



04/27-02/55

Rev. bras. alerg. imunopatol.

Copyright © 2004 by SBAI

ARTIGO ORIGINAL

Alterações da imunidade celular associada à patogênese da Imunodeficiência Comum Variável

Changes in cellular immunity associated with the pathogenesis of Common Variable Immunodeficiency

Errante P.R.¹, Kokron C.M.^{2,3}, Toledo-Barros, M.^{3,4}, Camargo M.M.⁵, Rizzo L.V.^{6,7}

Resumo

Objetivo: Avaliação da morte celular por ativação em linfócitos T de pacientes com imunodeficiência comum variável (CVID) e de outros parâmetros da resposta imune.

Métodos: Células mononucleares obtidas a partir de sangue periférico (PBMC) de 32 pacientes com CVID e 32 indivíduos normais foram utilizadas para o estudo da expressão de CD40L, linfoproliferação e apoptose. Para a análise de marcadores de ativação (CD25 e CD69) e de interação entre células T e B (CD70) PBMC foram estimuladas por diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas). Os sobrenadantes de cultura foram utilizados para quantificação de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ) por ELISA. Todos os testes laboratoriais foram aplicados no grupo controle de voluntários sadios. Os resultados foram analisados utilizando testes de diferença de proporções, ANOVA, Kruskal-Wallis e a prova de Mann-Whitney.

Resultados: O grupo de pacientes com CVID demonstrou aumento percentual de linfócitos CD3/CD4 que sofreram apoptose em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e menor expressão de CD40L ($p < 0,0001$), CD25, CD69 e CD70 em estudo cinético. Foi observado decréscimo na síntese de IL-4 ($p < 0,05$), IL-5 ($p < 0,05$) e menor quantidade de células CD3 ($p < 0,005$), CD3/CD4 ($p < 0,0001$), CD3/CD4/CD45RA ($p < 0,0001$), CD3/CD4/CD45RO ($p < 0,0001$), CD19 ($p < 0,0001$), e na proporção de células CD3/CD4: CD3/CD8 ($p < 0,0001$) no grupo de pacientes com CVID quando comparados com o grupo de indivíduos normais.

Abstract

Objective: Evaluation of activation induced cell death (AICD) on T lymphocytes and other parameters of the immune response in patients with common variable immunodeficiency (CVID).

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 32 patients with CVID and 32 normal controls were used to study CD40L expression, lymph proliferation and apoptosis. PBMC were stimulated for different time periods (24, 48, 72 and 96 hours) and analyzed for activation markers (CD25 and CD69) and markers of T-B interaction (CD70). Cytokines (IL-2, IL-4, IL-5 and IFN- γ) were measured by ELISA in the culture supernatants. All laboratorial tests were applicable in the control group of health volunteer. The results were analyzed using the linear trend in proportion test, ANOVA, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney.

Results: Patients with CVID showed an increase in the percentage of CD3/CD4 lymphocytes dieing by AICD when compared with the control group ($p < 0,05$), they also showed a decreased expression of CD40L ($p < 0,0001$), CD25, CD69 and CD70 in a kinetic expression assay. A decreased in the synthesis of IL-4 ($p < 0,05$) and IL-5 ($p < 0,05$) was also observed. A decrease in the expression of CD3 ($p < 0,005$), CD3/CD4 ($p < 0,0001$), CD3/CD4/CD45RA ($p < 0,0001$), CD3/CD4/CD45RO ($p < 0,0001$), CD19 ($p < 0,0001$), and the CD3/CD4:CD3/CD8 ratio ($p < 0,0001$) were observed when patients were compared to normal individuals.

Conclusões: O aumento da morte de células T ativadas sugere que este fenômeno seja responsável pelo decréscimo nas células T e B circulantes, expressão de CD40L, CD25, CD69 e CD70, além da síntese diminuída de citocinas Th2, com conseqüente prejuízo da resposta celular e mediada por anticorpos destes pacientes.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2004; 27(2):55-69 imunodeficiência comum variável, citocinas, interleucinas-2, -4 e -5, anexina-V.

Conclusions: The increase in AICD suggest that phenomena is responsible for the decrease in the levels of peripheral blood T and B lymphocytes, as well as the decrease in the expression of CD40L, CD25, CD69 e CD70 and diminished synthesis of Th2-type cytokines, thus leading to the cellular immunity and antibody abnormalities observed in these patients.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2004; 27(2):55-69 common variable immunodeficiency, citokines, interleukins-2, -4, -5, annexin-V

1 - Mestre em Imunologia, Departamento de Imunologia, ICB-IV, USP-São Paulo; 2 - Doutora em Medicina, Assistente do Serviço de Alergia e Imunologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 3 - Pesquisador(a) do Instituto de Investigação em Imunologia (iii), MCT, Brasil; 4 - Doutora em Imunologia e Microbiologia, Profa. Colaboradora da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 5 - Doutora em bioquímica e Imunologia, Profa. Dra. do Departamento de Imunologia, ICB-IV, USP-São Paulo; 6 - Prof. Livre Docente do Departamento de Imunologia, ICB-IV, USP-São Paulo; 7 - Fundação Zerbini, São Paulo, Brasil

Introdução

A CVID é uma imunodeficiência primária caracterizada por hipogamaglobulinemia, infecções recorrentes principalmente do trato respiratório, e em menor proporção, doenças autoimunes e neoplasias¹⁻⁵. O diagnóstico da CVID depende da exclusão de outras síndromes com quadro de hipogamaglobulinemia, como Síndrome da hiper-IgM⁶, agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X⁷, Síndrome de Duncan⁸ e, em adultos, leucemia, linfoma e timoma^{5,9}. Casos sem evidência de transmissão familiar ou infecciosa têm sido relatados, onde a utilização de sais de ouro e glicocorticóides pode induzir o surgimento de um quadro persistente de hipogamaglobulinemia, enquanto o uso de sulfasalazina e difenil-hidantoína podem induzir um quadro similar, porém transitório⁵.

O reconhecimento de antígenos e a presença de sinais co-estimulatórios promovem a ativação das células T “naive”, que passam a realizar expansão clonal e diferenciação em células T efetoras e de memória. A estimulação antigênica das células T efetoras induz a maior expansão clonal e desempenho das funções efetoras, como a secreção de citocinas e expressão de novas moléculas na su-

perfície das células T. Estas células T ativadas são capazes de produzir citocinas e expressar em sua superfície a molécula CD40L (CD154), eventos importantes para a geração de anticorpos e mudança de isótipo da cadeia pesada de imunoglobulinas por células B. Contudo, a ativação de linfócitos T maduros também resulta na expressão de Fas (CD95) e síntese *de novo* do ligante de Fas (FasL) na superfície dos linfócitos T ativados, onde esta interação pode levar à morte celular por ativação. O resultado final desta ativação leva à formação de bolhas na membrana plasmática e degradação do ácido desoxirribonucleico nuclear, fenômeno designado apoptose¹⁰. Uma vez que a maioria dos pacientes brasileiros com CVID, e um subgrupo de pacientes do hemisfério Norte, apresentam redução no número e proporção de diferentes populações leucocitárias; resposta linfoproliferativa diminuída para antígenos e mitógenos; produção alterada de citocinas e alteração na expressão de moléculas de adesão e superfície^{1,2,11-14}, este trabalho tem por objetivo o estudo da morte por ativação de células T nestes indivíduos e suas possíveis implicações sobre outros parâmetros da resposta imune.

Objetivo do estudo

O objetivo do estudo foi avaliar a morte celular por ativação nas células T de pacientes com CVID e suas implicações sobre a expressão de marcadores de ativação e interação celular, produção de citocinas, linfoproliferação, e porcentagem de linfócitos circulantes no sangue periférico.

Métodos

1-Laboratórios

Os exames de rotina dos pacientes com CVID foram realizados no Laboratório Central do Hos-

pital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos de consulta aos prontuários dos pacientes com CVID atendidos no ambulatório de Imunodeficiências Primárias da Disciplina de Imunologia e Alergia da Faculdade

de Medicina da Universidade de São Paulo-FMU-SP (tabela 1).

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB IV-USP.

Tabela 1 - Caracterização dos pacientes com CVID.

Pacientes	Idade atual	Idade de diagnóstico	Dosagem de imunoglobulinas			Porcentagem de células B
			IgG	IgA	IgM	
1	32	29	412	ND	ND	2,93
2	71	60	100	ND	ND	4,32
3	39	35	200	41	7	3,32
4	18	16	546	ND	150	15,83
5	49	47	102	ND	ND	3,1
6	49	47	ND	ND	ND	4,62
7	29	26	38	ND	ND	1,86
8	44	42	173	ND	17	6,67
9	24	22	452	7	2	3,08
10	61	59	400	ND	ND	4,79
11	78	67	314	ND	255	4,01
12	56	48	391	55	28	2,82
13	56	48	8	ND	ND	1,97
14	18	16	326	15	3	4,04
15	30	20	12	ND	ND	1,66
16	17	13	96	5	2	2,17
17	57	43	363	ND	12	12,86
18	29	27	ND	ND	ND	1,71
19	15	12	329	13	8	5,03
20	80	75	324	13	8	3,31
21	29	26	ND	ND	ND	3,2
22	25	18	380	97	184	1,07
23	21	20	ND	ND	ND	2,01
24	31	26	176	ND	ND	3,5
25	22	15	105	ND	3	6,5
26	27	19	433	ND	2	3,43
27	39	30	195	ND	ND	5,02
28	38	35	548	184	66	3,0
29	38	21	157	ND	ND	3,18
30	62	53	776	ND	ND	11,45
31	36	34	100	ND	ND	2,07
32	15	14	377	ND	13	10,62

ND = abaixo do limite de detecção.

2-Critérios de Inclusão e Exclusão

Os pacientes incluídos neste estudo estão em acompanhamento na Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP desde 1997. Os critérios diagnósticos utilizados estão de acordo com a Organização Mundial de Saúde^{15, 16}, Grupo Panamericano de Imunodeficiência (PAGID) e Sociedade Européia de Imunodeficiências (ESID)¹⁷.

Pacientes com CVID foram avaliados por prova funcional da proteína BTK para a não inclusão de pacientes com XLA. Foram estudados 32 indivíduos com CVID (valores séricos de IgG médios abaixo de 300 mg/dL ou dois desvios-padrões abaixo dos níveis normais para a idade com níveis de IgM e IgA diminuídos, ao diagnóstico), 15 homens, acompanhados de respectivo grupo controle constituído por 32 indivíduos voluntários normais (15 homens). Foram excluídos pacientes em utilização de medicamentos ou que foram submetidos a exposição prévia a medicamentos causadores de imunodeficiência humoral^{15,17} e pacientes menores de dez anos de idade. A retirada de sangue ocorreu após o preenchimento do consentimento informativo por escrito sempre em pacientes sem infecção, imediatamente antes de receberem o tratamento terapêutico de imunoglobulinas humanas poliespecíficas para uso endovenoso (IVIG).

Todos os procedimentos foram aprovados pelas comissões de ética em pesquisa em humanos do HC-FMUSP e do ICB-USP.

3-Citometria de fluxo

Amostras de sangue foram obtidas por punção de veias periféricas, coletadas em tubos heparinizados e preparadas para realizar a marcação dos linfócitos, expressão das moléculas de ativação, de interação entre células T e B e apoptose.

Em resumo, procedeu-se a separação de PBMC por gradiente de centrifugação sobre Isolymph. Após lise das hemáceas, alíquotas de 100 µl contendo $1,0 \times 10^6$ células foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Para a leitura de citometria de fluxo, foram utilizados anticorpos conjugados com isoticianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou CyChrome, acompanhados de controle isotópico apropriado. As suspensões celulares foram submetidas à leitura em citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Foram analisadas 10.000 células, utilizando como parâmetros; FSC (Forward scatter) x SSC (Side scatter), número de células x FL1, número de células x FL2, número de células x FL3, FL1 x FL2, FL1 x FL3 e FL2 x FL3 (figuras 1A e 1B).

Figura 1A - Histograma representando a porcentagem de células CD3 obtidas a partir de pacientes com CVID e grupo controle. PBMC foram separadas após centrifugação com Isolymph. Após lise de hemáceas, as células foram incubadas com anticorpo anti-CD3 acompanhado de controle isotópico apropriado. As suspensões celulares foram submetidas a leitura em citômetro de fluxo utilizando como parâmetros FSC x SSC e número de células x FL3. Os valores descritos correspondem às porcentagens de células obtidas para cada experimento.

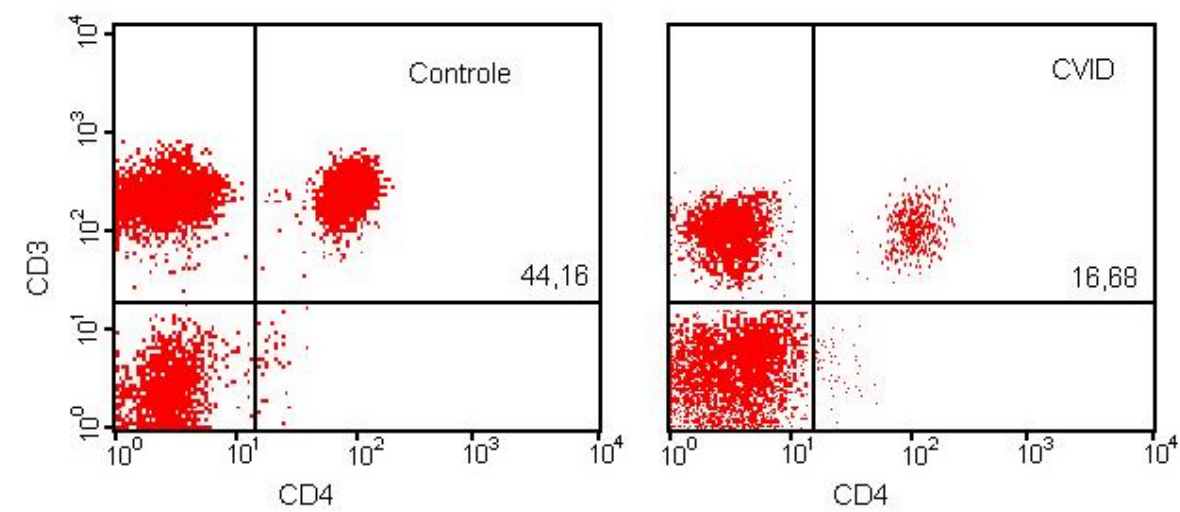
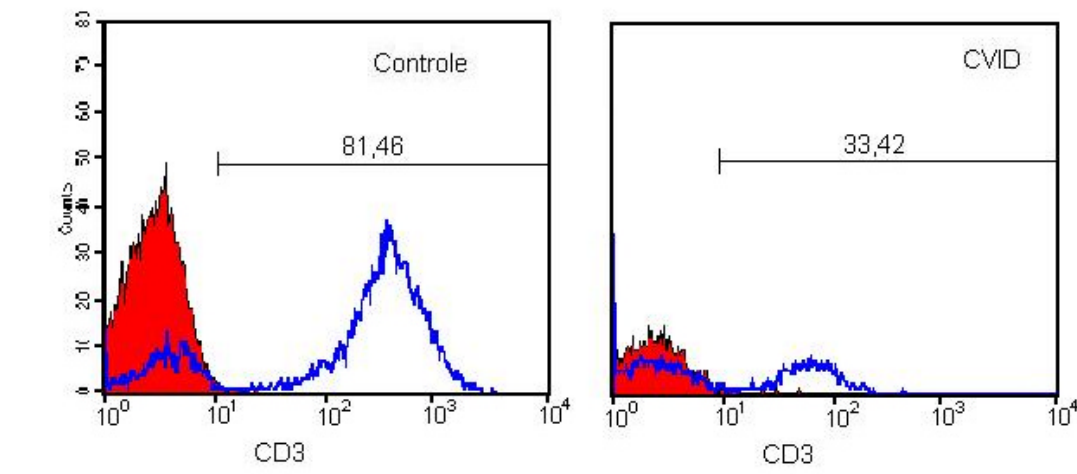


Figura 1B - Dot plot representando a porcentagem de células CD3CD4 obtidas a partir de pacientes com CVID e grupo controle. PBMC foram separadas após centrifugação com Isolymp. Após lise de hemáceas, as células foram incubadas com anticorpo anti-CD3+anti-CD4 acompanhados de controle isotípico apropriado. As suspensões celulares foram submetidas a leitura em citômetro de fluxo utilizando como parâmetros FSC x SSC e FL1 x FL3. Os valores descritos correspondem às porcentagens de células obtidas para cada experimento.



3.1.-Ensaio de morte celular por ativação

Para o estudo da apoptose, PBMC foram cultivadas com fitohemaglutinina (PHA) durante 72 horas e marcadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e Anexina-V.

3.2.-Cinética da expressão de moléculas de ativação e interação entre células T e B

Para a cinética da expressão de moléculas de ativação e interação entre células T e B, PBMC foram cultivadas na presença de fitohemaglutinina (PHA) durante 24, 48, 72 e 96 horas e depois marcadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD25 (cadeia α do receptor para IL-2); anti-CD69 (glicoproteína de superfície expressa precocemente durante a ativação linfocitária); e anti-CD70 (glicoproteína de superfície expressa tardiamente durante a ativação linfocitária). Para a expressão de CD40L (glicoproteína de superfície expressa na superfície das células T, que ao interagir com CD40 expresso na superfície das células B, é responsável pelo aumento da síntese de imunoglobulinas e troca de isótipo de cadeia pesada), PBMC foram cultivadas na presença de PHA durante 24 horas e marcadas com anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD40L.

3.3.-Fenotipagem de PBMC

Para o estudo fenotípico de subpopulações linfocitárias, PBMC foram marcadas com anticorpos

anti-CD3, anti-CD3/CD4/CD8, anti-CD19, anti-CD45RA e CD45RO.

4-Linfoproliferação

PBMC foram cultivadas na presença de concaivalina (Con-A) ou fitohemaglutinina (PHA) acompanhadas de respectivos poços controles sem estimulação antigênica durante 48 horas. Timidina triciada foi acrescida 16 horas antes da finalização do tempo de cultura, e as células foram coletadas em filtros de papel e a radioatividade mensurada por cintilação em aparelho contador de radiação beta. O resultado de cada paciente foi expresso em função da média aritmética das contagens por minuto (cpm) das culturas em triplicata, acompanhadas de desvio padrão. O índice de proliferação linfocitária correspondeu ao c.p.m. estimulado/c.p.m. não estimulado, onde valores aceitáveis para proliferação linfocitária se correlacionaram a índices de proliferação linfocitária > 20.

5-Dosagem de citocinas por ELISA

PBMC foram cultivadas com fitohemaglutinina (PHA) durante 24 horas para a dosagem de IL-2, e 48 horas para IL-4, IL-5 e IFN- γ . Os sobrenadantes de cultura foram coletados e a quantificação de citocinas foi realizada por ELISA.

6-Análise estatística

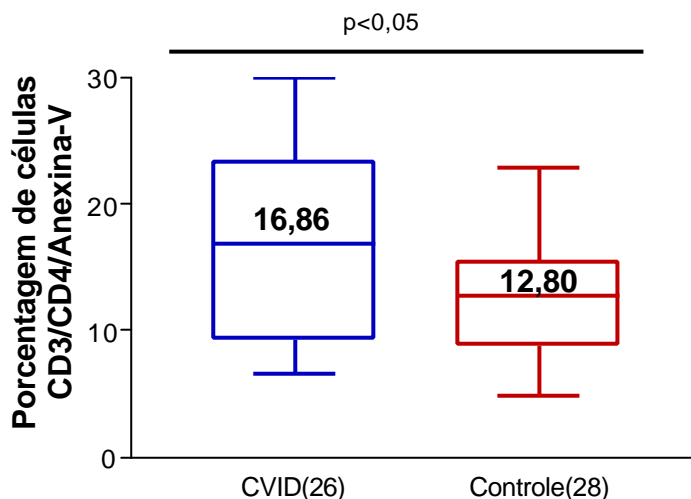
Utilizou-se para a análise estatística, os seguintes testes para comparação dos grupos controle e CVID: ANOVA e Kruskal-Wallis (H), e utilizou-se a prova de Mann-Whitney para a comparação entre os grupos de indivíduos normais e pacientes com CVID. Adotou-se como nível de significância o valor de 0,05 ($\alpha=5\%$), e os níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

Resultados

1-Morte celular por ativação

Os resultados para o ensaio de morte por ativação estão representados na figura 2, onde PBMC foram obtidas a partir de 26 pacientes com CVID e 28 indivíduos controle sadios. Neste experimento foi verificada maior porcentagem de células mortas por apoptose no grupo de pacientes com CVID. Foi utilizada a prova de Mann-Whitney para a comparação entre os grupos e observou-se diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

Figura 2 - Porcentagem de células CD3/CD4 que sofreram apoptose após estimulação policlonal. O grupo de pacientes com CVID (N=26) apresentou maior porcentagem de células mortas por ativação após estimulação durante 72 horas com PHA que os controles (N=28). Estes valores estão representados numericamente pela s medianas de cada grupo experimental e demonstram diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).



2-Estudo da cinética de expressão de CD25, CD69, CD70 e CD40L após ativação.

Utilizando PBMC de 29 pacientes com CVID e 21 indivíduos controle para o estudo cinético da expressão de moléculas de superfície associados com a ativação de células T, ou com interação entre células T e B, observamos em todos os tempos experimentais testados (24, 48 e 72 horas após ativação) que os linfócitos T de pacientes com CVID demonstraram menor expressão de CD25 (figura 3A), CD69 (figura 3B) e CD70 (figura

3C), quando comparados com a expressão destas moléculas na superfície dos linfócitos de indivíduos normais. Este mesmo achado foi observado para a expressão de CD40L no grupo de pacientes com CVID, sendo observada novamente uma diferença estatística significativa na comparação entre os grupos conforme apresentado na figura 4 ($p<0,0001$). Para a análise estatística desses resultados procedeu-se a utilização dos testes ANOVA, Kruskal-Wallis (H) e Mann-Whitney.

Figura 3A - O estudo cinético de CD25 em células CD3CD4 demonstrou diminuição na expressão desta molécula em todos os tempos experimentais para o grupo de pacientes com CVID. PBMC foram estimuladas durante 24, 48, 72 e 96 horas com PHA e as células foram coletadas nos respectivos tempos experimentais para a caracterização de CD25 em células CD3CD4. A análise estatística demonstrou diminuição estatisticamente significativa para a expressão desta molécula em todos os tempos experimentais no grupo de pacientes com CVID

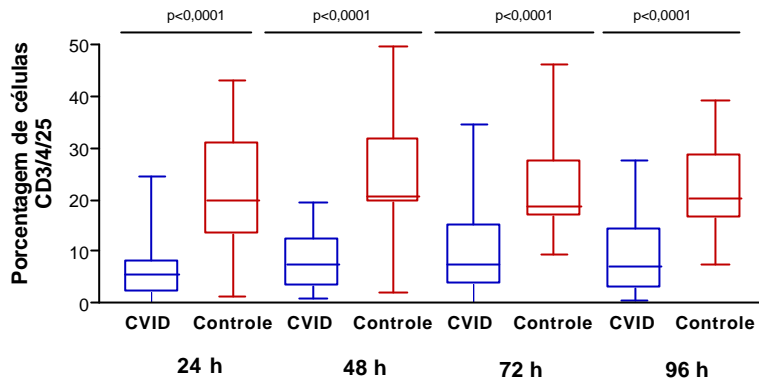


Figura 3B - O estudo cinético de CD69 em células CD3CD4 demonstrou diminuição na expressão desta molécula em todos os tempos experimentais para o grupo de pacientes com CVID. PBMC foram estimuladas durante 24, 48, 72 e 96 horas com PHA e as células foram coletadas nos respectivos tempos experimentais para a caracterização de CD69 em células CD3CD4. A análise estatística demonstrou diminuição estatisticamente significativa para a expressão desta molécula em todos os tempos experimentais no grupo de pacientes com CVID.

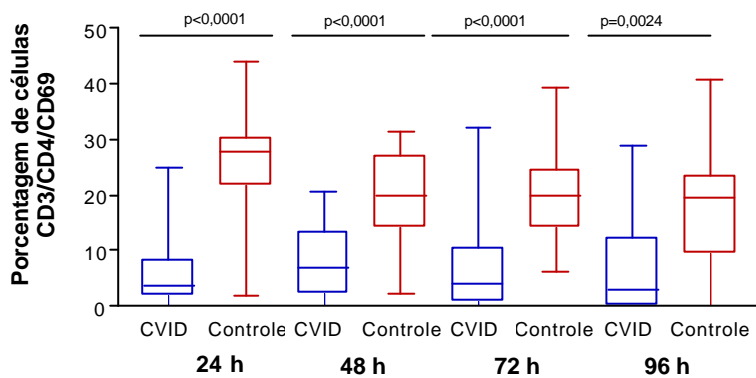


Figura 3C - O estudo cinético de CD70 em PBMC demonstrou diminuição na expressão desta molécula em todos os tempos experimentais para o grupo de pacientes com CVID. PBMC foram estimuladas durante 24, 48, 72 e 96 horas com PHA e as células foram coletadas nos respectivos tempos experimentais para a caracterização de CD70. A análise estatística demonstrou diminuição estatisticamente significativa para a expressão desta molécula em todos os tempos experimentais no grupo de pacientes com CVID.

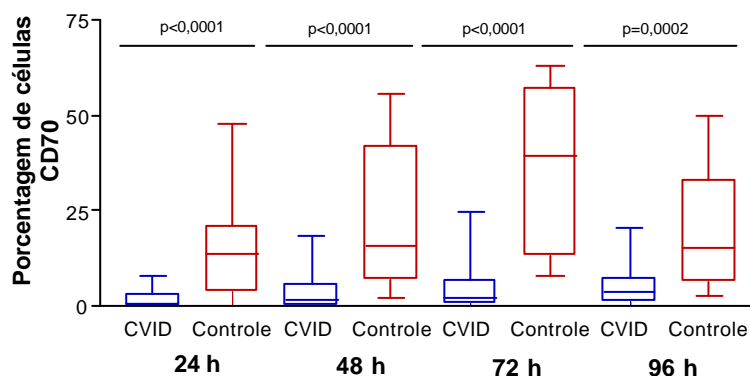
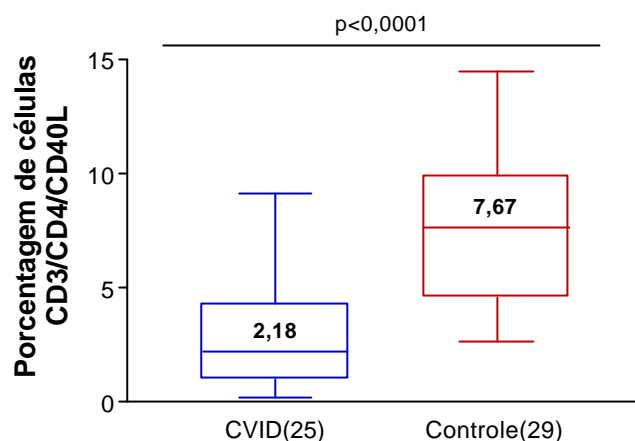


Figura 4 - Células T ativadas de pacientes com CVID (N=25) apresentaram menor expressão de CD40L. PBMC foram isoladas de pacientes com CVID e indivíduos saudáveis (N=29), estimuladas com PHA durante 24 horas e marcadas com anticorpos anti-CD3+anti-CD4+anti-CD40L. Os linfócitos T de pacientes com CVID apresentaram menor expressão de CD40L, cujos valores das medianas encontram-se expressos para cada grupo, demonstrando a presença de diferença estatística significativa ($p < 0,0001$).



3-Fenotipagem de PBMC

Uma vez que os experimentos *in vitro* demonstraram no grupo de pacientes com CVID diminuição significativa na expressão de marcadores moleculares de ativação e interação celular, fenômenos responsáveis pela maior expansão clonal e desempenho das funções efetoras das células T, decidimos verificar a presença de possível redução no número de linfócitos no sangue periférico desses pacientes. Dessa forma, foi constatada uma diminuição percentual do número de células

T CD3 ($p < 0,005$) (figura 5), CD3/CD4 ($p < 0,0001$) (figura 6), da proporção de células CD3/CD4:CD3/CD8 ($p < 0,0001$) (figura 7), células virgens (CD45RA) ($p < 0,0001$) (figura 8), de memória (CD45R0) ($p < 0,0001$) (figura 9), e células B ($p < 0,0001$) (figura 10) no grupo de pacientes com CVID. Para a análise estatística dos resultados obtidos, foi utilizado a prova de Mann-Whitney para a correlação entre o grupo de pacientes com CVID e o grupo controle.

Figura 5 - O grupo de pacientes com CVID (N=32) apresentou diminuição percentual de células CD3 obtidas a partir de sangue periférico. PBMC obtidas de pacientes com CVID e de indivíduos saudáveis (N=32) foram marcadas com anticorpo anti-CD3, o que demonstrou menor quantidade destas células no grupo de pacientes com CVID. A comparação entre os dois grupos demonstrou diferença estatística significativa ($p < 0,005$).

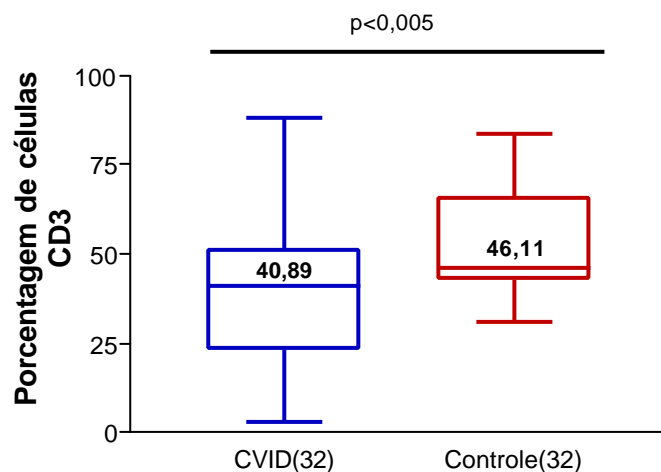


Figura 6 - O grupo de pacientes com CVID (N=32) apresentou diminuição percentual de células CD3CD4 obtidas a partir de sangue periférico. PBMC obtidas de pacientes com CVID e de indivíduos saudáveis (N=32) foram marcadas com anticorpo anti-CD3 e anti-CD4, o que demonstrou menor quantidade destas células no grupo de pacientes com CVID. A comparação entre os dois grupos demonstrou diferença estatística significativa ($p < 0,0001$).

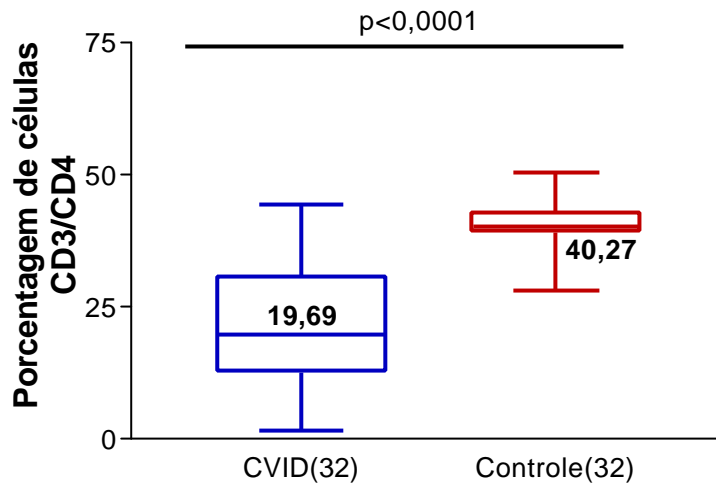


Figura 7 - O grupo de pacientes com CVID (N=32) demonstrou diminuição na comparação entre as proporções de células CD3CD4/CD3CD8. Após marcação das PBMC dos indivíduos com CVID e o grupo controle (N=32) com anticorpos antiCD3+anti-CD4 ou anti-CD8, observou-se que o grupo de pacientes com CVID apresentou diminuição da proporção de células CD3CD4/CD3/CD8. Os valores acima descritos correspondem as medianas de cada grupo e a análise estatística demonstrou diferença significativa ($p < 0,0001$).

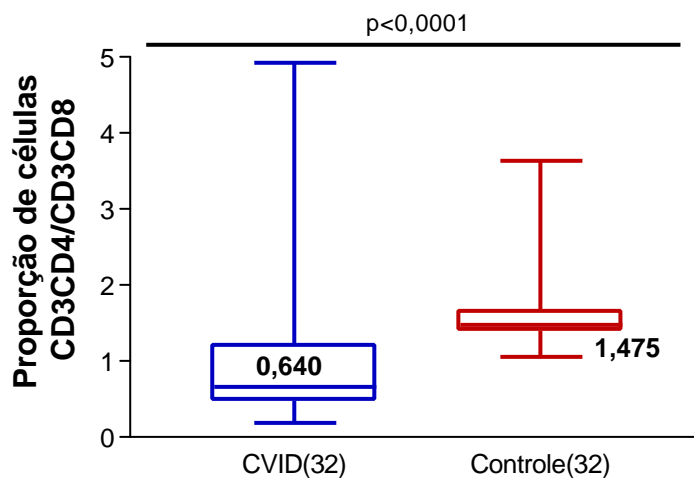


Figura 8 - O grupo de pacientes com CVID (N=32) apresentou diminuição percentual do número de células T *naive*. PBMC obtidas de pacientes com CVID e de indivíduos saudáveis (N=32) foram marcadas com anticorpo anti-CD3+anti-CD4+anti-CD45RA, o que demonstrou menor quantidade de células T CD45RA no grupo de pacientes com CVID. Os valores acima descritos correspondem as medianas de cada grupo e a análise estatística demonstrou diferença significativa ($p<0,0001$).

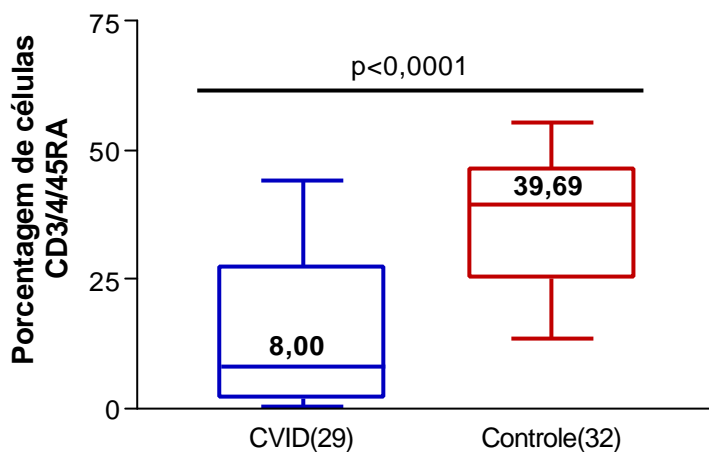


Figura 9 - O grupo de pacientes com CVID (N=19) apresentou diminuição percentual do número de células T de memória. PBMC obtidas de pacientes com CVID e de indivíduos saudáveis (N=32) foram marcadas com anticorpo anti-CD3 +anti-CD4+anti-CD45RO, o que demonstrou menor quantidade de células T CD45RO no grupo de pacientes com CVID. Os valores acima descritos correspondem as medianas de cada grupo e a análise estatística demonstrou diferença significativa ($p<0,0001$).

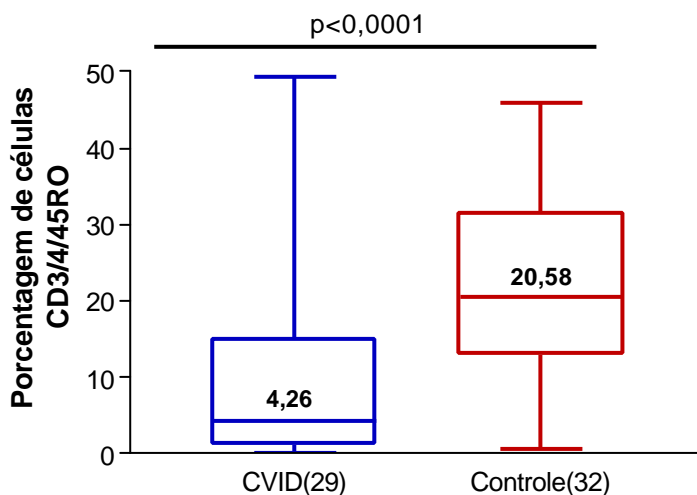
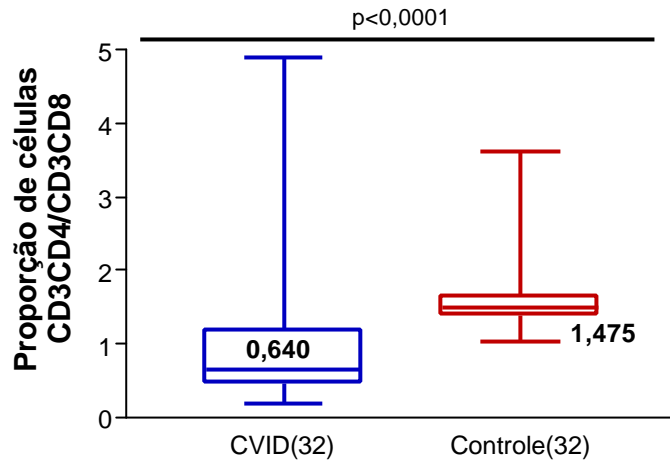


Figura 10 - O grupo de pacientes com CVID (N=32) demonstrou diminuição percentual na contagem de células B. PBMC obtidas de pacientes com CVID e de indivíduos saudios (N=32) foram marcadas com anticorpo anti-CD19, o que demonstrou menor quantidade de células B no grupo de pacientes com CVID. Os valores acima descritos correspondem as medianas de cada grupo e a análise estatística demonstrou diferença significativa ($p < 0,0001$).

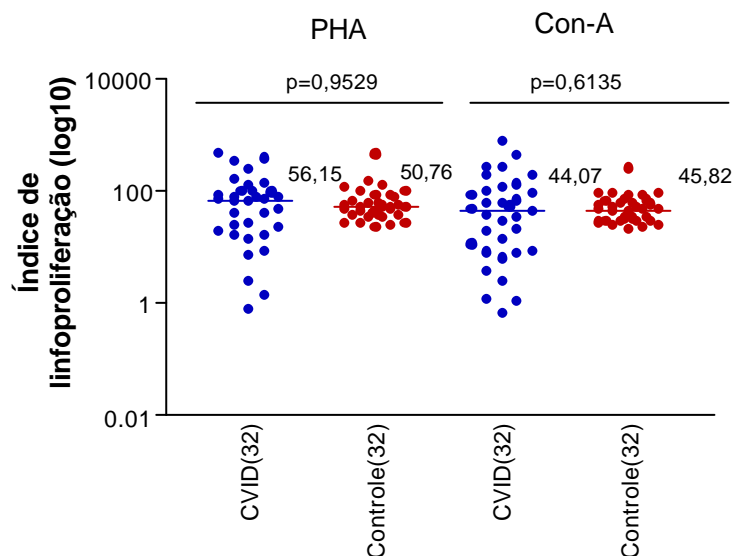


4-Linfoproliferação

A despeito da diminuição relativa e absoluta de diversas populações linfocitárias descritas acima, a resposta linfoproliferativa frente ao estímulo policlonal, representada pelo índice de estimulação (IE), não apresentou diferença estatística na comparação entre os grupos de pacientes com

CVID e o grupo controle ($p=0,9529$ para PHA e $p=0,6135$ para Con-A) (figura 11). Para a análise estatística dos resultados obtidos, foi utilizada a prova de Mann-Whitney para a comparação entre o grupo de pacientes com CVID e o grupo controle.

Figura 11 - O estudo da resposta linfoproliferativa para mitógenos não demonstrou diferença entre o grupo de pacientes com CVID (N=32) e grupo controle (N=32). PBMC foram estimuladas com PHA ou Con-A durante 48 horas, 16 horas antes da finalização do tempo de cultura, as células foram coletadas e a radioatividade mensurada através de cintilação em aparelho contador de radiação beta. Os valores acima descritos correspondem as medianas de cada grupo e a análise estatística não demonstrou diferença significativa.



5-Dosagem de citocinas por ELISA

As citocinas estudadas não mostraram diferenças significantes entre o grupo de pacientes e grupo controle. Entretanto, pudemos observar menor produção de IL-4 ($p < 0,05$) (figura 12), IL-

5 ($p < 0,05$) (figura 13) pelo grupo de pacientes com CVID. Das citocinas cujos níveis produzidos após estimulação não diferiam entre os grupos cabe ressaltar a IL-2 ($p = 0,1484$) (figura 14).

Figura 12 - A produção de IL-4 foi inferior pelo grupo de pacientes com CVID (N=32) em relação aos controles (N=32). PBMC foram estimuladas durante 48 horas com PHA e os sobrenadantes foram coletados para dosagem de IL-4 por ELISA. Os valores acima descritos correspondem as medianas de cada grupo e a análise estatística demonstrou a presença de diferença significativa ($p < 0,05$).

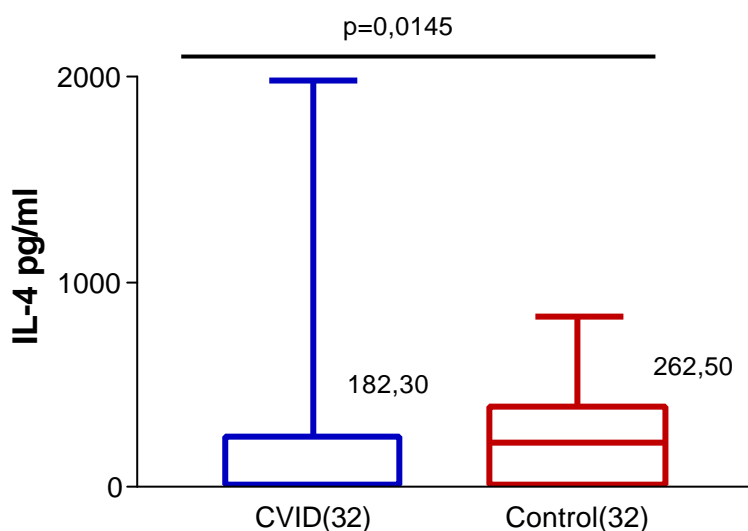


Figura 13 - A produção de IL-5 foi inferior pelo grupo de pacientes com CVID (N=32) em comparação aos controles (N=32). PBMC foram estimuladas durante 48 horas com PHA e os sobrenadantes foram coletados para dosagem de IL-5 por ELISA. Os valores acima descritos correspondem as medianas de cada grupo e a análise estatística demonstrou a presença de diferença significativa ($p < 0,05$).

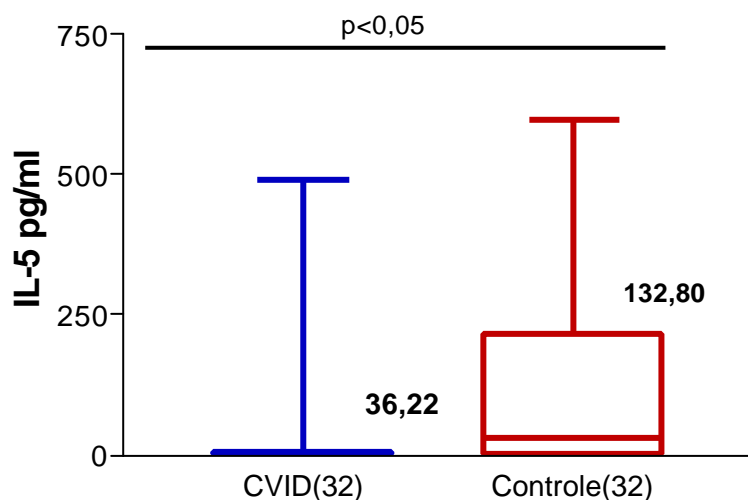
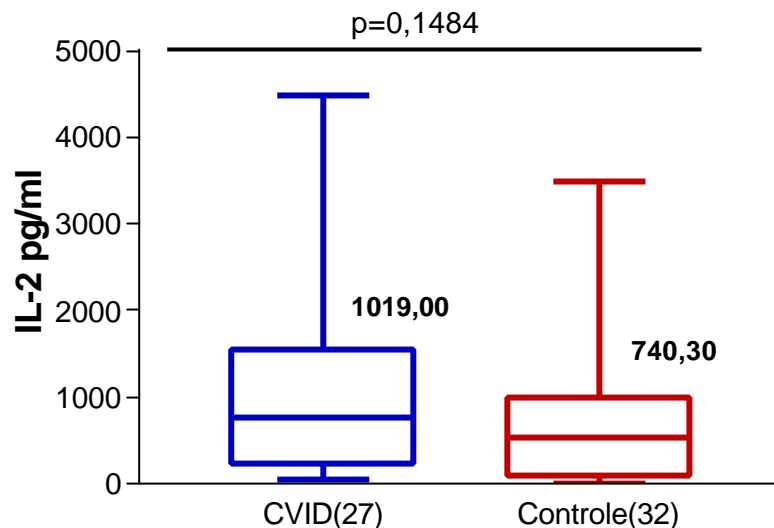


Figura 14 - A produção de IL-2 foi semelhante entre o grupo de pacientes com CVID (N=27) e grupo controle (N=32). PBMC foram estimuladas durante 24 horas com PHA e os sobrenadantes foram coletados para dosagem de IL-2 por ELISA. Os valores acima descritos correspondem às medianas de cada grupo e a análise estatística não demonstrou diferença significativa ($p=0,1484$).



Discussão

Determinamos neste estudo que linfócitos T de pacientes com CVID apresentaram maior taxa de morte por ativação, acompanhada de menor expressão de moléculas de ativação como CD25, CD69 e de interação entre células T e B, como CD40L e CD70. Uma vez que o reconhecimento de antígenos e a presença de sinais co-estimulatórios promovidos por estas moléculas favorecem a ativação das células T que passam a realizar expansão clonal, diferenciação e desempenho de suas funções efetoras, a ausência destes sinais pode comprometer a secreção de citocinas, proliferação de células T e B, o que poderia contribuir para o quadro de linfopenia e prejuízo na síntese de imunoglobulinas por estes pacientes.

Observamos em nosso estudo que o grupo de pacientes com CVID apresentou maior taxa de morte por ativação em relação ao grupo controle, sugerindo que a constante estimulação antigênica de linfócitos T ativados pode promover a morte de células T ativadas por apoptose. Uma vez que estas células foram capazes, na maioria dos pacientes, de proliferar e gerar IL-2 na presença de mitógeno, isto demonstra que estas células são capazes de sofrer ativação, o que vai contra nos-

so resultados obtidos em estudo cinético de ativação linfocitária e expressão das moléculas CD25, CD69, CD70 e CD40L.

A despeito da importância da capacidade linfoproliferativa como parâmetro de atividade imunológica, esta medida é incapaz de oferecer informações funcionais sobre os linfócitos ativados. Desta forma decidimos determinar os tipos e a quantidade de citocinas produzidas após estimulação policlonal em ambos os grupos, o que demonstrou um déficit na produção de citocinas do padrão Th2 (IL-4, IL-5), mas não Th1 (IL-2) no grupo de pacientes com CVID. Uma vez que altas concentrações de IL-2 favorecem a expressão de FasL sobre as células T estimuladas por antígeno, que ao interagirem com Fas induzem o processo apoptótico, isto sustenta a idéia de morte por ativação das células T de pacientes com CVID. Nossos resultados também podem ser reforçados por outras observações descritas em literatura que afirmam que este fenômeno pode ser reproduzido *in vitro* pela exposição a mitógenos, ou *in vivo* através dos superantígenos¹⁰. Como pacientes com síndromes de imunodeficiência acompanhada de hipogamaglobulinemia possuem risco aumentado de desenvolverem infecções recorrentes gastrointestinais e respiratórias por *Streptococcus*

pneumoniae, *Hemophilus influenza* ou *Mycoplasma pneumoniae*^{4,5}, todos estes agentes portadores de superantígenos, não seria surpreendente que este fenômeno pudesse ocorrer em pacientes com CVID e contribuir para o surgimento de defeitos celulares observados em alguns deles.

O grupo constituído por pacientes com CVID demonstrou diminuição percentual dos linfócitos T CD3 e CD3CD4 acompanhada da redução de outras subpopulações linfocitárias como CD45RA e CD45RO, fator contribuinte para alteração da relação CD3CD4/CD3CD8 observada nestes mesmos pacientes. Como as células T são importantes para a expansão clonal de células B e síntese de anticorpos, a morte de células T ativadas poderia contribuir para a linfopenia de células B e síntese de anticorpos. Uma vez que esses fenômenos *in vitro* poderiam se estender *in vivo*, esta seria uma das explicações para a redução do número de linfócitos no sangue periférico observado nesses pacientes e relatado também na literatura^{18,19} e descrito nesse trabalho, pela menor porcentagem de linfócitos T e B circulantes no sangue periférico de pacientes com CVID.

Tais observações nos parecem relevantes por indicar a possível existência de depleção seletiva de linfócitos ativados por antígenos, por mecanismo apoptótico. Hipoteticamente, é possível que a morte celular por ativação seja induzida pela estimulação repetida por antígenos amplamente disseminados apresentados por APC, uma vez que pacientes com CVID apresentam infecções de caráter agudo, crônico ou de repetição. Iniciado o processo de ativação e estimulação repetitiva de células T, a morte por ativação de células T seria uma consequência fatídica, o que levaria a ausência de estimulação das células B pelas células T, seja dependente de interações cognatas pelo contato célula a célula, ou não cognatas dependentes de fatores solúveis, o que explicaria em parte a hipogamaglobulinemia.

O acompanhamento de mais de setenta pacientes brasileiros com CVID nos últimos dez anos nos permitiu estabelecer que estes indivíduos se comportam, em sua maioria, como um subgrupo de pacientes descritos em países do hemisfério Norte que apresentam associação entre os defeitos na imunidade humoral (hipogamaglobulinemia) e defeitos de imunidade celular. Este fato pode ser o resultado de diferenças na quantidade

e qualidade dos patógenos aos quais nossos pacientes estão expostos, ou em diferenças na resposta ao tratamento, uma vez que a terapia de reposição endovenosa de imunoglobulinas se faz, em grande parte, com imunoglobulinas oriundas da Europa ou dos Estados Unidos e conseqüentemente com um conteúdo de paratopos diferentes dos que se esperariam para a população brasileira, ou ainda, por diferenças genéticas.

Esses fenômenos relacionados reforçam a hipótese que a CVID seja uma enfermidade classificada em dois subgrupos, um com disfunção predominantemente humoral (hipogamaglobulinemia) e outro acompanhado de um déficit celular¹⁷, conforme observado nos pacientes atendidos pelo Serviço de Alergia e Imunologia Clínica do Hospital das Clínicas da FMUSP. Isto nos leva a supor que, em alguns pacientes, as alterações na resposta celular podem ser consequência do aumento na morte de células T ativadas, o que implicaria em menor expressão de moléculas de ativação e de CD40L, síntese prejudicada de citocinas Th2, decréscimo do número de células T e B circulantes, com conseqüente prejuízo da resposta celular e mediada por anticorpos. Portanto, o estudo dos mecanismos que controlam o aparecimento destas anormalidades contribuirá para o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos para o tratamento dessa enfermidade, assim como oferecerá parâmetros objetivos que podem ser avaliados para determinar os fatores responsáveis pelas diferenças de comportamento observadas entre os nossos pacientes e outros grupos de pacientes com CVID descritos em países do hemisfério Norte.

Referências bibliográficas

1. Vasconcelos DM, Duarte AJS. Imunodeficiência comum variável (hipogamaglobulinemia de início tardio ou hipogamaglobulinemia adquirida): breve revisão. Rev. bras. alerg. imunopatol. 1989;12: 147-157.
2. Duarte AJ da S, Vasconcelos DM, Sato MN, Sales JMF, Yamaguchi NH, Brígido LFM *et al.* Imunodeficiência Comum Variável (hipogamaglobulinemia de início tardio ou hipogamaglobulinemia adquirida): seguimento inicial de 11 casos. Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo 1990;45:91-94.
3. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Clinical and Immunologic analyses of 103 patients with com-

- mon variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1989;9:22-33.
4. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *J Clin Immunol* 1999;92:34-48.
 5. Webster ADB. Common variable immunodeficiency. *Humoral Immunodeficiencies. Immunol., Allergy Clin North America* 2001;21:1-22.
 6. Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama A *et al.* The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with Xlinked hyper-IgM syndrome. *Cell* 1993;72:291-300.
 7. Zhu Q, Zhang M, Raelings DR, Vihinen M, Hagemann T, Saffran DC *et al.* Deletion within the Src homology domain 3 of Bruton's tyrosine kinase resulting in X-linked agammaglobulinemia (XLA). *J Exp Med* 1994;180: 461-70.
 8. Purtilo DT, Yang JPS, Cassel CK, Harper R, Stephenson SR, Landing BH *et al.* X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1975;1:935-40.
 9. Cunningham-Rundles C, Siegal FP, Cunningham-Rundles S, Lieberman P. Incidence of cancer in 98 patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1987;7:294-99.
 10. Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 1998;8:615-623.
 11. Spickett GP, Farrant ME, North ME, Zhang J, Morgan L, Webster AD. Common variable immunodeficiency: how many diseases? *Immunol. Today* 1997;18:325-328.
 12. Farrington M, Grosmaire LS, Nonoyama S, Fischer SH, Hollenbaugh D, Ledbetter JA *et al.* CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1994;91:1099-103.
 13. Zhou Z, Huang R, Danon M, Mayer L, Cunningham-Rundles C. IL-10 production in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;86:298-304.
 14. North ME, Webster ADB, Farrant J. Primary defect in CD8⁺ lymphocytes in the antibody deficiency disease (common variable immunodeficiency): abnormalities in intracellular production of interferon-gamma (IFN- γ) in CD28⁺ ("citotoxic") and CD28⁻ ("suppressor") CD8⁺ subsets. *Clin. Exp Immunol* 1998;111:70-75.
 15. Report of an IUIS Committee. Primary Immunodeficiency Diseases. *Clin Exp Immunol* 1999;118: Supplement, 1-28.
 16. WHO Scientific Group. Primary immunodeficiency diseases: report of a WHO scientific group. *Clin Exp Immunol* 1997;99:1-124.
 17. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic Criteria for the Primary Immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol* 1999;93: 190-197.
 18. Iglesias J, Matamoros N, Raga S, Ferrer JM, Mila J. CD95 expression and function on lymphocyte subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID); related to increase apoptosis. *Clin Exp Immunol* 1999;117:138-146.
 19. Rosen, FS, Wedgwood RJP, Eibl MM, Fischer A, Aiuti F, Notarangelo L. *et al.* Primary immunodeficiency diseases. Report of a WHO scientific group. *Clin. Exp. Immunol* 1997;109:1-28.

Agências Financiadoras: FAPESP e MCT (Programa Institutos do Milênio)

Endereço para correspondência

Luiz Vicente Rizzo

Av. Prof. Lineu Prestes, 1730

Lab. Imunologia Clínica

Dept. Imunologia, ICB- USP

05508-900 São Paulo - SP

Tel.: 0XX-11-3091.7430

Fax: 0XX-11-3091.7394

E-mail: lvrizzo@icb.usp.br