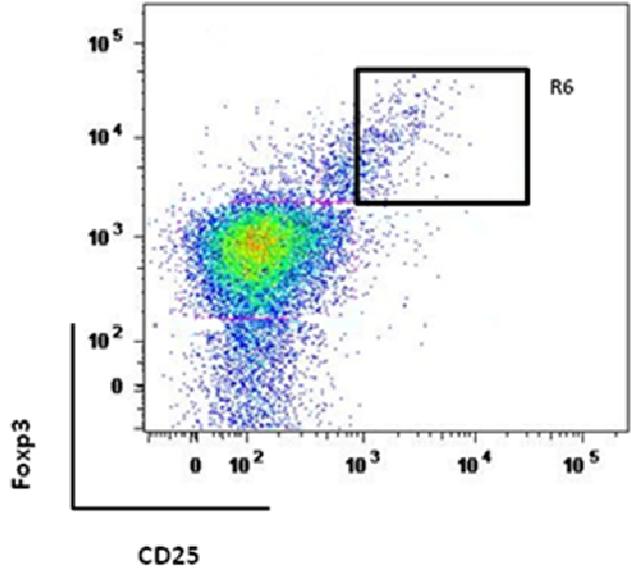


C

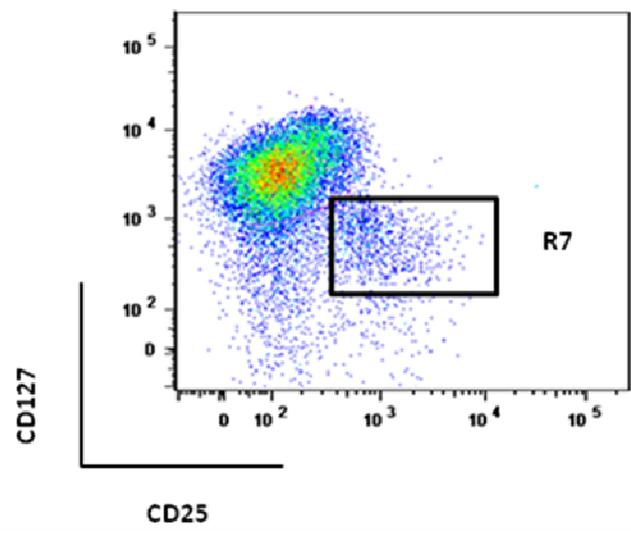
Figura 2. Estratégias de análise por citometria de fluxo das populações linfocitárias com potencial regulador em indivíduos controles e pacientes com ICV e DlgA. A) População de linfócitos T CD4⁺ (R4) conforme o tamanho destas células e a expressão do co-receptor CD4. B) População de linfócitos T CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ (R6). C) População de linfócitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW} (R7).



A



B



C

3.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS ATRAVÉS DO MÉTODO ELISA

As células mononucleares obtidas conforme o item 3.2 foram descongeladas e colocadas em placas de 48 poços com fundo chato (Costar Cambridge, MA, EUA) em uma concentração de 1×10^6 células/poço (triplicata) em 1 mL de DMEM + 5% de soro humano AB+ na presença de 10 ug/mL de Fitohemaglutinina (PHA, Sigma Chemical Co, EUA). As células foram mantidas na estufa a 37 °C com atmosfera de 10% de CO₂ e saturada de umidade a 95% e sobrenadantes foram coletados em 24, 48 e 72 horas para dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10.

Placas de 96 poços com fundo chato e de alta afinidade para EIA/RIA (Costar, Cambridge, MA, EUA), foram sensibilizadas com 50 ul mAb recombinante de rato anti-citocina humana IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) em tampão carbonato de sódio 0,5M, pH 9,6 e incubadas por 24 horas a 4 °C. A concentração final de anticorpos anti-citocinas foi determinada previamente por meio de curvas comparativas, usando interleucina recombinante dentro do intervalo sugerido pelo fornecedor. As placas assim cobertas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween 0,05% (PBS, pH 7,4; 0,05% de Tween 20; 0,01% de Thimerosal). A seguir, as placas foram submetidas ao bloqueio dos sítios não cobertos pelo anticorpo de captura pela utilização de 100 uL/poço de solução estéril de PBS contendo 5% de soroalbumina bovina (BSA, Sigma Chemical Co, USA) e mantidas duas horas à temperatura ambiente. Após quatro lavagens das placas com PBS-Tween 0,05%, os sobrenadantes de cultura das amostras a serem testadas provenientes da proliferação de células mononucleares e a curva padrão com a citocina apropriada foram acrescidas aos poços (100 uL/poço) e incubadas duas horas à 37 °C. Seguida à lavagem de cada poço, cinco vezes com PBS-Tween 0,05%, foi acrescido o segundo mAb conjugado à biotina (PharMingen, San Diego, CA, USA) diluído em PBS-Tween 0,05 % e mantido durante duas horas à temperatura ambiente. Após serem efetuadas cinco lavagens com PBS-Tween 0,05%, foi acrescido a cada poço 50 uL de streptoavidina marcada com peroxidase, (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) diluído em PBS-Tween 0,05% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Os poços foram lavados cinco vezes, sendo acrescida a solução contendo o substrato contendo 0,03% de H₂O₂ e o cromógeno ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma Chemical Co, USA) dissolvido em tampão citrato 0,028 M/fosfato de sódio 0,044 M. Com o desenvolvimento da reação, avaliado pelo

aparecimento de cor nos poços, a reação foi interrompida com a utilização de ácido cítrico 0,2 M, e a absorbância determinada em leitor de ELISA (Molecular Devices, Mountain View, CA, USA) e o programa Vectra que o acompanha, utilizando um comprimento de onda de 405 nm.

3.6 EXTRAÇÃO DE RNAm

1×10^7 células foram ressuspendidas em 500 uL de Trizol (Intrigen Corporation, Carlsbad, CA, USA) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente para obtenção de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) total. Posteriormente foram adicionados 200 uL de clorofórmio (Amresco – Solon, OH, USA). As amostras foram homogeneizadas por inversão, incubadas 2-3 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. Após centrifugação, a fase aquosa contendo RNAm foi transferida um novo tubo e 500 uL de isopropanol (Sigma-Aldrich) foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas por inversão, incubadas 45 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas como descrito anteriormente. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o precipitado de RNAm ressuspendido em 1 mL de etanol 75 % e centrifugado a 7500 g por 5 minutos a 4 °C. O etanol foi retirado cuidadosamente e o RNAm diluído em 30 uL de água livre de DNAsas e RNAsas (DEPC). Depois de uma incubação de 12 h a 4 °C a concentração do RNAm das amostras foi feita espectrofotometria determinando a densidade óptica ($\lambda=260$ nm).

3.7 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR COM ELIMINAÇÃO DO DNA CONTAMINANTE

Foram transferidos de 1 a 5 ug de RNAm total para um tubo de 0,5 mL e acrescentados 2,4 uL de Tampão de reação 10X, 1 uL de RQ1 livre de RNAsas e DNAsas e elevado o volume até 24 uL com água DEPC. Em seguida, as amostras foram incubadas a 25 °C por 15 minutos. Posteriormente foi inibida a ação da DNase I com a adição de 1 uL de solução de EGTA 20mM e acrescentados 1,5 uL de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primers (0,1 ug/uL). As amostras foram incubadas a 65 °C por 10 minutos e imediatamente o RNAm tratado foi transferido para gelo e incubado por 5 minutos. Preparo-se à parte uma mistura contendo 1uL de BSA (*Bovine Serum Albumin*) acetilada (20 ug/mL), 10 uL de transcriptase reversa M-MVL (M-MVL RT), Tampão de reação 5X e 10 uL de deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) 10

mM. Essa mistura foi adicionada aos tubos contendo as amostras de RNAm. Por último, foram acrescentados em cada amostra 2 uL de M-MVL RT (200 U/uL) seguido de duas incubações, a primeira a 37 °C por 1 hora e a segunda a 65 °C por 10 minutos. O ácido deoxirribonucleico complementar (DNAc) obtido foi estocado em freezer a -80 °C.

3.8 PCR EM TEMPO REAL DO GENE *FOXP3*

Para avaliar quantitativamente a expressão gênica do fator de transcrição *Foxp3*, foi realizado uma mistura de reação para cada amostra de 5 uL de *Taqman*[®] *Universal PCR Máster Mix*, 3,5 uL de água DEPC, 1 uL de cDNA e 0,5 uL de sondas para amplificar o gene *FOXP3*. Como controle foi utilizada uma sonda para amplificação do gene de expressão constitutiva Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). O ensaio foi realizado em triplicata.

3.9 ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada com o programa *GraphicPad PRISM* versão 5 para Windows (*GraphPad Software, San Diego California USA*). Para realizar a comparação entre os grupos de indivíduos controle e pacientes com ICV ou DIgA, foram utilizados os testes de diferença de proporção. Quando os dados apresentaram uma distribuição normal (conforme o teste de normalidade *D'Agostino & Pearson*) foi utilizado o teste de *T-Student*. Caso contrário, foi aplicado o teste bicaudal de *Mann Whitney*. Para todos os testes, adotou-se como nível de significância 0,05 ($\alpha=5\%$), onde os valores descritivos (p) abaixo desse valor foram considerados significativos.

3.10 LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO DOS EXPERIMENTOS

Os exames laboratoriais para o diagnóstico dos pacientes com ICV e DIgA foram realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP. Os resultados de tais exames e dados clínicos dos pacientes foram fornecidos pelos profissionais responsáveis através de consulta dos prontuários médicos.

Os experimentos de citometria de fluxo, PCR em tempo real e ELISA foram realizadas no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB IV-USP.

4 RESULTADOS

4.1 IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL

4.1.1 *Freqüência das diferentes subpopulações linfocitárias no sangue de pacientes com ICV*

Através da técnica de citometria de fluxo, foram analisadas células mononucleares do sangue de 33 pacientes com ICV e 30 indivíduos saudáveis para determinar a freqüência relativa das populações de linfócitos B e T. A análise *ex vivo* revelou que a freqüência de linfócitos B CD19⁺ nos pacientes com ICV não difere daquela dos indivíduos controle (8,79±4,10 vs. 10,63±2,52; p=0,0546) (Figura 3B) (tabela 7) . Do mesmo modo, a freqüência relativa de linfócitos T CD3⁺ nesses pacientes também se encontrou dentro dos valores normais referenciais quando comparada com os indivíduos controles (70,88±16,87 vs. 74,20±7.14; p=0,9287) (Figura 3A).

A análise da freqüência de células CD3⁺CD8⁺ mostrou que o grupo de pacientes com ICV apresenta um aumento destas células em relação aos controles (36,86±12,77 vs. 28,71±6,93; p=0,0029) (Figura 3D). Em relação às células CD3⁺CD4⁺, foi observada uma diminuição desta população no grupo de pacientes comparado com os controles (31,89±11,72 vs. 43,50±6,25 ; p<0,0001) (Figura 3C). Além disso, quarenta e cinco por cento dos pacientes mostraram freqüências relativas de linfócitos T CD4⁺ que se encontravam abaixo dos valores de referência para indivíduos saudáveis (Tabela 3). Finalmente, quando foi avaliada a proporção relativa de ambas as subpopulações linfocitárias, dois terços dos pacientes com ICV mostraram uma inversão da proporção de células CD4⁺:CD8⁺ (Figura 3E).

Tabela 7 - Níveis normais de referência de marcadores das diferentes populações linfocitárias conforme estabelecido pela Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

População	Porcentagem relativa (%)
CD3 ⁺	60-87
CD4 ⁺	32-61
CD8 ⁺	18-45
CD19 ⁺	5-20

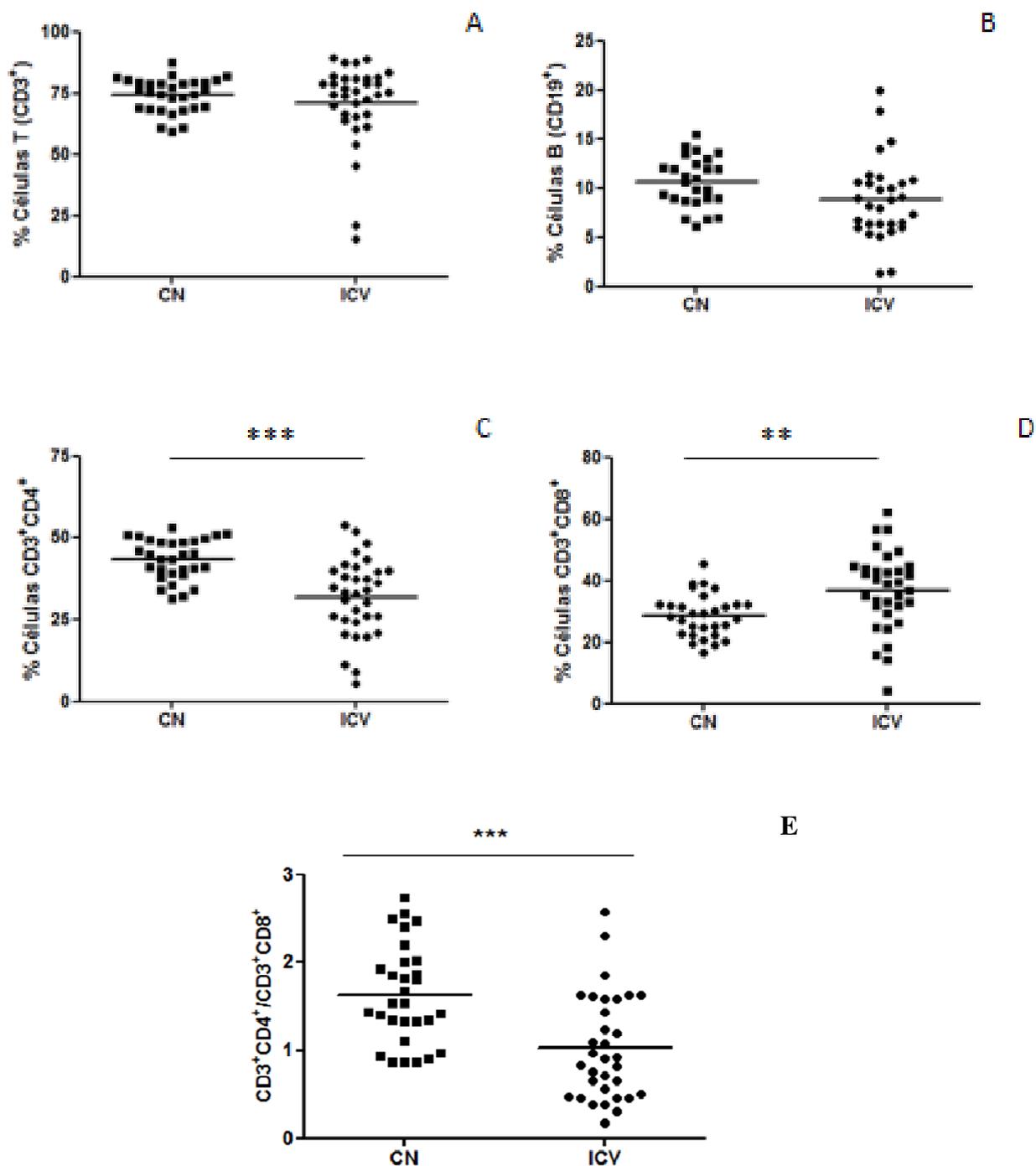
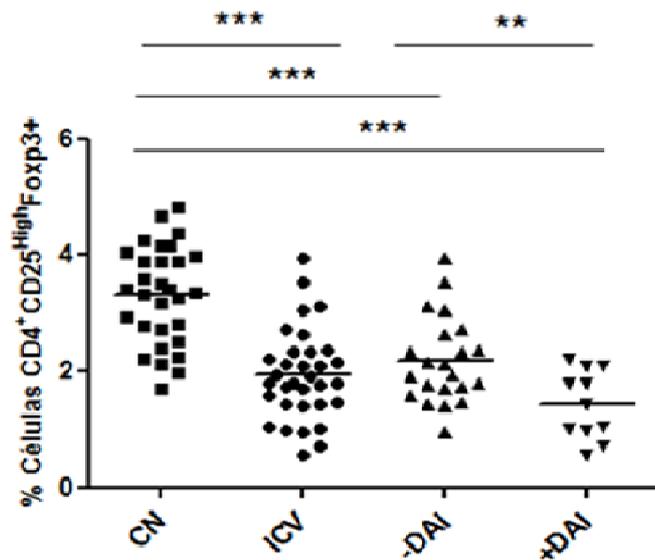


Figura 3. Frequência das diferentes subpopulações linfocitárias no sangue de indivíduos controle e pacientes com ICV. Células mononucleares do sangue de 30 indivíduos controle (CN) e 33 pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) foram marcadas com anticorpos monoclonais (A) anti-CD19, (B) anti-CD3, (C) anti-CD3 e anti-CD8 e (D) anti-CD3 e anti-CD4 e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. A frequência de cada população para cada indivíduo incluído na análise é mostrada. A barra horizontal indica a porcentagem média de linfócitos de cada grupo. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos (*).

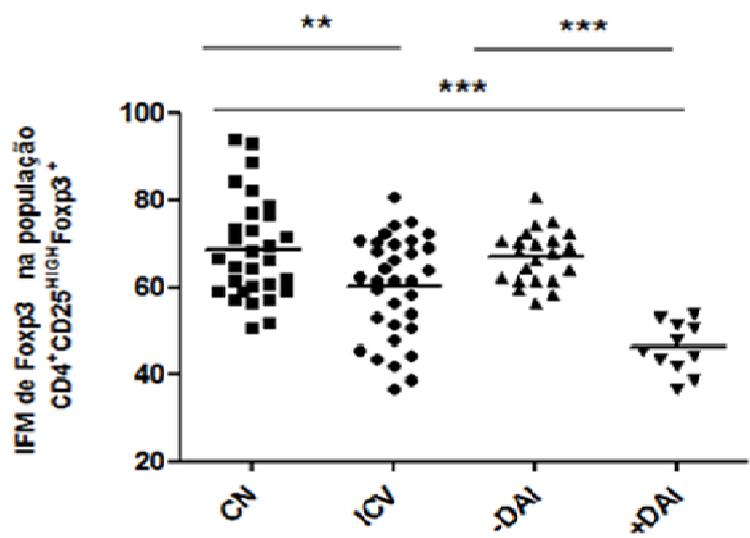
4.1.2 Freqüência de células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ em pacientes com ICV

Foi avaliada a freqüência *ex vivo* da população de células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ no sangue de indivíduos controles e com ICV e foi observado que os pacientes apresentam uma freqüência reduzida dessas células em relação aos indivíduos sadios ($1,93\pm 0,77$ vs. $3,32\pm 0,83$; $p < 0,0001$) (Figura 4A). Depois, comparou-se a freqüência destas células entre os subgrupos de pacientes com doença auto-imune (+DAI) ou sem doença auto-imune (-DAI), sendo observadas diferenças significativas, tendo o subgrupo +DAI apresentado uma freqüência de células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ menor que o subgrupo -DAI ($1,43\pm 0,60$ vs. $2,18\pm 10,74$; $p = 0,0067$) (Figura 4A). Adicionalmente, comparou-se a freqüência de células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ em pacientes com ICV classificados em função da presença ou ausência de alergia, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos ($2,13\pm 0,86$ vs. $1,71\pm 0,62$; $p = 0,1194$) (Figura 5A).

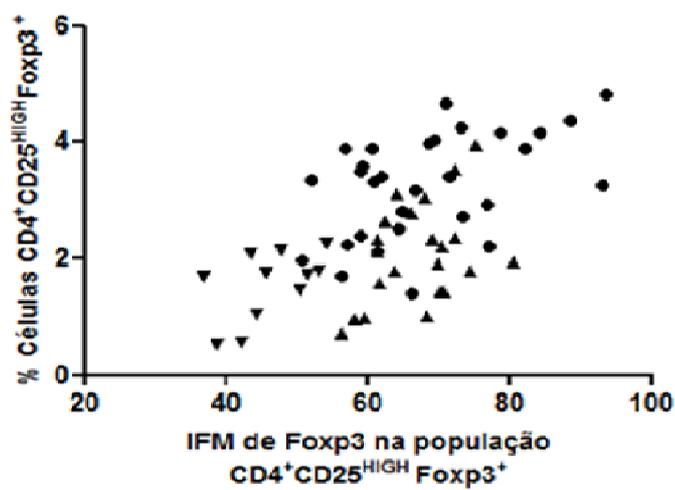
Figura 4. Avaliação por citometria de fluxo da população linfocitária CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ em indivíduos controles e pacientes com ICV, com ou sem doença auto-imune. A) Frequência das células CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ e B) Intensidade de fluorescência média (IFM) de Foxp3 na população CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺, em indivíduos controle (CN), pacientes com ICV (ICV), pacientes com ICV com doença auto-imune (+DAI) ou sem doença auto-imune (-DAI). C) Correlação entre a frequência de células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ e IFM de Foxp3 para cada indivíduo. A barra horizontal indica o valor da média do grupo. Valores de p<0.05 foram considerados significativos (*).



A



B



C

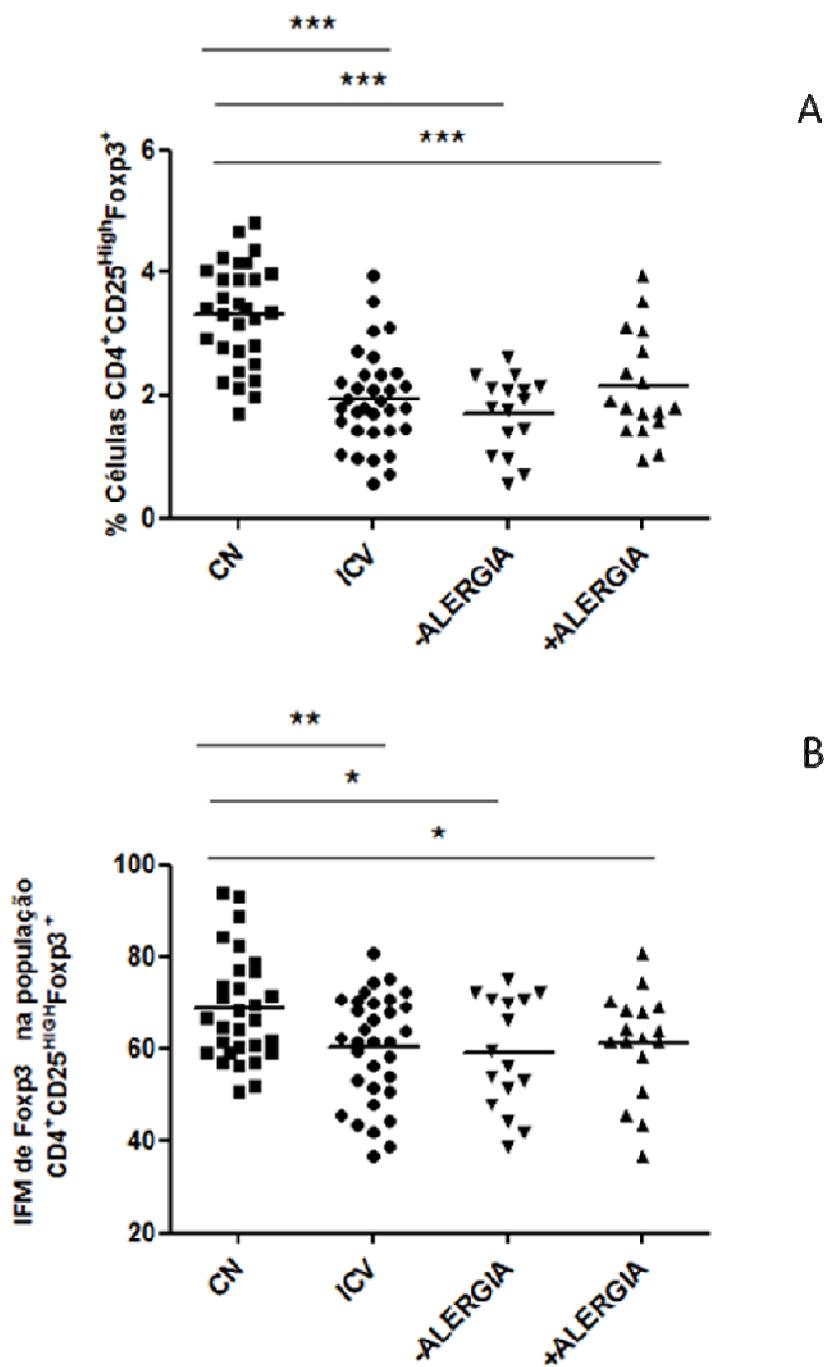


Figura 5. Avaliação por citometria de fluxo da população linfocitária CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ em indivíduos controle e pacientes com ICV, com ou sem sintomas alérgicos. A) Freqüência das células CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ e B) Intensidade de fluorescência média (IFM) de Foxp3 na população CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺, em indivíduos controle (CN), pacientes com ICV (ICV), pacientes com ICV com alergia (+ALERGIA) ou sem doença alérgica (-ALERGIA). A barra horizontal indica o valor da média do grupo. Valores de p<0.05 foram considerados significativos (*)

4.1.3 Intensidade de fluorescência média de Foxp3 na população CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ em pacientes com ICV

Posteriormente, avaliou-se a intensidade de fluorescência média (IFM) de Foxp3 na população CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ de indivíduos controles e de pacientes com ICV. Como resultado, observamos uma diminuição na expressão de Foxp3 nesta população nos pacientes em relação aos indivíduos controle (60,07±11,66 vs. 68,57±11,62; p=0,0053) (Figura 4B). A seguir, comparamos a IFM de Foxp3 nas células CD4⁺CD25^{HIGH}FOXP3⁺ dos pacientes com ou sem doença auto-imune, sendo observado que a expressão de Foxp3 encontra-se altamente reduzida na população CD4⁺CD25^{HIGH}FOXP3⁺ do subgrupo +DAI em comparação aos grupos -DAI (46,11±5,77 vs. 67,05±6,18; p<0,0001) e Controle (68,57±11,62; p<0,0001) (Figura 4B). Quando o subgrupo de pacientes -DAI foi comparado aos indivíduos controle, não foram observadas diferenças entre as IFM de Foxp3 (67,05±6,18 vs. 68,57±11,62; p=0,5818) (Figura 4B). Posteriormente, correlacionou-se a freqüência de células CD4⁺CD25^{HIGH}FOXP3⁺ e IFM de Foxp3 em cada indivíduo incluído no estudo, sendo observada associação entre uma menor freqüência de Tregs e uma menor expressão de Foxp3 nos indivíduos com ICV e diagnóstico de auto-imunidade (Figura 4C).

Também analisamos a IFM de Foxp3 em células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ dos pacientes com ICV com ou sem alergia. Desta vez, não foram observadas diferenças na expressão de Foxp3 entre os subgrupos (62,66±10,91 vs. 57,33±12,15; p=0,6075) (Figura 5B).

4.1.4 Expressão do transcrito do gene FOXP3 em células mononucleares do sangue de pacientes com ICV

Foi extraído RNAm de células mononucleares do sangue de pacientes com ICV e indivíduos controle com a finalidade de determinar o nível de expressão do gene *FOXP3* mediante a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Foi observado que pacientes com ICV apresentaram uma menor expressão do transcrito em relação aos indivíduos sadios (0,53±0,20 vs. 1,05±0,42; p<0,0001) (Figura 6A). Posteriormente, realizamos uma análise comparativa da expressão gênica entre os subgrupos de pacientes com ICV com ou sem auto-imunidade, sendo observada diferença estatisticamente significativa entre eles (0,35±0,11 vs. 0,59±0,19; p=0,0238) (Figura 6A). A mesma análise

entre subgrupos de pacientes com ICV com ou sem alergia revelou que não há diferença estatisticamente entre ambos os grupos ($0,55\pm 0,23$ vs. $0,52\pm 0,19$; $p=0,8135$)(Figura 6B).

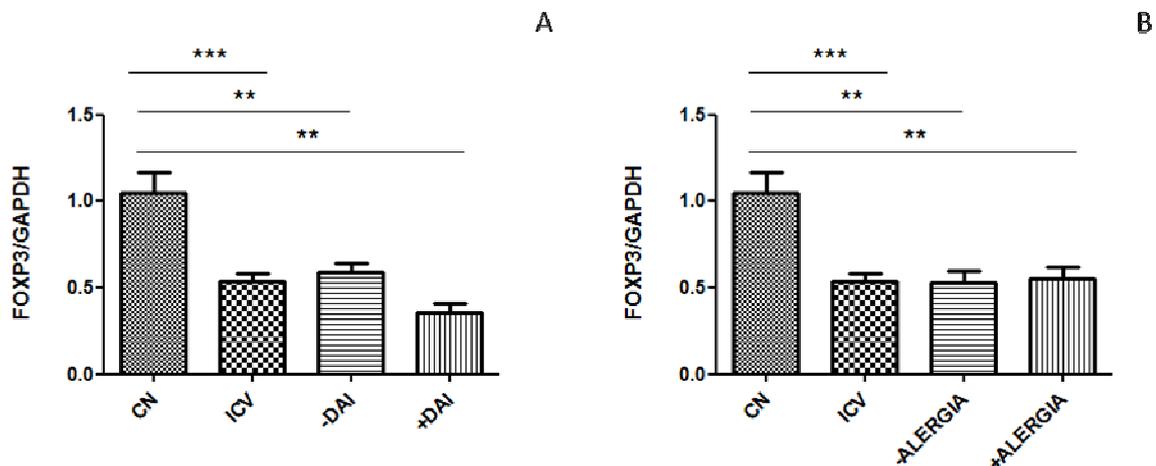


Figura 6. Análise dos níveis de expressão do RNAm em indivíduos controles e pacientes com ICV de *FOXP3* por PCR em tempo real. Valores de expressão em indivíduos controle (CN), pacientes com ICV (ICV) com doença auto-imune (+DAI) ou sem doença auto-imune (-DAI) (A), e pacientes com ICV com alergia (+ALERGIA) ou sem alergia (-ALERGIA) (B). Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos (*). Gene normalizador Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*).

4.1.5 Avaliação da produção de citocinas pelas células mononucleares do sangue de pacientes com ICV

Células mononucleares do sangue de indivíduos saudáveis foram estimuladas com PHA, sendo realizada uma cinética de produção de citocinas. Uma vez estabelecidos os picos de produção para cada citocina, as células de pacientes com ICV e indivíduos controle foram estimuladas com PHA por 24, 48 e 72 horas para avaliação a produção de citocinas pelo método ELISA, a fim de correlacionar o perfil de citocinas produzidas com a frequência de células $CD4^+CD25^{HIGH}FOXP3^+$.

A análise mostrou que as células dos pacientes com ICV produzem menor quantidade de IL-2 ($0,32\pm 0,26$ ng/mL) e IL-4 ($0,14\pm 0,19$ ng/mL) em 24h de cultura em relação aos indivíduos controles ($0,75\pm 0,13$ ng/mL; $p=0,0001$ e $0,27\pm 0,12$ ng/mL; $p=0,0037$, respectivamente) (Figuras 7 A e B). De maneira similar, as células dos pacientes com ICV produzem menor quantidade de IL-5 ($0,16\pm 0,17$ ng/mL) e IL-10 ($0,23\pm 0,22$ ng/mL) após

estímulo por 48h em relação aos indivíduos controles ($0,36\pm 0,18$ ng/mL; $p=0,0079$ e $0,75\pm 0,21$ ng/mL; $p=0,0002$, respectivamente) (Figuras 7 C e D).

Quando analisamos a produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10 dos pacientes em função da presença ou ausência de doença auto-imune, não observamos diferenças significativas na produção destas citocinas entre os subgrupos (Figuras 7 A-D). A mesma análise foi realizada classificando-se os pacientes em função da presença ou ausência de sintomas alérgicos, não sendo observadas diferenças significativas entre os mesmos (Figuras 7 A-D).

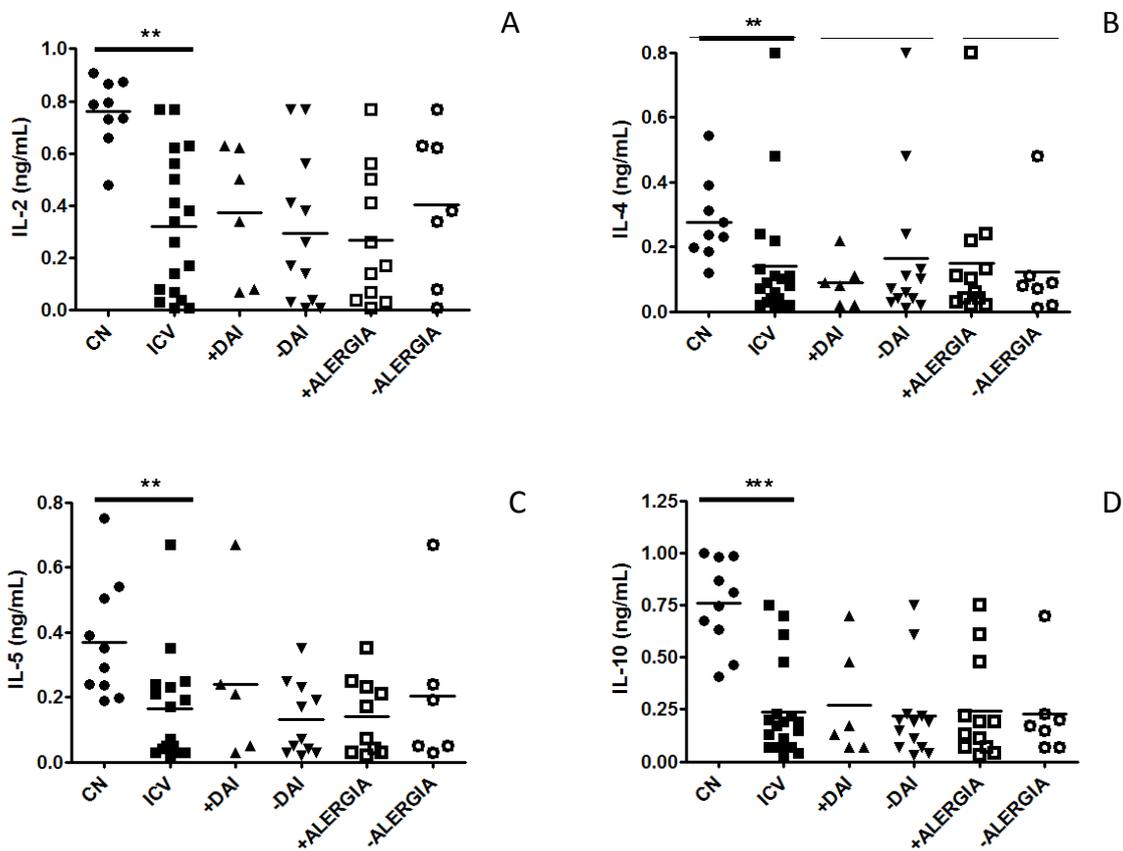


Figura 7. Análise da produção de citocinas em indivíduos controles e pacientes com ICV através do método ELISA. Quantificação da produção de IL-2 (A) e IL-4 (B) em sobrenadantes de culturas de PBMC após estimulação com PHA por 24 horas. Produção de IL-5 (C) e IL-10 (D) em sobrenadantes de culturas de PBMC após estimulação com PHA por 48 horas. (Indivíduos controle (CN), pacientes com ICV (ICV), pacientes com ICV e doença auto-imune (DAI+) ou sem doença auto-imune (DAI-), pacientes com ICV com alergia (+ALERGIA) e sem alergia (-ALERGIA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (*).

4.2 DEFICIÊNCIA SELETIVA DE IMUNOGLOBULINA A

4.2.1 *Freqüência das diferentes subpopulações linfocitárias no sangue de pacientes com DIgA*

Através da técnica de citometria de fluxo, foram analisadas células mononucleares do sangue de 15 pacientes com DIgA e 13 indivíduos saudáveis para determinar a freqüência relativa das populações de linfócitos B e T. A análise revelou que a freqüência de linfócitos B CD19⁺ nos pacientes não difere daquela encontrada nos indivíduos controle (11,06±3,22 vs. 13,28±3,49; p=0,0992) (Figura 8B). Do mesmo modo, a freqüência relativa de linfócitos T CD3⁺ nesses pacientes também se encontrou dentro dos valores normais referenciais quando comparada aos indivíduos controles (67,03±10,31 vs. 70,21±4,62; p=0,6450) (Figura 8A).

A análise da freqüência de células CD3⁺CD8⁺ não mostrou diferenças significativas entre indivíduos com DIgA e controles (21,27±5,48 vs. 23,15±12,77; p=0,3849) (Figura 8D). Porém, houve uma diminuição no número de células CD3⁺CD4⁺ nestes pacientes em relação aos controles (35,51±9,21 vs. 47,75±4,76; p=0,0002) sendo que quarenta por cento dos pacientes mostraram freqüências relativas desses linfócitos que se encontravam abaixo dos valores de referência para indivíduos saudáveis (Figura 8C). Apesar disso, os pacientes com DIgA apresentaram proporções de células CD4:CD8 dentro dos valores de referência (Figura 8E).

4.2.2 Frequência de células $CD4^+CD25^{High}Foxp3^+$ em pacientes com DlgA

Posteriormente, avaliamos a frequência da subpopulação $CD4^+CD25^{High}Foxp3^+$ no sangue de indivíduos controles e de pacientes com DlgA, sendo observado que os pacientes apresentaram uma frequência reduzida dessas células quando comparados aos indivíduos saudáveis ($0,77\pm 0,0,23$ vs. $1,15\pm 0,28$; $p=0,0006$) (Figura 9A). Posteriormente, comparou-se a frequência destas células entre os subgrupos de pacientes com doença auto-imune (+DAI) ou sem doença auto-imune (-DAI) não sendo observadas diferenças significativas entre estes subgrupos ($1,71\pm 0,19$ vs. $0,86\pm 0,11$; $p=0,2195$) (Figura 9A). Comparou-se a frequência de células $CD4^+CD25^{High}Foxp3^+$ em pacientes com DlgA classificados em função da presença ou ausência de alergia, não sendo encontradas diferenças entre ambos os grupos ($0,78\pm 0,23$; vs. $0,75\pm 0,82$; $p=0,8205$) (Figura 10A).

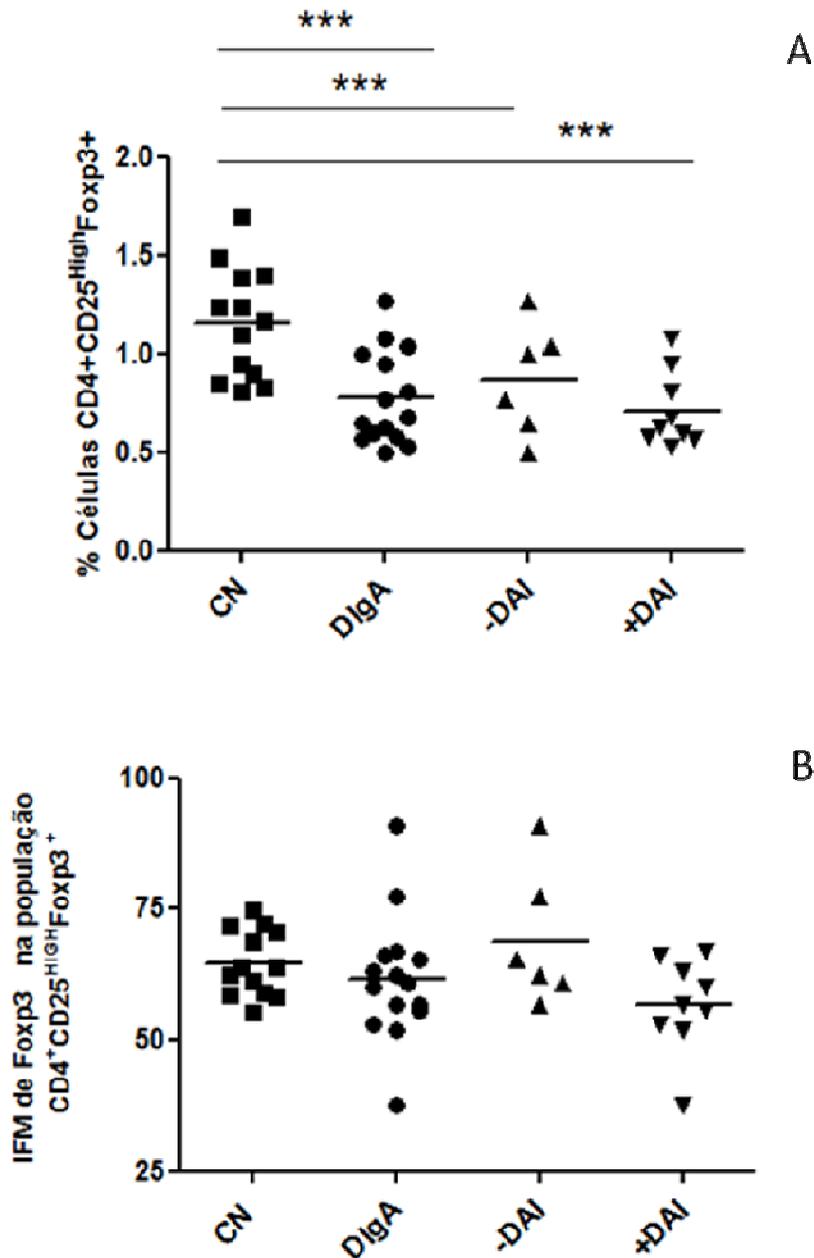


Figura 9. Avaliação por citometria de fluxo da população linfocitária CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ em indivíduos controles e pacientes com DlgA, com ou sem doença auto-imune. A) Freqüência das células CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ e B) Intensidade de fluorescência média (IFM) de Foxp3 na população CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺, em indivíduos controle (CN), pacientes com DlgA (DlgA), pacientes com DlgA com doença auto-imune (+DAI) ou sem doença auto-imune (-DAI). A barra horizontal indica o valor da média do grupo. Valores de p<0.05 foram considerados significativos (*).

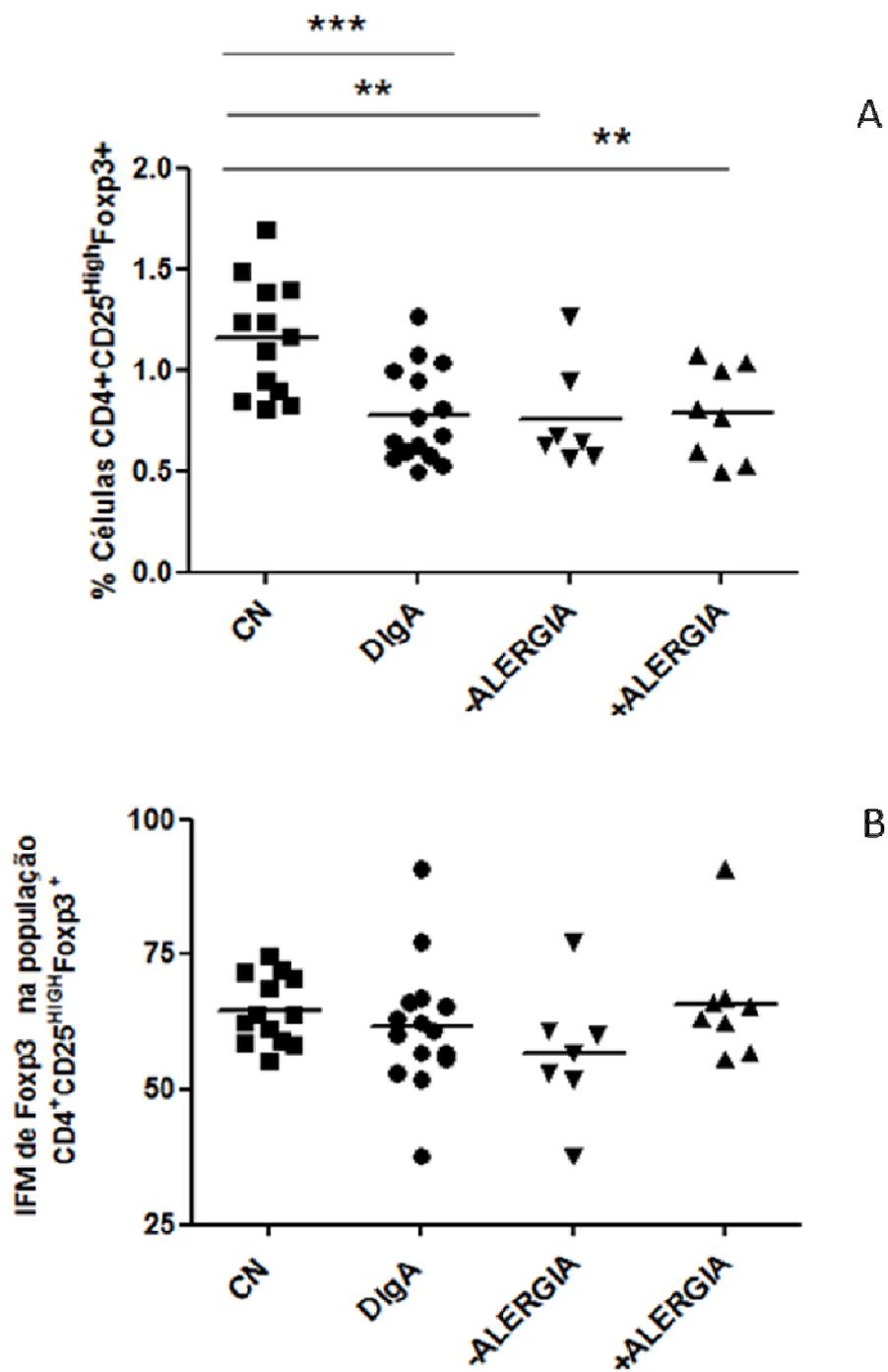


Figura 10. Avaliação por citometria de fluxo da população linfocitária CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ em indivíduos controle e pacientes com DigA, com ou sem atopia. A) Freqüência das células CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ e B) Intensidade de fluorescência média (IFM) de Foxp3 na população CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺, em indivíduos controle (CN), pacientes com DigA (DigA), pacientes com DigA com, pacientes com alergia (+ALERGIA) ou sem alergia (-ALERGIA). A barra horizontal indica o valor da média do grupo. Valores de p<0.05 foram considerados significativos (*).

4.2.3 Intensidade de fluorescência média de Foxp3 na população $CD4^+CD25^{High}Foxp3^+$ em pacientes com DlgA

Avaliamos a intensidade de fluorescência média (IFM) de Foxp3 na população $CD4^+CD25^{High}Foxp3^+$ de indivíduos controles e pacientes com DlgA, não sendo observadas diferenças na expressão de Foxp3 entre os grupos ($64,70 \pm 6,28$ vs. $61,67 \pm 11,91$; $p=0,4191$) (Figura 9B). A seguir, foi comparada a IFM de Foxp3 nas células $CD4^+CD25^{High}Foxp3^+$ dos pacientes com ou sem doença auto-imune, não sendo observadas diferenças significativas entre os subgrupos ($56,82 \pm 8,94$ vs. $68,93 \pm 12,88$; $p=0,0502$) (Figura 9B). Analisando-se a IFM de Foxp3 nas células $CD4^+CD25^{High}Foxp3^+$ dos pacientes classificados em função da presença ou ausência de alergia, não encontramos diferença na expressão de Foxp3 entre os subgrupos ($65,88 \pm 10,95$ vs. $56,86 \pm 11,94$; $p=0,0823$) (Figura 10B).

4.2.4 Frequência de células $CD4^+CD25^+CD127^{Low}$ em pacientes com DlgA

Avaliou-se, a frequência da população de células $CD4^+CD25^+CD127^{Low}$ no sangue de indivíduos controles e de pacientes com DlgA, sendo observado que os pacientes apresentaram uma frequência reduzida destas células em relação aos indivíduos sadios ($1,89 \pm 0,45$ vs. $2,46 \pm 0,58$; $p=0,0075$) (Figura 11A). Posteriormente, comparou-se a frequência destas células entre os subgrupos de pacientes com doença auto-imune (+DAI) e sem doença auto-imune (-DAI) não sendo observadas diferenças significativas entre estes subgrupos ($1,86 \pm 0,50$ vs. $2,03 \pm 0,48$; $p=0,5929$) (Figura 11A). Comparou-se a frequência de células $CD4^+CD25^+CD127^{Low}$ em pacientes com DlgA classificados em função da presença ou ausência de alergia, não sendo encontradas diferenças entre ambos os grupos ($1,84 \pm 0,49$; vs. $1,94 \pm 0,43$; $p=0,6863$) (Figura 12A).

Figura 11. Análise da população linfocitária CD4⁺CD25⁺CD127^{Low} em indivíduos controles e pacientes com DlgA, com ou sem doença auto-imune. A) Freqüência das células CD4⁺CD25⁺CD127^{Low}, (B) Intensidade de fluorescência média (IFM) de Foxp3 na população CD4⁺CD25⁺CD127^{Low} e (C) Freqüência das células Foxp3⁺ na população CD4⁺CD25⁺CD127^{Low} em indivíduos controle (CN), pacientes com DlgA (DlgA), pacientes com DlgA com doença auto-imune (+DAI) ou sem doença auto-imune (-DAI). A barra horizontal indica o valor da média do grupo. Valores de p<0.05 foram considerados significativos (*).

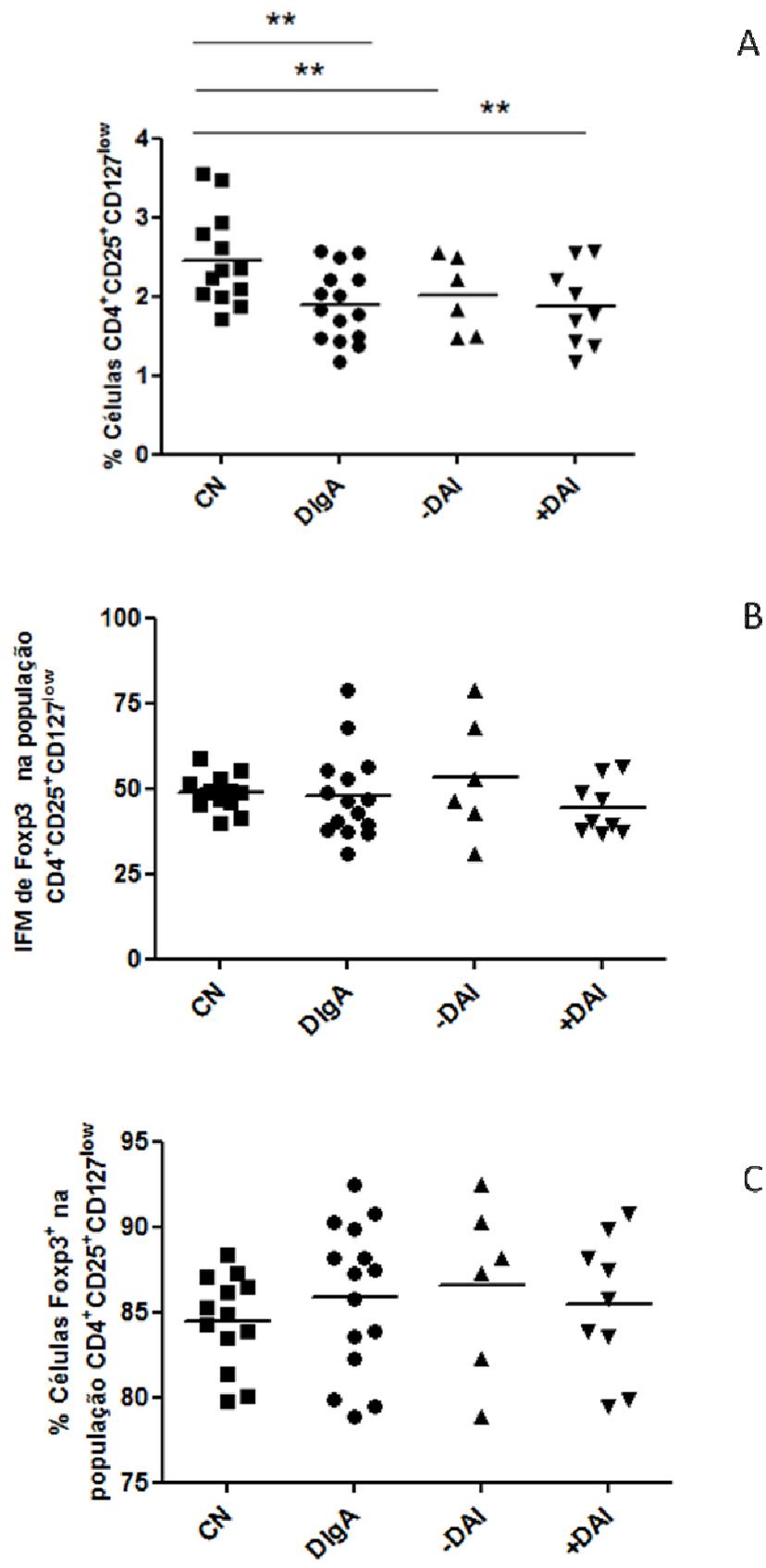
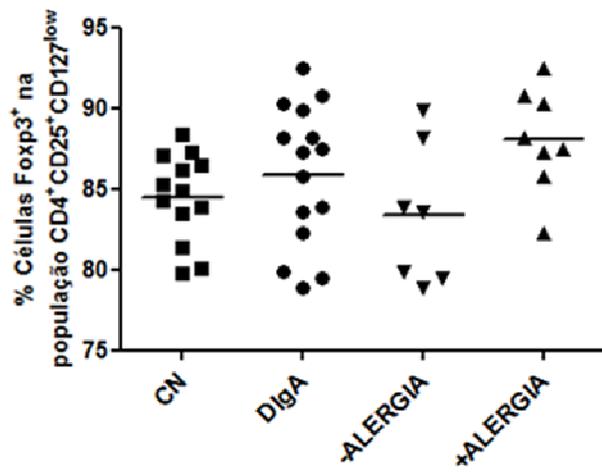
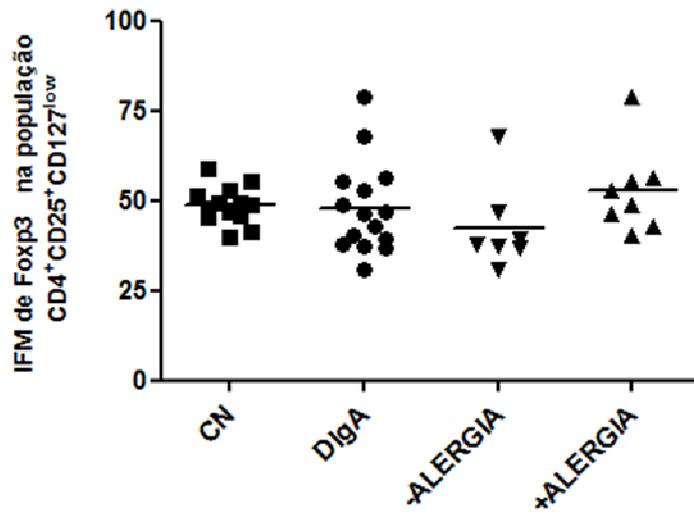
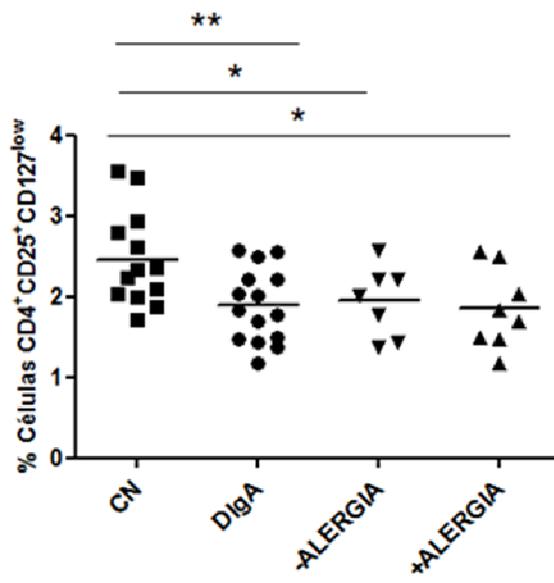


Figura 12. Análise da população linfocitária CD4⁺CD25⁺CD127^{low} em indivíduos controles e pacientes com DlgA, com ou sem atopia. A) Freqüência das células CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, (B) Intensidade de fluorescência média (IFM) de Foxp3 na população CD4⁺CD25⁺CD127^{low} e (C) Freqüência das células Foxp3⁺ na população CD4⁺CD25⁺CD127^{low} em indivíduos controle (CN), pacientes com DlgA (DlgA), pacientes com DlgA com alergia (+ALERGIA) ou sem alergia (-ALERGIA).



4.2.5 Intensidade de fluorescência média de Foxp3 na população CD4⁺CD25⁺CD127^{low} em pacientes com DlgA

Avaliamos a intensidade de fluorescência média (IFM) de Foxp3 na população CD4⁺CD25⁺CD127^{low} de indivíduos controles e pacientes com DlgA, não sendo observadas diferenças na expressão de Foxp3 entre os grupos (47,84±12,83 vs. 48,63±5,21; p=0,8377) (Figura 11B). A seguir, foi comparada a IFM de Foxp3 nas células CD4⁺CD25⁺CD127^{low} dos pacientes com ou sem doença auto-imune, não sendo observadas diferenças significativas entre os subgrupos (44,26±7,71 vs. 53,22±17,55; p=0,1953) (Figura 11B). Analisando-se a IFM de Foxp3 nas células CD4⁺CD25⁺CD127^{low} dos pacientes classificados em função da presença ou ausência de alergia, encontramos diferença na expressão de Foxp3 entre os subgrupos (52,66±12,04 vs. 42,33±12,19; p=0,0401) (Figura 12B).

4.2.6 Frequência de células Foxp3⁺ na população CD4⁺CD25⁺CD127^{low} em pacientes com DlgA

A seguir, analisamos a frequência de células Foxp3⁺ dentro da população CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, não encontrando-se diferenças entre pacientes e controles (85,91±4,36 vs. 84,52±2,72; p=0,3304) (Figura 11C). Posteriormente, quando esta análise foi realizada classificando os pacientes conforme a presença ou ausência de doença auto-imune, não foram observadas diferenças significativas (85,46±4,06 vs. 86,58±5,08; p=0,6413) (Figura 11C). De maneira similar, quando os pacientes foram classificados em função da presença ou ausência de sintomas alérgicos, também não foram observadas diferenças entre os grupos (88,09±3,19 vs. 83,41±4,34; p=0,0638) (Figura 12C).

4.2.7 Avaliação da produção de citocinas pelas células mononucleares do sangue de pacientes com DlgA

Células mononucleares do sangue de pacientes com DlgA e indivíduos controle foram estimuladas com PHA por 24, 48 e 72 horas para a avaliação da produção de citocinas a fim de correlacionar o perfil de citocinas produzidas com a frequência de células CD4⁺CD25⁺CD127^{low}. A análise mostrou que as células dos pacientes com DlgA produzem

menor quantidade de IL-2 ($0,34\pm 0,32$ ng/mL) e IL-4 ($0,05\pm 0,05$ ng/mL) em 24h de cultura em relação aos indivíduos controles ($0,75\pm 0,13$ ng/mL; $p=0,0017$ e $0,27\pm 0,12$ ng/mL; $p=0,0001$, respectivamente) (Figuras 13 A e B). De maneira similar, as células dos pacientes com DlgA produzem menor quantidade de IL-5 ($0,16\pm 0,17$ ng/mL) e IL-10 ($0,20\pm 0,25$ ng/mL) após estímulo por 48h em relação aos indivíduos controles ($0,36\pm 0,18$ ng/mL; $p=0,0082$ e $0,75\pm 0,21$ ng/mL; $p=0,0005$, respectivamente) (Figuras 13 C e D).

Quando analisamos a produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10 pelos pacientes em função da presença ou ausência de doença auto-imune, não observamos diferenças significativas na produção dessas citocinas entre os subgrupos de pacientes (Figuras 13A-D). A mesma análise foi realizada classificando os pacientes em função da presença ou ausência de sintomas alérgicos, não sendo observadas diferenças entre os grupos (Figuras 13A-D).

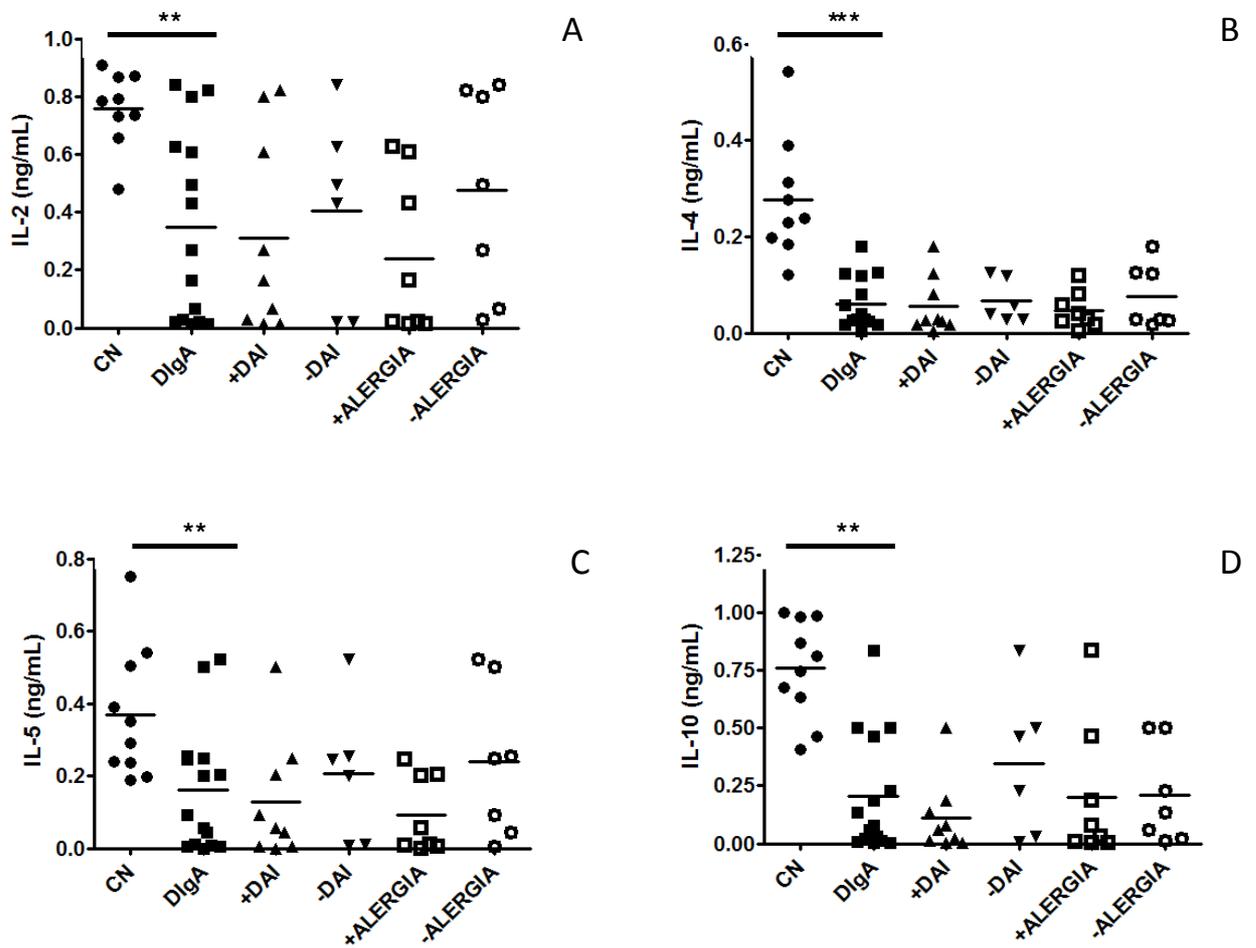


Figura 13. Análise da produção de citocinas em indivíduos controles e pacientes com DlgA através do método ELISA. Quantificação da produção de IL-2 (A) e IL-4 (B) em sobrenadantes de culturas de PBMC após estimulação com PHA por 24 horas. Produção de IL-5 (C) e IL-10 (D) em sobrenadantes de culturas de PBMC após estimulação com PHA por 48 horas (Indivíduos controle (CN), pacientes com deficiência de IgA (DlgA), pacientes com deficiência de IgA e doença auto-imune (DAI+) ou sem doença auto-imune (DAI-), pacientes com deficiência de IgA com alergia (+ALERGIA) ou sem alergia (-ALERGIA).

5 DISCUSSÃO

As imunodeficiências já foram consideradas limitadas a condições clínicas tais como o aumento da incidência ou gravidade de doenças infecciosas. No entanto, é atualmente aceito que muitas imunodeficiências primárias também são caracterizadas por um notável aumento na incidência de fenômenos auto-ímmunes e inflamatórios, além de um aumento à susceptibilidade ao câncer (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999; CARNEIRO-SAMPAIO, M. e COUTINHO, A., 2007). No caso particular da ICV, a alta incidência de auto-ímmunidade e sintomas alérgicos nestes pacientes sugere que complexos defeitos no sistema imunológico, além de defeitos quantitativos e qualitativos na produção de anticorpos, devem contribuir para a alta diversidade de manifestações clínicas observadas.

A presença de doenças auto-ímmunes representa distúrbios nos mecanismos que regulam a resposta ímmune e mantêm a tolerância imunológica, a qual depende da habilidade do sistema ímmune em discriminar entre o próprio e o não-próprio (KYEWSKI, B. e KLEIN, L., 2006). Este estado de tolerância é estabelecido e mantido por mecanismos centrais e periféricos que impedem a maturação e ativação de clones de linfócitos auto-reativos potencialmente nocivos. Os mecanismos homeostáticos centrais têm origem no timo durante uma fase precoce do desenvolvimento, na qual as células T imaturas que reconhecem antígenos próprios com alta afinidade são eliminadas mediante um processo conhecido como seleção negativa (KYEWSKI, B. e KLEIN, L., 2006). Paralelamente, aqueles linfócitos T que escapam à seleção tímica e que reconhecem auto-antígenos tecido-específicos que não são abundantes no timo, são eliminados por mecanismos de tolerância periférica, que provêem um segundo nível de proteção contra a auto-ímmunidade (KYEWSKI, B. e KLEIN, L., 2006). Não obstante, alguns desses clones podem escapar destes mecanismos inibidores e causar doenças auto-ímmunes em certas circunstâncias.

Um número crescente de trabalhos indica uma participação significativa de uma subpopulação de linfócitos CD4⁺ com potencial regulador na manutenção da homeostase imunológica em adição aos mecanismos de indução de anergia e morte por apoptose (SAKAGUCHI, S. *et al.*, 1995; SHEVACH, E. M., 2002; O'GARRA, A. e VIEIRA, P., 2004; KRONENBERG, M. e RUDENSKY, A., 2005; SAKAGUCHI, S., 2005) e na modulação das respostas ímmunes a patógenos, ao câncer e a transplantes (CHATILA, T. A., 2005). No entanto, existe informação limitada e controversa em relação ao papel desta população na

patogênese das doenças auto-imunes e alérgicas em seres humanos (CAO, D. *et al.*, 2003; PUTHETI, P. *et al.*, 2003; BOYER, O. *et al.*, 2004; PUTHETI, P. *et al.*, 2004; VIGLIETTA, V. *et al.*, 2004; LYSSUK, E. Y. *et al.*, 2007). As células reguladoras (Tregs) têm sido reportadas como estando diminuídas em indivíduos com artrite reumatóide (CAO, D. *et al.*, 2003) e lúpus sistêmico eritematoso (LYSSUK, E. Y. *et al.*, 2007). Porém, na esclerose múltipla foi observado um aumento (PUTHETI, P. *et al.*, 2003) ou nenhuma alteração na frequência destas células (PUTHETI, P. *et al.*, 2004), embora outros estudos demonstram uma perda na capacidade supressora das mesmas (KRIEGEL, M. A. *et al.*, 2004; VIGLIETTA, V. *et al.*, 2004). Ainda, a deficiência de Tregs também foi observada em indivíduos com hepatite C e vasculite, enquanto a função supressora desta população se manteve intacta (BOYER, O. *et al.*, 2004).

Em uma das maiores coortes de ICV já estudada, as doenças auto-imunes foram descritas em 21% dos pacientes (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999), no entanto, prevalências maiores também foram observadas (LOPES-DA-SILVA, S. e RIZZO, L. V., 2008). Apesar da grande variabilidade nestes resultados, a qual pode ser parcialmente explicada pelas diferenças entre coortes de ICV avaliadas em cada estudo e pela heterogeneidade nos critérios diagnósticos utilizados por diferentes grupos para o diagnóstico de auto-imunidade, as estatísticas demonstram uma alta prevalência destas doenças nesses indivíduos em relação à população geral (5-7%) (DIAMOND, B., 2005). Na coorte brasileira de indivíduos com ICV, doenças auto-imunes foram diagnosticadas em aproximadamente 15,5% dos pacientes (KOKRON, C. M. *et al.*, 2004), sendo o Vítilligo a de maior frequência, diferindo de outras coortes nas quais a trombocitopenia púrpura é a principal doença (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999; CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2008). Ainda, fenômenos auto-imunes têm sido relatados como mais freqüentes entre as mulheres com ICV (CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 1989), porém, na nossa casuística há uma aparente maior incidência de auto-imunidade em indivíduos do sexo masculino (KOKRON, C. M. *et al.*, 2004).

Diversos mecanismos têm sido sugeridos para explicar o paradoxal surgimento de doenças auto-imunes em pacientes com ICV, como por exemplo, a predisposição genética, infecção persistente, desregulamento imune e defeitos nos mecanismos de indução e manutenção da tolerância.

Inicialmente, defeitos monogênicos em genes *ICOS*, *TACI* e *BAFF-R* foram identificados em indivíduos com ICV. No entanto, o papel destas raras mutações na indução da deficiência imunológica presente nesses pacientes não está completamente compreendido, particularmente em relação à auto-imunidade (BACCHELLI, C. *et al.*, 2007).

Defeitos na imunidade inata podem contribuir para o surgimento de doenças auto-imunes. A diferenciação e maturação defeituosa das células dendríticas, com diminuição da expressão de moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e HLA-DR bem como a baixa produção de IL-12 foram descritas em alguns pacientes com ICV (BAYRY, J. *et al.*, 2005; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e RADIGAN, L., 2005). Considerando a importante participação destas células no início da resposta imune adaptativa, os defeitos acima mencionados poderiam conduzir ao processamento defeituoso de antígenos e sua posterior eliminação, podendo resultar em inflamação crônica e conseqüente lesão tecidual secundária devido à deposição final de imunocomplexos em órgãos, formação de auto-anticorpos e reatividade cruzada entre os tecidos normais e os antígenos estranhos. Além disso, como conseqüência da hipogamaglobulinemia característica desses pacientes, a fagocitose por monócitos poderia também estar comprometida, devido a uma opsonização não efetiva (AMORAS, A. L. *et al.*, 2003).

Por outro lado, falhas nos mecanismos de tolerância centrais e periféricos podem levar à persistência de auto-anticorpos por diferentes processos, incluindo mutação somática anormal, falhas na exclusão de clones auto-reativos ou defeitos na maturação de células dendríticas que podem comprometer a indução da tolerância imunológica. Além disso, a perda de células B de memória, principalmente da população CD27⁺IgD⁻IgM⁻ foi associada ao desenvolvimento de doença auto-imune (TAUBENHEIM, N. *et al.*, 2005). Ademais, diferentes populações de células T reguladoras estão envolvidas na manutenção da tolerância periférica, suprimindo a ativação e expansão dos linfócitos B e T auto-reativos.

Uma análise preliminar das subpopulações linfocitárias nos indivíduos por nós estudados mostrou que, apesar dos pacientes com ICV apresentarem freqüências de células B e T dentro dos valores normais de referência, 45% dos indivíduos apresentaram uma freqüência reduzida de células T CD4⁺, podendo isto estar acompanhado ou não de uma alteração na freqüência de células CD3⁺CD8⁺. Esta inversão na proporção celular CD4:CD8 também foi observada para outras coortes de pacientes com ICV (CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2008). Conforme a informação nos prontuários médicos de cada paciente, aqueles

indivíduos nos quais foi observada uma redução de células T CD4⁺ têm mantido ou mesmo aumentado esta linfopenia no decorrer dos últimos quatro anos, embora seus hemogramas anuais não mostrem leucopenia ou linfopenia. Portanto, as nossas observações sugerem que alterações nas freqüências das subpopulações de linfócitos T contribuem para a inversão na proporção de células CD4:CD8, o que poderia encobrir a linfopenia de células CD4⁺ observada nesses pacientes.

Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar a linfopenia CD4⁺ em indivíduos com ICV, entre elas, a timopoiese defeituosa, produção reduzida de interleucina-2 (IL-2), anormalidades na homeostase linfocitária mediada por interleucina-7 e apoptose aumentada devido à ativação celular persistente causada por infecções recorrentes (ARKWRIGHT, P. D. *et al.*, 2002; BRANDT, D. e GERSHWIN, M. E., 2006; KNIGHT, A. K. e CUNNINGHAM-RUNDLES, C., 2006).

Considerando a alta incidência de doenças auto-imunes em indivíduos com ICV e a linfopenia de células CD4⁺ observada nesses pacientes, consideramos de interesse analisar a população de linfócitos CD4⁺ com potencial regulador e avaliar se defeitos quantitativos destas células podem explicar a alta incidência de doenças auto-imunes associadas a esta imunodeficiência. Com esse fim, foram analisadas por citometria de fluxo, células mononucleares do sangue de pacientes com ICV e de indivíduos saudáveis utilizados como controles, para a determinação da porcentagem de linfócitos CD4⁺ com potencial regulador.

A expressão da cadeia alfa do receptor da IL-2 (CD25) na superfície de linfócitos CD4⁺ como marcador de células Tregs naturais, tem certas limitações devido à possível contaminação por células T recentemente ativadas, preocupação inevitável especialmente quando se trata de indivíduos com doenças auto-imunes, alérgicas, neoplásicas ou infecciosas. No entanto, em seres humanos, aquelas células com alta expressão constitutiva do marcador CD25 (CD25^{High}) apresentam correlação com a função supressora em ensaios *in vitro* (BAECHER-ALLAN, C. *et al.*, 2001). Além disso, a identificação do fator de transcrição Foxp3 como um marcador molecular específico das células Tregs e gene regulador mestre do desenvolvimento e função das mesmas (FONTENOT, J. D. *et al.*, 2003; HORI, S. *et al.*, 2003; HORI, S. e SAKAGUCHI, S., 2004), sem dúvidas têm contribuído para o entendimento e melhor caracterização desta população. Porém, diferentemente do observado em linfócitos T reguladores de camundongos, em seres humanos o Foxp3 também é expresso em células T recentemente ativadas (GAVIN, M. A. *et al.*, 2006; WANG, JUN ET AL., 2007). Portanto,

avaliando-se estas limitações, foi estabelecido que o estudo por citometria de fluxo das células $CD4^+CD25^{HIGH}FOXP3^+$ representaria melhor a população com propriedades reguladoras.

A nossa avaliação desta população revelou uma redução na frequência das células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ circulantes no sangue dos indivíduos com ICV em relação ao grupo de indivíduos controle, principalmente naqueles pacientes com auto-imunidade. Diversos mecanismos podem ser responsáveis pela frequência reduzida destas células nestes pacientes. Poderíamos pensar que alterações nas vias relacionadas ao desenvolvimento e diferenciação das células Tregs naturais ou em sua homeostase periférica poderiam ser em parte responsáveis pela baixa frequência de células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ observada em pacientes com ICV, principalmente em indivíduos com doença auto-imune. A favor desta possibilidade, foi observada em pacientes com ICV uma correlação entre os baixos números de células T $CD4^+$, principalmente aquelas com fenótipo *naive*, e a frequência de círculos excisados do receptor de células T (TRECs). Os TRECs são fragmentos de DNA resultantes do processo de recombinação genética responsável pela diversidade do repertório de TCRs, os quais não se multiplicam nas divisões celulares, sendo utilizados para a determinação de células emigrantes do timo (GUAZZI, V. *et al.*, 2002; DE VERA, M. J. *et al.*, 2004). Isto sugere que defeitos na timopoiese que comprometem a geração *de novo* de células T poderiam contribuir para o baixo percentual de células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ observado nestes pacientes.

No entanto, considerando que as nossas observações estão baseadas em leucócitos circulantes no sangue, elas podem não ser representativas da dinâmica das células T reguladoras nos tecidos linfóides, particularmente no caso de condições inflamatórias tais como desordens auto-imunes. Existe a possibilidade de que a frequência reduzida de células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ observada nos pacientes com doenças auto-imunes seja resultado da migração preferencial dessas células aos sítios de inflamação, deixando a circulação, como consequência da dinâmica que esta população reguladora tem *in vivo*. Por outro lado, a frequência diminuída e/ou capacidade migratória reduzida destas células poderiam estar envolvidas na patogênese de auto-imunidade em indivíduos com ICV, como demonstrado recentemente em lúpus eritematoso (LEE, H. Y. *et al.*, 2008). Embora as nossas observações sejam importantes para a etiologia da auto-imunidade em pacientes com ICV, elas não

definem se a frequência reduzida das células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ é consequência ou causa da doença auto-imune.

Posteriormente, considerando a participação do fator de transcrição Foxp3 no desenvolvimento e atividade supressora dos linfócitos $CD4^+$ com potencial regulador, avaliamos a intensidade de fluorescência média (IFM) deste marcador na população $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ de indivíduos com ICV. A análise mostrou que a população $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ dos pacientes apresentava uma IFM de Foxp3 menor que a observada nos controles. Em função desse resultado interessante, analisamos a expressão deste marcador em indivíduos com ICV com ou sem auto-imunidade, sendo observado que os pacientes com doença auto-imune apresentaram uma frequência reduzida de células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ e esta encontrou-se acompanhada de uma menor expressão de Foxp3.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo concernentes à intensidade de expressão de Foxp3 nos diferentes grupos de estudo, foram confirmados por PCR em tempo real. No entanto, deve ser levado em consideração que os RNAm utilizados neste experimento eram proveniente de PBMC. Portanto, a informação obtida é referentes à expressão do transcrito na totalidade de células $Foxp3^+$, não sendo possível avaliar a contribuição relativa das células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ com potencial regulador e os linfócitos recentemente ativados.

A expressão reduzida de Foxp3 na população $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ de pacientes com doença auto-imune poderia ser consequência da menor expressão deste marcador em todas as células $Foxp3^+$. Apoiando esta hipótese, foi demonstrado em modelo murino, no qual a expressão do gene *FOXP3* nas células Tregs foi atenuada, que a expressão diminuída deste marcador nestas células resulta no desenvolvimento de uma síndrome auto-imune agressiva similar à observada em camundongos *scurfy*. Mais importante ainda, a expressão diminuída de Foxp3 causou a doença por diminuição da função supressora das Tregs e conversão das mesmas em células efectoras (WAN, Y. Y. e FLAVELL, R. A., 2007).

Por outro lado, a menor expressão de Foxp3 na população $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ de pacientes com doença auto-imune poderia resultar da eliminação seletiva das células $Foxp3^{High}$, podendo este último caso ser consequência da morte destas células ou migração das mesmas aos sítios de inflamação. Alternativamente, os níveis reduzidos de Foxp3 observados neste subgrupo de pacientes com ICV poderiam estar associados a mutações no gene *FOXP3*. Esta hipótese é consistente com as observações feitas em indivíduos

diagnosticados com IPEX, no qual o desenvolvimento defeituoso de células Tregs leva ao desenvolvimento de fenômenos auto-imunes graves (BACCHETTA, R. *et al.*, 2006). É sugerido que mutações no gene *FOXP3* nestes indivíduos poderiam resultar em anormalidades biológicas heterogêneas, conduzindo não necessariamente à falta de diferenciação das células reguladoras $CD4^+CD25^{HIGH}$, mas a uma disfunção dessas células, bem como das células T efectoras (BACCHETTA, R. *et al.*, 2006).

Nossos dados também revelaram que aqueles pacientes com ICV nos quais não foi diagnosticada doença auto-imune, embora apresentassem uma frequência reduzida de células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ em relação ao grupo controle, não mostraram diferenças na expressão de Foxp3 nesta população. Com isso, os valores de IFM de Foxp3 nas células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ apresentaram uma estratificação mutuamente excludente dos pacientes com ICV em função da presença ou ausência de doença auto-imune. Mais interessante ainda, embora a frequência média de células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ em pacientes com doença auto-imune seja menor que a observada para aqueles sem estas desordens, existe uma sobreposição parcial em relação a este parâmetro entre ambos os subgrupos de pacientes. Isto indica que a principal diferença entre pacientes com ICV com ou sem doenças auto-imunes é a intensidade de expressão de Foxp3 nas células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ e não a frequência desta população. Além do mais, as conseqüências funcionais e clínicas de apresentar-se uma frequência reduzida de células $Foxp3^+$ podem estar amplificadas em indivíduos com linfopenia, uma vez que o número absoluto de células $CD4^+$ encontra-se diminuído.

Interessantemente, foi recentemente publicado que células T $CD4^+D25^+D127^{low}$ de pacientes com ICV e doença auto-imune apresentam uma função supressora atenuada em relação os pacientes sem esta condição e a indivíduos saudáveis (YU, G. P. *et al.*, 2009).

Os nossos achados de que a baixa expressão de Foxp3 encontra-se associada com auto-imunidade em indivíduos com ICV, está de acordo com o conceito de que a alta expressão e níveis estáveis desta proteína são requeridos para o desenvolvimento normal e função das células T reguladoras em seres humanos (ALLAN, S. E. *et al.*, 2008). Ademais, considerando que pacientes com ICV sem auto-imunidade apresentaram valores de IFM de Foxp3 similares aos indivíduos controle, a avaliação deste parâmetro poderia ter um valor diagnóstico para a identificação e avaliação clínica de indivíduos em risco de desenvolver doenças auto-imunes. Acreditamos que uma análise detalhada das subpopulações de

linfócitos T, em adição ao hemograma, poderia ser de utilidade não somente no diagnóstico de imunodeficiências, mas também para o monitoramento de uma possível evolução de doenças auto-imunes nestes pacientes.

Por outro lado, o aumento da incidência de doenças auto-imunes como parte da desregulação imunológica tem sido relatado em pacientes com ICV. Diversos estudos demonstraram que as células de pacientes com ICV apresentam, após a estimulação mitogênica *in vitro*, um desvio na produção de citocinas para um perfil Th1, com produção aumentada de IFN- γ e TNF- α , e diminuição da produção de citocinas Th2, tais como IL-4, IL-5 e IL-10 (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999). Nossos ensaios de estimulação linfocitária *in vitro* mostraram que os pacientes estudados apresentaram um perfil de produção de citocinas Th2 reduzido em relação aos indivíduos controle, compatível com o estado hipogamaglobulinêmico.

Além disso, defeitos moleculares subjacentes às imunodeficiências podem interferir com o estabelecimento e/ou manutenção da tolerância, modificando a produção de citocinas como a IL-2. Esta citocina, cuja deficiência tem sido relatada em ICV, é importante no desencadeamento da apoptose das células T auto-reativas. Ademais, embora as células T reguladoras não produzam IL-2, elas dependem desta citocina para o seu desenvolvimento no timo, sua expansão na periferia e ativação da sua função imunossupressora (BLUESTONE, J. A. e ABBAS, A. K., 2003). Nossos resultados demonstraram que os pacientes com ICV produzem menor quantidade desta citocina quando comparados aos indivíduos saudáveis, o que está de acordo com a literatura. Apesar de não terem sido observadas diferenças entre os pacientes com ICV com ou sem doença auto-imune, a redução geral na produção de IL-2 poderia contribuir não só para a linfopenia observada nesses indivíduos, mas também para a frequência reduzida de células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ nos mesmos.

De maneira similar ao relatado sobre ICV, existem diversas hipóteses que buscam explicar a associação entre a DlgA e a alta incidência de fenômenos auto-imunes observados nestes pacientes. Um acompanhamento em longo prazo de indivíduos com esta doença tem mostrado que a alta susceptibilidade a infecções é a principal característica durante a infância. Após esse período, na segunda década de vida, acontecem mudanças nesses parâmetros com redução das infecções e o desenvolvimento de doenças auto-imunes (JACOB, C. M. *et al.*, 2008).

Às mucosas dos tratos respiratórios, intestinais e genitourinários correspondem a aproximadamente 400 m² da superfície corporal. Em conjunto, essas superfícies representam uma enorme área de entrada potencial de patógenos inalados ou ingeridos bem como de alérgenos ambientais. Além disso, a IgA secretada representa a primeira linha de defesa contra microorganismos, neutralizando diretamente patógenos extracelulares e vírus através do seu transporte transepitelial e ativando receptores de células do sistema imune, facilitando assim a sua eliminação (WOOF, J. M. e KERR, M. A., 2004; CORTHESEY, B., 2007). Desta maneira, a ausência de IgA nas mucosas de indivíduos com DIgA poderia permitir a entrada de organismos patogênicos e/ou facilitar a absorção de diversos antígenos ambientais, os quais poderiam possivelmente apresentar uma reação cruzada com tecidos normais. Além disso, as respostas inflamatórias decorrentes da infecção poderiam provocar dano nos tecidos com conseqüente expressão de novos determinantes antigênicos e indução da produção de auto-anticorpos.

Alternativamente, uma deficiência na eliminação de antígenos, resultando na deposição de imunocomplexos em diversos órgãos, poderia conduzir ao desenvolvimento de processos inflamatórios crônicos. A favor destas hipóteses, foi observado que imunocomplexos são encontrados em 60% dos indivíduos com DIgA. Além disso, mesmo na ausência de manifestações clínicas de auto-imunidade, auto-anticorpos contra tiroglobulina, hemácias e proteínas nucleares, entre outros, têm sido encontrados em indivíduos com DIgA (JACOB, C. M. *et al.*, 2008). Os pacientes com DIgA recrutados no nosso estudo, apresentaram diversas doenças auto-imunes, sendo as mais prevalentes a doença celíaca e o hipotireoidismo.

De maneira similar ao observado para ICV, tem sido sugerida uma predisposição genética ao desenvolvimento de auto-imunidade nesses pacientes. Junto com a DIgA, a Diabetes mellitus insulino-dependente e a Doença Celíaca tem sido associadas com certos haplótipos do MHC, em particular o HLA-A1, B8, DR3 (SCHROEDER, H. W., JR. *et al.*, 1998). No entanto, outras doenças auto-imunes tais como Lúpus eritematoso Sistêmico (LES), Miastenia gravis e Tireoidite auto-imune têm sido associadas com este e outros haplótipos, motivo pelo qual poderia ocorrer que a associação de DIgA com certas doenças auto-imunes seja conseqüência de um desequilíbrio de ligação e não uma causa direta (LATIFF, A. H. e KERR, M. A., 2007).

Outra possibilidade seria que falhas nos mecanismos de tolerância centrais e periféricos, anteriormente discutidos para ICV, pudessem também ser responsáveis pela alta incidência de auto-imunidade em pacientes com DlgA. Em vista dos resultados obtidos para ICV e considerando a possível ligação entre a DlgA e a ICV, foi avaliada a frequência de células T $CD4^+CD25^{HIGH}FOXP3^+$ com potencial regulador em indivíduos com DlgA. Na nossa análise observamos que os pacientes com DlgA apresentaram uma frequência reduzida destas células em relação aos indivíduos controle, sendo este resultado similar ao observado em indivíduos com ICV. No entanto, desta vez não foram observadas diferenças na IFM de Foxp3 entre controles e pacientes.

Posteriormente, quando os pacientes com DlgA foram agrupados conforme a presença ou ausência de doença auto-imune, não foram observadas diferenças na frequência das células $CD4^+CD25^{HIGH}FOXP3^+$ nem na IFM de Foxp3 entre esses indivíduos. Esses resultados, diferentes dos observados para ICV, sugerem que talvez a diferença entre os indivíduos com DlgA com ou sem doença auto-imune, não esteja na frequência das células $CD4^+CD25^{HIGH}FOXP3^+$ circulantes no sangue ou a expressão de Foxp3, e sim na capacidade migratória desta população para os tecidos inflamados, como observado para pacientes com LES (LEE, H. Y. *et al.*, 2008). Alternativamente, as células $CD4^+CD25^{HIGH}FOXP3^+$ de indivíduos com doença auto-imune poderiam apresentar frequências similares às observadas em indivíduos sem esta condição, porém com perda da capacidade supressora das mesmas, como já foi observado em outras doenças auto-imunes, como por exemplo, na esclerose múltipla (KRIEGEL, M. A. *et al.*, 2004; PUTHETI, P. *et al.*, 2004; VIGLIETTA, V. *et al.*, 2004).

Como mencionado anteriormente, em seres humanos, as células T reguladoras naturais são definidas com base em marcadores fenotípicos compartilhados por linfócitos ativados. No entanto, recentemente tem sido sugerido que o receptor da interleucina-7 (CD127) poderia ser um importante marcador para a identificação da população reguladora (LUI, WEIHONG ET AL., 2006; SEDDIKI, N ET AL., 2006). Em seres humanos, a expressão de CD127 é reduzida em todas as células T após ativação. Diferentemente da maioria das células T efectoras e de memória, as quais re-expressam este marcador ($CD127^+$), as células T reguladoras mantêm a baixa expressão do mesmo ($CD127^{low}$). Além disso, foi observado que a expressão de CD127 se correlaciona inversamente ao Foxp3 e, conseqüentemente, a maioria das células $FOXP3^+$ encontram-se dentro da população $CD127^{low}$. Portanto, o CD127

é considerado um melhor biomarcador que o CD25 para a identificação de células CD4⁺Foxp3⁺, sendo a combinação CD4⁺CD25⁺CD127^{low} a que compreende a maior proporção de células Foxp3⁺. Complementariamente, ensaios funcionais desta população demonstraram que estas células têm propriedades supressoras similares àquela da população CD4⁺CD25^{high} (LUI, WEIHONG ET AL., 2006). Dessa maneira, o CD127 foi incluído no nosso painel de anticorpos para avaliar por citometria de fluxo a freqüência desta nova população linfocitária com propriedades reguladoras em indivíduos com DlgA.

A análise da população CD4⁺CD25⁺CD127^{low} confirmou os resultados obtidos previamente em relação a população CD4⁺CD25^{HIGH}FOXP3⁺. Observou-se que os pacientes com DlgA apresentaram uma menor freqüência destas células no seu sangue em relação aos indivíduos controle, embora não foram observadas diferenças nestas células quando os pacientes foram avaliados conforme a presença ou ausência de doença auto-imune. Para confirmar o possível fenótipo regulatório desta população, analisamos a porcentagem de células Foxp3⁺ dentro da população CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, e conforme relatado previamente na literatura, a maioria da células CD4⁺CD25⁺CD127^{low} eram Foxp3⁺. No entanto, não houve diferenças em relação à porcentagem destas células entre indivíduos controle e os diferente grupos de pacientes com DlgA.

De maneira similar às doenças auto-ímmunes, as atopias constituem respostas desreguladas contra agentes não infecciosos. As atopias são desordens inflamatórias caracterizadas por uma resposta imune exacerbada contra alérgenos ambientais comuns e inócuos (HAWRYLOWICZ, C. M. e O'GARRA, A., 2005). De maneira similar às doenças auto-ímmunes, as doenças alérgicas mostram complexas associações genéticas e possuem um componente hereditário. Em indivíduos susceptíveis, a exposição inicial ao alérgeno induz a produção de altos níveis de imunoglobulina E (IgE) específica, a qual liga-se a receptores de alta afinidade (FcεRI) presentes na superfície de mastócitos e basófilos das mucosas. Desta forma, contatos subseqüentes com o alérgeno induzem a rápida ativação destas células através da interação do antígeno com a IgE em complexo com o receptor FcεRI, conduzindo à degranulação e liberação de mediadores inflamatórios, tais como a histamina, leucotrienos e citocinas que causam o aumento da permeabilidade vascular, contração do músculo liso e produção de muco os quais são responsáveis pelo aparecimento dos sintomas alérgicos (HAWRYLOWICZ, C. M. e O'GARRA, A., 2005).

Ademais, a diferenciação de linfócitos CD4⁺ em células efetoras produtoras de citocinas do perfil Th2 é essencial para o desenvolvimento da resposta alérgica. Assim, as citocinas IL-4 e IL-13 induzem a produção de IgE pelas células B e a IL-5 regula o crescimento, diferenciação e ativação de eosinófilos (CHUNG, K. F. e BARNES, P. J., 1999). Em conjunto, todos esses fatores conduzem ao aparecimento de doenças como asma, rinite alérgica e dermatite atópica e, em casos extremos, podem produzir anafilaxia e morte (HAWRYLOWICZ, C. M. e O'GARRA, A., 2005).

Os mecanismos pelos quais o sistema imune responde a antígenos ambientais não patogênicos conduzindo ao aparecimento de alergia ou estado de tolerância ainda são desconhecidos. Por um lado, mecanismos de seleção tímica das células Tregs naturais têm sido descritos, os quais poderiam ser responsáveis pela diferenciação destas células específicas para auto-antígenos (JORDAN, M. S. *et al.*, 2001; LISTON, A. e RUDENSKY, A. Y., 2007). Porém, não está claro se células Tregs específicas para antígenos ambientais são produzidas por esta via. No caso das atopias, a importância do processo de seleção tímica na prevenção de respostas contra alérgenos é desconhecida, uma vez que esses antígenos estão ausentes no momento em que acontece o fenômeno de seleção negativa. Portanto, controles adicionais devem ter lugar na periferia para prevenir este tipo de resposta indesejada a antígenos ambientais.

Tem sido descrito que células T *naive* são capazes de adquirir características regulatórias como consequência da exposição antigênica na periferia, sendo estas denominadas Tregs adaptativas ou induzidas. Por um lado, encontram-se as células Tr1, as quais caracterizam-se por produzir altos níveis de IL-10 e TGF- β (RONCAROLO, M. G. *et al.*, 2001), porém não expressam Foxp3 (VIEIRA, P. L. *et al.*, 2004), o que sugere que esta seja uma população de células reguladoras diferente daquelas naturais. Por outro lado, existe uma população celular induzida a partir de linfócitos CD4⁺ após a entrada do antígeno por via oral, chamada Th3 (WEINER, H. L., 2001). Estas células, de maneira similar às Tr1, não apresentam marcadores de superfície específicos e expressam Foxp3 e altos níveis de TGF- β . Desta maneira, estas duas populações com potencial regulador poderiam ter uma função mais relevante na resposta a antígenos ambientais do que as Tregs naturais.

A presença de células alérgeno-específicas produtoras de IFN (Th1), IL-4 (Th2) e IL-10 (Tr1) foi observada tanto em indivíduos com atopia quanto indivíduos saudáveis (AKDIS, M. *et al.*, 2004; HAWRYLOWICZ, C. M. e O'GARRA, A., 2005). No entanto, as células Tr1

representam a população dominante na resposta a antígenos ambientais em indivíduos saudáveis, sugerindo que elas constituem um estado de tolerância ativo ou natural nesses indivíduos. Por outro lado, existe uma alta frequência de células T alérgeno-específicas secretoras de IL-4 em indivíduos alérgicos (LING, E. M. *et al.*, 2004). Assim, embora o papel das células T reguladoras na patogênese de doenças alérgicas ainda não se encontrar claramente estabelecido, sugere-se que a proporção diferente das populações alérgeno-específicas em cada indivíduo determine o desenvolvimento ou não da resposta imune exacerbada, podendo as células T reguladoras tanto naturais como adaptativas prevenirem a ativação patológica de células Th2 em resposta a alérgenos (LING, E. M. *et al.*, 2004). Conseqüentemente, um desbalanço entre estas populações poderia decorrer da supressão deficiente por parte das células Tregs ou fortes sinais de ativação sobre as células Th2 que ultrapassassem tal regulação, conduzindo ao fenômeno atópico (AKDIS, M. *et al.*, 2004).

Um claro exemplo desta falta de equilíbrio entre as populações alérgeno-específicas é observado em indivíduos com IPEX que, como mencionado anteriormente, carecem de células Tregs e apresentam um desvio para o perfil Th2 das células T efectoras, sofrendo de manifestações alérgicas severas. Esta condição reflete a ausência de controle das células Foxp3^+ no momento da exposição inicial ao antígeno, o que sugere um papel fundamental das células Tregs naturais na prevenção da sensibilização ao alérgeno.

Levando em consideração os conceitos mencionados anteriormente, avaliamos a população $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{HIGH}}\text{Foxp3}^+$ de pacientes com ICV em função da presença ou ausência de sintomas alérgicos. Diferentemente do observado quando os pacientes foram avaliados conforme a presença ou ausência de doença auto-imune, a nova análise revelou que a frequência destas células nos indivíduos com ICV sem atopia não diferia daquela existente nos pacientes com esses sintomas. Da mesma maneira, não observamos nenhuma diferença significativa entre estes subgrupos de paciente em relação à IFM de Foxp3, embora os dois grupos apresentassem uma expressão menor deste marcador em comparação ao grupo controle, sendo este resultado confirmado pela avaliação da expressão de *FOXP3* por PCR em tempo real.

É importante destacar que as poucas pesquisas realizadas sobre o papel das células T reguladoras na patogênese de doenças alérgicas foram realizadas dentro de um contexto de alergia mediada por IgE. No caso dos pacientes com ICV que desenvolvem asma e rinite, estes apresentam uma sintomatologia semelhante à observada nos indivíduos atópicos,

porém, sem a presença de IgE específica e com resultado do *prick test* negativo (CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e BODIAN, C., 1999; KOKRON, C. M. *et al.*, 2004). Quando se considera unicamente a história clínica, a prevalência de asma em pacientes com ICV pode ser superestimada, uma vez que algumas pessoas apresentam sintomas respiratórios devido a infecções de repetição e alterações cicatriciais.

Recentemente, pacientes com ICV foram submetidos à espirometria, provocação bronquial com histamina e o alérgeno *Der p*, e *Prick test* e determinação *in vitro* de IgE específica para aeroalérgenos, para avaliar-se a reação alérgica nesses indivíduos (AGONDI, R. C. *et al.*, 2010). Apesar dos resultados negativos do *Prick test*, a provocação brônquica com *Der p* detectou um aumento da responsividade brônquica em 80% dos pacientes com história sugestiva de asma. Com isso, os sintomas alérgicos observados em alguns indivíduos com ICV poderiam ocorrer devido a uma resposta local mediada por IgE ou mecanismos de ativação local de mastócitos, basófilos e células endoteliais do trato respiratório, independentemente da presença de IgE ou de quantidades detectáveis da mesma. Portanto, poderíamos pensar que, no caso de indivíduos com ICV, as células $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ não teriam uma função diferencial na patogênese dos sintomas alérgicos, podendo estar envolvidos outros mecanismos de regulação imunológica.

Como mencionado, o perfil de citocinas produzidas pelos pacientes com ICV frente à estimulação mitogénica *in vitro* mostrou uma redução geral de citocinas Th2, as quais se correlacionam com o estado hipogamaglobulinêmico desses indivíduos. No entanto, quando a produção das citocinas foi analisada em função da presença ou ausência de sintomas alérgicos nesses pacientes, não foram observadas diferenças significativas. Uma vez que a IL-4 é um mediador fundamental na resposta alérgica necessário para o processo de troca de classe para IgE, não é surpreendente que esta citocina seja produzida igualmente nos pacientes com ICV com ou sem atopia, considerando-se que nesses indivíduos há ausência desta imunoglobulina no soro. Além disso, a produção da citocina IL-10, a qual regula a produção de IgE diminuindo a sua transcrição gênica e aumentando os níveis de IgG4, embora encontrada diminuída no grupo de pacientes, também não se mostrou diferente com relação aos indivíduos sem atopia. Apesar de não ter sido possível analisar por citometria de fluxo as células $CD4^+IL-4^+$ e $CD4^+IL-10^+$ de pacientes com ICV, de maneira que nos permitisse avaliar se um possível desbalanço entre essas populações poderia ser responsável pelos sintomas atópicos nesses indivíduos, a produção similar das citocinas IL-4

e IL-10 entre os subgrupos de pacientes sugere que a participação de células efetoras Th2 e Tr1 não seja determinante na etiologia dos sintomas alérgicos nos pacientes com ICV.

De maneira semelhante ao observado em pacientes com ICV, a frequência de células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ ou $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ em indivíduos com DIgA e alergia não se apresentou diferente nos pacientes sem esta condição. No entanto, as doenças atópicas apresentadas por estes indivíduos são mediadas por IgE, considerando-se que, nesta imunodeficiência somente a produção de IgA encontra-se afetada. Uma possível explicação para esta observação seria que a frequência similar de células $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ ou $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ fosse devida a uma incapacidade destas células em sair da circulação e migrar para os tecidos nos quais haveria exposição ao alérgeno. A favor desta hipótese foi observada infiltração reduzida de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ na pele de indivíduos com dermatite atópica (VERHAGEN, J. *et al.*, 2006). Alternativamente, apesar das células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ e $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ se encontrar na mesma frequência nos subgrupos de pacientes, estas poderiam não ser funcionais, como também já foi proposto para os casos de DIgA e doença auto-imune.

Por outro lado, é sabido que os glucocorticóides utilizados no tratamento da asma reduzem os sinais pró-inflamatórios, aumentando a frequência de Tregs e a expressão de Foxp3 (BRAITCH, M. *et al.*, 2009). Portanto, existe a possibilidade das populações $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ e $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ encontrar-se reduzidas em pacientes com DIgA e alergia, porém, sendo mascaradas pela ação de glucocorticóides sobre estas populações celulares e, conseqüentemente, não são observadas diferenças entre os grupos alérgicos e não alérgicos.

Finalmente, não deve ser descartada a possibilidade das células $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ ou $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ não serem um fator diferencial nos fenômenos alérgicos em indivíduos com DIgA, podendo estar envolvidas populações de células Tregs adaptativas geradas na periferia. Embora a nossa análise tenha mostrado uma frequência aparentemente menor de células $Foxp3^+$ junto com uma expressão reduzida deste marcador na população $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ no grupo de pacientes com DIgA sem alergia, isso pode ser devido ao fato de que, coincidentemente, quatro dos sete pacientes não atópicos também apresentaram doença auto-imune, o que pode ter contribuído para a diminuição da média do grupo.

Quando a produção de citocinas pelos PBMCs desses pacientes, em função da presença ou ausência de sintomas alérgicos, não observamos diferenças significativas. Este resultado é similar ao observado nos pacientes com ICV, embora a etiologia dos sintomas alérgicos seja diferente. Portanto, sendo que a IL-4 e a IL-5 são mediadores fundamentais na resposta alérgica, necessários para o processo de troca de classe para IgE e o crescimento, diferenciação e ativação de mastócitos e eosinófilos, não era esperado que estas citocinas fossem produzidas igualmente pelos pacientes com DIgA com ou sem atopia. Além disso, conforme a literatura, a citocina IL-10 suprimiria a produção de IgE desviando a resposta imune para um perfil Th1, com produção de IgG. No entanto, apesar da produção desta citocina ter estado reduzida nos indivíduos com DIgA, não foram encontradas diferenças estatisticamente entre os pacientes com ou sem alergia. Talvez, como no caso da ICV, a produção similar da citocinas IL-10 entre os subgrupos mencionados sugira que a participação de células Tr1 não seja determinante na etiologia dos sintomas alérgicos em pacientes com DIgA.

Além das células T CD4⁺ reguladoras naturais e adaptativas (SHEVACH, E. M., 2002; BLUESTONE, J. A. e ABBAS, A. K., 2003; O'GARRA, A. e VIEIRA, P., 2004; SAKAGUCHI, S. *et al.*, 2006), também há outros tipos celulares com propriedades reguladoras, tais como as células CD8⁺ (NOBLE, A. *et al.*, 2006), TCRαβ⁺ duplo negativas (THOMSON, C. W. *et al.*, 2006) e TCRγδ (HAYDAY, A. e TIGELAAR, R., 2003), embora pouco seja conhecido sobre a sua participação na patogenia de doenças auto-imunes e alérgicas. Existem outros tipos celulares capazes de secretar IL-10 e/ou TFG-β, incluindo macrófagos, células B e células dendríticas, os quais podem ter um potencial imunoregulador. Ademais, células NK, células epiteliais, macrófagos e mesmo células T efetoras convencionais sintetizam citocinas reguladoras, podendo contribuir diretamente para o controle da doença, ou indiretamente, promovendo a geração de diversas populações reguladoras. Portanto, todas estas populações celulares com potencial regulador podem ter suas contribuições na etiologia dos fenômenos alérgicos e/ou auto-imunes observados na Imunodeficiência Comum Variável e na Deficiência Seletiva de Imunoglobulina A.

6 CONCLUSÕES

- Indivíduos com ICV apresentam freqüências reduzidas de células $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ circulantes no sangue, principalmente os pacientes com doença auto-imune. Além disso, a intensidade de fluorescência média de Foxp3 na população $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ mostra uma estratificação dos pacientes em função da presença ou ausência de doença auto-imune, também comprovado por PCR em tempo real, podendo isto ter um valor diagnóstico.
- Indivíduos com ICV com sintomas alérgicos não apresentam diferenças na freqüência de células $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$, nem na intensidade de fluorescência média de Foxp3 nessa população celular em relação aos pacientes não atópicos.
- Indivíduos com DIgA apresentam freqüências reduzidas de células $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ e $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ circulantes no sangue, embora não haja diferenças na intensidade de fluorescência média de Foxp3 nessas populações nem na porcentagem de células Foxp3⁺.
- Indivíduos com DIgA analisados em função da presença ou ausência de doença auto-imune ou alergia não apresentam diferenças na freqüência de células $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ e $CD4^+CD25^+CD127^{low}$, na intensidade de fluorescência média de Foxp3 nessas populações nem na porcentagem de células Foxp3⁺.
- Os pacientes com ICV e DIgA estudados apresentam um perfil de citocinas compatível com o estado hipogamaglobulinêmico.

REFERÊNCIAS

DE ACORDO COM: ASSOCIACAO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação de documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

ABBAS, A. K., *et al.* Cellular and Molecular Immunology. SAUNDERS - forth edition. 2000.

AGHAMOHAMMADI, A., *et al.* IgA deficiency: correlation between clinical and immunological phenotypes. J Clin Immunol, v.29, n.1, Jan, p.130-6. 2009.

AGHAMOHAMMADI, A., *et al.* Progression of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency. Int Arch Allergy Immunol, v.147, n.2, p.87-92. 2008.

AGONDI, R. C., *et al.* Allergic asthma in patients with common variable immunodeficiency. Allergy, v.65, n.4, Apr, p.510-5. 2010.

AKDIS, M., *et al.* Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. J Exp Med, v.199, n.11, Jun 7, p.1567-75. 2004.

AL-ATTAS, R. A. e A. H. RAHI. Primary antibody deficiency in Arabs: first report from eastern Saudi Arabia. J Clin Immunol, v.18, n.5, Sep, p.368-71. 1998.

ALLAN, S. E., *et al.* Generation of potent and stable human CD4+ T regulatory cells by activation-independent expression of FOXP3. Mol Ther, v.16, n.1, Jan, p.194-202. 2008.

ALLAN, S. E., *et al.* Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. Int Immunol, v.19, n.4, Apr, p.345-54. 2007.

AMORAS, A. L., *et al.* Defective Fc-, CR1- and CR3-mediated monocyte phagocytosis and chemotaxis in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia patients. J Investig Allergol Clin Immunol, v.13, n.3, p.181-8. 2003.

ANDERSEN, P., *et al.* Deficiency of somatic hypermutation of the antibody light chain is associated with increased frequency of severe respiratory tract infection in common variable immunodeficiency. Blood, v.105, n.2, Jan 15, p.511-7. 2005.

ARKWRIGHT, P. D., *et al.* Autoimmunity in human primary immunodeficiency diseases. Blood, v.99, n.8, Apr 15, p.2694-702. 2002.

BACCHELLI, C., *et al.* Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency. Clin Exp Immunol, v.149, n.3, Sep, p.401-9. 2007.

BACCHETTA, R., *et al.* Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. J Clin Invest, v.116, n.6, Jun, p.1713-22. 2006.

- BAECHER-ALLAN, C., *et al.* CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J Immunol, v.167, n.3, Aug 1, p.1245-53. 2001.
- BALLOW, M. Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. J Allergy Clin Immunol, v.109, n.4, Apr, p.581-91. 2002.
- BAYRY, J., *et al.* Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. Trends Mol Med, v.11, n.8, Aug, p.370-6. 2005.
- BEIER, K. C., *et al.* Induction, binding specificity and function of human ICOS. Eur J Immunol, v.30, n.12, Dec, p.3707-17. 2000.
- BENNETT, C. L., *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet, v.27, n.1, Jan, p.20-1. 2001.
- BLUESTONE, J. A. e A. K. ABBAS. Natural versus adaptive regulatory T cells. Nat Rev Immunol, v.3, n.3, Mar, p.253-7. 2003.
- BONHOMME, D., *et al.* Impaired antibody affinity maturation process characterizes a subset of patients with common variable immunodeficiency. J Immunol, v.165, n.8, Oct 15, p.4725-30. 2000.
- BONILLA, F. A. e R. S. GEHA. 12. Primary immunodeficiency diseases. J Allergy Clin Immunol, v.111, n.2 Suppl, Feb, p.S571-81. 2003.
- BORTE, S., *et al.* Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. Blood, v.114, n.19, Nov 5, p.4089-98. 2009.
- BOYER, O., *et al.* CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. Blood, v.103, n.9, May 1, p.3428-30. 2004.
- BRAITCH, M., *et al.* Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. Acta Neurol Scand, v.119, n.4, Apr, p.239-45. 2009.
- BRANDT, D. e M. E. GERSHWIN. Common variable immune deficiency and autoimmunity. Autoimmun Rev, v.5, n.7, Aug, p.465-70. 2006.
- BRANDTZAEG, P., *et al.* The clinical condition of IgA-deficient patients is related to the proportion of IgD- and IgM-producing cells in their nasal mucosa. Clin Exp Immunol, v.67, n.3, Mar, p.626-36. 1987.
- BROUET, J. C., *et al.* Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. Eur J Immunol, v.30, n.9, Sep, p.2516-20. 2000.
- BRUNKOW, M. E., *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet, v.27, n.1, Jan, p.68-73. 2001.

BRYANT, A., *et al.* Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. Clin Immunol Immunopathol, v.56, n.2, Aug, p.239-48. 1990.

CAO, D., *et al.* Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. Eur J Immunol, v.33, n.1, Jan, p.215-23. 2003.

CARNEIRO-SAMPAIO, M. e A. COUTINHO. Tolerance and autoimmunity: lessons at the bedside of primary immunodeficiencies. Adv Immunol, v.95, p.51-82. 2007.

CARNEIRO-SAMPAIO, M. M., *et al.* Frequency of selective IgA deficiency among Brazilian blood donors and healthy pregnant women. Allergol Immunopathol (Madr), v.17, n.4, Jul-Aug, p.213-6. 1989.

CASTIGLI, E. e R. S. GEHA. Molecular basis of common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol, v.117, n.4, Apr, p.740-6; quiz 747. 2006.

CASTIGLI, E., *et al.* TAC1 is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. Nat Genet, v.37, n.8, Aug, p.829-34. 2005.

CERUTTI, A. e M. RESCIGNO. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. Immunity, v.28, n.6, Jun, p.740-50. 2008.

CHAPEL, H. e C. CUNNINGHAM-RUNDLES. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. Br J Haematol, v.145, n.6, Jun, p.709-27. 2009.

CHATILA, T. A. Role of regulatory T cells in human diseases. J Allergy Clin Immunol, v.116, n.5, Nov, p.949-59; quiz 960. 2005.

CHUNG, K. F. e P. J. BARNES. Cytokines in asthma. Thorax, v.54, n.9, Sep, p.825-57. 1999.

CLAMAN, H. N., *et al.* Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. Proc Soc Exp Biol Med, v.122, n.4, Aug-Sep, p.1167-71. 1966.

CONLEY, M. E. e M. D. COOPER. Immature IgA B cells in IgA-deficient patients. N Engl J Med, v.305, n.9, Aug 27, p.495-7. 1981.

CONLEY, M. E. e D. L. DELACROIX. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? Ann Intern Med, v.106, n.6, Jun, p.892-9. 1987.

CONLEY, M. E., *et al.* Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). Clin Immunol, v.93, n.3, Dec, p.190-7. 1999.

CORTHESEY, B. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? J Immunol, v.178, n.1, Jan 1, p.27-32. 2007.

CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. J Clin Immunol, v.9, n.1, Jan, p.22-33. 1989.

CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Common variable immunodeficiency. Curr Allergy Asthma Rep, v.1, n.5, Sep, p.421-9. 2001a.

CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Physiology of IgA and IgA deficiency. J Clin Immunol, v.21, n.5, Sep, p.303-9. 2001b.

CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Autoimmune manifestations in common variable immunodeficiency. J Clin Immunol, v.28 Suppl 1, May, p.S42-5. 2008.

CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e C. BODIAN. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. Clin Immunol, v.92, n.1, Jul, p.34-48. 1999.

CUNNINGHAM-RUNDLES, C. e L. RADIGAN. Deficient IL-12 and dendritic cell function in common variable immune deficiency. Clin Immunol, v.115, n.2, May, p.147-53. 2005.

CUNNINGHAM-RUNDLES, C., *et al.* Efficacy of intravenous immunoglobulin in primary humoral immunodeficiency disease. Ann Intern Med, v.101, n.4, Oct, p.435-9. 1984.

DE VERA, M. J., *et al.* Assessing thymopoiesis in patients with common variable immunodeficiency as measured by T-cell receptor excision circles. Ann Allergy Asthma Immunol, v.93, n.5, Nov, p.478-84. 2004.

DI RENZO, M., *et al.* Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas/fasligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS. Clin Exp Immunol, v.125, n.1, Jul, p.117-22. 2001.

DI RENZO, M., *et al.* Enhanced apoptosis of T cells in common variable immunodeficiency (CVID): role of defective CD28 co-stimulation. Clin Exp Immunol, v.120, n.3, Jun, p.503-11. 2000.

DIAMOND, B. Autoimmunity. Immunol Rev, v.204, Apr, p.5-8. 2005.

DIECKMANN, D., *et al.* Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. J Exp Med, v.193, n.11, Jun 4, p.1303-10. 2001.

ESPANOL, T., *et al.* Development of a common variable immunodeficiency in IgA-deficient patients. Clin Immunol Immunopathol, v.80, n.3 Pt 1, Sep, p.333-5. 1996.

FAGARASAN, S. Evolution, development, mechanism and function of IgA in the gut. Curr Opin Immunol, v.20, n.2, Apr, p.170-7. 2008.

FAGARASAN, S., *et al.* Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. Ann Rev Immunol, v.28, Apr 23, p.243-73.

FENG, L. [Epidemiological study of selective IgA deficiency among 6 nationalities in China]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, v.72, n.2, Feb, p.88-90, 128. 1992.

FEVANG, B., *et al.* Common variable immunodeficiency and the complement system; low mannose-binding lectin levels are associated with bronchiectasis. Clin Exp Immunol, v.142, n.3, Dec, p.576-84. 2005.

FONTENOT, J. D., *et al.* Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol, v.4, n.4, Apr, p.330-6. 2003.

GAVIN, M. A., *et al.* Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.17, Apr 25, p.6659-64. 2006.

GEHA, R. S., *et al.* Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. J Allergy Clin Immunol, v.120, n.4, Oct, p.776-94. 2007.

GERSHON, R. K., *et al.* Suppressor T cells. J Immunol, v.108, n.3, Mar, p.586-90. 1972.

GERSHON, R. K. e K. KONDO. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. Immunology, v.18, n.5, May, p.723-37. 1970.

GERSHON, R. K. e K. KONDO. Infectious immunological tolerance. Immunology, v.21, n.6, Dec, p.903-14. 1971.

GIOVANNETTI, A., *et al.* Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. J Immunol, v.178, n.6, Mar 15, p.3932-43. 2007.

GODFREY, V. L., *et al.* X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. Am J Pathol, v.138, n.6, Jun, p.1379-87. 1991.

GRIMBACHER, B., *et al.* Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. Nat Immunol, v.4, n.3, Mar, p.261-8. 2003.

GUAZZI, V., *et al.* Assessment of thymic output in common variable immunodeficiency patients by evaluation of T cell receptor excision circles. Clin Exp Immunol, v.129, n.2, Aug, p.346-53. 2002.

HAMMARSTROM, L., *et al.* Transfer of IgA deficiency to a bone-marrow-grafted patient with aplastic anaemia. Lancet, v.1, n.8432, Apr 6, p.778-81. 1985.

HAMMARSTROM, L., *et al.* Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). Clin Exp Immunol, v.120, n.2, May, p.225-31. 2000.

HAWRYLOWICZ, C. M. e A. O'GARRA. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. Nat Rev Immunol, v.5, n.4, Apr, p.271-83. 2005.

HAYDAY, A. e R. TIGELAAR. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. Nat Rev Immunol, v.3, n.3, Mar, p.233-42. 2003.

HORI, S., *et al.* Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science, v.299, n.5609, Feb 14, p.1057-61. 2003.

HORI, S. e S. SAKAGUCHI. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. Microbes Infect, v.6, n.8, Jul, p.745-51. 2004.

JACOB, C. M., *et al.* Autoimmunity in IgA deficiency: revisiting the role of IgA as a silent housekeeper. J Clin Immunol, v.28 Suppl 1, May, p.S56-61. 2008.

JANEWAY, C. A., *et al.* Agammaglobulinemia. Trans Assoc Am Physicians, v.66, p.200-2. 1953.

JONULEIT, H., *et al.* Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. J Exp Med, v.193, n.11, Jun 4, p.1285-94. 2001.

JORDAN, M. S., *et al.* Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. Nat Immunol, v.2, n.4, Apr, p.301-6. 2001.

KAINULAINEN, L., *et al.* Diagnostic findings in 95 Finnish patients with common variable immunodeficiency. J Clin Immunol, v.21, p.145-149. 2001.

KANO, T., *et al.* Selective IgA deficiency in Japanese blood donors: frequency and statistical analysis. Vox Sang, v.50, n.2, p.81-6. 1986.

KAPPLER, J. W., *et al.* T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. Cell, v.49, n.2, Apr 24, p.273-80. 1987.

KERR, M. A. The structure and function of human IgA. Biochem J, v.271, n.2, Oct 15, p.285-96. 1990.

KHATTRI, R., *et al.* An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. Nat Immunol, v.4, n.4, Apr, p.337-42. 2003.

KNIGHT, A. K. e C. CUNNINGHAM-RUNDLES. Inflammatory and autoimmune complications of common variable immune deficiency. Autoimmun Rev, v.5, n.2, Feb, p.156-9. 2006.

KOKRON, C. M., *et al.* Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. An Acad Bras Cienc, v.76, n.4, Dec, p.707-26. 2004.

KONDRATENKO, I., *et al.* Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. MRC Immunodeficiency Group. Clin Exp Immunol, v.108, n.1, Apr, p.9-13. 1997.

- KRIEGEL, M. A., *et al.* Defective suppressor function of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. J Exp Med, v.199, n.9, May 3, p.1285-91. 2004.
- KRONENBERG, M. e A. RUDENSKY. Regulation of immunity by self-reactive T cells. Nature, v.435, n.7042, Jun 2, p.598-604. 2005.
- KYEWSKI, B. e L. KLEIN. A central role for central tolerance. Annu Rev Immunol, v.24, p.571-606. 2006.
- LATIFF, A. H. e M. A. KERR. The clinical significance of immunoglobulin A deficiency. Ann Clin Biochem, v.44, n.Pt 2, Mar, p.131-9. 2007.
- LEE, H. Y., *et al.* Altered frequency and migration capacity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford), v.47, n.6, Jun, p.789-94. 2008.
- LEE, M. L., *et al.* Use of intravenous immunoglobulin to prevent or treat infections in persons with immune deficiency. Annu Rev Med, v.48, p.93-102. 1997.
- LEVINGS, M. K., *et al.* Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. J Exp Med, v.193, n.11, Jun 4, p.1295-302. 2001.
- LING, E. M., *et al.* Relation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. Lancet, v.363, n.9409, Feb 21, p.608-15. 2004.
- LISTON, A. e A. Y. RUDENSKY. Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. Curr Opin Immunol, v.19, n.2, Apr, p.176-85. 2007.
- LOPES-DA-SILVA, S. e L. V. RIZZO. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. J Clin Immunol, v.28 Suppl 1, May, p.S46-55. 2008.
- LOSI, C. G., *et al.* Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency. J Clin Immunol, v.25, n.5, Sep, p.496-502. 2005.
- LUI, W. E. A. CD127 expression inversely correlates with FOXP3 and suppressive function of human CD4⁺ Tregs cells. J Exp Med, v.203, n.7, July, 10, p.1701-1711. 2006.
- LYSSUK, E. Y., *et al.* Reduced number and function of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. Adv Exp Med Biol, v.601, p.113-9. 2007.
- MCHUGH, R. S. e E. M. SHEVACH. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. J Allergy Clin Immunol, v.110, n.5, Nov, p.693-702. 2002.
- MELLANDER, L., *et al.* Secretory antibodies in IgA-deficient and immunosuppressed individuals. J Clin Immunol, v.6, n.4, Jul, p.284-91. 1986.

- MONTEIRO, R. C., *et al.* Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. J Exp Med, v.171, n.3, Mar 1, p.597-613. 1990.
- MOSMANN, T. R. e R. L. COFFMAN. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol, v.7, p.145-73. 1989.
- NIJENHUIS, T., *et al.* Common variable immunodeficiency (CVID) in a family: an autosomal dominant mode of inheritance. Neth J Med, v.59, n.3, Sep, p.134-9. 2001.
- NISHIZUKA, Y. e T. SAKAKURA. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. Science, v.166, n.906, Nov 7, p.753-5. 1969.
- NOBLE, A., *et al.* Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. Blood, v.107, n.11, Jun 1, p.4475-83. 2006.
- O'GARRA, A. e P. VIEIRA. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. Nat Med, v.10, n.8, Aug, p.801-5. 2004.
- PAN-HAMMARSTROM, Q., *et al.* Reexamining the role of TAC1 coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. Nat Genet, v.39, n.4, Apr, p.429-30. 2007.
- PIQUERAS, B., *et al.* Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. J Clin Immunol, v.23, n.5, Sep, p.385-400. 2003.
- POWELL, B. R., *et al.* An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. J Pediatr, v.100, n.5, May, p.731-7. 1982.
- PUTHETI, P., *et al.* Multiple sclerosis: a study of chemokine receptors and regulatory T cells in relation to MRI variables. Eur J Neurol, v.10, n.5, Sep, p.529-35. 2003.
- PUTHETI, P., *et al.* Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. J Clin Immunol, v.24, n.2, Mar, p.155-61. 2004.
- RAMSAY, A. J., *et al.* The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. Science, v.264, n.5158, Apr 22, p.561-3. 1994.
- RONCAROLO, M. G., *et al.* Type 1 T regulatory cells. Immunol Rev, v.182, Aug, p.68-79. 2001.
- ROSECAN, M., *et al.* Agammaglobulinemia in the adult. Am J Med, v.19, n.2, Aug, p.303-13. 1955.
- ROSEN, S. W., R.J.P; EIBL, M.M; FISCHER, A; AIUTI, F; NOTARANGELO, L. Primary immunodeficiency diseases. Report of a WHO scientific group. . Clin Exp Immunol, v.109, n.1-28. 1997.

SAIKI, O., *et al.* Three distinct stages of B-cell defects in common varied immunodeficiency. Proc Natl Acad Sci U S A, v.79, n.19, Oct, p.6008-12. 1982.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol, v.6, n.4, Apr, p.345-52. 2005.

SAKAGUCHI, S., *et al.* Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunol Rev, v.212, Aug, p.8-27. 2006.

SAKAGUCHI, S., *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol, v.155, n.3, Aug 1, p.1151-64. 1995.

SALZER, U., *et al.* Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. Nat Genet, v.37, n.8, Aug, p.820-8. 2005.

SALZER, U., *et al.* ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. Clin Immunol, v.113, n.3, Dec, p.234-40. 2004.

SANFORD, J. P., *et al.* Absence of serum gamma globulins in an adult. N Engl J Med 1954. 1027-9 p.

SCHROEDER, H. W., JR., *et al.* Susceptibility locus for IgA deficiency and common variable immunodeficiency in the HLA-DR3, -B8, -A1 haplotypes. Mol Med, v.4, n.2, Feb, p.72-86. 1998.

SEDDIKI, N. E. A. expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. J Exp Med, v.203, n.7, July, 10, p.1693-1700. 2006.

SEGGEV, J. S. Spontaneous remission of common variable immunodeficiency of 20 years duration. J Allergy Clin Immunol, v.88, n.3 Pt 1, Sep, p.418-20. 1991.

SELIGMANN, M., *et al.* Changes in serum immunoglobulin patterns in adults with common variable immunodeficiency. Clin Exp Immunol, v.84, n.1, Apr, p.23-7. 1991.

SHEVACH, E. M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol, v.2, n.6, Jun, p.389-400. 2002.

SNELLER, M. C. Common variable immunodeficiency. Am J Med Sci, v.321, n.1, Jan, p.42-8. 2001.

SNELLER, M. C. e W. STROBER. Abnormalities of lymphokine gene expression in patients with common variable immunodeficiency. J Immunol, v.144, n.10, May 15, p.3762-9. 1990.

SPICKETT, G. P. Current perspectives on common variable immunodeficiency (CVID). Clin Exp Allergy, v.31, n.4, Apr, p.536-42. 2001.

STAGG, A. J., *et al.* Failure in antigen responses by T cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID). Clin Exp Immunol, v.96, n.1, Apr, p.48-53. 1994.

SUZUKI, H., *et al.* Various expression patterns of alpha1 and alpha2 genes in IgA deficiency. Allergol Int, v.58, n.1, Mar, p.111-7. 2009.

SUZUKI, K. e S. FAGARASAN. Diverse regulatory pathways for IgA synthesis in the gut. Mucosal Immunol, v.2, n.6, Nov, p.468-71. 2009.

TAAMS, L. S., *et al.* Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. Eur J Immunol, v.31, n.4, Apr, p.1122-31. 2001.

TADA, T., *et al.* Properties of the antigen-specific suppressive T-cell factor in the regulation of antibody response of the mouse. IV. Special subregion assignment of the gene(s) that codes for the suppressive T-cell factor in the H-2 histocompatibility complex. J Exp Med, v.144, n.3, Sep 1, p.713-25. 1976.

TAKAHASHI, T., *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. Int Immunol, v.10, n.12, Dec, p.1969-80. 1998.

TAUBENHEIM, N., *et al.* Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients. J Immunol, v.175, n.8, Oct 15, p.5498-503. 2005.

THOMSON, C. W., *et al.* Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators. Immunol Res, v.35, n.1-2, p.163-78. 2006.

THORNTON, A. M., *et al.* Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. Eur J Immunol, v.34, n.2, Feb, p.366-76. 2004.

VAN THIEL, D. H., *et al.* A syndrome of immunoglobulin A deficiency, diabetes mellitus, malabsorption, a common HLA haplotype. Immunologic and genetic studies of forty-three family members. Ann Intern Med, v.86, n.1, Jan, p.10-9. 1977.

VAN ZELM, M. C., *et al.* An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. N Engl J Med, v.354, n.18, May 4, p.1901-12. 2006.

VASCONCELOS, D. M. A. D., A.J. Imunodeficiência Comum Variável (Hipogamaglobulinemia de Início Tardio ou Hipogamaglobulinemia Adquirida): Breve revisão Rev.Bras.Alerg.Imunol, v.12, n.5, p.147-157. 1989.

VERHAGEN, J., *et al.* Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. J Allergy Clin Immunol, v.117, n.1, Jan, p.176-83. 2006.

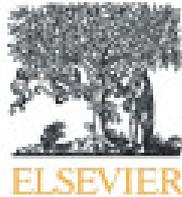
VIALARD, J. F., *et al.* Altered dendritic cell distribution in patients with common variable immunodeficiency. Arthritis Res Ther, v.7, n.5, p.R1052-5. 2005.

VIEIRA, P. L., *et al.* IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol, v.172, n.10, May 15, p.5986-93. 2004.

- VIGLIETTA, V., *et al.* Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. J Exp Med, v.199, n.7, Apr 5, p.971-9. 2004.
- WALL, R. L. e S. SASLAW. Adult agammaglobulinemia. AMA Arch Intern Med, v.95, n.1, Jan, p.33-6. 1955.
- WAN, Y. Y. e R. A. FLAVELL. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. Nature, v.445, n.7129, Feb 15, p.766-70. 2007.
- WANG, J. E. A. Transiente expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. Eur J Immunol, v.37, p.129-138. 2007.
- WANG, Z., *et al.* Discordance between IgA switching at the DNA level and IgA expression at the mRNA level in IgA-deficient patients. Clin Immunol, v.91, n.3, Jun, p.263-70. 1999.
- WARNATZ, K., *et al.* Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)/IgM(-)/IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. Blood, v.99, n.5, Mar 1, p.1544-51. 2002.
- WEINER, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev, v.182, Aug, p.207-14. 2001.
- WILDIN, R. S., *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. Nat Genet, v.27, n.1, Jan, p.18-20. 2001.
- WOOF, J. M. e M. A. KERR. IgA function--variations on a theme. Immunology, v.113, n.2, Oct, p.175-7. 2004.
- YEL, L. Selective IgA deficiency. J Clin Immunol, v.30, n.1, Jan, p.10-6.
- YEL, L. Selective IgA deficiency. J Clin Immunol, v.30, n.1, Jan, p.10-6. 2010.
- YU, G. P., *et al.* Regulatory T cell dysfunction in subjects with common variable immunodeficiency complicated by autoimmune disease. Clin Immunol, v.131, n.2, May, p.240-53. 2009.
- YU, J. E., *et al.* Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol, v.124, n.2, Aug, p.349-56, 356 e1-3. 2009.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo Publicado



available at www.sciencedirect.com
Clinical Immunology
www.elsevier.com/locate/yclim



Reduced frequency of CD4⁺CD25^{HIGH}FOXP3⁺ cells and diminished FOXP3 expression in patients with Common Variable Immunodeficiency: A link to autoimmunity?

J. Genre^{a,*}, P.R. Errante^a, C.M. Kokron^{b,c}, M. Toledo-Barros^b,
N.O.S. Câmara^{a,d}, L.V. Rizzo^{a,b,c,e}

^a Department of Immunology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, Brazil

^b Division of Clinical Immunology and Allergy, University of São Paulo Medical School, Brazil

^c Laboratory of Medical Investigation (LIM) – 60, University of São Paulo Medical School, Brazil

^d Nephrology Division, Federal University of São Paulo, Brazil

^e Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Brazil

Received 5 August 2008; accepted with revision 21 March 2009

Available online 25 April 2009

KEYWORDS
Autoimmunity;
Common Variable
Immunodeficiency;
FOXP3;
Regulatory T cells

Abstract Common Variable Immunodeficiency (CVID) is a primary immunodeficiency disease characterized by defective immunoglobulin production and often associated with autoimmunity. We used flow cytometry to analyze CD4⁺CD25^{HIGH}FOXP3⁺ T regulatory (Treg) cells and ask whether perturbations in their frequency in peripheral blood could underlie the high incidence of autoimmune disorders in CVID patients. In this study, we report for the first time that CVID patients with autoimmune disease have a significantly reduced frequency of CD4⁺CD25^{HIGH}FOXP3⁺ cells in their peripheral blood accompanied by a decreased intensity of FOXP3 expression. Notably, although CVID patients in whom autoimmunity was not diagnosed had a reduced frequency of CD4⁺CD25^{HIGH}FOXP3⁺ cells, FOXP3 expression levels did not differ from those in healthy controls. In conclusion, these data suggest compromised homeostasis of CD4⁺CD25^{HIGH}FOXP3⁺ cells in a subset of CVID patients with autoimmunity, and may implicate Treg cells in pathological mechanisms of CVID.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Common Variable Immunodeficiency (CVID) is a primary immunodeficiency characterized by a failure of B cells to differentiate into plasma cells, resulting in impaired secretion of immunoglobulins and consequently increased susceptibility to infections of the respiratory and gastrointestinal tracts by encapsulated bacteria [1–4]. Paradoxically,

* Corresponding author. Av. Prof. Lineu Prestes, 1730 – Laboratório de Imunologia Clínica, São Paulo – SP 05508-900, Brazil. Fax: +55 11 3091 7394.

E-mail address: jgenre@cb.usp.br (J. Genre).

although patients with CVID have a diminished capacity to produce antibodies, they have a high incidence of auto-immune manifestations [5,6].

Compelling evidence indicates a significant role for a population of CD4⁺ T regulatory (Treg) cells in suppressing immune responses and in maintaining immunological homeostasis [7]. In humans, these cells are characterized by the constitutive expression of high levels of the α -chain of the interleukin-2 receptor (CD25^{HIGH}) [8] and the transcription factor Forkhead Box protein P3 (FOXP3), which is thought to be key for the normal development and suppressor activity of Treg cells [9]. Although Treg cells have been shown to down-modulate immune responses to auto antigens, allergens, pathogens and cancer cells, and to mediate peripheral transplantation tolerance [10,11], controversial views exist about whether defects in this T cell population directly contribute to the pathogenesis of human autoimmune diseases [12–16].

In the present study, we sought to determine whether autoimmunity in patients with CVID is associated with alterations in circulating CD4⁺CD25^{HIGH}FOXP3⁺ Treg cells.

Materials and methods

Patients

Thirty three subjects with CVID were recruited from the Division of Clinical Immunology and Allergy of São Paulo Medical School. Diagnosis of CVID followed the clinical and laboratory criteria established by the Pan-American Group of Immunodeficiency (PAGID), the European Society for Immunodeficiencies (ESID) and the Clinical Immunology Committee of the International Union of Immunological Societies (IUIS). Autoimmunity was diagnosed following clinical and laboratory guidelines for each of the diseases the patients presented with. Hemolytic Anemia was diagnosed by positive Coombs test, Rheumatic Fever was diagnosed by both

carditis and arthritis which were exacerbated after streptococcus infection, Pernicious Anemia was diagnosed by hematologic findings and serum B12 vitamin dosage, Vitiligo was clinically diagnosed by its hallmark clinical appearance, Atrophic Gastritis was diagnosed by gastric biopsy, Psoriasis was diagnosed by skin biopsy, Celiac Disease was diagnosed by intestinal biopsy and Sjögren's Syndrome was diagnosed by an altered Schirmer's test and salivary gland biopsy. Blood samples were collected from patients before infusion of intravenous immunoglobulin therapy. None of the patients presented any apparent clinical infection before sampling.

The CVID cohort that we describe here is very similar in its general aspects to those described in other studies. However, some differences should be noted: our cohort has a low incidence of granulomatous manifestations and there are a significant number of non-Caucasian subjects [6].

As controls, 30 sex- and age-matched individuals with no history of CVID or autoimmune disease were enrolled. Clinical characteristics of patients and controls are listed in Table 1. The study was approved by the local ethics committee and written informed consent was obtained from all studied subjects.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of CVID patients and control subjects were obtained from fresh heparinized venous blood by Isolymp (Gallard-Schlesinger Industries, Inc, Norway) density gradient centrifugation and suspended in DWEW (Sigma Chemical Co.) supplemented with 5% normal AB human serum (Human serum type AB-Bioclal Laboratories, INC., Rancho Dominguez, C.A., USA).

Flow cytometric analysis

To evaluate the *ex vivo* expression of cell surface markers on PBMC of CVID patients and healthy individuals, monoclonal antibodies (mAb) used in this study were Fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-human CD4, Phycoerythrin-conjugated anti-human CD25 and CyChrome-conjugated anti-CD3 (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Single-cell suspensions (1×10^6 cells) were prepared and stained for 30 min at 4 °C with optimal dilutions of each mAb, followed by two washes in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 0.5% normal AB human serum. For intracellular staining of FOXP3, cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions before incubation with Allophycocyanin-conjugated anti-human FOXP3 (PCHI01; eBioscience, San Diego, CA) mAb for 30 min at 4 °C. For all the markers evaluated in this study, appropriate isotype-matched control antibodies were used to determine non-specific staining. Samples analyses were performed on FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

For quantification of T lymphocyte subpopulations, a lymphocytes gate was established based on the size and granularity of these cells. Then, CD4⁺ and CD8⁺ cells gates were established based on the mutually exclusive expression of these markers within the whole lymphocyte population (Figs. 1A and B). For phenotypic characterization and quantification of CD4⁺CD25^{HIGH}FOXP3⁺ cells, 100,000 events were recorded for each sample in the CD4⁺ lymphocytes gate. Next, the frequency of FOXP3⁺ cells expressing high

Table 1 Characteristic of CVID patients and control subjects included in the study.

Subjects	Controls	CVID
N	30	33
Sex		
Male	14	16
Female	16	17
Age (years range)	18–70	18–74
Clinical characteristics		
No autoimmunity (n/N)		22/33
Autoimmunity (n/N) ^a		11/33
Hemolytic anemia		2/33
Rheumatic Fever		1/33
Pernicious anemia		1/33
Vitiligo		4/33
Atrophic gastritis		1/33
Psoriasis		1/33
Celiac disease		1/33
Sjögren syndrome		1/33

^a One male patient presents Atrophic gastritis and Sjögren syndrome.

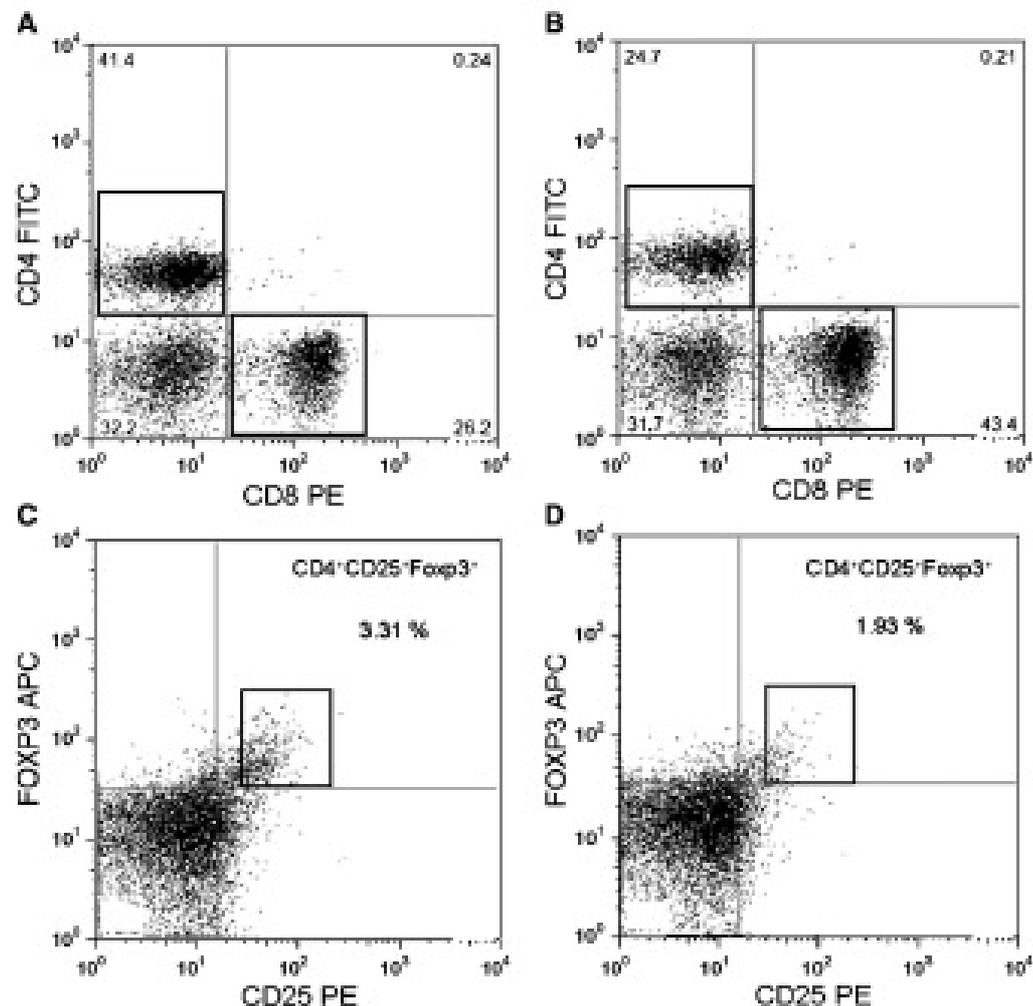


Figure 1 Gating strategy for CD4, CD8 and CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells. For quantification of T lymphocytes subpopulations, CD4⁺ and CD8⁺ cells gates were established based on the mutually exclusive expression of these markers within the whole lymphocytes population for healthy controls (CN) (panel A) and Common Variable Immunodeficiency (CVID) patients (panel B). For phenotypic characterization and quantification of the CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ T cell population, a CD4⁺ T cells gate was established within the lymphocytes population. Subsequently, the frequency of CD25^{high}FOXP3⁺ T cells within this gate and their Forkhead box P3 mean fluorescence intensity were assessed for healthy controls (CN) (panel C) and Common Variable Immunodeficiency (CVID) patients (panel D).

levels of CD25 was calculated, and the FOXP3 Mean Fluorescence Intensity in this population was assessed (Figs. 1C and D). In all cases, non-specific background staining was below gate values considered in the FOXP3 MFI calculation. Analysis of flow cytometry data was performed using FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA).

Real time PCR of FOXP3

Total RNA extraction from freshly purified PBMC was performed with TRIzol reagent (Invitrogen Life technologies) and cDNA synthesis was carried out (Invitrogen Life technologies) according to the manufacturer's protocol. Quantitative real time PCR was performed using Taqman[®] Universal PCR Master Mix. The following primers were used to amplified

FOXP3 and GAPDH: (Invitrogen Life technologies) FOXP3 forward: 5'-GGCACTCCTCCAGGACAG-3'; reverse: 5'-GCTGATCATGGCTGGGCTCT-3'; GAPDH forward: 5'ATTCCACCCATGGCAAATTC-3', reverse: 5'-GCATCGCCCCACTTGATT-3'. All PCR assays were performed in triplicate. Thermocycling conditions included 40 cycles of denaturing at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 15 s and extension at 72 °C for 60 s. Data was analyzed with the ABI Prism 7500 Detection system (Applied Biosystems, Foster, CA) using the comparative threshold cycle method. Expression levels were normalized to GAPDH.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego

California USA). Where data followed a normal distribution (checked by D'Agostino and Pearson omnibus normality test) experimental groups were compared with a two-tailed Student's test. Otherwise, a two-tail Mann-Whitney test was used. For correlation analyses, r and p values were calculated using Spearman's correlation test. p values were considered significant when <0.05 .

Results

Common Variable Immunodeficiency (CVID) is a primary immunodeficiency with variable immunological defects and heterogeneous clinical manifestations [1–5]. Although CVID is considered a humoral immunodeficiency, variable degrees of T cell dysfunction have been noted frequently in these patients [17–19].

Characterization of T cells subsets in patients with Common Variable Immunodeficiency

We analyzed peripheral blood mononuclear cells from 33 CVID patients and 30 healthy controls to determine the frequency of T lymphocytes, focusing on the subpopulations of CD4⁺ T cells. Flow cytometric analysis of CD3 surface expression revealed that the frequency of T cells does not differ between CVID patients and control subjects (data not shown). Although hemograms of these individuals showed that they were neither leukopenic nor lymphopenic (data not shown), when the frequency of T lymphocytes subpopulations was analyzed, half of the CVID patients presented with an inversion of the CD4/CD8 ratio (Fig. 2A). In most of the cases, this finding was due to a decrease in the frequency of CD3⁺CD4⁺ T cells and an increase in the number CD3⁺CD8⁺ T cells in the peripheral blood of these individuals (data not shown).

A clinical follow up of CVID patients for a period of 3–4 years, revealed that for patients in whom a decrease of absolute CD4⁺ lymphocytes numbers was observed, this lymphopenia was maintained or diminished over time

(Fig. 2B). Noteworthy, this subgroup of patients comprised individuals with and without diagnosis of autoimmune disease. These observations suggest that an inversion of CD4/CD8 ratio could conceal the reduction of CD4⁺ T cells seen in these patients and a detailed analysis of lymphocyte subpopulations in addition to hemograms could be of assistance, not only in the diagnosis of immunodeficiency, but also to monitor the possible evolution of autoimmunity in these patients.

Autoimmune manifestations represent the most common clinical feature of primary immunodeficiencies [20]. In the Brazilian cohort of CVID patients, autoimmune disorders were diagnosed in 15.5% of the individuals (Table 1) [6], with Vitiligo being most frequent and differing from other cohorts in which Idiopathic Thrombocytopenic Purpura is the principal disease [5,21]. Although there is an apparently higher incidence of autoimmunity in males than females in our study group, this was likely because patients with other manifestations, such as allergy or cancer, were not included and, by chance more males with autoimmunity gave informed written consent to participate. In the general cohort of CVID patients followed in our clinic, autoimmunity is evenly represented amongst males and females.

Reduced frequency of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells in patients with Common Variable Immunodeficiency and autoimmunity

Despite the increasing number of studies carried out in animal models to investigate the role of Treg cells in the development of autoimmune disorders, limited and controversial information exists about the contribution of this regulatory T cell population to the pathogenesis of human autoimmune disorders [12–14]. Therefore, we investigated the possibility that patients with CVID and autoimmune disorders could have lower numbers of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells than CVID patients in which autoimmunity was not diagnosed.

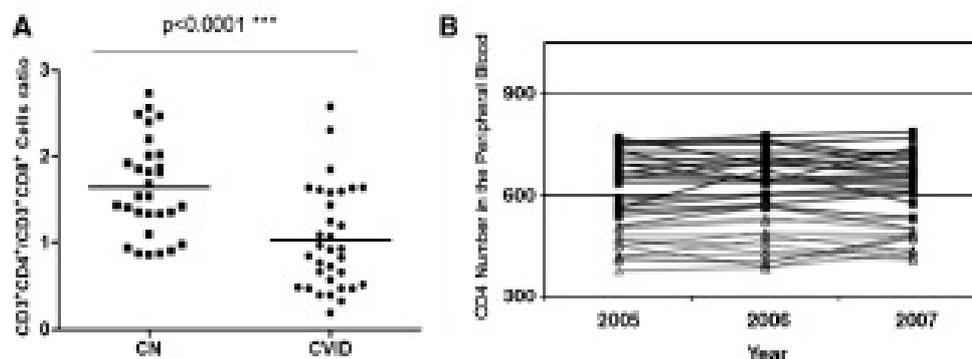


Figure 2 CD4:CD8 cells ratio and absolute CD4⁺ T cells counts for Common Variable Immunodeficiency patients. (A) The horizontal bars indicate the mean ratio of CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ cells in healthy controls (CH) and Common Variable Immunodeficiency (CVID) patients. The individual ratio for each subject included in the analysis is shown. p values <0.05 were considered significant (*). (B) Absolute CD4⁺ lymphocytes counts over time in the peripheral blood of patients with CVID. Continuous lines and closed squares represent the CD4 counts in patients without autoimmunity. Dashed lines and open triangles are representative of the CD4 counts in patients with autoimmunity.

PBMC from CVID patients and healthy individuals were analyzed by flow cytometry to determine the frequency of $CD25^{high}FOXP3^+$ cells within the $CD4^+$ T lymphocyte population. In agreement with the recent publication of Fevang et al. [22] we observed a reduced frequency of $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ cells in the Brazilian cohort of CVID patients when compared to healthy individuals ($1.93 \pm 0.77\%$ vs. $3.32 \pm 0.83\%$; $p < 0.0001$) (Fig. 3A). Furthermore, our results demonstrated for the first time that CVID patients with autoimmune disease show a lower frequency of $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ cells in their peripheral blood than patients without autoimmunity ($1.43 \pm 0.60\%$ vs. $2.18 \pm 0.74\%$; $p = 0.0067$) (Fig. 3A). These observations are in agreement with the results obtained from real time quantitative PCR analysis of FOXP3 expression, showing that FOXP3 mRNA levels were reduced in PBMC of CVID patients when compared to healthy subjects ($p < 0.0001$), especially in those individuals with diagnosis of autoimmune disease ($p = 0.0238$) (Fig. 4).

Reduced FOXP3 expression in patients with Common Variable Immunodeficiency and autoimmunity

As FOXP3 is an important molecule related to the differentiation and function of Treg cells [9] we analyzed FOXP3 expression in healthy individuals and CVID patients. The mean fluorescence intensity (MFI) of FOXP3 was assessed in $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ cells and a significant decrease in FOXP3 expression was observed in CVID patients compared to control subjects (60.07 ± 11.66 vs. 68.57 ± 11.62 ; $p = 0.0053$) (Fig. 3B). We therefore further analyzed the FOXP3 MFI in $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ cells in both subgroups of CVID patients. We found that FOXP3 expression was greatly reduced in $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ cells of +AID subgroup when compared with those from -AID (46.05 ± 5.77 vs. 67.05 ± 6.18 ; $p < 0.0001$) and control subjects (68.57 ± 11.62 ; $p < 0.0001$) (Fig. 3B). In contrast, when compared to healthy subjects, the -AID subgroup of patients did not differ in FOXP3 MFI (67.05 ± 6.18 vs. 68.57 ± 11.62) (Fig. 3B).

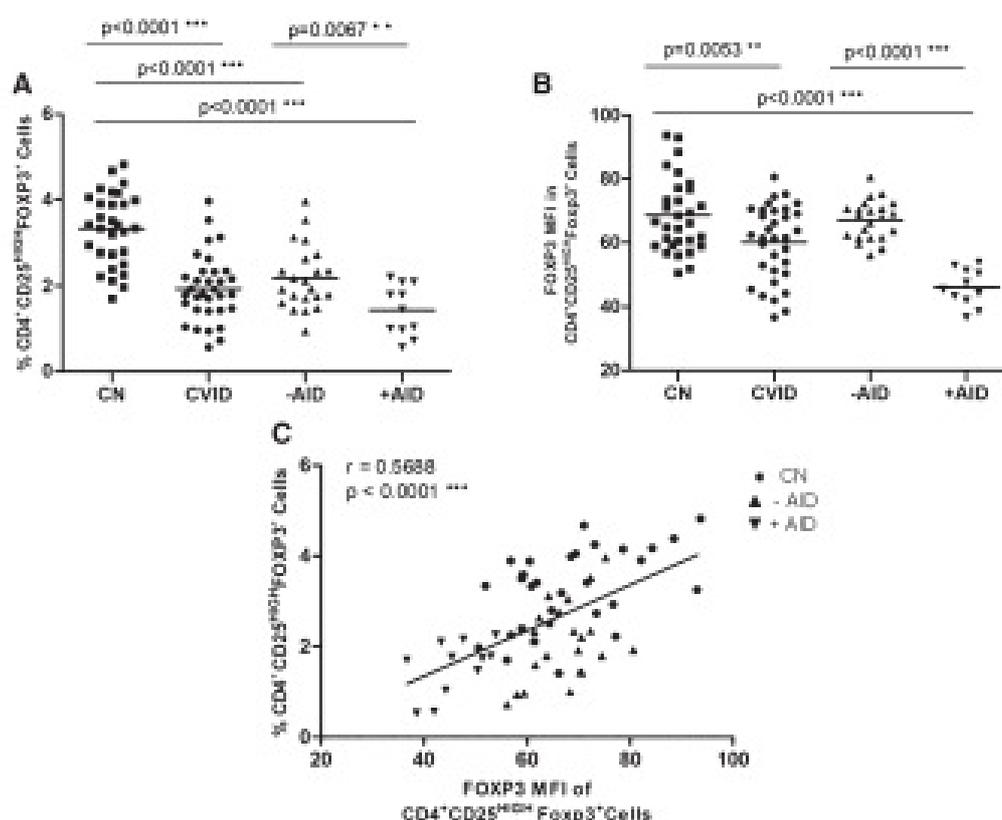


Figure 3 Frequency of $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ cells and Forkhead Box P3 (FOXP3) MFI in healthy subjects and Common Variable Immunodeficiency patients. Peripheral blood mononuclear cells of 30 healthy controls (CN) and 33 Common Variable Immunodeficiency (CVID) patients were stained for CD4, CD25 and FOXP3. CVID patients were classified for analyses based on the absence (-AID) ($n = 22$) or presence (+AID) ($n = 11$) of autoimmune disease. (A) Frequency of $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ cells. The horizontal bars indicate the mean frequency of Treg cells in each group. (B) FOXP3 expression in $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ cells. The horizontal bars indicate the mean FOXP3 MFI in the Treg population for each of the study groups. (C) Correlation analysis of the frequencies of $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ cells and FOXP3 MFI for healthy control (CN) and patients with (+AID) and without (-AID) diagnosis of autoimmune disease. p values < 0.05 were considered significant (*).

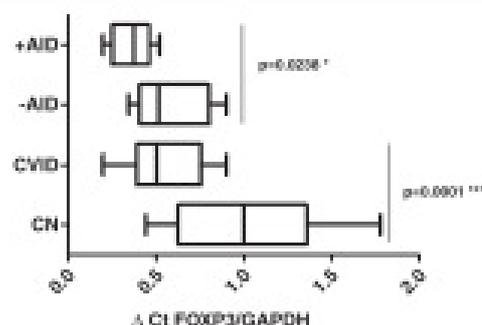


Figure 4 Foxhead box P3 (FOXP3) mRNA levels in PBMC from healthy subjects and Common Variable Immunodeficiency patients. Total mRNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy controls (CH) and Common Variable Immunodeficiency (CVID) patients with (+AID) and without (-AID) autoimmune disease. FOXP3 mRNA expression for each group of individuals included in this study was assessed by real time PCR. FOXP3 expression levels were normalized to GAPDH. *p* values < 0.05 were considered significant (*).

Finally, a correlation analysis between the frequency of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells and FOXP3 WFI of these cells showed a positive correlation for all groups of individuals ($r = 0.5688$; $p < 0.0001$) (Fig. 3C). These data suggest that in addition to a reduced number of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells circulating in the peripheral blood, some patients may also show reduced levels of FOXP3 expression.

Discussion

The principal aim of this study was to investigate whether autoimmune disease in CVID patients correlates with altered peripheral Treg cell homeostasis. We demonstrate for the first time that CVID patients with autoimmune disease show reduced frequencies of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells in the peripheral blood accompanied by decreased FOXP3 expression. Our results suggest that in addition to genetic background and environmental factors, further studies should be conducted to explore whether compromised FOXP3 expression and subsequent attenuation in CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells function could be associated with the outcome of autoimmune diseases in a subset of CVID patients. Our findings also suggest that it would be of interest to explore whether alterations in the differentiation and/or function of B lymphocytes could impact the development and/or peripheral homeostasis of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Treg cells.

A number of different mechanisms may account for the reduced frequency of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells observed in CVID patients with autoimmune disease. It is tempting to speculate that pathways involved in the development and differentiation of natural Treg cells or their peripheral homeostasis could be in part responsible for the decrease frequency of this population of cells in patients with autoimmune disorders. Considering that our observations are based on analysis of circulating blood leukocytes, they may not be representative of the dynamics of Treg cells in lymphoid tissues, particularly in the case of inflammatory

conditions such as autoimmune disorders. It could be possible that the reduced frequency of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells in CVID patients with autoimmune disease may result from the preferential migration of these lymphocytes to sites of inflammation, thus leaving the circulation.

Although our observations are important in the etiology of autoimmunity in CVID patients, they do not define whether the decrease in Treg cells is a consequential or causal of autoimmunity. There is evidence from other autoimmune diseases that an altered frequency and/or decreased migratory capacity of regulatory T cells might be causal, as shown recently for systemic lupus erythematosus [23]. In support of this possibility for CVID patients, defects in the naive T cell compartments in the thymus have been observed [24,25], and this defect in thymopoiesis may contribute to the low frequency of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells and ultimately autoimmune disorders.

Another possible interpretation for the variation in frequency of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells seen in CVID patients could be altered peripheral regulation of FOXP3 expression in this regulatory T cell population. Remarkably, FOXP3 WFI values displayed an almost mutually exclusive stratification of CVID patients subgroups (Figs. 3B and C). This reduced expression of FOXP3 in the peripheral blood of patients with autoimmune disorders could either result from its lower expression in all FOXP3⁺ cells, or selective elimination of FOXP3^{high} cells. Since patients without autoimmunity have FOXP3 WFI values similar to those of healthy controls, analysis of FOXP3 WFI may be a useful diagnostic tool to identify and follow individuals at risk for developing autoimmune disorders. Notably, the functional consequences of reduced FOXP3⁺ cells may be amplified in individuals with inverted CD4/CD8 ratios since in these patients the total numbers of FOXP3⁺ cell would be further decreased.

Although the mean frequency of Treg cells in +AID patients is lower than that observed in the -AID subgroup, Figures 3A and C show that there is a partial overlap of this parameter between patients with and without autoimmune disorders. These data indicate that the major difference between CVID patients with and without autoimmune disease is the intensity of FOXP3 expression rather than the frequency of these cells. The finding that lower expression of FOXP3 is associated with autoimmunity is in agreement with the concept that high and stable expression of FOXP3 is required for the normal development and function of natural Tregs in humans [26]. In support of this observation, it has been shown in mice that decreased expression of FOXP3 in Treg cells caused immune disease by subverting the suppressive function of these cells and converting them into effector cells which contributed to, rather than inhibited, inflammation [27]. Taken together, our findings might offer a way to improve CVID patients' stratification and prompt the development of therapies targeting regulatory T cells in CVID autoimmunity.

Acknowledgments

This work was supported by grants from The Foundation for Support of Research in the State of São Paulo (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP (04/15887-1 and 07/07139-3)), The National Council for Scientific and Technologic Development (Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq), The Brazilian Ministry of Science and Technology (WCT) through the Instituto do Milênio Programme. DrR is a recipient of a personal grant from CNPq. The authors wish to thank to all the patients, their families and control subjects involved in this study for their trust and cooperation. We are grateful to the staff of Hospital das Clínicas University of São Paulo Medical School for blood samples collection and the excellent care they provide to the patients. We thank Megan Levings for critical review of the manuscript.

References

- [1] H.C. Sneller, W. Strober, E. Eisenstein, J.S. Jaffe, C. Cunningham-Kundles, NH conference. New insights into common variable immunodeficiency, *Ann. Intern. Med.* 118 (1993) 720–730.
- [2] C. Cunningham-Kundles, Clinical and immunologic analysis of 103 patients with common variable immunodeficiency, *J. Clin. Immunol.* 9 (1989) 22–33.
- [3] G.P. Spickett, J. Farrant, M.E. North, J.G. Zhang, L. Morgan, A.D. Webster, Common variable immunodeficiency: how many diseases? *Immunol. Today* 18 (1997) 325–328.
- [4] R.A. Hermaszewski, A.D. Webster, Primary hypogammaglobulinemia: a survey of clinical manifestations and complications, *Q. J. Med.* 86 (1993) 31–42.
- [5] C. Cunningham-Kundles, C. Bodian, Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients, *Clin. Immunol.* 92 (1999) 34–48.
- [6] C.M. Kokron, R.R. Erante, M.T. Barros, G.Y. Baracho, M.M. Carrago, J. Nelli, L.Y. Rizzo, Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency, *An. Acad. Bras. Cienc.* 76 (2004) 707–726.
- [7] S. Sakaguchi, Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 345–352.
- [8] C. Baccher-Allan, J.A. Brown, G.J. Freeman, D.A. Hafler, CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood, *J. Immunol.* 167 (2001) 1245–1253.
- [9] J.D. Fontana, M.A. Gavin, A.Y. Rudensky, Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 330–336.
- [10] R.S. McHugh, E.M. Shevach, The role of suppressor T cells in regulation of immune responses, *J. Allergy Clin. Immunol.* 110 (2002) 693–702.
- [11] S.E. Allan, R. Broady, S. Gregori, M.E. Himmel, N. Locke, M.G. Roncarolo, R. Bacchetta, M.K. Levings, CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases, *Immunol. Rev.* 223 (2008) 391–421.
- [12] S.C. Lin, K.H. Chen, C.H. Lin, C.C. Kuo, Q.D. Ling, C.H. Chan, The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients, *Eur. J. Clin. Invest.* 37 (2007) 987–996.
- [13] M. Bonelli, A. Savitskaya, K. von Dalwigk, C.M. Steiner, D. Astaha, J.S. Smeaton, C. Scheinecker, Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), *Int. Immunol.* 20 (2008) 861–868.
- [14] M.J. Vargas-Rojas, J.C. Crispin, Y. Richaud-Patin, J. Acosta-Varela, Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance, *Lupus* 17 (2008) 289–294.
- [15] K. Venken, N. Hellings, K. Hensen, J.L. Rummens, R. Medaer, B. D'Haeghe, W.B. Dubois, J. Raaij, P. Stinissen, Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4+CD25+ regulatory T-cell function and FOXP3 expression, *J. Neurosci. Res.* 83 (2006) 1432–1446.
- [16] A. Balandina, S. Lecart, P. Dartevelle, A. Saoudi, S. Bernh-Akfin, Functional defect of regulatory CD4+ CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis, *Blood* 105 (2005) 735–741.
- [17] S. Cunningham-Kundles, C. Cunningham-Kundles, F.P. Siegel, S. Gupta, E.M. Smithwick, C. Kosloff, R.A. Good, Defective cellular immune response *in vitro* in common variable immunodeficiency, *J. Clin. Immunol.* 1 (1981) 65–72.
- [18] I. Kondratenko, R.L. Armitot, A.D. Webster, J. Farrant, Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells, *MRC Immunodeficiency Group, Clin. Exp. Immunol.* 108 (1997) 9–13.
- [19] G. Pastorelli, M.G. Roncarolo, J.L. Tauraine, G. Perronne, R.A. Toza, J.E. de Vries, Peripheral blood lymphocytes of patients with common variable immunodeficiency (CVI) produce reduced levels of interleukin-4, interleukin-2 and interferon-gamma, but proliferate normally upon activation by mitogens, *Clin. Exp. Immunol.* 78 (1989) 334–340.
- [20] M. Carneiro-Sampaio, A. Coutinho, Tolerance and autoimmunity: lessons at the bedside of primary immunodeficiencies, *Adv. Immunol.* 95 (2007) 51–82.
- [21] C. Cunningham-Kundles, Autoimmune manifestations in common variable immunodeficiency, *J. Clin. Immunol.* 28 (Suppl. 1) (2008) S42–S45.
- [22] B. Fewang, A. Yndestad, W.J. Sandberg, A.M. Holm, E. Müller, R. Aukrust, S.S. Froland, Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: association with chronic inflammation *in vivo*, *Clin. Exp. Immunol.* 147 (2007) 521–525.
- [23] H.Y. Lee, Y.K. Hong, H.J. Yun, Y.M. Kim, J.R. Kim, W.H. Yoo, Altered frequency and migration capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus, *Rheumatology (Oxford)* 47 (2008) 789–794.
- [24] V. Guazzelli, F. Alati, I. Mezzaroma, F. Mazzotta, G. Andolfi, A. Montellaro, M. Piondromicci, R. Fanti, M. Manzoli, A. Alati, Assessment of thymic output in common variable immunodeficiency patients by evaluation of T cell receptor excision circles, *Clin. Exp. Immunol.* 129 (2002) 346–353.
- [25] M.J. De Wera, L. A-Hariri, A.T. Gewurz, Assessing thymopoiesis in patients with common variable immunodeficiency as measured by T-cell receptor excision circles, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 93 (2004) 478–484.
- [26] S.E. Allan, A.N. Alstad, N. Harindis, N.K. Girdlin, M. Amendola, R. Bacchetta, L. Naldini, M.G. Roncarolo, H. Soudryns, M.K. Levings, Generation of potent and stable human CD4+ T regulatory cells by activation-independent expression of FOXP3, *Mol. Ther.* 16 (2008) 194–202.
- [27] Y.Y. Wan, R.A. Flavell, Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression, *Nature* 445 (2007) 766–770.

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](#)