

PATRÍCIA CRISTINA GOMES PINTO

**AVALIAÇÃO DA QUIMIOTAXIA E DA VIA DE SINALIZAÇÃO MAPK
P38 ATIVADA POR RECEPTORES *TOLL-LIKE* 2 E 4 EM NEUTRÓFILOS DE
PACIENTES PORTADORES DE IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2014

PATRÍCIA CRISTINA GOMES PINTO

**AVALIAÇÃO DA QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS E DA VIA DE
SINALIZAÇÃO MAPK P38 ATIVADA POR TLR2 E TLR4 EM PACIENTES
PORTADORES DE IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do
Adolescente, da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito à obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Andrade Pinto

Co-orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Melo de
Andrade

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora

Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof^a. Adelina Martha dos Reis

Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Humberto José Alves

Coordenadora do Centro de Pós-Graduação

Prof^a. Sandhi Maria Barreto

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação

Prof^a. Ana Cristina Côrtes Gama

Chefe do Departamento de Pediatria

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/ Saúde da Criança e do Adolescente

Prof^a. Ana Cristina Simões e Silva

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/ Saúde da Criança e do Adolescente

Prof. Eduardo Araújo Oliveira

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/ Saúde da

Criança e do Adolescente

Alexandre Rodrigues Ferreira – Titular

Débora Márques de Miranda - Suplente

Ana Cristina Simões e Silva -Titular

Benigna Maria de Oliveira - Suplente

Eduardo Araújo de Oliveira -Titular

Sérgio Veloso Brant Pinheiro - Suplente

Ivani Novato Silva –Titular

Juliana Gurgel - Suplente

Jorge Andrade Pinto – Titular

Helena Maria Gonçalves Becker - Suplente

Marcos José Burle de Aguiar –Titular

Roberta Maia de Castro Romanelli - Suplente

Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana –Titular

Cláudia Regina Lindgren - Suplente

Suelen Rosa de Oliveira – Discente Titular

Izabel Vasconcelos Barros Poggiali – Discente Suplente

Agradecimientos

Agradecimentos

Ao professor Jorge Andrade Pinto pelas orientações sempre oportunas, críticas, inteligentes e criativas. Minha admiração pelo exemplo profissional e meu profundo agradecimento pelo aprendizado e acolhimento durante todo o período da realização da tese.

Ao professor Marcus Vinícius Melo de Andrade pela excelente oportunidade de poder trabalhar no laboratório Lineu Freire-Maia da Faculdade de Medicina da UFMG, onde eu pude aprender muito.

Ao Sérgio de Assis Batista que me ajudou quando precisei aprender na prática diária. Obrigada por ter me estendido a mão nos momentos mais difíceis, sempre com tranquilidade, firmeza e segurança. Não deixarei de lembrar da sua atitude nos momentos em que outros precisarem de mim como precisei de você.

A Juliana Beatriz do Santos Nunes pela grandiosa colaboração na parte clínica deste projeto, ajudando na seleção dos pacientes e sempre solucionando minhas dúvidas.

À Flavia Ribeiro Vargas pelos ensinamentos sobre a técnica da quimiotaxia antes da sua mudança para o Canadá.

Aos membros da equipe do Serviço de Imunologia, principalmente aquelas pessoas que estiveram presentes no dia-a-dia desta pesquisa colaborando e torcendo por mim: Luciana Cunha, Juliana Nunes, Fernanda Minafra, Sílvia Andrade, Marta, Thiago e Talita. Acrescento meu agradecimento pelas orientações profissionais para os cuidados com meus pacientes em Juiz de Fora.

À equipe do CTR-DIP composta de funcionários dispostos a ajudar e com verdadeiro entendimento sobre o sentido da pesquisa. Obrigada pelo acolhimento alegre!

Aos pacientes que participaram deste projeto, o meu desejo de que a ciência, cada vez mais, melhore a qualidade de vida deles.

À amiga Ana Lúcia de Lima Guedes, professora da UFJF, que me ajudou nas substituições no trabalho em Juiz de Fora e que sonhou junto comigo para que tudo isso se realizasse.

À banca da qualificação (professoras Adriana Kakehasi, Ivani Novato e Silvana Elói), pelas orientações esclarecedoras e pertinentes.

Aos funcionários Jeferson Fonseca e Jerry Camargo pela receptividade e ajuda com as burocracias durante a realização desta pesquisa.

Ao Manoel Cordeiro sempre disposto a ajudar nas coletas de sangue para o projeto.

Aos amigos Oscarina Ezequiel, José Murillo Neto e Abrahão Elias Hallak Neto, professores da UFJF, pelo incentivo de sempre.

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

A UFJF pela concessão da bolsa PROQUALI durante um período da pós-graduação.

A Vanuza Chagas pela ajuda na seleção do material do projeto e o auxílio no preparo das soluções.

Dedicatória

Dedico sempre aos meus amores

Aquiles, Maria, Marcel, Alessandra, Paula, Paulo, João Pedro

e a meus tios Luiz Carlos (in memorian) e Maurícia

Sumário

SUMÁRIO

Lista de siglas, símbolos e abreviaturas-----	01
Lista de Figuras-----	05
Lista de Tabelas-----	07
1. INTRODUÇÃO-----	09
2. REVISAO DA LITERATURA-----	14
2.1.Imunodeficiência comum variável (ICV)-----	15
2.2.Imunidade inata-----	20
2.2.1. Quimiotaxia de neutrófilos-----	21
2.2.2. Sinalização celular: neutrófilos e <i>toll-like receptors</i> (TLRs)-----	28
3. JUSTIFICATIVA-----	36
4. OBJETIVOS-----	38
4.1. Objetivo geral-----	39
4.2. Objetivos específicos-----	39
5. METODOLOGIA-----	40
5.1. Delineamento do estudo-----	41
5.2. Conceitos operacionais-----	41
5.3. Detalhamento populacional-----	42
5.3.1. Pacientes-----	42
5.3.2. Controles-----	47
5.4. Critérios de inclusão-----	49
5.4.1. Para pacientes e controles participantes do estudo da quimiotaxia-----	49
5.4.2. Para pacientes e controles participantes do estudo da sinalização celular-----	49
5.5. Critérios de exclusão-----	51
5.6. Atividades laboratoriais-----	51
5.6.1. Coleta da amostra-----	51
5.6.2. Separação de neutrófilos-----	52

5.6.3. Quimiotaxia de neutrófilos-----	53
5.6.3.1. Padronização do ensaio de quimiotaxia-----	53
5.6.3.2. Avaliação da quimiotaxia de neutrófilos em pacientes e controles-----	56
5.6.4. Avaliação da sinalização de TLRs em neutrófilos-----	57
5.6.4.1. Incubação dos neutrófilos com estímulo-----	57
5.6.4.2. Dosagem de proteínas-----	58
5.6.4.3. <i>Western blot</i> -----	59
5.7. Análise estatística-----	60
5.8. Considerações éticas-----	61
5.9. Referências bibliográficas-----	61
6. ARTIGO-----	76
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS-----	112
8. ANEXOS-----	114
8.1. Protocolo de pesquisa-----	115
8.2. TCLE-----	118
8.2.1. TCLE do adulto-----	118
8.2.2. TCLE dos pais/responsáveis-----	122
8.2.3. TCLE do adolescente-----	126
8.3. Preparo de soluções-----	130
8.4. Dados populacionais, classificação fenotípica e IQ dos pacientes portadores de ICV selecionados para o estudo da sinalização celular -----	133
8.5. Dados populacionais e IQ dos controles selecionados para o estudo da sinalização celular-----	133

Listas de siglas, símbolos e abreviaturas

µg: microgramas

µl: microlitros

µm: micrômetro

AP-1 (*activator protein 1*)

BAFF-R (*B cell-activating factor receptor*)

BSA (*bovine serum albumin*)

C5a: componente do complemento 5a

CD14 (*cluster of differentiation 14*)

CD19 (*cluster of differentiation 19*)

CD2 (*cluster of differentiation 2*)

CD4 (*cluster of differentiation 4*)

CD8 (*cluster of differentiation 4*)

CD40 (*cluster of differentiation 40*)

COEP-UFMG: Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

CO₂: dióxido de carbono

CPL (*cecal ligation and puncture*)

CTR-DIP: Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias

EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

ESID (*European Society for Immunodeficiencies*)

f-MLP: N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina

G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*)

GPCR (*G protein-coupled receptor*)

HC-UFMG: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

HIV (*human immunodeficiency vírus*)

HPV (*human papiloma virus*)

HTLV (*human T lymphotropic virus*)

ICAM-1(*intercellular adhesion molecule 1*)

ICOS (*inducible costimulator*)

ICV: imunodeficiência comum variável

IDP: imunodeficiência primária

IFN β (*interferon β*)

IgA: imunoglobulina A

IgE: imunoglobulina E

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

IL12: interleucina 12

IL2: interleucina 2

IL8: interleucina 8

IRAK (*IL-1 receptor- associated kinase*)

LPS: lipopolissacarídeo

L-selectina: selectina de leucócitos

LTB4: leucotrieno B4

Mac-1(*macrophage-1 antigen*)

MAL (*MyD88 adaptor-like*)

MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)

MAPK ERK (*MAPK extracellular signal regulated*)

MAPK JNK (MAPK – c-Jun amino(N)- terminal)

MAPK P38: proteína quinase ativada por mitógeno - p38

MD-2 (*myeloid differentiation-2*)

mg/dia: miligramas por dia

mg/dl: miligramas por decilitro

ml: mililitros

mM: milimolar

Msh5 (*mut S protein homolog 5*)

MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*)

NET (*neutrophilic extracellular traps*)

NFkB (*nuclear factor kappa B*)

nM: nanomolar

P3C: Pam3cys=(S)-(2,3-bis (palmitoyloxy)-(2RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser(S)-Lys₄-OH trihydrochloride – lipopeptide tripalmitoyl-S-glycerylcysteine

PAF (*platelet-activating factor*)

PAGID (*Panamerican Group for Immunodeficiency*)

PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*)

PBS (*phosphate buffer saline*)

pM: picomolar

PRR (*pattern recognition receptor*)

PTEN (*phosphatase and tensin homolog*)

RPM: rotações por minuto

RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)

RRP: receptores de reconhecimento padrão

SCH: síndrome de Chediak-Hiagashi

SFB: soro fetal bovino

TACI (*transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor*)

TBS-T: Tampão Tris-salina - com tween

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TH2: (*T helper lymphocyte type 2*)

TICAM1 (*TIR domain – containing adaptor molecule*)

TIR (*Toll-interleukin 1 receptor*)

TIRAM (*TRIF-related adaptor molecule*)

TLR (*Toll-like receptors*)

TNF α : *tumoral necrosis factor α*

TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*)

TRIF (*TIR-domain containing adaptor inducing interferon beta*)

VCAM-1 (*vascular cell adhesion protein 1*)

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da quimiotaxia de neutrófilo-----	24
Figura 2. Representação esquemática da família de TLRs e seus PAMPs----- -----	30
Figura 3. Representação esquemática da sinalização de TLRs suas moléculas adaptadoras com ativação da via AP-1 pela MAPK p38-----	32
Figura 4. Fluxograma da seleção dos pacientes incluídos no estudo-----	44
Figura 5. Montagem da câmara AP 48-----	55
Figura 6. Representação gráfica da curva dose-efeito do número de neutrófilos migrados por campo-----	56
Figura 7. Tempos e estímulos para TLR2 e TLR4 nos neutrófilos-----	58

Lista de Figuras do artigo

Figura 1. Quimiotaxia de neutrófilos dos grupos controle e de pacientes portadores de ICV em resposta ao RPMI e ao estímulo com o f-MLP-----	91
Figura 2. Índice quimiotático (IQ) apresentado pelo grupo controle e de pacientes portadores de ICV em resposta ao RPMI e ao estímulo com a f-MLP-----	92
Figura 3. Dispersão dos valores dos índices quimiotáticos dos 38 pacientes portadores de ICV e 19 controles saudáveis -----	93

Figura 4. Diferença entre a migração de neutrófilos/campo frente ao f-MLP e a migração de neutrófilos/campo frente ao RPMI apresentada pelos grupos controle e de pacientes portadores de ICV-----94

Figura 5. Análise densitométrica da intensidade da banda da proteína MAPK p38 no ensaio de *Western blot* para cada estímulo e tempo-----96

Figura 6. Ativação da MAPK p38 fosforilada e total representada pelas bandas do *Western blot* de controle e paciente portador de ICV-----97

Figura 7. Análise da densitométrica da intensidade da banda da proteína MAPK p38 no ensaio de *western blot* para cada estímulo e tempo, em pacientes portadores de ICV e controles sem a doença-----98

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados populacionais, clínicos e laboratoriais de pacientes portadores de ICV- -----	45
Tabela 2. Valores dos níveis de imunoglobulinas dos 38 pacientes incluídos no estudo-- -----	46
Tabela 3. Características populacionais e dosagens de imunoglobulinas do grupo controle-----	48
Tabela 4. Dados populacionais e classificação fenotípica dos pacientes portadores de ICV selecionados para o estudo da sinalização celular-----	50
Tabela 5. Dados populacionais dos indivíduos controles selecionados para o estudo da sinalização celular-----	50
Tabela 6. Dados da curva padrão para dosagem de proteínas-----	59
Tabela 7. Dados populacionais, classificação fenotípica e IQ dos pacientes portadores de ICV selecionados para o estudo da sinalização celular-----	133
Tabela 8. Dados populacionais e IQ dos controles selecionados para o estudo da sinalização celular -----	133

Lista de Tabelas do artigo

Tabela 1. Dados populacionais, clínicos e laboratoriais de pacientes portadores de ICV-

-----85

Tabela 2. Relação entre IQ e faixa etária, sexo, fenótipo e presença ou não de

bronquiectasia-----95

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Há mais de 100 anos, estudando o sistema imunológico, Ehrlich e Elie Metchnikoff descreveram mecanismo de defesa contra infecções. Paul Ehrlich descreveu a imunidade adaptativa que é a imunidade mediada por anticorpos e Elie Metchnikoff estudou os neutrófilos, células com função crucial na imunidade inata ⁽¹⁾. Hoje, sabe-se que a imunidade adaptativa funciona em conjunto e na dependência da imunidade inata. A imunidade inata precedeu a imunidade adaptativa na filogenética, sendo ela que determina a demanda de instruções para iniciar o funcionamento do sistema imunológico ⁽²⁾.

As imunodeficiências primárias são um grupo heterogêneo de doenças que acometem o sistema imunológico, aumentando a susceptibilidade às infecções. Há relato de anormalidades funcionais de células B, células T e de componentes da imunidade inata, assim como os neutrófilos e os *toll-like receptors* (TLRs) ⁽³⁻⁵⁾.

Dentre as imunodeficiências primárias, destaca-se a imunodeficiência comum variável (ICV) pela sua importante prevalência em todas as faixas etárias. Pacientes portadores de ICV são frequentemente acometidos por infecções recorrentes que é um dos fenótipos desta doença ^(6, 7). Além disso, estes pacientes podem apresentar complicações, as quais são descritas como outros quatro fenótipos desta imunodeficiência primária: autoimunidade, infiltração linfocítica policlonal, malignidade e enteropatia ⁽⁸⁾.

Há necessidade de melhor entendimento sobre a fisiopatologia da ICV, objetivando-se facilitar o diagnóstico e melhorar a intervenção terapêutica e a qualidade de vida dos pacientes portadores desta doença. Em se tratando de uma imunodeficiência classificada dentro do sistema humoral com defeitos predominantes de células B, muito

pouco se conhece sobre as alterações da imunidade inata em pacientes com ICV, principalmente no que se refere à ação de uma célula tão representativa neste contexto que são os neutrófilos. Sabe-se que a quimiotaxia de neutrófilos, migração celular em direção⁽⁹⁾ a quimioatrativos, para os locais de injúria infecciosa é um dos mecanismos cruciais da resposta imunológica inata, sendo extremamente importante para o controle local do crescimento bacteriano e, conseqüentemente, para a prevenção da disseminação das bactérias patogênicas⁽¹⁰⁾.

Anormalidades na população de neutrófilos e na sua resposta aos quimioatrativos têm sido verificadas em várias doenças inflamatórias, infecções, neoplasias e em doenças relacionadas à autoimunidade⁽¹¹⁻¹⁵⁾. Há estudos na literatura que verificaram defeitos na quimiotaxia de neutrófilos em pacientes portadores de imunodeficiências primária como naqueles portadores de deficiência de IgA, agamaglobulinemia, imunodeficiência combinada grave, síndrome da hiperimmunoglobulina E, síndrome de Chediak-Higashi e em portadores da síndrome de Wiskott-Aldrich que serão descritos posteriormente, na seção de revisão da literatura⁽¹⁶⁻²²⁾.

A sinalização celular é um dos principais mecanismos para a efetividade da imunidade inata, pois receptores intracelulares e extracelulares reconhecem antígenos e transmitem sinais atuando na defesa do organismo. Dentro da categoria de receptores celulares, destacam-se os TLRs que são receptores de reconhecimento padrão (RRP) capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS). Vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de avaliar o papel dos TLRs na função dos neutrófilos. Os neutrófilos humanos expressam os TLRs de 1 a 10, exceto o TLR3^(5, 23-26). Merecem destaque os receptores TLR2 e TLR4 presentes em neutrófilos, os quais são importantes, principalmente, para a sinalização relacionada a bactérias gram-

positivas e gram-negativas, que frequentemente causam infecções recorrentes em pacientes portadores de ICV^(9, 25). O reconhecimento de patógenos pelo TLR facilita a dimerização deste receptor que, através do seu domínio TIR, desencadeia os eventos de sinalização celular. O TLR2 é responsável pelo reconhecimento de uma variedade de patógenos e pode formar dímeros, tornando-se um receptor ativo. O dímero formado entre TLR1/2 reconhece PAMPS de bactérias gram-positivas, incluindo peptidoglicano, lipopeptídeos e ácido lipoteicoico; enquanto que com TLR6 é capaz de reconhecer ácido lipoteicoico e zimosam (polissacarídeo derivado do fungo). O TLR4 pode formar um homodímero e é importante receptor associado ao reconhecimento do LPS (lipopolissacarídeo) presente em bactérias gram-negativas, juntamente com o CD14 (*cluster of differentiation*) e a glicoproteína MD-2 (*myeloid differentiation-2*). O MD-2 confere responsividade do TLR4 ao LPS e o CD14 controla a endocitose do TLR4 induzida pelo LPS. A hipoatividade dos TLRs pode resultar em grande susceptibilidade aos patógenos^(27, 28). Estudos da atuação de TLRs em pacientes portadores de ICV foram realizados, principalmente, em células B e células dendríticas, mas não em neutrófilos^(29, 30).

Estudos mostram que a MAPK p38, uma proteinoquinase ativada via TLRs, é uma das principais vias de sinalização relacionada à quimiotaxia de neutrófilos⁽³¹⁾ e atua através do estímulo à mobilização de neutrófilos dentro do vaso, na transmigração e no direcionamento do neutrófilo⁽³²⁾.

Sabendo-se que já há importante comprometimento de células B e de célula T^(7, 33-36) e diante da importância do entendimento da fisiopatologia da ICV associado ao frequente acometimento destes pacientes por infecções recorrentes, este estudo tem como objetivo avaliar a quimiotaxia do neutrófilo em resposta ao estímulo com o quimioatrativo f-MLP (peptídeo derivado de bactérias) e verificar a via de sinalização

MAPK p38 ativada por TLR2 e TLR4 estimulados com peptidoglicano e LPS, respectivamente, em neutrófilos de pacientes portadores de ICV acompanhados no ambulatório de Imunologia do HC-UFMG, comparando-os com seus controles sem a doença.

Esta tese de doutorado será apresentada sob a formatação regulamentada pelo colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da UFMG, sendo composta por esta introdução, seguindo-se uma revisão da literatura referente à imunidade inata no contexto da quimiotaxia de neutrófilos e sinalização celular e da imunodeficiência comum variável, com posterior descrição da metodologia utilizada e um artigo original com apresentação dos resultados e discussão. Foram descritas as considerações finais e os anexos. As referências bibliográficas estão listadas ao final de cada sessão, dispostas em ordem de citação, seguindo as normas de Vancouver, conforme a recomendação do Programa.

Revisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Imunodeficiência comum variável

A ICV é a mais frequente das imunodeficiências primárias (IDP). Apesar da deficiência de IgA ser a IDP mais comum, a ICV é clinicamente mais relevante. A prevalência de ICV no mundo é de aproximadamente 1: 25.000 pessoas, variando em uma faixa de 1: 10.000 a 1: 50.000 indivíduos⁽³⁷⁾. O início das manifestações clínicas pode ocorrer em qualquer faixa etária, mas tem distribuição bimodal, com picos na primeira década e início da terceira década de vida⁽³⁸⁾. Ambos os sexos são igualmente afetados^(7, 34). Na ICV, os níveis de IgG e IgA estão reduzidos e os de IgM podem se apresentar normais, reduzidos ou aumentados. Pacientes com ICV podem não apresentar anticorpos a antígenos vacinais. A demonstração de ausência de competência imunológica na produção de anticorpos após a exposição ou imunização é considerada uma característica importante da ICV na maioria dos protocolos⁽³⁹⁾. As células B podem se apresentar em número reduzido e, em alguns estudos, há descrição de alterações da imunidade celular^(40, 41). Pode haver um atraso de 4 a 9 anos no tempo entre o início dos sinais e sintomas da ICV e o diagnóstico da doença.^(38, 42, 43)

Cerca de 90% dos casos de ICV ocorre de forma esporádica, embora 10-20% dos indivíduos portadores da doença possam ter outro membro da família acometido, geralmente como herança autossômica dominante.^(8, 44) A ICV pode se apresentar como uma evolução da deficiência de IgA, o que sugere uma base genética para susceptibilidade a estas duas imunodeficiências primárias⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾.

Na fisiopatologia da ICV, ainda pouco conhecida, há redução do número absoluto ou relativo de células TCD4⁺ e aumento de células TCD8⁺ com alteração da relação CD4/CD8⁽⁴⁹⁾. Os pacientes portadores de ICV podem apresentar prejuízo na

produção de IL-2 ou de citocinas de perfil Th2 com disfunção de células T reguladoras⁽⁴⁰⁾. São descritos defeitos em linfócitos B abrangendo receptores envolvidos na diferenciação e na maturação celular, especialmente mutações de CD19, assim como na geração da diversidade de genes, como o BAFF-R, ICOS e TACI^(33, 50-53). A maioria dos pacientes portadores de ICV tem contagem normal de células B no sangue periférico com redução de células de memória clássicas (CD19⁺CD27⁺IgD⁻IgM⁻) e prejuízo na formação de linfócitos B na medula óssea⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾. Várias mutações genéticas e polimorfismos (ICOS, TNFR13B/TACI, TNFR13C/BAFF-R, CD19 e Msh5) envolvidos em algum elemento da biologia dos linfócitos B foram associados à ICV, tendo sido encontrados em apenas 10% dos casos^(36, 44).

Os critérios diagnósticos para ICV de acordo com o European Society for Immunodeficiencies - ESID/ Panamerican Group for Immunodeficiency - PAGID são infecções recorrentes, idade acima de quatro anos, níveis reduzidos de IgG (pelo menos 2 desvios-padrão abaixo da média para a idade), diminuição de mais um isotipo de imunoglobulina (IgA e/ou IgM), exclusão de outras causas bem definidas de hipogamaglobulinemias, ausência de isohemaglutininas e de resposta à vacina⁽⁵⁷⁾. A demonstração de incompetência na produção de anticorpos após exposição ou imunização é considerada uma característica importante para o diagnóstico de ICV na maioria dos protocolos^(6, 57), mas já foi descrito na literatura que pacientes com redução significativa de IgG (<200mg/dl), provavelmente, não são capazes de produzir anticorpos⁽³⁹⁾. Desta forma, em alguns estudos, nem todos os pacientes portadores de ICV foram avaliados em relação à resposta vacinal^(8, 58).

As infecções recorrentes são comuns em pacientes portadores de ICV, principalmente, em seios paranasais, pulmões e trato gastrointestinal⁽⁵⁹⁾. Pacientes portadores de ICV apresentam infecções por bactérias capsuladas como *Staphylococcus*

aureus, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Branhamella catarrhalis*. Além disso, podem apresentar artrite por *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. Entre os agentes infecciosos causadores de diarreia nestes pacientes encontram-se a *Giardia lamblia*, o *Campylobacter enteritis* e os enterovírus ^(4, 38). Bactérias capsuladas, predominantemente, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* representam os agentes mais comumente isolados em pacientes portadores de deficiências primárias de anticorpos, o que reflete o importante papel dos anticorpos na opsonização destes patógenos ⁽⁹⁾. Além das infecções recorrentes ou crônicas, estes pacientes podem apresentar outras enteropatias, doenças autoimunes e incidência aumentada de malignidade. ⁽⁸⁾.

Um registro de pacientes portadores de ICV que teve duração de dez anos (1996 a 2006) foi utilizado para definir cinco fenótipos diferentes do seguinte modo: 1. Sem complicações (apenas infecções), 2. Doença autoimune associada, 3. Presença de infiltração linfocítica policlonal, 4. Com malignidade linfoide e com 5. Enteropatia. Um total de 83% destes pacientes apresentava apenas um dos fenótipos. Diferentes fenótipos foram associados a diferentes tempos de sobrevida. Evidenciou-se que a malignidade linfoide ocorreu mais tarde na progressão da doença e, em geral, em pacientes portadores de infiltração linfocítica policlonal pré-existente. Na maioria das vezes, o fenótipo clínico poderá ser determinado até cinco anos após o início dos sinais e sintomas da ICV, entretanto, o valor prognóstico de cada fenótipo deve ser acompanhado de forma longitudinal ⁽⁸⁾.

As manifestações clínicas selecionadas para caracterizar os diferentes fenótipos clínicos foram as seguintes, segundo Chapel H et al, 2008:

- ausência de complicações: grupo que manifesta apenas infecções recorrentes, sem as complicações referidas a seguir. As principais infecções são pneumonias, sinusites, otites e diarreia. Menos frequentemente, os pacientes podem apresentar hepatites virais, infecção por herpes zoster e giardíase.

- autoimunidade para pacientes que apresentam pelo menos um dos seguintes diagnósticos de doenças autoimunes: artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, espondiloartrites, diabetes mellitus insulino dependente, anemia perniciosa, gastrite atrófica (comprovada por biópsia gástrica), anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia idiopática, eritema nodoso, psoríase. Alguns pacientes podem manifestar estas doenças antes do diagnóstico de ICV.

- infiltração linfocítica policlonal: pacientes que apresentam hepatomegalia e/ou esplénomegalia inexplicadas (comprovada ao exame físico e/ou através de ultrassonografia), linfadenomegalia crônica e granulomas não explicado por outras causas (comprovados por biópsia e localizados no fígado, baço, pele, pulmões, cérebro e linfonodos). Algumas destas manifestações podem estar relacionadas à infecção prévia pelo vírus *Epstein barr*, retrovírus ou herpes vírus 8 ⁽⁶⁰⁾.

- malignidade: pacientes que desenvolvem neoplasias linfoides ou outras formas de cânceres durante a doença. Os pacientes podem apresentar neoplasias hematológicas e tumores sólidos como de mama, próstata, ovário, pele e cólon. As neoplasias mais comuns são o linfoma e o câncer gástrico ^(38, 61, 62). Algumas neoplasias podem estar associadas às infecções prévias por vírus oncogênicos (herpes vírus 2 ou 4, HTLV- 1, HTLV-2 e HPV-6) ⁽⁶¹⁾.

- enteropatia: pacientes portadores de doença inflamatória intestinal e a biópsia revelando infiltração em lâmina própria e mucosa intraepitelial com atrofia de vilosidades. Os pacientes podem apresentar diarreia crônica com síndrome de má

absorção, doença de Crohn, retocolite ulcerativa, doença celíaca e linfangiectasia intestinal ⁽³⁸⁾.

A doença pulmonar associada à ICV tem alta morbidade e mortalidade. Uma importante lesão pulmonar, a bronquiectasia, acomete 37 a 73% dos pacientes, podendo estar associada às infecções graves ^(8, 63, 64).

As características clínicas têm sido associadas a diferentes alterações imunológicas já identificadas como parte da doença conforme a classificação fenotípica ⁽⁵⁸⁾ ⁽⁴⁴⁾. Malignidade linfoide pode se associar à infiltração linfocítica policlonal pré-existente e correlacionar com níveis séricos aumentados de IgM ao diagnóstico. A autoimunidade pode estar associada a baixos níveis de CD4 ⁽⁸⁾.

Em 2012, SALZER e colaboradores descreveram cinco fenótipos clínicos agrupados de forma diferente, unindo doença linfoproliferativa e autoimunidade. Desta forma, a classificação fenotípica foi dividida em 1. Infecções, 2. Lesões granulomatosas, 3. Manifestações gastrointestinais, 4. Autoimunidade associada à doença linfoproliferativa (infiltração linfocítica) e 5. Malignidade ⁽³⁶⁾.

Em relação à imunidade inata, estudos já evidenciaram defeitos de sinalização das células dendríticas ⁽⁶⁵⁾ e amplo defeito de sinalização de TLR em linfócitos B de pacientes portadores de ICV que, caracteristicamente, já apresentam hipogamaglobulinemia e pobre resposta a vacinação ^(30, 66).

O uso de imunoglobulina endovenosa pode contribuir para a diminuição das infecções recorrentes na grande maioria dos pacientes ^(67, 68). A dose recomendada é de 300 a 600mg/Kg a cada 21 ou 30 dias. Alternativamente, há a possibilidade de se aplicar a imunoglobulina subcutânea a cada 15 dias ^(69, 70).

A profilaxia com antimicrobianos tem sido utilizada em pacientes portadores de ICV, apesar de poucas evidências científicas. Alguns autores consideram o uso de

antimicrobianos para a profilaxia de infecções quando estas são frequentes (mais que três por ano) ou severas ⁽⁵⁹⁾. Os antimicrobianos mais utilizados para a profilaxia são o sulfametoxazol-trimetoprim e os macrolídeos⁽⁴³⁾.

Observou-se que a sobrevida reduzida de pacientes portadores de ICV pode se associar a baixos títulos de IgG, a altos títulos de IgM, à presença de poucas células B periféricas e ao atraso no diagnóstico. O risco de óbito pode ser maior em pacientes com complicações não infecciosas como linfoma, hepatite, alteração funcional ou estrutural do pulmão e doença gastrointestinal ⁽⁷¹⁾.

Os pacientes portadores de ICV são estudantes, trabalhadores, aposentados ou possuem outras atividades diárias e que vivem melhores com a terapia de reposição de imunoglobulina. Entretanto, alguns pacientes, apresentam complicações ainda associadas com aumento da morbidade e mortalidade ⁽⁷¹⁾. Estudos clínicos e imunológicos devem fazer parte da constante busca pela melhoria da qualidade de vida destes pacientes de forma geral.

2.2.Imunidade Inata

A imunidade inata atua em conjunto com a imunidade adaptativa na resposta imunológica do organismo⁽⁷²⁻⁷⁵⁾. As principais células efetoras da imunidade inata são os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células *natural killer (NK)*. Além destas células, os mediadores inflamatórios como as proteínas do complemento, as proteínas da fase aguda, citocinas e quimiocinas atuam na imunidade inata ⁽⁷²⁾.

A imunidade inata é imediata, constituindo a primeira etapa de defesa do organismo na resposta imunológica contra os patógenos. É através dos neutrófilos que a

imunidade inata inicia a defesa do organismo contra bactérias, fungos, vírus e protozoários ⁽⁷⁶⁾.

Atualmente, sabe-se que a imunidade inata não é tão inespecífica como se pensava antes, pois é através dela que os RRP's reconhecem vários agentes agressores ao organismo devido a estruturas denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs)⁽⁷⁴⁾. Atualmente, os TLRs, encontrados em neutrófilos, possuem importante papel na imunidade inata, atuando como RRP's, por apresentarem capacidade de reconhecer os PAMPs ⁽²⁾.

2.2.1. Quimiotaxia de neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes do sangue e originam-se das células-tronco da medula óssea através da ação do fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF). Este fator estimula o lançamento dos neutrófilos maduros para a circulação periférica em condições basais ou através de estímulos externos como acontece durante a liberação de quimiocinas no processo inflamatório. No local da inflamação, a meia-vida (aproximadamente 6h) do neutrófilo pode ser prolongada pela ação de agentes quimiotáticos que atuam no recrutamento destas células ⁽¹⁰⁾.

O neutrófilo maduro apresenta núcleo segmentado (polimorfonuclear) e citoplasma com granulações. Estudos recentes mostram que os neutrófilos podem gerar as chamadas NETs (*neutrophilic extracellular traps*) que são as armadilhas extracelulares neutrofilicas formadas por substâncias dos grânulos e componentes nucleares. As NETs são capazes de anular fatores de virulência e destruir bactérias extracelulares⁽⁷⁷⁾.

O neutrófilo é a primeira célula a atuar quando a imunidade inata é acionada para proteger o organismo⁽¹⁾. Eles chegam rapidamente aos locais de infecção, possuem

uma grande variedade de funções efetoras antimicrobianas com capacidade para produzir citocinas e iniciar a resposta inflamatória, sendo eliminados da circulação e dos tecidos inflamados através de apoptose ^{(77) (78)}. Os neutrófilos são importantes para o controle local da proliferação bacteriana e prevenção de disseminação de patógenos ⁽¹⁰⁾.

A quimiotaxia é o processo de migração celular em direção ao gradiente químico (quimioatrativos). A quimiotaxia dos neutrófilos do sangue para outros tecidos ocorre predominantemente nas vênulas pós-capilares e é mediada por processos químicos, mecânicos e moleculares que fazem com que os neutrófilos migrem para os locais de infecção, por meio de uma série de eventos que incluem a sua ativação, mobilização, rolamento, adesão e diapedese ⁽¹⁰⁾ (Figura 1). O gradiente químico induz, no neutrófilo, à reorganização da actina, mudanças de forma e desenvolvimento de polaridade, contribuindo para a sua mobilidade durante a quimiotaxia. ^(10, 79, 80).

Durante o processo inflamatório, as células endoteliais ativadas expressam moléculas de adesão da família das selectinas: molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e a molécula 1 de adesão da célula vascular (VCAM-1). As selectinas são glicoproteínas presentes nos leucócitos (L-selectinas) e nas células endoteliais (E-selectinas) que medeiam a adesão fraca dos neutrófilos ao endotélio, permitindo o seu rolamento na parede de vaso e o contato com os quimioatrativos. As integrinas dos leucócitos promovem a adesão forte ao endotélio que efetivamente adere o neutrófilo à parede do vaso, contribuindo para a diapedese (locomoção do sangue para outros tecidos através de espaços entre as células endoteliais) ou para a transmigração (locomoção através de fissuras formadas nas células endoteliais) ⁽⁸¹⁾. A Mac-1 (CD11b/CD18 - antígeno macrofágico) é considerada uma das integrinas mais importantes para a resposta inflamatória com participação de neutrófilos ⁽⁸²⁾.

A proteína G, composta de três subunidades (α , β e γ) e localizada na superfície interna da membrana celular, é envolvida na transdução de sinais celulares, alternando um estado de ligação com uma guanosina difosfato inativa (GDP) e a guanosina trifosfato ativa (GTP). Os quimioatrativos se ligam aos receptores transmembrana acoplados a proteína G (GPCR) que possuem sete domínios expressos na superfície dos neutrófilos. Estes receptores são divididos de acordo com o quimioatrativo envolvido na quimiotaxia, f-MLP, PAF, C5a, LTB4 e IL8. A ligação do GPCR com o quimioatrativo resulta em uma troca do GDP pelo GTP e ativa enzimas celulares, como adenil ciclase e fosfolipases. Após a sua ativação, a fosfolipase C degrada o fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (IP3) e o 1,2 diacilglicerol (DAG). O IP3 promove a liberação do cálcio intracelular que controla a emissão de pseudópodos, atuando na mobilidade dos neutrófilos, através da ação da actina e o DAG ativa a proteinoquinase C que promove a fosforilação de radicais em diversas proteínas intracelulares, contribuindo para a atividade motora do neutrófilo^(83, 84)

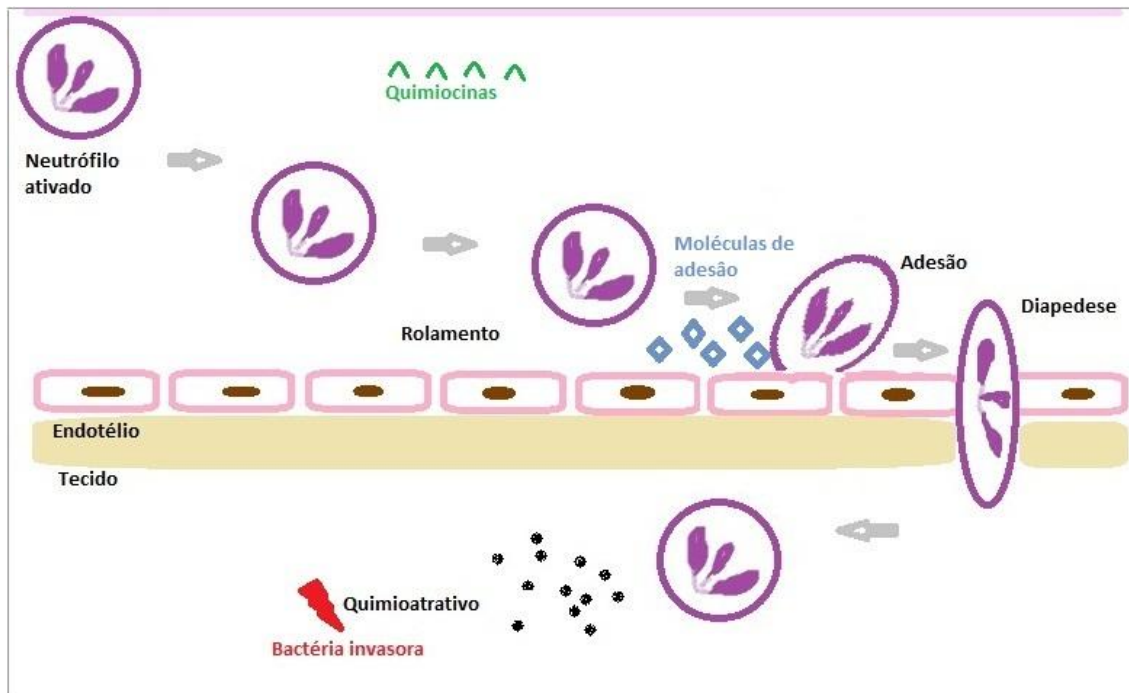


Figura1. Representação esquemática da quimiotaxia de neutrófilo. Fonte: adaptado Reddy RC, Standiford TJ. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. Current opinion in hematology. 2010;17(1):18-24.

Usando vários agentes quimiotáticos, neutrófilos podem ser analisados *in vitro* para possíveis anormalidades na quimiotaxia ⁽²¹⁾. Entre os quimiotáticos que promovem a migração de neutrófilos destacam-se a interleucina 8 (IL 8), o fator ativador plaquetário (PAF), o componente do complemento 5a (C5a), o leucotrieno B4 (LTB4) e o N-formil-L-metionil-L- leucil-L-fenilalanina (f-MLP) ⁽⁸⁵⁾. A IL8 é uma quimiocina produzida pelos monócitos, macrófagos e células endoteliais, podendo ser estimulada por agentes infecciosos e por substâncias endógenas como o óxido nítrico, TNF α e IL1 ^(86, 87). O PAF é produzido pela ativação de plaquetas e neutrófilos ^(88, 89). O LTB4 é derivado do metabolismo do ácido araquidônico e produzido por células mielóides. O C5a é uma anafatoxina obtida após a clivagem da proteína C5 do complemento. A f-MLP (formil-metil-leucil-fenilalanina) é um quimioatrativo constituído de um peptídeo derivado de bactérias com capacidade de estimular neutrófilos ⁽⁹⁰⁻⁹²⁾.

Na sepse, a quimiotaxia de neutrófilos é um evento central da resposta inflamatória e tem sido demonstrado em modelo de perfuração e ligação cecal (CLP) em animais de experimentação que a falência de migração de neutrófilos para o foco infeccioso é acompanhada por um número aumentado de bactérias no fluido peritoneal e sangue, seguidos de alta taxa de mortalidade ^(12, 93-95). A quimiotaxia está alterada na sepse em humanos em vários estágios do recrutamento de neutrófilos ⁽¹⁰⁾.

Os defeitos de quimiotaxia de neutrófilos foram descritos em outras doenças associadas a um aumento da susceptibilidade às infecções como neoplasia, diabetes e síndrome de imunodeficiência adquirida ^(12, 13).

Vários estudos verificaram a quimiotaxia de neutrófilos em pacientes portadores de IDP. D'Amélio e colaboradores, 1979, verificaram a atividade quimiotática dos neutrófilos de 20 pacientes portadores de imunodeficiências primárias, entre elas, a ICV (cinco pacientes), a agamaglobulinemia (cinco pacientes) e deficiência de IgA (dez pacientes) na vigência de processos infecciosos. Em seis pacientes com deficiência de IgG (dois portadores de ICV, quatro portadores de agamaglobulinemia) e nove pacientes portadores de deficiência de IgA foi encontrado prejuízo na quimiotaxia caracterizado por baixo índice quimiotático (razão entre o número de neutrófilos migrados em resposta ao quimioatrativo pela migração aleatória, sem quimioatrativo, de neutrófilos). Neste estudo, o prejuízo na quimiotaxia estava associado à presença de infecções graves (segundo a classificação considerada pelos autores, quando os pacientes apresentavam queda do estado geral com necessidade de internação) e moderadas (febre alta, mais de cinco dias de evolução e necessidade do uso de antibióticos), sendo que não foram encontradas anormalidades na quimiotaxia em pacientes com infecções leves. Os autores inferiram a possibilidade de que possa haver

um fator sérico em determinados pacientes portadores de imunodeficiências primárias que interfere com a função quimiotática durante o processo infeccioso. ^{(17) (96)}.

A Síndrome de Chediak-Higashi (SCH) se caracteriza por infecções de repetição, hipoalbinismo cutâneo e ocular e corpúsculos gigantes no interior dos lisossomos⁽⁹⁷⁾. A resposta quimiotática de três pacientes portadores de SCH foi avaliada comparando com três controles saudáveis, utilizando a câmara de Boyden. O estímulo quimiotático foi gerado com soro autólogo de SCH e de controles saudáveis incubados com endotoxina (LPS). A diminuição da resposta quimiotática (células que migraram com o estímulo) foi mais evidente em pacientes portadores de SCH independente do estímulo ter sido gerado por soro de controles saudáveis ou soro de portadores de SCH. Mesmo tendo sido usados outros estímulos (filtrado de cultura de bactérias, soro de cobaia ativado com endotoxina), a resposta quimiotática dos pacientes com SCH persistia diminuída. Os autores não encontraram anormalidades na viabilidade, na mobilidade ou na adesão celular dos neutrófilos. O soro dos pacientes portadores de SCH não continha inibidores de quimiotaxia e era capaz de gerar quantidades normais de fatores quimiotáticos. Neste estudo, o diâmetro do poro do filtro utilizado no ensaio de quimiotaxia pode ter influenciado a diminuição da resposta quimiotática, pois houve intensificação da diminuição da resposta quando o diâmetro do poro foi diminuído de 5 para 1,2 μm o que pode ter sido influenciado pelo fato de neutrófilos de pacientes portadores de SCH apresentarem corpúsculos gigantes no interior dos lisossomos (4 μm)⁽¹⁶⁾.

Defeitos relacionados à geração de fatores quimiotáticos foram descritos em neutrófilos de quatro pacientes portadores de imunodeficiência combinada severa (SCID) ⁽¹⁹⁾ e sugeriu-se que este defeito possa estar relacionado à imunodeficiência, já que houve melhora após a realização do transplante. Neste estudo, os valores de

referência considerados como deficiência de resposta quimiotática foram aqueles em que havia diminuição da quantidade de células migradas em resposta ao quimioatrativo em mais de 80% quando comparados com os resultados de voluntários saudáveis previamente avaliados.

Ao avaliarem dois pacientes com síndrome da Hiperimmunoglobulinemia E (Hiper-IgE), uma imunodeficiência caracterizada por altos títulos de IgE, dermatite atópica grave e infecções recorrentes cutâneas e pulmonares ⁽⁹⁸⁾, Van Epps e colaboradores, 1983, verificaram diminuição do índice quimiotático nos dois pacientes após estímulo com o f-MLP, mas apenas um dos pacientes apresentou diminuição do índice quimiotático diante do estímulo com C5a, sugerindo uma seletividade da resposta da migração dependendo do quimioatrativo ⁽²¹⁾. Ao avaliar três pacientes portadores de síndrome da Hiper-IgE, Ito e colaboradores, 2003, verificaram que a diminuição da resposta quimiotática dos neutrófilos estava associada à insuficiente produção de $INF\gamma$ o que poderia contribuir para explicar a patogênese da doença associada a infecções caracterizadas por estafilococcias de repetição e abscessos cutâneos e pulmonares⁽¹⁸⁾.

A síndrome de Wiskott-Aldrich é uma doença rara caracterizada por diminuição do número e tamanho das plaquetas, eczema e imunodeficiência⁽⁹⁹⁾. Em estudos de Zicha e colaboradores, 1998, não foi verificada diminuição da atividade quimiotática e os neutrófilos apresentaram mobilidade preservada ⁽²²⁾.

Em pacientes portadores de Deficiência de Adesão Leucocitária do tipo II em que há defeito metabólico em via sintética comum para ligantes de selectinas, observou-se falência da quimiotaxia de neutrófilos associada à redução de rolamento e aderência dessas células ao epitélio⁽²⁰⁾.

Em um estudo com 23 pacientes portadores de diversos tipos de IDP ⁽²¹⁾, observou-se que em apenas um dos seis pacientes portadores de ICV a quimiotaxia

absoluta (número de neutrófilos migrados em resposta ao quimioatrativo) e o índice quimiotático encontravam-se diminuídos.

2.2.2. Sinalização celular: neutrófilos e TLRs

O reconhecimento inicial de microrganismos é mediado por vários receptores expressos em células que atuam na imunidade inata. Dentre estes receptores, encontra-se aquele homólogo a uma proteína da *Drosophila melanogaster*, denominado *toll*, com a função de proteger as moscas contra as infecções. Nos mamíferos, estes receptores foram descritos na década de 90 e denominados de *toll-like receptors* – TLR⁽¹⁰⁰⁾. Os TLRs são glicoproteínas de uma família constituída de onze tipos de proteínas descritas em humanos (dos 15 tipos estudados) que desempenham papel crucial no início da resposta inata do organismo⁽¹⁰¹⁾ e se apresentam como receptores de superfície da membrana celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) ou endossômicos (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) que permitem ao hospedeiro se defender de vários tipos de microrganismos^(25, 27) (Figura 2). Os TLRs endossômicos apresentam domínio voltados para o lume do endossomo e aqueles localizados na superfície da membrana celular são constituídos por uma proteína transmembrana contendo um domínio extracelular (550-950 aminoácidos com 18 a 31 repetições ricas em leucina) e um domínio citoplasmático (cerca de 200 aminoácidos). O TLR e o receptor de IL1 são da família de receptores relacionados com a imunidade inata que contém um domínio intracelular denominado de domínio TIR^(28, 102, 103). Quando o TLR reconhece o PAMP, há início da resposta imunológica, através de sua dimerização que ativa as vias de sinalização por meio do seu domínio intracelular TIR^(28, 101, 104).

Além dos neutrófilos, os TLRs estão presentes em outros tipos celulares envolvidos na função imunológica como o baço, os pulmões, as tonsilas, os linfonodos

e o trato gastrointestinal^{(2, 25) (78)}. A quimiotaxia dos neutrófilos é influenciada pelos TLRs. A interação entre o TLR e o PAMP favorece o deslocamento dos neutrófilos e sua rápida chegada ao sítio inflamatório guiado por agentes quimiotáticos⁽¹⁰⁾. Quando os TLRs dos neutrófilos se unem aos seus PAMPs, as vias de sinalização são ativadas provocando derramamento de l-selectina, regulação positiva de integrinas, aumento da produção de citocinas e fagocitose, retardando a apoptose^(105, 106).

O reconhecimento de PAMPs pelos RRP, como os TLRs, denota um mecanismo de grande eficiência e especificidade da imunidade inata no que se refere à detecção de estruturas que são essenciais para a sobrevivência de bactérias, vírus, fungos e protozoários. Os TLRs reconhecem PAMPs como lipopolissacarídeos (TLR4), peptidoglicanos, lipopeptídeos (TLR2/TLR6, TLR1/TLR2), flagelina (TLR5), DNA bacteriano e viral (TLR9), RNA de fita simples (TLR7, TLR8) e RNA viral de dupla fita (TLR3). Dentre os diversos TLRs conhecidos, os TLR2 e TLR4 são os mais bem estudados em razão da grande variedade de células que os expressam em suas superfícies e suas conseqüentes repercussões no organismo humano, detectando uma variedade de agentes patogênicos⁽²⁸⁾.

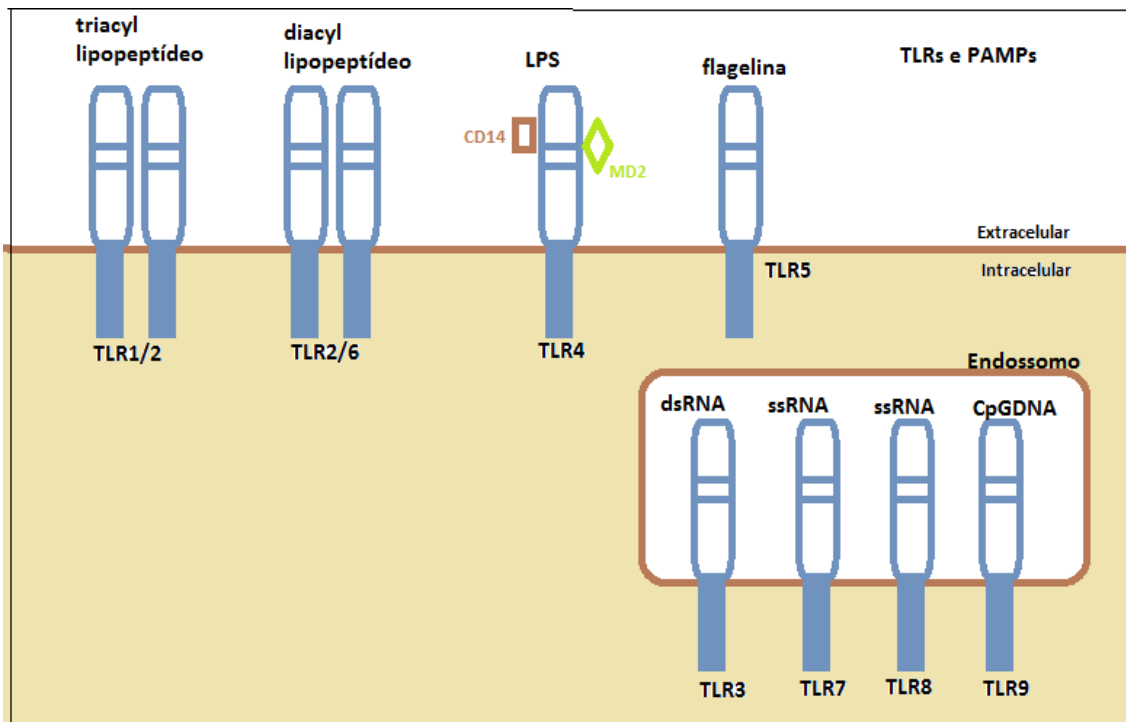


Figura 2. Representação esquemática da família de TLRs e seus PAMPs. TLR2 é essencial para reconhecer lipopeptídeos. Associados ao TLR2, TLR1 e TLR6 discriminam triacyl e diacyl lipopeptídeos, respectivamente. TLR4 é receptor de LPS. TLR9 é essencial para o reconhecimento de CPG de DNA bacteriano. TLR3 é implicado no reconhecimento de RNA viral de dupla fita, enquanto TLR7 e TLR8 no reconhecimento de RNA viral de fita simples. TLR5 reconhece flagelina. Fonte: adaptado de Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*. 2005;17(1):2.

O TLR2 é essencial para a detecção de bactérias gram-positivas via peptidoglicano. Também, é capaz de reconhecer estruturas da *Neisseria meningitidis*, micobactérias, *Candida albicans*, vírus do sarampo, estruturas proteicas da superfície de *Trypanosoma cruzi* ⁽²⁵⁾ e determinadas estruturas de bactérias gram-negativas ⁽¹⁰⁷⁾. TLR1 e TLR6 formam dímeros com TLR2 a fim de reconhecer estruturas específicas de bactérias como o diacyl (TLR6) ou triacyl (TLR1) lipopeptídeo ^{(108) (28)}.

O TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias gram-negativas, estrutura da *Candida albicans*, *Trypanosoma*, proteína externa do Vírus Respiratório Sincicial e do *Mycobacterium tuberculosis*. Várias outras proteínas tem sido sugeridas como ativadoras de imunidade celular através de TLR4, incluindo fibrinogênio, fimbrias bacterianas e ácido teicurônico. O CD14 e o MD-2 são proteínas que aumentam a especificidade do TLR4 ao LPS ⁽²⁵⁾.

A interação entre PAMPs e TLRs sinalizadores ativam os neutrófilos através de vias de transdução de sinais, NFkB ou MAPK, as quais induzem a expressão de genes envolvidos na resposta imunológica, produzindo citocinas. ⁽¹⁰⁵⁾. As funções dos neutrófilos podem ser reguladas por citocinas pró e anti-inflamatórias ^(26, 106).

As diferentes respostas mediadas por PAMPs específicos de TLR podem ser explicadas pelo uso de moléculas adaptadoras como a MyD88, a proteína associada ao TIR/adaptador semelhante a MyD88 (Mal), a proteína adaptadora contida no domínio TIR indutora de IFN β 1(TRIF) molécula 1 contida no domínio TIR(TRIF/TICAM1) e a molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM). A molécula adaptadora MyD88 é essencial para a indução da produção de citocinas (TNF α e IL12), sendo um adaptador universal para TLR, exceto para TLR3 ⁽¹⁰⁹⁾. O adaptador TIRAP/Mal é essencial à sinalização dependente de MyD88 via TLR2 e TLR4 ^(27, 28) e o TRAM é utilizado apenas por TLR4. Por outro lado, o adaptador TRIF/TICAM1 é utilizado por TLR4 como via independente de MyD88 ⁽¹⁰⁸⁾ (Figura 3). Com exceção de TLR3, todos os TLRs utilizam funcionalmente a proteína adaptadora MyD88 como parte da via de sinalização intracelular que conduz a ativação de NFkB e MAPquinasas ⁽¹⁰²⁾.

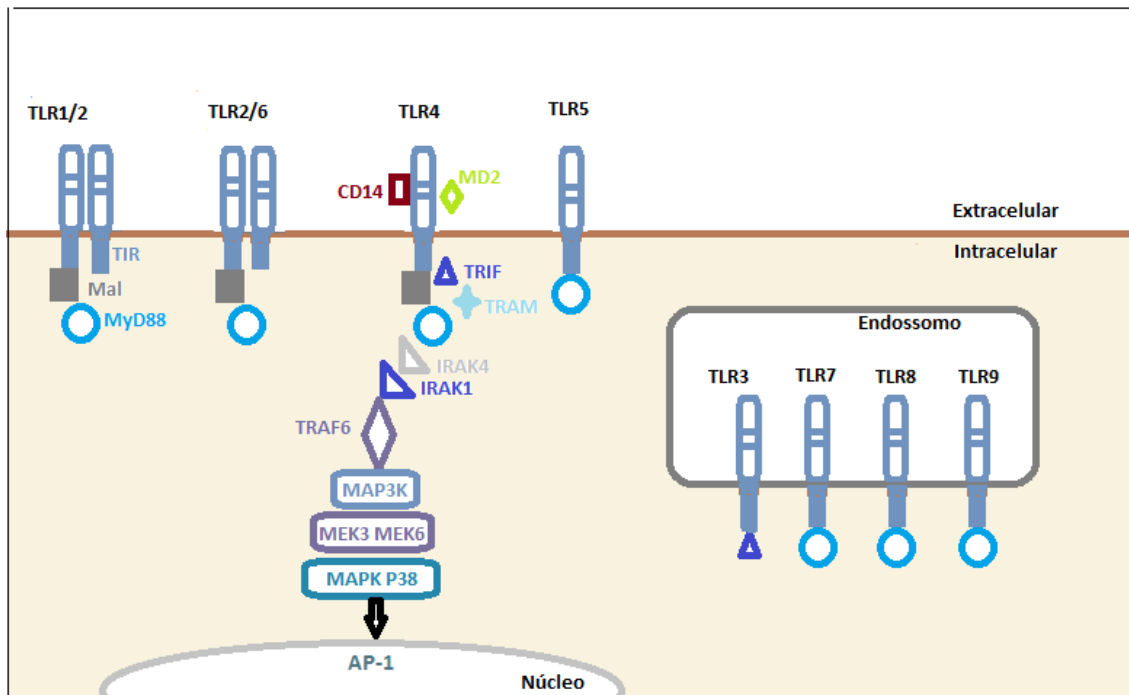


Figura 3. Representação esquemática dos TLRs e suas moléculas adaptadoras e ativação da via AP1 pela MAPK p38. Com a AP-1 há a transcrição de citocinas inflamatórias. Fonte: adaptado de Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006;124(4):790.

Quando estimulada, a MyD88 recruta membros da família de IRAK (IL-1 *receptor-associated kinase*), como o IRAK 4 e facilita a fosforilação de IRAK1. A forma ativada de IRAK 1 se associa a TRAF6 (fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral) que ativa TAK1 (fator de crescimento β associado a quinase 1), membro da família da MAP3K que em sequência ativa MEK3 e MEK6 e a MAPK. A MAPK ativa a via de transcrição AP1 que controla várias funções celulares incluindo diferenciação, proliferação e apoptose^(28, 110-113).

As MAPKs são quinases serina-treonina que atuam mediando sinais reguladores nas células e as mais estudadas são p-38, ERK e a JNK. A cascata de sinalização das MAPKs pode ser ativada por vários estímulos que regulam a produção de citocinas e fatores de crescimento. A família MAPK p38 está associada à resposta inflamatória desempenhando importante papel na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL1,

TNF α), no ciclo celular e na apoptose. A MAPK p38 é composta de quatro subgrupos ou isoformas: p38 α , p38 β , p38 γ e a p38 δ . Destas, a p38 α e a p38 β são expressas universalmente e apesar dos quatro tipos expressarem ativações similares, algumas diferenças já foram encontradas na cinética e na intensidade destas ativações ⁽²³⁾⁽¹¹¹⁾.

Como todas as MAPKs, a MAPK p38 é ativada por quinases duplas denominadas MAP quinases quinases (MKKs). As principais MKKs conhecidas como ativadoras de MAPK p38 são a MEK3 e a MEK6. A MEK6 ativa todas as isoformas de p38, enquanto a MEK3 é mais seletiva, participando da ativação apenas de α , β e γ . A MAPK p38 α é a principal isoforma envolvida na resposta inflamatória. Por outro lado, a ativação das isoformas de p38 pode ser controlada por diferentes reguladores e coativadores através de várias combinações de ativações existentes. O mecanismo de ativação de MAPK p38 pode variar em diferentes células, dependendo de condições fisiológicas ou patológicas. A MAPK p38 ativada é capaz de fosforilar diversos substratos nos compartimentos celulares, além de atuar na resposta ao stress incluindo a irradiação ultravioleta, choque térmico, lipopolissacarídeos, inibidores da síntese de proteínas e na mobilidade celular ⁽¹¹⁴⁾. MAPK p38 também tem papel regulador na proliferação e diferenciação de células do sistema imunológico como GM-CSF e o CD40 ^(111, 113).

A via dependente de MAPK-p38 é considerada a principal via de sinalização que orienta a atuação de neutrófilos *in vivo*, desempenhando papel crucial na quimiotaxia destas células, sendo esta função regulada pela expressão de receptores de superfície, como os TLRs e quimiocinas ^(31, 115). Diversas citocinas, incluindo quimioatrativos tem se mostrado capazes de fosforilar a MAPK p38 em neutrófilos. Está claro que a inibição da MAPK p38 por inibidores sintéticos prejudica a quimiotaxia de neutrófilos, pois com a atuação da MAPK p38 inibida, ocorre atraso na mobilização de neutrófilos dentro do

vaso, prejudica a transmigração e o direcionamento do neutrófilo *in vitro* ⁽³²⁾. Estudos prévios sugerem que a MAPK p38 atua na orientação da direção dos neutrófilos aos quimioatrativos e um dos mecanismos sugeridos é através da regulação da PTEN (*phosphatase tensin homolog*) o qual atua na priorização de sinais celulares químicos com papel na migração e adesão celular ^(32, 116, 117).

A ativação de MYD88 pelos TLRs fosforila a MAPK p38 e induz a maturação do fagossomo, regulando o tráfego endocítico, contribuindo para a fagocitose do patógeno ^(118, 119). Recentes estudos tem demonstrado que os pacientes portadores de ICV apresentam respostas alteradas de TLRs. Estes estudos sobre a sinalização celular foram, predominantemente, realizados em células dendríticas e células B, mas não em neutrófilos ^(30, 66, 120). Em estudo de Yu e colaboradores, 2009, pacientes portadores de ICV apresentaram deficiência de resposta de TLR7 e TLR9, os TLRs predominantemente expressos em células B e células dendríticas. Estes defeitos incluíram a perda da ativação celular, proliferação e produção de citocinas pelas células B e células dendríticas o que poderia ter um papel importante na patogênese da ICV ⁽⁶⁶⁾. A ativação de célula B por TLR9 acoplados com extratos de bactérias (*Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*) apresentou respostas significativamente reduzidas em portadores de ICV e, no entanto, nenhuma mutação ou polimorfismos em TLR9 foram identificados, sugerindo que estas diferenças funcionais não eram devidas a defeitos do receptor ^(29, 30). Atualmente, Taraldsrud e colaboradores, 2014, verificaram que as células dendríticas de pacientes portadores de ICV responderam normalmente aos estímulos virais, não encontrando defeitos de sinalização de TLR7 e TLR9 ⁽¹²¹⁾ como aqueles verificados em estudos prévios.

Não há dados na literatura sobre a sinalização de TLR em neutrófilos de pacientes portadores de ICV, mesmo tendo em vista a importância destas células e dos

TLRs na proteção contra as infecções, principalmente no que se refere à ação de TLR2 e TLR4, importantes receptores expressos em neutrófilos e que atuam contra o contingente de bactérias que acometem os pacientes portadores de ICV.

Justificativa do estudo

3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Considerando que a incidência de infecções recorrentes é critério importante para o diagnóstico de ICV, faz-se necessária a avaliação da quimiotaxia e da atuação de TLRs (TLR2 e TLR4) na sinalização via MAPK p38 em neutrófilos de pacientes portadores de ICV. Tais enfoques poderão ser importantes ferramentas para a melhor compreensão da fisiopatologia da ICV, contribuindo para o diagnóstico e assessoramento aos novos estudos para o tratamento da doença.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo avaliar a quimiotaxia e a via de sinalização MAPK P38 ativada pelos TLR2 e TLR4 em neutrófilos de pacientes portadores de ICV acompanhados no ambulatório de Imunologia do HC-UFG.

4.2 Objetivos especiais

- Comparar a quimiotaxia de neutrófilos em pacientes portadores de ICV acompanhados no ambulatório de Imunologia do HC-UFG com indivíduos saudáveis.

- Avaliar a via de sinalização MAPK P38 ativada por TLR2 e TLR4 em neutrófilos de pacientes portadores de ICV acompanhados no ambulatório de Imunologia do HC-UFG, comparando-os com indivíduos saudáveis.

Metodologia

5. METODOLOGIA

5.1. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional, transversal e comparativo.

5.2. Conceitos operacionais

O estudo foi conduzido no ambulatório do Serviço de Imunologia do HC/UFMG localizado no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz (CTR – DIP) e no Laboratório Professor Lineu Freire-Maia da Faculdade de Medicina da UFMG.

O Serviço de Imunologia do HC/UFMG é referência para a cidade de Belo Horizonte e sua região metropolitana e para municípios do interior de Minas Gerais. Os pacientes são encaminhados a este serviço para propedêutica e terapêutica ao nível de atenção secundária. O CTR – DIP é o local onde os pacientes portadores de imunodeficiência primária são atendidos e recebem imunoglobulina venosa. O laboratório Professor Lineu Freire-Maia da Faculdade de Medicina da UFMG foi o local da realização de todos os exames laboratoriais.

O estudo foi realizado no período de abril de 2010 a abril de 2014. No ano de 2010, a pesquisadora realizou o aperfeiçoamento no atendimento a pacientes portadores de IDP no ambulatório de imunodeficiências primárias do Serviço de Imunologia do HC/UFMG.

Previamente à realização das técnicas laboratoriais, a pesquisadora foi submetida a treinamento no laboratório Professor Lineu Freire-Maia da Faculdade de Medicina da UFMG, de agosto de 2012 a agosto de 2013.

A coleta de dados foi realizada em prontuários e diretamente com os pacientes no dia da coleta do sangue, tendo sido anotados em um protocolo de pesquisa confeccionado para este estudo (anexo 8.1, página 115).

Os pacientes foram abordados no dia programado para a infusão de imunoglobulina venosa, quando se questionou, também, sobre a possibilidade de infecção atual. Não foram coletados sangue de pacientes no momento de quadro infecciosos instalados. Quando o paciente relatava algum tipo de infecção no momento da abordagem para o TCLE, outro dia para coleta era aguardado visto que, em geral, as infusões de imunoglobulinas eram realizadas a cada 21 ou 30 dias.

Previamente à infusão da imunoglobulina, foi solicitada a assinatura do TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 8.2, página 118) ao paciente que concordou em participar do estudo, realizou-se a entrevista conforme protocolo de pesquisa e, após obtenção do consentimento, foi coletado o sangue do paciente.

5.3. Detalhamento populacional

5.3.1. Pacientes

Este estudo apresenta uma parte da casuística de pacientes portadores de IDP do Serviço de Imunologia do HC-UFMG que conta com mais de 20 anos de acompanhamento desta população. Foram selecionados os pacientes encaminhados ao serviço que obtiveram o diagnóstico de imunodeficiência comum variável, conforme os critérios do ESID/PAGID⁽⁵⁷⁾: infecções recorrentes, idade acima de quatro anos, níveis reduzidos de IgG (pelo menos 2 desvios-padrão abaixo da média para a idade), diminuição de pelo menos mais um isotipo de imunoglobulina (IgA e/ou IgM) e

exclusão de outras causas bem definidas de hipogamaglobulinemias. Conforme descrito na literatura, pacientes com redução significativa de IgG (<200mg/dl), provavelmente, não são capazes de produzir anticorpos⁽³⁹⁾ e em alguns estudos, nem todos os pacientes portadores de ICV foram avaliados em relação à resposta vacinal^(8, 58). Para a maioria dos pacientes deste estudo não foi realizada a pesquisa da produção de anticorpos após exposição ou imunização.

Em relação aos fenótipos, foram utilizados os critérios publicados pelo estudo multicêntrico europeu⁽⁵⁸⁾ e adotados em estudo multicêntrico⁽⁸⁾, segundo a classificação: A. sem complicações (apenas infecções), B. presença de doença autoimune associada, C. presença de infiltração linfocítica policlonal, D. malignidade ou E. enteropatia.

Do total de 59 pacientes portadores do diagnóstico de ICV em acompanhamento ambulatorial, foram excluídos 21 deles (ver critérios de exclusão na página 51) e uma amostra de 38 pacientes participou do estudo da quimiotaxia de neutrófilos (Figura 4).

Por questão didática, neste estudo foram atribuídas letras maiúsculas (A, B, C, D, E) para identificação de cada fenótipo, tendo sido incluídos 21 pacientes portadores do fenótipo A, 4 pacientes portadores dos fenótipos B e E associados, 2 pacientes portadores apenas do fenótipo B, 1 paciente portador do fenótipo E, 9 pacientes portadores do fenótipo C e 1 paciente portador do fenótipo D.

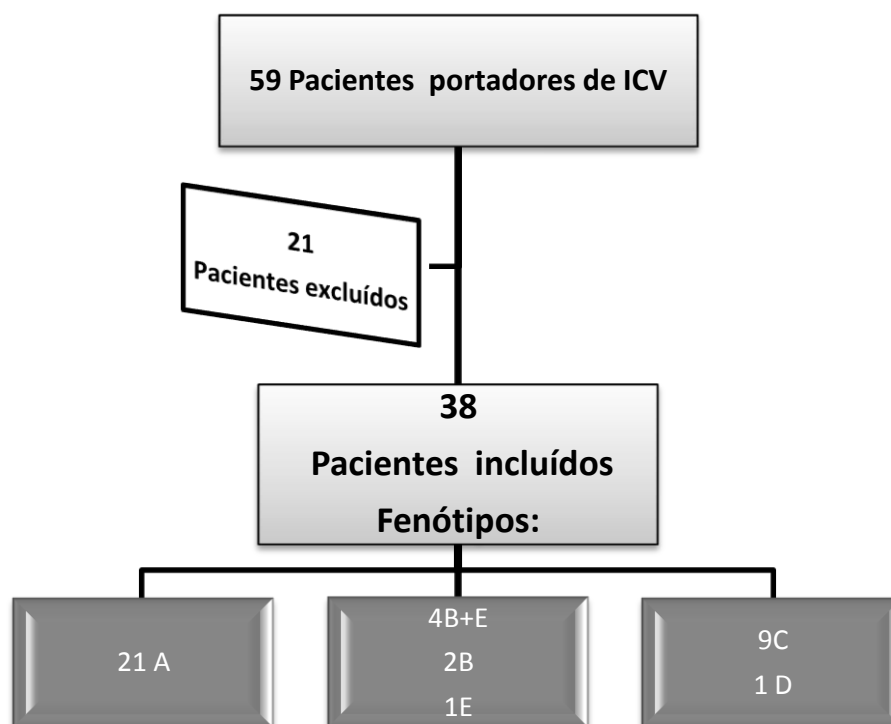


Figura 4. Fluxograma de seleção dos pacientes portadores de ICV incluídos no estudo. Fenótipos: A=infecções, B=autoimunidade, C=Infiltração linfocítica policlona, D=malignidade e E=enteropatia.

Os 38 pacientes do estudo da quimiotaxia eram de ambos os sexos e faixa etária entre 13 e 63 anos (Tabela 1), sendo três adolescentes e 35 adultos. A divisão segundo a faixa etária e sexo foi, didaticamente, assim definida: de 13 a 20 anos (4 pacientes, sendo 1 mulher e 3 homens); 21 a 30 anos (3 pacientes, sendo 2 mulheres e 1 homem); 31 a 40 anos (13 pacientes, sendo 8 mulheres e 6 homens) e maior ou igual a de 41 anos (18 pacientes, sendo 9 mulheres e 9 homens).

Os dados dos pacientes portadores de ICV selecionados para avaliação da quimiotaxia de neutrófilos incluindo a identificação, classificação fenotípica e os resultados da avaliação laboratorial para o diagnóstico da doença estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados populacionais, clínicos e laboratoriais de pacientes portadores de ICV.

Paciente	Idade/ Sexo	Fenótipo *	Manifestações Clínicas	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	CD4 **	CD8	CD19
01	47/M	A	PSB, herpes	48,6	5,8	30,3	628	603	183
02	13/M	A	PSB, impetigo, aftas	409	<7	56	767	621	416
03	37/M	A	Pneumonia, meningite, mielite, óbito irmãos	38	<7	10	862	1112	460
04	43/M	A	PSB, otite	58,7	<7	39	642	1045	10
05	43/F	A	PSB, diarreia, Def. IgA prévia	361	<7	45	645	656	158
06	37/F	A	PSB, diarreia, aftas, celulite, candidíase	65	<7	5	1138	806	457
07	20/F	C	PSB, consanguinidade, HEPATOSPLENOMEGALIA, LINFADENOPATIA	83	<7	25,8	585	446	90
08	39/M	A	PSB, otite	408	31	460	934	1312	58
09	55/M	A	PSB, diarreia	450	<7	25	nd	nd	Nd
10	36/M	C	PSB, herpes zoster, ESPLENOMEGALIA	363	2	453	1434	1213	355
11	41/M	A	Pneumonia, sinusite, otite, mastoidite, meningite, tuberculose, herpes zoster	36,1	<7	17,8	472	669	37
12	63/M	C	PSB, meningite, ESPLENOMEGALIA, giardíase, aftas	292	<12	119	101	164	13
13	41/F	A	Pneumonia, sinusites, otite	111	<7	21	611	384	217
14	41/M	C	PSB, diarreia/giardíase, ESPLENOMEGALIA, irmão com ICV	556	2	7	416	731	171
15	27/F	B+E	Sinusite, LINFADENOMEGALIA, ESPLENOMEGALIA, DIARRÉIA CRÔNICA, erisipela, herpes farínge	528	30	31	57	62	49,8
16	48/F	E	Pneumonia, sinusite, DIARRÉIA CRÔNICA	75	12	14	nd	nd	nd
17	41/F	C	PSB, tuberculose, otite, ESPLENOMEGALIA	270	<42	<32	416	804	31
18	34/F	C	PSB, ESPLENOMEGALIA	72	<12	<7	364	266	16
19	25/F	A	Pneumonia, sinusite	209	7	14	nd	nd	nd
20	41/F	A	Pneumonia, otite	702	<7	8	608	396	187
21	33/F	A	PSB, otite, herpes zoster	33	<7	<4	640	405	71
22	38/M	A	Pneumonia, Sinusite	73	<7	<4	508	2865	155
23	37/F	A	PSB, otite, abscessos	110	<7	<1	nd	nd	nd
24	33/F	A	Pneumonia, Sinusite	177	<7	20	681	1153	176
25	36/F	A	Pneumonia, Sinusite	64	<7	5	nd	nd	nd
26	52/M	C	Sinusite, HEPATOMEGALIA	154	24	17	401	440	73
27	57/F	C	PSB, HEPATOSPLENOMEGALIA	190	0	20	354	381	61
28	59/F	B	PSB, herpes zoster, ANEMIA HEMOLÍTICA	233	<7	32	450	401	268
29	45/M	A	PSB	157	<7	27	nd	nd	nd
30	38/F	B+E	PBS, GASTRITE ATRÓFICA, DIARRÉIA CRÔNICA	38	<7	5	709	3553	307
31	17/M	A	PSB	62	15	32	531	749	464
32	14/M	B+E	Sinusite, otite, celulite, ARTRITE DIARRÉIA CRÔNICA/COLITE	360	62	33	3381	1761	1531
33	47/F	C	PSB, LINFADENOMEGALIA, diarreia	195	22	63	1720	364	2912
34	25/M	B	Pneumonia, sinusite, otite, ARTRITE	161	<7	27	775	803	160
35	39/M	D	PSB, diarreia, CÂNCER GÁSTRICO	23	<7	16	6519	1314	87
36	36/M	A	PSB, otite, diarreia, sepse, candidíase	<200	<7	17,3	213	794	112
37	41/F	A	PSB, otite	326	<7	13	521	748	nd
38	49/M	B+E	PSB, PLAQUETOPENIA, DIARRÉIA CRÔNICA	33	<7	17	482	586	30

PSB = Pneumonia, Sinusite, Bronquiectasia. Fenótipo*: A=Infecções sem complicações, B=Autoimunidade, C=Infiltração linfocítica policlonal, D=Malignidade e E=enteropatia. **CD4, CD8 e CD19 expressos em número absoluto de células/mm³. nd= não disponível. As manifestações clínicas relacionadas às complicações fenotípicas estão descritas em letras maiúsculas.

As infecções que mais comumente acometeram os pacientes portadores de ICV foram as pneumonias, em 35 (92%) e sinusite em 34 (89%) do total de pacientes incluídos no estudo. Estas infecções ocorreram, principalmente, antes do início do tratamento com imunoglobulina venosa. Em relação à bronquiectasia, importante complicação encontrada em portadores de ICV, apesar de não ser considerado um fenótipo da doença, 25 (65,7%) pacientes apresentaram esta complicação (Tabela 1).

Os diagnósticos das doenças autoimunes, das enteropatias e neoplasias obedeceram a critérios clínicos e laboratoriais recomendados pelas sociedades das especialidades envolvidas.

A média, o desvio padrão e análise da variação (número máximo e número mínimo) dos níveis de IgG, IgA e IgM dos pacientes incluídos no estudo encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Valores dos níveis de imunoglobulinas de 38 pacientes portadores ICV.

Funções estatísticas	IgG* (739-1390)	IgA *(84-354)	IgM * (81-167)
M ±DP (min-Max)**	209,1±174,2(23-702)	9,7±8,3 (0-42)	46,5±100,2(1-460)

*Valores de referência dos níveis de imunoglobulinas (mg/dl) para adultos entre parênteses. ** M± DP (min-Max) = média ± desvio-padrão (valor mínimo e valor máximo).

A contagem de CD4 estava abaixo do percentil 10 (476 células/mm³) em 26,3% (10) dos pacientes. A contagem de CD8 estava abaixo do percentil 10 (248 células/mm³) em apenas 5,2% (2) dos pacientes e acima do percentil 90 (724 células/mm³) em 39,5% (15) deles. A Tabela 1 mostra os valores absolutos de CD4 e CD8 dos pacientes portadores de ICV incluídos no estudo.

5.3.2. Controles

Para o grupo controle, 19 voluntários saudáveis foram incluídos no estudo após assinatura do TCLE, apresentando faixa etária entre 17 e 57 anos, sendo 11 mulheres e 8 homens e foram divididos em 4 faixas etárias: de 13 a 20 anos, 2 controles saudáveis; para a faixa etária entre 21 e 30 anos, 6; faixa etária entre 31 e 40 anos, 5 e para aqueles com 41 anos ou mais, 6. O grupo controle foi composto por funcionários e estudantes dos setores onde foi realizado o estudo. A dosagem de imunoglobulinas dos controles foi realizada pelo método de imunoturbidimetria. Com exceção de dois controles saudáveis, as dosagens das imunoglobulinas foram realizadas no laboratório do HC/UFGM. A Tabela 3 se refere às características da população e dosagens de imunoglobulinas dos controles saudáveis (identificados por letras minúsculas) que participaram do estudo.

Tabela 3. Características populacionais e dosagens de imunoglobulinas do grupo de controles saudáveis.

Controles	Idade	Sexo	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgA (mg/dl)
a	31	F	1021	83	204
b	45	F	1410	124	232
c	35	F	1546	116	213
d	32	M	1142	160	362
e	42	F	1111	53	151
f	35	F	635	92	156
g	57	F	1009	82	265
h	46	M	1332	56	212
i	23	M	947	78	213
j	29	F	1119	64	149
k	53	F	1267	115	280
l	26	F	1123	162	186
m	19	M	1207	108	473
n	30	M	1041	132	218
o	37	F	721	112	288
p	28	F	1166	80	347
q	23	M	1130	160	192
r	17	M	1405	151	284
s	44	M	873	83	328

Assim como para os pacientes portadores de ICV, no momento da coleta do sangue dos controles, estes não apresentavam quadros infecciosos.

5.4. Critérios de Inclusão

5.4.1. Para pacientes e controles participantes do estudo da quimiotaxia

Conforme relatado no detalhamento populacional, foram incluídos todos os 38 pacientes selecionados do grupo total de portadores de ICV acompanhados no ambulatório de IDP do HC-UFMG.

Todos os 19 controles foram incluídos no estudo da quimiotaxia de neutrófilos.

5.4.2. Para pacientes e controles participantes da avaliação da sinalização celular

Para se proceder à realização do *western blot* com objetivo de avaliar as vias de sinalização de MAPK p38 ativada por TLR2 e TLR4, foram selecionados 11 pacientes portadores de ICV e 7 indivíduos do grupo controle participantes do estudo da quimiotaxia de neutrófilos, conforme mostram as tabelas 4 e 5. O critério utilizado para a inclusão deste grupo de 18 indivíduos, pacientes e controles, foi baseado no valor médio do índice quimiotático (anexos 8.4 e 8.5, página 133). Nesta pesquisa, aqueles indivíduos que apresentaram índice quimiotático mais próximo da média do grupo de pacientes e controles foram incluídos nesta parte do estudo, devido a pequena variabilidade entre eles, objetivando não incluir pacientes ou controles que já apresentavam alguma diferença na quimiotaxia em relação à migração frente ao f-MLP.

Tabela 4. Dados populacionais e classificação fenotípica de pacientes portadores de ICV selecionados para o estudo da sinalização celular.

Paciente	Idade/sexo	Fenótipo
01	47/M	A
02	13/M	A
08	39/M	A
14	41/M	C
18	24/F	C
23	37/F	A
29	45/M	A
31	17/M	A
33	47/F	C
34	25/M	B
35	39/M	D

Tabela 5. Dados populacionais dos controles selecionados para o estudo da sinalização celular.

Controle	Idade/sexo
s	44/M
a	31/M
r	17/M
o	37/F
n	30/M
l	26/F
f	35/M

5.5. Critérios de Exclusão

Foram excluídos 21 pacientes: um deles não concordou em participar do estudo, três pacientes perderam o seguimento, 11 recebiam a infusão de imunoglobulina no interior do estado e seis eram menores de 13 anos. Neste estudo, optou-se por dividir os grupos de pacientes e controles em faixas etárias e não foram incluídos indivíduos menores que treze anos de idade. Segundo a literatura, pode haver diferença fisiológica na quimiotaxia de neutrófilos em indivíduos saudáveis menores que 13 anos de idade (122).

5.6. Atividades laboratoriais

Após o treinamento, todos os exames foram realizados pela pesquisadora no período de setembro de 2013 a março de 2014.

5.6.1. Coleta da amostra

A coleta da amostra foi realizada antes da infusão de imunoglobulina venosa programada para o paciente. Não foi necessário jejum e a maioria das amostras foi coletada no início da manhã. Imediatamente após a coleta do sangue periférico (10 ml) em tubo com EDTA, a amostra foi enviada ao Laboratório Lineu Freire-Maia da Faculdade de Medicina da UFMG onde se procedeu à realização dos exames. O início do processamento da amostra se deu em, no máximo, até 1 hora após a coleta.

No mesmo dia da coleta do sangue, realizou-se a separação de neutrófilos, a avaliação da quimiotaxia, a incubação dos neutrófilos com estímulos e a estocagem do

sobrenadante a -80 graus centígrados. Posteriormente, realizou-se a dosagem de proteínas e o *western blot* para a avaliação da sinalização celular.

5.6.2. Separação de neutrófilos

A separação de neutrófilos foi realizada por meio do gradiente Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) conforme protocolos de estudos anteriores e adaptados para o laboratório ^(123, 124). Os 10 ml de sangue total colhidos com EDTA foram transferidos para o tubo com 10 ml de Ficoll e centrifugados a 1300 rpm, à temperatura 20°C por 40 minutos. Posteriormente, foram descartados o plasma e o Ficoll e a suspensão contendo neutrófilos foi transferida para um tubo graduado em 50ml e, por duas vezes, foi realizada a lise de hemácias acrescentando-se solução própria para este fim (solução de lise), homogeneizado por dois minutos e deixado na geladeira (4°C) por mais 10 minutos. Após cada lise, a solução foi centrifugada com 50 ml de PBS 1X a 1500 rpm, 10°C, por oito minutos. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e acrescentado 1 ml de meio RPMI ao *pellet* que foi homogeneizado. Posteriormente, foram adicionados 50 ml de RPMI e centrifugou-se a 1500 rpm, 10°C, por 8 minutos. Após ter descartado o sobrenadante, acrescentou-se 1 ml de solução tampão de neutrófilos (PBS 1X, SFB 2% e EDTA a 1mM), homogeneizou-se e procedeu-se à contagem de neutrófilos na câmara de Neubauer. Uma suspensão final de neutrófilos foi utilizada para os ensaios contendo $1,0 \times 10^6$ neutrófilos/ml RPMI-BSA.

5.6.3. Quimiotaxia de neutrófilos

5.6.3.1. Padronização do ensaio de quimiotaxia

A padronização do teste de quimiotaxia compreendeu o período de agosto de 2012 a agosto de 2013.

A quimiotaxia foi avaliada através de ensaio em câmara de 48 poços (AP48) separados por filtro de policarbonato com poros de 5µm diâmetro (Figura 5), conforme protocolos de estudos anteriores^(125, 126) e do fabricante (www.neuroprobe.com) adaptados para o laboratório, utilizando-se a suspensão de neutrófilos previamente isolados pelo gradiente de Ficoll-Hypaque.

O quimioatrativo utilizado foi o f-MLP (formil-metil-leucil-fenilalanina) (Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA), um peptídeo derivado de bactérias e com capacidade de estimular neutrófilos humanos⁽⁹⁰⁾.

Para a padronização do teste, foi avaliada a quimiotaxia de voluntário (aleatório, saudável) com diferentes diluições do quimioatrativo f-MLP. As concentrações testadas foram 10mM; 10µM; 0,01 µM; 0,1nM e 0,1pM. O meio RPMI puro foi utilizado como controle negativo.

Na parte inferior da câmara, foram adicionados 28µl do RPMI puro (controle negativo, sem quimioatrativo) e o quimioatrativo f-MLP nas concentrações citadas. Após inserir o filtro e o silicone, foram adicionados 50µl da suspensão de neutrófilos ($1,0 \times 10^6$ neutrófilos/ml) na parte superior da câmara. Após a incubação (por 1 hora a 37°C com 5% de CO₂), o filtro de policarbonato foi retirado, procedeu-se a fixação das células com metanol e a coloração com *May-grunwald* e Giemsa.

Para a padronização do ensaio e, posteriormente, durante a verificação da quimiotaxia de pacientes e controles, o número de células migradas para a parte inferior do filtro foi contado (objetiva 100x) em 10 campos aleatórios, em quadruplicata e os resultados foram expressos de acordo com o número de neutrófilos migrados por campo. A avaliação em quadruplicata foi preferida, mesmo tendo sido observadas contagens homogêneas entre os campos nas duplicatas e triplicatas. As células que migraram em direção aos estímulos quimiotáticos foram consideradas como tendo migração direcionada e as células que migraram em direção ao RPMI representaram o controle negativo do teste (migração randômica ou aleatória).

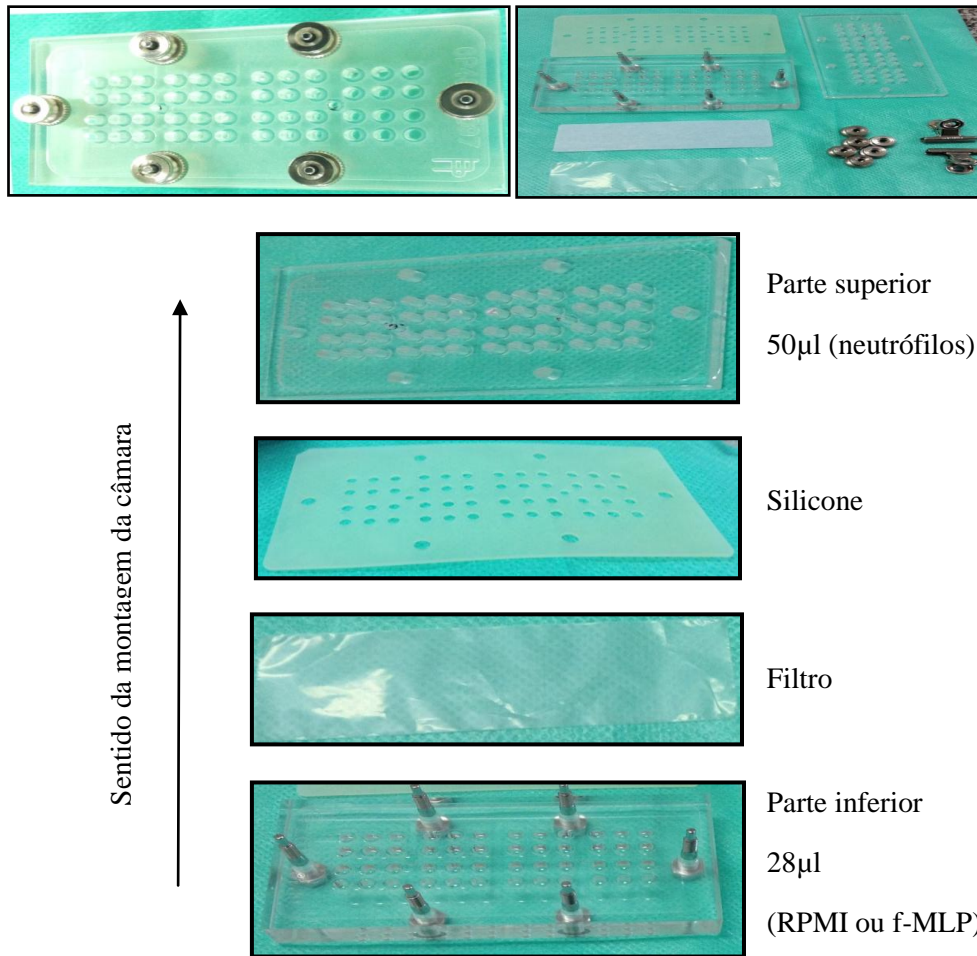


Figura 5. Montagem da câmara AP 48.

A Figura 6 mostra o número de neutrófilos migrados em resposta ao f-MLP, sendo que a concentração 0,01 µM foi a que promoveu maior e melhor efeito, tendo sido, portanto, utilizada para os demais experimentos. Outros estudos avaliaram uma concentração ideal de f-MLP para a realização do ensaio de quimiotaxia próxima a este valor ^(17, 21, 127, 128).

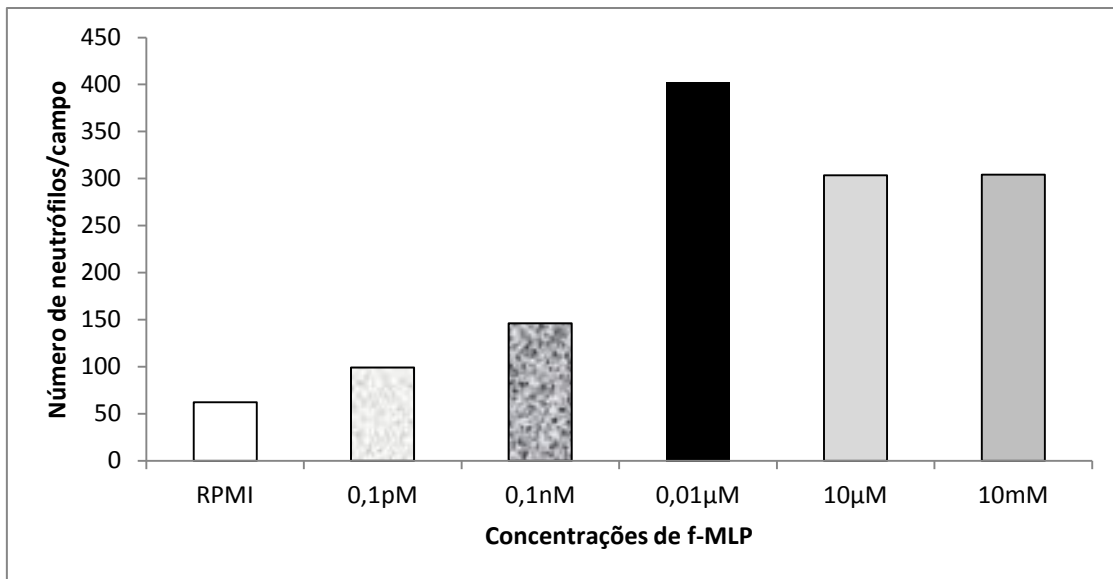


Figura 6. Representação gráfica da curva dose-efeito do número de neutrófilos migrados por campo. Número de neutrófilos migrados em resposta a diferentes concentrações de f-MLP. A solução utilizada para os testes de quimiotaxia em pacientes e controles foi a de 0,01µM.

5.6.3.2. Avaliação da quimiotaxia de neutrófilos em pacientes e controles

Em todos os ensaios com pacientes portadores de ICV foi incluído um controle saudável.

Na parte inferior da câmara, foram adicionados 28µl do RPMI puro e o quimioatrativo f-MLP na solução padrão (solução 0,01µM) conforme a curva dose efeito de neutrófilos migrados e na parte superior, 50µl de neutrófilos ($1,0 \times 10^6$ neutrófilos/ml). Após a incubação, o filtro de polycarbonato foi retirado e procedeu-se à fixação e à coloração.

O índice quimiotático foi dado pela razão entre o número de neutrófilos migrados/campo com o quimioatrativo, a f-MLP, e o número de neutrófilos migrados/campo com o meio RPMI. Associada ao índice quimiotático, foi avaliada a diferença entre a migração ^(18, 21, 129) frente ao f-MLP e a migração frente ao RPMI para os pacientes e controles.

5.6.4. Avaliação da sinalização de TLRs em neutrófilos

Para o estudo das vias de sinalização, os neutrófilos obtidos por separação pelo gradiente de Ficoll-Hypaque foram centrifugados a 1200rpm em 5 minutos e ressuspensos em meio RPMI. A suspensão total de neutrófilos foi dividida em tubos, cada um com 180µl contendo $1,0 \times 10^6$ neutrófilos/ml.

5.6.4.1. Incubação dos neutrófilos com estímulos

LPS (lipopolissacarídeo – LPS, *Escherichia coli* 055: B5 – de Sigma – St Louis, MO) e P3C (lipopeptídeo Pam₃CYS - (S)-(2,3-bis (palmitoyloxy)-(2RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser(S)-Lys₄-OH trihydrochloride) foram utilizados como estímulos, na concentração de 100ng/ml.

Os neutrófilos foram estimulados com LPS e P3C e incubados (37⁰C e 5% de CO₂). Inicialmente, foi realizada a cinética de estímulos nos tempos 5, 15, 30 e 60 minutos. Uma amostra de células de um dos tubos não recebeu estímulo (SE). Como não houve variação significativa na cinética em relação aos outros tempos e já se tendo observado fosforilação mais intensa com 15 minutos e queda da fosforilação aos 60 minutos, a via sinalização foi avaliada aos 15 e 60 minutos (Figura 7). Após a incubação dos neutrófilos com os estímulos, estes foram centrifugados a 4⁰, 1200rpm durante 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 100µl de solução de tampão de lise. Após homogeneização e centrifugação, as amostras foram estocadas a -80⁰C.

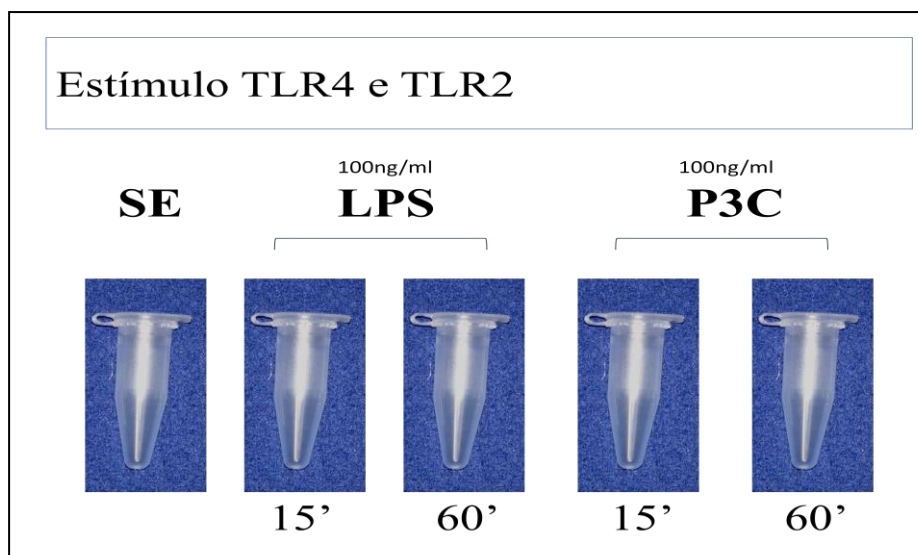


Figura 7. Representação dos tempos escolhidos e os estímulos utilizados para TLR2 e TLR4 dos neutrófilos.

5.6.4.2. Dosagem de proteínas

As proteínas totais foram dosadas por espectrofotometria. Procedeu-se à realização da curva padrão (Tabela 6), com dosagem de proteínas pelo método de Bradford ⁽¹³⁰⁾. Os 180 μ l do reagente de Bradford (bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foram adicionados a 20 μ l das amostras. A leitura de absorbância foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm (Victor x4, Perkin Elmer, CA, EUA).

A quantidade de proteína total foi determinada comparando-se os resultados com os da curva padrão e construídos com valores de concentração de soroalbumina (BSA, 1/10) de 0,2 μ g/ μ l a 1,6 μ g/ μ l, em triplicata.

Tabela 6. Dados da curva padrão para dosagem de proteínas

Identificação	Quantidade de BSA (1/10)	Quantidade do reagente de Bradford	Concentração de BSA
1	2µl	198µl	0,2µl/ml
2	4µl	196µl	0,4µl/ml
3	6µl	194µl	0,6µl/ml
4	8µl	192µl	0,8µl/ml
5	10µl	190µl	1,0µl/ml
6	12µl	188µl	1,2µl/ml
7	14µl	186µl	1,4µl/ml
8	16 µl	184 µl	1,6 µl/ml

5.6.4.3. *Western blot* ⁽¹³¹⁾

Para o western blot foram utilizados volumes contendo 40 µg de proteína total. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (gradiente de 4 – 12%) (NUPAGE Bis-Tris Gel/Invitrogen) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Invitrogen), que foi lavada com TBS (Tampao Tris-salina pH 7,2) por 5 minutos sob agitação seguida de bloqueio com 25ml de tampão de bloqueio (TBS, Tween-20 a 0,05% e leite em pó a 3%) por 1h. Depois do bloqueio, as membranas foram lavadas duas vezes, por 5 minutos, com 15 ml de tampão de diluição do anticorpo (TBS, Tween-20 a 0,05% e BSA a 4%). Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anti-MAPK p38 fosforilado e com anti-MAPK total (Cell Signaling, Danvers, MA, EUA) e mantidas em geladeira “overnight” sob agitação com estes anticorpos primários na diluição de 1: 1.000. As membranas foram lavadas quatro vezes por 5 minutos com 15 ml do tampão TBS-T (TBS, Tween-20 a 0,05%) e incubadas à temperatura ambiente por 1h com o anticorpo secundário (“ECL Rabbit IgG, HRP – linked”- GE healthcare/Amersham Biosciences) diluído em tampão de bloqueio na proporção de 1:2.000. Para a detecção das proteínas, as membranas foram lavadas com TBS-T uma

vez por 15 minutos, seguida de três lavagens com TBS-T por 5 minutos e, posteriormente, duas lavagens de 2 minutos com TBS. A revelação foi realizada com solução reveladora Immobilon™ Western- Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA, EUA) e procedeu-se à leitura em sistema de documentação fotográfica (ImageQuant 350, GE, Healthcare).

Após a revelação do *western blot*, realizou-se a densitometria em equipamento Kodak Image Station 4000R a fim de quantificar a densidade das bandas. Aos valores obtidos aplicou-se transformação logarítmica e normalização pelo valor da proteína encontrado. A expressão da intensidade da fosforilação foi dada por uma unidade arbitrária que equivale a razão encontrada entre o valor da banda referente ao estímulo (15 ou 60 minutos) pela banda referente à ausência do estímulo (SE). O valor final para análise dos dados foi apresentado como média das razões de cada estímulo e tempo.

5.7. Análise estatística

O aplicativo SPSS (versão 15.0, SSPS Inc., Chicago, IL) e GraphPad Prism software 6.0 (La Jolla, CA) e Excel 2007 foram utilizados para a análise estatística e a confecção dos gráficos.

A análise estatística foi descritiva. Variáveis categóricas foram descritas quanto à frequência absoluta e relativa. Variáveis contínuas foram descritas através de medidas de tendência central e de dispersão (média \pm DP).

Para o teste de significância estatística global foi utilizada a comparação das médias dos grupos a partir do teste t-student ou Mann-Whitney, conforme o teste de normalidade.

Para a análise dos dados da densitometria foi realizado um teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk) e o teste da diferença das médias entre os grupos (Mann-Whitney). O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

5.8. Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos em 22 de março de 2013 (Protocolo número 231.791). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 8.1, página 118) para a participação na pesquisa foi lido e assinado pelo participante e/ou seu responsável legal, antes de qualquer procedimento para a inclusão do paciente no estudo. A pesquisadora ficou disponível para discussão com o paciente/responsável e para esclarecimento de dúvidas que pudessem surgir. Considerou-se a faixa etária mínima de 13 anos, no momento da coleta dos dados. Para os três adolescentes foram obtidas assinaturas em documentos separados – um TCLE para o adolescente e outro para o/a pai/mãe ou responsável.

5.9. Referências bibliográficas

A pesquisa bibliográfica foi realizada a partir de base de dados do Medline interface Pubmed. Os artigos selecionados foram obtidos através do Portal de Periódicos da CAPES e de alguns trabalhos científicos referenciados por esses artigos também foram incluídos.

Os termos utilizados para a pesquisa foram: common variable immunodeficiency, chemotaxis, neutrophils, toll-like receptors, MAPK, assim como os

seus correspondentes em português. Foram incluídas as publicações em línguas inglesa e portuguesa.

As citações no texto foram numeradas, sendo que as referências bibliográficas foram organizadas em ordem de citação no texto, de acordo com as normas de Vancouver.

Bibliografia

1. Kaufmann SH. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nature immunology*. 2008;9(7):705-12.
2. Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Critical care medicine*. 2002;30(1 Supp):S1-S11.
3. Conley ME. Diagnostic guidelines--An International Consensus document. *Clinical immunology*. 1999;93(3):189.
4. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clinical immunology*. 1999;93(3):190-7.
5. Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Advances in immunology*. 2001;78:1-56.
6. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *British journal of haematology*. 2009;145(6):709-27.
7. Park MA, Li JT, Hagan JB, Maddox DE, Abraham RS. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *Lancet*. 2008;372(9637):489-502.

8. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. 2008;112(2):277-86.
9. Fried AJ, Bonilla FA. Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(3):396-414.
10. Reddy RC, Standiford TJ. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Current opinion in hematology*. 2010;17(1):18-24.
11. Mathis SP, Jala VR, Lee DM, Haribabu B. Nonredundant roles for leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2 in inflammatory arthritis. *Journal of immunology*. 2010;185(5):3049-56.
12. Tavares-Murta BM, Zaparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CH, Murta EF, et al. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Critical care medicine*. 2002;30(5):1056-61.
13. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(8):519-31.
14. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 2010;330(6002):362-6.
15. Houghton AM. Mechanistic links between COPD and lung cancer. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(4):233-45.
16. Clark RA, Kimball HR. Defective granulocyte chemotaxis in the Chediak-Higashi syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 1971;50(12):2645-52.
17. D'Amelio R, Rossi P, Le Moli S, Aiuti F. Defective neutrophil chemotaxis in hypogammaglobulinemia and selective IgA deficiency. *Clinical immunology and immunopathology*. 1980;16(3):287-96.

18. Ito R, Mori M, Katakura S, Kobayashi N, Naruto T, Osamura Y, et al. Selective insufficiency of IFN-gamma secretion in patients with hyper-IgE syndrome. *Allergy*. 2003;58(4):329-36.
19. Pahwa SG, Smithwick EM, Grimes ER, O'Reilly RJ, Pahwa RN, Good RA. Chemotactic defects in severe combined immunodeficiency. *The Journal of pediatrics*. 1978;92(1):43-50.
20. Phillips ML, Schwartz BR, Etzioni A, Bayer R, Ochs HD, Paulson JC, et al. Neutrophil adhesion in leukocyte adhesion deficiency syndrome type 2. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96(6):2898-906.
21. Van Epps DE, El-Naggar A, Ochs HD. Abnormalities of lymphocyte locomotion in immunodeficiency disease. *Clinical and experimental immunology*. 1983;53(3):679-88.
22. Zicha D, Allen WE, Brickell PM, Kinnon C, Dunn GA, Jones GE, et al. Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome. *British journal of haematology*. 1998;101(4):659-65.
23. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782-7.
24. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(25):13766-71.
25. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current opinion in immunology*. 2002;14(1):103-10.
26. O'Mahony DS, Pham U, Iyer R, Hawn TR, Liles WC. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *International journal of medical sciences*. 2008;5(1):1-8.
27. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*. 2005;17(1):1-14.

28. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
29. Cunningham-Rundles C, Radigan L, Knight AK, Zhang L, Bauer L, Nakazawa A. TLR9 activation is defective in common variable immune deficiency. *Journal of immunology*. 2006;176(3):1978-87.
30. Escobar D, Pons J, Clemente A, Iglesias J, Regueiro V, Bengoechea JA, et al. Defective B cell response to TLR9 ligand (CpG-ODN), *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* extracts in common variable immunodeficiency patients. *Cellular immunology*. 2010;262(2):105-11.
31. Kim D, Haynes CL. The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression. *The Analyst*. 2013;138(22):6826-33.
32. Xu N, Hossain M, Liu L. Pharmacological inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases affects KC/CXCL1-induced intraluminal crawling, transendothelial migration, and chemotaxis of neutrophils in vivo. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:290565.
33. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nature genetics*. 2005;37(8):829-34.
34. Cunningham-Rundles C, Knight AK. Common variable immune deficiency: reviews, continued puzzles, and a new registry. *Immunologic research*. 2007;38(1-3):78-86.
35. Urschel S, Kayikci L, Wintergerst U, Notheis G, Jansson A, Belohradsky BH. Common variable immunodeficiency disorders in children: delayed diagnosis despite typical clinical presentation. *The Journal of pediatrics*. 2009;154(6):888-94.
36. Salzer U, Unger S, Warnatz K. Common variable immunodeficiency (CVID): exploring the multiple dimensions of a heterogeneous disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1250:41-9.

37. Primary immunodeficiency diseases. Report of an IUIS Scientific Committee. International Union of Immunological Societies. Clinical and experimental immunology. 1999;118 Suppl 1:1-28.
38. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. Clinical immunology. 1999;92(1):34-48.
39. Agarwal S, Cunningham-Rundles C. Assessment and clinical interpretation of reduced IgG values. Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology. 2007;99(3):281-3.
40. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, et al. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. Journal of immunology. 2007;178(6):3932-43.
41. North ME, Webster AD, Farrant J. Defects in proliferative responses of T cells from patients with common variable immunodeficiency on direct activation of protein kinase C. Clinical and experimental immunology. 1991;85(2):198-201.
42. Eades-Perner AM, Gathmann B, Knerr V, Guzman D, Veit D, Kindle G, et al. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2004-06. Clinical and experimental immunology. 2007;147(2):306-12.
43. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, et al. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. Journal of clinical immunology. 2007;27(3):308-16.
44. Bonilla FA, Geha RS. Common variable immunodeficiency. Pediatric research. 2009;65(5 Pt 2):13R-9R.
45. Hammarstrom L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). Clinical and experimental immunology. 2000;120(2):225-31.

46. Vorechovsky I, Cullen M, Carrington M, Hammarstrom L, Webster AD. Fine mapping of IGAD1 in IgA deficiency and common variable immunodeficiency: identification and characterization of haplotypes shared by affected members of 101 multiple-case families. *Journal of immunology*. 2000;164(8):4408-16.
47. Schaffer AA, Pfannstiel J, Webster AD, Plebani A, Hammarstrom L, Grimbacher B. Analysis of families with common variable immunodeficiency (CVID) and IgA deficiency suggests linkage of CVID to chromosome 16q. *Human genetics*. 2006;118(6):725-9.
48. Aghamohammadi A, Mohammadi J, Parvaneh N, Rezaei N, Moin M, Espanol T, et al. Progression of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency. *International archives of allergy and immunology*. 2008;147(2):87-92.
49. Kondratenko I, Amlot PL, Webster AD, Farrant J. Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. MRC Immunodeficiency Group. *Clinical and experimental immunology*. 1997;108(1):9-13.
50. Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarstrom Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nature genetics*. 2005;37(8):820-8.
51. Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam KP, et al. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(1):35-9.
52. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Drager R, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nature immunology*. 2003;4(3):261-8.
53. Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, Bohm J, et al. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(33):13945-50.

54. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Shinozaki K, Yamada S, Komiyama A. Plasma cell generation from B-lymphocytes via CD27/CD70 interaction. *Leukemia & lymphoma*. 1999;35(3-4):219-25.
55. Ochtrop ML, Goldacker S, May AM, Rizzi M, Draeger R, Hauschke D, et al. T and B lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency. *Blood*. 2011;118(2):309-18.
56. Warnatz K, Denz A, Drager R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, 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*. 2002;99(5):1544-51.
57. Bonilla FA, Bernstein IL, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2005;94(5 Suppl 1):S1-63.
58. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008;111(1):77-85.
59. Yong PF, Tarzi M, Chua I, Grimbacher B, Chee R. Common variable immunodeficiency: an update on etiology and management. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2008;28(2):367-86, ix-x.
60. Wheat WH, Cool CD, Morimoto Y, Rai PR, Kirkpatrick CH, Lindenbaum BA, et al. Possible role of human herpesvirus 8 in the lymphoproliferative disorders in common variable immunodeficiency. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(4):479-84.
61. Kinlen LJ, Webster AD, Bird AG, Haile R, Peto J, Soothill JF, et al. Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinaemia. *Lancet*. 1985;1(8423):263-6.
62. Mellekjaer L, Hammarstrom L, Andersen V, Yuen J, Heilmann C, Barington T, et al. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable

immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clinical and experimental immunology*. 2002;130(3):495-500.

63. Busse PJ, Farzan S, Cunningham-Rundles C. Pulmonary complications of common variable immunodeficiency. *Annals of allergy, asthma & immunology* : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology. 2007;98(1):1-8; quiz -11, 43.

64. Sherani K, Upadhyay H, Vakil A, Cervellione K, Thurm C. Common variable immunodeficiency and bronchiectasis: an easily missed common association. *Chest*. 2014;145(3 Suppl):123A.

65. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Galicier L, Lepelletier Y, Webster D, et al. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. *Blood*. 2004;104(8):2441-3.

66. Yu JE, Knight AK, Radigan L, Marron TU, Zhang L, Sanchez-Ramon S, et al. Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(2):349-56, 56 e1-3.

67. Cunningham-Rundles C. How I treat common variable immune deficiency. *Blood*. 2010;116(1):7-15.

68. Agarwal S, Cunningham-Rundles C. Treatment of hypogammaglobulinemia in adults: a scoring system to guide decisions on immunoglobulin replacement. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(6):1699-701.

69. Chapel HM, Spickett GP, Ericson D, Engl W, Eibl MM, Bjorkander J. The comparison of the efficacy and safety of intravenous versus subcutaneous immunoglobulin replacement therapy. *Journal of clinical immunology*. 2000;20(2):94-100.

70. Gardulf A, Andersen V, Bjorkander J, Ericson D, Froland SS, Gustafson R, et al. Subcutaneous immunoglobulin replacement in patients with primary antibody deficiencies: safety and costs. *Lancet*. 1995;345(8946):365-9.

71. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. 2012;119(7):1650-7.
72. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777-89.
73. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997;91(3):295-8.
74. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Seminars in immunology*. 1998;10(5):349-50.
75. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Seminars in immunology*. 1998;10(5):351-3.
76. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(3):173-82.
77. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
78. Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, Yang D, Gong WH, Yoshimura T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *Journal of leukocyte biology*. 2001;69(5):698-704.
79. Korn ED. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiological reviews*. 1982;62(2):672-737.
80. Oliver JM, Berlin RD. Surface and cytoskeletal events regulating leukocyte membrane topography. *Seminars in hematology*. 1983;20(4):282-304.
81. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994;84(7):2068-101.
82. Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration during endotoxemia. *Journal of leukocyte biology*. 1999;66(1):10-24.

83. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International immunopharmacology*. 2013;17(4):1185-97.
84. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International immunopharmacology*. 2013;17(3):638-50.
85. Shimizu Y, Daniels RH, Elmore MA, Finnen MJ, Hill ME, Lackie JM. Agonist-stimulated Cl⁻ efflux from human neutrophils. A common phenomenon during neutrophil activation. *Biochemical pharmacology*. 1993;45(9):1743-51.
86. Chaly YV, Paleolog EM, Kolesnikova TS, Tikhonov, II, Petratchenko EV, Voitenok NN. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *European cytokine network*. 2000;11(2):257-66.
87. Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thrombosis and haemostasis*. 1995;74(1):224-7.
88. Turner NC, Wood LJ, Foster M, Gueremy T. Effects of PAF, FMLP and opsonized zymosan on the release of ECP, elastase and superoxide from human granulocytes. *The European respiratory journal*. 1994;7(5):934-40.
89. Koike H, Imanishi N, Natsume Y, Morooka S. Effects of platelet activating factor receptor antagonists on intracellular platelet activating factor function in neutrophils. *European journal of pharmacology*. 1994;269(3):299-309.
90. Sugawara T, Miyamoto M, Takayama S, Kato M. Separation of neutrophils from blood in human and laboratory animals and comparison of the chemotaxis. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 1995;33(2):91-100.
91. Katanaev VL. Signal transduction in neutrophil chemotaxis. *Biochemistry Biokhimiia*. 2001;66(4):351-68.
92. Harvath L. Neutrophil chemotactic factors. *Exs*. 1991;59:35-52.

93. Alves-Filho JC, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C, Benjamim CF, Basile-Filho A, Arraes SM, et al. Neutrophil function in severe sepsis. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2006;6(2):151-8.
94. Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, Hummel T, Chouker A, Peter K, et al. Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. *Shock*. 2006;26(3):254-61.
95. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*. 2008;30 Suppl 1:3-9.
96. Steerman RL, Snyderman R, Leikin SL, Colten HR. Intrinsic defect of the polymorphonuclear leucocyte resulting in impaired chemotaxis and phagocytosis. *Clinical and experimental immunology*. 1971;9(6):939-46.
97. Dotta L, Parolini S, Prandini A, Tabellini G, Antolini M, Kingsmore SF, et al. Clinical, laboratory and molecular signs of immunodeficiency in patients with partial oculo-cutaneous albinism. *Orphanet journal of rare diseases*. 2013;8:168.
98. Freeman AF, Holland SM. The hyper-IgE syndromes. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2008;28(2):277-91, viii.
99. Buchbinder D, Nugent DJ, Phillipovich AH. Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, current management, and emerging treatments. *The application of clinical genetics*. 2014;7:55-66.
100. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6):973-83.
101. Frazao JB, Errante PR, Condino-Neto A. Toll-like receptors' pathway disturbances are associated with increased susceptibility to infections in humans. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2013;61(6):427-43.
102. Akira S. TLR signaling. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;311:1-16.

103. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(5):979-87; quiz 88.
104. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Current opinion in immunology*. 2000;12(1):13-9.
105. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003;102(7):2660-9.
106. Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *Journal of leukocyte biology*. 2005;77(6):886-92.
107. Zahringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*. 2008;213(3-4):205-24.
108. Hayashi EA, Akira S, Nobrega A. Role of TLR in B cell development: signaling through TLR4 promotes B cell maturation and is inhibited by TLR2. *Journal of immunology*. 2005;174(11):6639-47.
109. Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LA. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nature immunology*. 2012;13(6):535-42.
110. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*. 2007;26(22):3214-26.
111. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2011;75(1):50-83.
112. Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(8):2262-71.
113. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research*. 2005;15(1):11-8.

114. Aouadi M, Laurent K, Prot M, Le Marchand-Brustel Y, Binetruy B, Bost F. Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages. *Diabetes*. 2006;55(2):281-9.
115. Aomatsu K, Kato T, Fujita H, Hato F, Oshitani N, Kamata N, et al. Toll-like receptor agonists stimulate human neutrophil migration via activation of mitogen-activated protein kinases. *Immunology*. 2008;123(2):171-80.
116. Cara DC, Kaur J, Forster M, McCafferty DM, Kubes P. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in chemokine-induced emigration and chemotaxis in vivo. *Journal of immunology*. 2001;167(11):6552-8.
117. Shen YH, Zhang L, Gan Y, Wang X, Wang J, LeMaire SA, et al. Up-regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) mediates p38 MAPK stress signal-induced inhibition of insulin signaling. A cross-talk between stress signaling and insulin signaling in resistin-treated human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(12):7727-36.
118. Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science*. 2004;304(5673):1014-8.
119. Doyle SE, O'Connell RM, Miranda GA, Vaidya SA, Chow EK, Liu PT, et al. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(1):81-90.
120. Marron TU, Yu JE, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor function in primary B cell defects. *Frontiers in bioscience*. 2012;4:1853-63.
121. Taraldsrud E, Fevang B, Aukrust P, Beiske KH, Floisand Y, Froland S, et al. Common variable immunodeficiency revisited: normal generation of naturally occurring dendritic cells that respond to Toll-like receptors 7 and 9. *Clinical and experimental immunology*. 2014;175(3):439-48.
122. Al-Nakeeb S, Thompson EN. Assessment of neutrophil chemotaxis and random migration in childhood. Comparison between leading-front and lower surface count methods. *Archives of disease in childhood*. 1980;55(4):296-8.

123. Ferrante A, Thong YH. A rapid one-step procedure for purification of mononuclear and polymorphonuclear leukocytes from human blood using a modification of the Hypaque-Ficoll technique. *Journal of immunological methods*. 1978;24(3-4):389-93.
124. Bignold LP, Ferrante A. Mechanism of separation of polymorphonuclear leukocytes from whole blood by the one-step Hypaque-Ficoll method. *Journal of immunological methods*. 1987;96(1):29-33.
125. Falk W, Goodwin RH, Jr., Leonard EJ. A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *Journal of immunological methods*. 1980;33(3):239-47.
126. Harvath L, Falk W, Leonard EJ. Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. *Journal of immunological methods*. 1980;37(1):39-45.
127. Mrowietz U, Jurgens G. A method for the determination of leukocyte migration for large sample numbers by automated densitometric quantification. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 1995;30(1):49-58.
128. Herrmann JM, Bernardo J, Long HJ, Seetoo K, McMenamin ME, Batista EL, Jr., et al. Sequential chemotactic and phagocytic activation of human polymorphonuclear neutrophils. *Infection and immunity*. 2007;75(8):3989-98.
129. Wan T, Yeung C, Tam A. Neutrophil functions of Chinese neonates. *Journal of paediatrics and child health*. 2000;36(2):153-8.
130. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
131. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods*. 2006;38(4):283-93.

Anexos

8. ANEXOS

8.1. PROTOCOLO DE PESQUISA

<p style="text-align: center;">AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E SINALIZAÇÃO ATIVADA POR AGONISTAS TOLL EM PACIENTES PORTADORES DE IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL</p>
--

Número do protocolo _____ Número do registro _____
--

1. IDENTIFICAÇÃO:

- Nome do paciente: _____ Telefone: _____
- Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: __ Sexo: Masculino Feminino
- Naturalidade: _____ Cor: Branco Pardo Preto
- Profissão: _____ Estado Civil: Solteiro Casado Divorciado
- Escolaridade: analfabeto 1 grau 2 grau 3 grau
- Endereço atual: _____

2. QUADRO CLÍNICO atual:

Sem queixas () / Com queixas não infecciosas () Qual? _____

3. CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA

- A. () sem complicações (apenas infecções)
- B. () autoimunidade
- C. () infiltração linfocítica policlonal
- D. () malignidade
- E. () enteropatia

4. HISTORIA DA DOENÇA

Idade do paciente ao diagnóstico: ___/___(mês/ano)

Data do diagnóstico: ___/___/___ Manifestações iniciais: ___/___(mês/ano)

Tempo entre inicio dos sintomas e diagnóstico: _____

Pneumonia sim não / n. episódios () / Sinusite sim não / n. episódios ()

Bronquiectasia sim não / n. episódios () / Otite sim não / n. episódios ()

Diarreia sim não / n. episódios () Crônica sim não () biópsia: _____

Neoplasia sim não / n. episódios () Autoimune sim não / n. episódios ()

Qual: _____ Outro sim não / qual: _____ n. episódios ()

Internação: sim não / n. episódios () / UTI: sim não / n. episódios ()

IgEv sim não / inicio: : ___/___(mês/ano) / Antibiótico profilático: sim não

Sinais e sintomas após tratamento: Mantidos: sim não Diminuídos: sim não

Aumentados: sim não Doença: _____ / N. episódios ()

5. DIAGNÓSTICO

Exames	Resultados	Data do exame	Outros exames
IgG/IgA/IgM			
Isohemaglutininas			
CD19			
CD4			
CD8			
NK			
Hemograma			
TC de tórax			

6. SEPARACAO DE NEUTRÓFILOS (data da realização=data da coleta)

Numero de células: _____

7. ENSAIO DA QUIMIOTAXIA DE NEUTROFILOS

Variáveis	Resultados
Data da realização exame=data coleta (__/__/____)	IQ=
RPMI / paciente (neutrófilos/campo)	
f-MLP/ paciente (neutrófilos/campo)	
RPMI / controle (neutrófilos/campo)	
f-MLP / controle (neutrófilos/campo)	

8. SINALIZACAO DE TLR EM NEUTROFILOS

Data	Dados	Resultado	Resultado
	Estímulo	LPS	P3C
	Tempos dos estímulos	NS/15/60	NS/15/60
	Curva padrão/Dosagem de proteína (placa)		
	Western blot/densitometria		

8.2. Termos de consentimento livre e esclarecido

8.2.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - ADULTO

Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP)

UFMG/PBH

**Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E
SINALIZAÇÃO ATIVADA POR AGONISTAS *TOLL* EM PACIENTES
PORTADORES DE IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL**

Tendo em vista o fato de que os neutrófilos são células do organismo responsáveis pela defesa contra infecções, este estudo tem como objetivo avaliar a atuação de neutrófilos nos pacientes com imunodeficiência comum variável, os quais têm infecções recorrentes. Este estudo será importante para a melhor compreensão da defesa imunológica do paciente com imunodeficiência em relação às infecções que o acometem de forma repetida. Além disso, este estudo poderá contribuir para melhor entendimento da doença e para pesquisas futuras no tratamento dos pacientes com imunodeficiência comum variável.

Você está convidado a participar da pesquisa e, caso concorde os seguintes procedimentos serão realizados: uma entrevista, coleta de dados do seu prontuário e coleta de 10 ml sangue.

Risco: o desconforto da coleta do sangue. A coleta poderá ser realizada em conjunto com a programação de controles laboratoriais do seu seguimento ambulatorial.

Benefícios: contribuição para o entendimento melhor da atuação dos neutrófilos nos pacientes que têm infecções de repetição em decorrência desta deficiência

imunológica e contribuição para o entendimento e aperfeiçoamento do tratamento da imunodeficiência comum variável.

Confidencialidade: as informações pessoais, neste estudo serão confidenciais, até onde é permitido por lei. Em certas situações, pessoas responsáveis por assegurar que o estudo foi conduzido apropriadamente, poderão rever os dados confidenciais. Pessoas não envolvidas no estudo não terão acesso a nenhuma informação pessoal.

Desligamento da pesquisa: a sua participação neste estudo é voluntária. Sua recusa em participar ou se desligar do estudo não sofrerá nenhuma penalidade nem perderá os benefícios aos quais tem direito. Se você desistir de participar, seu acompanhamento médico não será prejudicado.

Compensação financeira: você não receberá qualquer compensação financeira por sua participação neste estudo.

Contatos com a comissão de ética: se você tiver qualquer dúvida sobre seus direitos como participante da pesquisa, você poderá telefonar para o Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) ou COEP (UFMG) (XX-31) 34094592. Endereço: Avenida Antônio Carlos, 6626 – Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil- CEP 31.270.901.

CONSENTIMENTO

Declaro, por livre e espontânea vontade, que eu _____,
RG _____, CPF _____, residente à rua

aceito participar da pesquisa intitulada “AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E SINALIZAÇÃO ATIVADA POR AGONISTAS TOLL EM

PACIENTES PORTADORES DE IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL”, projeto de tese de doutorado da médica Patrícia Cristina Gomes Pinto, promovido pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG, sob a orientação do Prof. Dr. Jorge de Andrade Pinto e co-orientação do Prof. Dr. Marcus Vinícius Melo de Andrade.

Esta pesquisa tem o objetivo de avaliar a migração de neutrófilos e sinalização ativada por agonistas toll em pacientes portadores de imunodeficiência comum variável.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como: a) entrevista com profissional da saúde; b) coleta de 10 ml de sangue para a realização de exames;

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta e, esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados à pesquisa.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação, que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e, que a desistência não influenciará no atendimento que venho recebendo.

De acordo,

___/___/___

Assinatura do paciente

Data

Belo Horizonte, _____/_____/_____

Assinatura dos investigadores:

Patrícia Cristina Gomes Pinto (31-34099822/32-99794100)

Prof. Dr. Jorge Andrade Pinto (31-34099822)

Prof. Dr. Marcus Vinícius Melo de Andrade (31- 34098054)

Obs.: Cópias assinadas do consentimento devem ser: a) arquivadas pelo investigador principal, b) anexadas ao prontuário do paciente e c) fornecidas ao paciente.

Contatos com a comissão de ética: se você tiver qualquer dúvida sobre seus direitos como participante da pesquisa, você poderá telefonar para o Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) ou COEP (UFMG) (XX-31) 34094592. Endereço: Avenida Antônio Carlos, 6626 – Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil- CEP 31.270.901.

8.2.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - PAIS/RESPONSÁVEIS

Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP)

UFMG/PBH

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E SINALIZAÇÃO ATIVADA POR AGONISTAS *TOLL* EM PACIENTES PORTADORES DE IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL

Tendo em vista o fato de que os neutrófilos são células do organismo responsáveis pela defesa contra infecções, este estudo tem como objetivo avaliar a atuação de neutrófilos nos pacientes com imunodeficiência comum variável, os quais têm infecções recorrentes. Este estudo será importante para a melhor compreensão da defesa imunológica do paciente com imunodeficiência em relação às infecções que o acometem de forma repetida. Além disso, este estudo poderá contribuir para melhor entendimento da doença e para pesquisas futuras no tratamento dos pacientes com imunodeficiência comum variável.

Seu filho (a) está convidado a participar da pesquisa e, caso você concorde os seguintes procedimentos serão realizados: uma entrevista, coleta de dados do seu prontuário e coleta de 10 ml sangue.

Risco: o desconforto da coleta do sangue. A coleta poderá ser realizada em conjunto com a programação de controles laboratoriais do seguimento ambulatorial de seu (sua) filho (a).

Benefícios: contribuição para o entendimento melhor da atuação dos neutrófilos nos pacientes que têm infecções de repetição em decorrência desta deficiência

imunológica e contribuição para o entendimento e aperfeiçoamento do tratamento da imunodeficiência comum variável.

Confidencialidade: as informações pessoais, neste estudo serão confidenciais, até onde é permitido por lei. Em certas situações, pessoas responsáveis por assegurar que o estudo foi conduzido apropriadamente, poderão rever os dados confidenciais. Pessoas não envolvidas no estudo não terão acesso a nenhuma informação pessoal.

Desligamento da pesquisa: a participação de seu (sua) filho (a) neste estudo é voluntária. A sua recusa de que seu (sua) filho (a) participe ou se desligue do estudo não sofrerá nenhuma penalidade e ele (a) não perderá os benefícios aos quais tem direito. Se você desistir da participação de seu (sua) filho (a) no estudo, o acompanhamento médico dele (a) não será prejudicado.

Compensação financeira: você e seu (sua) filho (a) não receberão qualquer compensação financeira pela participação neste estudo.

Contatos com a comissão de ética: se você tiver qualquer dúvida sobre o direito de seu (sua) filho (a) como participante da pesquisa, você poderá telefonar para o Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) ou COEP (UFMG) (XX-31) 34094592. Endereço: Avenida Antônio Carlos, 6626 – Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil- CEP 31.270.901.

CONSENTIMENTO

Declaro, por livre e espontânea vontade, que permito a participação de meu (minha) filho (a) _____ com idade de ____ anos, RG/CPF _____ residente à rua _____ na pesquisa intitulada “AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E

SINALIZAÇÃO ATIVADA POR AGONISTAS TOLL EM PACIENTES PORTADORES DE IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL”, projeto de tese de doutorado da médica Patrícia Cristina Gomes Pinto, promovido pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG, sob orientação do Prof. Dr. Jorge de Andrade Pinto e co-orientação do Prof. Dr. Marcus Vinícius Melo de Andrade.

Esta pesquisa tem o objetivo de avaliar a migração de neutrófilos e sinalização ativada por agonistas toll em pacientes portadores de imunodeficiência comum variável.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como: a) entrevista com profissional da saúde; b) coleta de 10 ml de sangue para a realização de exames;

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta e, esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados à pesquisa.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação do meu (minha) filho (a), que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e, que a desistência não influenciará no atendimento que meu (minha) filho (a) vem recebendo.

De acordo,

___/___/___

Assinatura do pai/responsável pelo paciente

Data

Belo Horizonte, _____/_____/_____

Assinatura do investigador:

Patrícia Cristina Gomes Pinto (31-34099822/32-99794100)

Prof. Dr. Jorge Andrade Pinto (31-34099822)

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade (31-34098054)

Obs.: Cópias assinadas do consentimento devem ser: a) arquivadas pelo investigador principal, b) anexadas ao prontuário do paciente e c) fornecidas ao paciente.

Contatos com a comissão de ética: se você tiver qualquer dúvida sobre seus direitos como participante da pesquisa, você poderá telefonar para o Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) ou COEP (UFMG) (XX-31) 34094592. Endereço: Avenida Antônio Carlos, 6626 – Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil- CEP 31.270.901.

**8.2.3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO /
ADOLESCENTE (13 a17 anos)**

Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP)

UFMG/PBH

**Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E
SINALIZAÇÃO ATIVADA POR AGONISTAS *TOLL* EM PACIENTES
PORTADORES DE IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL**

Tendo em vista o fato de que os neutrófilos são células do organismo responsáveis pela defesa contra infecções, este estudo tem como objetivo avaliar a atuação de neutrófilos nos pacientes com imunodeficiência comum variável, os quais têm infecções recorrentes. Este estudo será importante para a melhor compreensão da defesa imunológica do paciente com imunodeficiência em relação às infecções que o acometem de forma repetida. Além disso, este estudo poderá contribuir para melhor entendimento da doença e para pesquisas futuras no tratamento dos pacientes com imunodeficiência comum variável.

Você está convidado a participar da pesquisa e, caso concorde os seguintes procedimentos serão realizados: uma entrevista, coleta de dados do seu prontuário e coleta de 10 ml sangue.

Risco: o desconforto da coleta do sangue. A coleta poderá ser realizada em conjunto com a programação de controles laboratoriais do seu seguimento ambulatorial.

Benefícios: contribuição para o entendimento melhor da atuação dos neutrófilos nos pacientes que têm infecções de repetição em decorrência desta deficiência

imunológica e contribuição para o entendimento e aperfeiçoamento do tratamento da imunodeficiência comum variável.

Confidencialidade: as informações pessoais, neste estudo serão confidenciais, até onde é permitido por lei. Em certas situações, pessoas responsáveis por assegurar que o estudo foi conduzido apropriadamente, poderão rever os dados confidenciais. Pessoas não envolvidas no estudo não terão acesso a nenhuma informação pessoal.

Desligamento da pesquisa: a sua participação neste estudo é voluntária. Sua recusa em participar ou se desligar do estudo não sofrerá nenhuma penalidade nem perderá os benefícios aos quais tem direito. Se você desistir de participar, seu acompanhamento médico não será prejudicado.

Compensação financeira: você não receberá qualquer compensação financeira por sua participação neste estudo.

Contatos com a comissão de ética: se você tiver qualquer dúvida sobre seus direitos como participante da pesquisa, você poderá telefonar para o Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) ou COEP (UFMG) (XX-31) 34094592. Endereço: Avenida Antônio Carlos, 6626 – Unidade Administrativa II, 2^o andar, sala 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil- CEP 31.270.901.

CONSENTIMENTO do adolescente

Eu _____ RG _____,
residente a rua _____ declaro,
por livre e espontânea vontade, que aceito participar da pesquisa intitulada
“AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E SINALIZAÇÃO ATIVADA
POR AGONISTAS TOLL EM PACIENTES PORTADORES DE

IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL”, projeto de tese de doutorado da médica Patrícia Cristina Gomes Pinto, promovido pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG, sob a orientação do Prof. Dr. Jorge de Andrade Pinto e co-orientação do Prof. Dr. Marcus Vinícius Melo de Andrade.

Esta pesquisa tem o objetivo de avaliar a migração de neutrófilos e sinalização ativada por agonistas toll em pacientes portadores de imunodeficiência comum variável.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como: a) entrevista com profissional da saúde; b) coleta de 10 ml de sangue para a realização de exames;

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta e, esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados à pesquisa.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação, que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e, que a desistência não influenciará no atendimento que venho recebendo.

De acordo,

___/___/___

Assinatura do paciente

Data

Belo Horizonte, _____/_____/_____

Assinatura dos investigadores:

Patrícia Cristina Gomes Pinto (31-34099822/32-99794100)

Prof. Dr. Jorge Andrade Pinto (31-34099822)

Prof. Dr. Marcus Vinícius Melo de Andrade (31 -34098054)

Obs.: Cópias assinadas do consentimento devem ser: a) arquivadas pelo investigador principal, b) anexadas ao prontuário do paciente e c) fornecidas ao paciente.

Contatos com a comissão de ética: se você tiver qualquer dúvida sobre seus direitos como participante da pesquisa, você poderá telefonar para o Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) ou COEP (UFMG) (XX-31) 34094592. Endereço: Avenida Antônio Carlos, 6626 – Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil- CEP 31.270.901.

8.3. Preparo de soluções

8.3.1. Soluções para separação, quimiotaxia e estímulos de neutrófilos:

1. PBS

Ingredientes	Quantidade	
	PBS - 1x	PBS - 10x
NaCl (cloreto de sódio)	8g	80g
KCl (cloreto de potássio)	0,2g	2g
KH ₂ PO ₄ (fosfato monobásico de potássio)	0,24g	2,4g
Na ₂ HPO ₄ (fosfato de sódio)	1,4g	14g

Completar com água MilliQsp _____ 1 litro/ pH=7,2

2. Solução de lise de neutrófilos

Ingredientes	Quantidade
NH ₄ Cl (cloreto de amônio)	8,29g
KHCO ₃ (bicarbonato de potássio)	1,0g
EDTA	0,0372g

Para 1 litro. Ajustar o pH em 7,3. Filtrar.

3. Solução tampão de neutrófilos: PBS 1x + SFB2% + 1mM de EDTA (1ml)

Ingredientes	Quantidade
PBS	880µl
SFB	20 µl
EDTA (solução de 1mM/100 µl)	100 µl

4. Solução de lise (*Lysis buffer* 1x)

Ingredientes	Quantidade
Glicerol	1ml
<i>Lysis buffer</i> 5x	2ml
<i>Protease inhibitor cocktail</i> (Sigma, St Louis, MO)	100µl
Comprimido <i>protease inhibitor cOplete</i> (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN))	1 unidade
Água destilada	Completar 10 ml

8.3.2. Preparo de soluções para o *western blot*

1. Running buffer 1x

Ingredientes	Quantidade
Água destilada	950ml
Running buffer (Nupage 20%)	50ml

2. Running buffer 1x com anti-oxidante

Ingredientes	Quantidade
Água destilada	950ml
Running buffer (Nupage 20%)	50ml
Antioxidante	1ml

3. Transfer buffer

Ingredientes	Quantidade
Água destilada	849ml
Transfer buffer (Nupage 20%)	50ml
Antioxidante	1ml
Metanol	100ml

Para transferência dupla foi utilizado metanol a 20%.

4. TBS 10x

Ingredientes	Quantidade
NaCl (cloreto de sódio)	80g
KCl (cloreto de potássio)	2g
Tris base	30g
Água destilada	800ml

Ajustar pH em 7,4. Autoclavar.

5. TBS 1x (a partir do TBS 10x)

Ingredientes	Quantidade
TBS 10x	100ml
Água destilada	900ml

6. TBS 1x 0,05% tween 20

Ingredientes	Quantidade
TBS 1x	1000ml
Tween 20	50 μ l

8.6. **Tabela 9.** Dados populacionais, classificação fenotípica e IQ dos pacientes portadores de ICV selecionados para o estudo da sinalização celular.

Paciente	Idade/sexo	Fenótipo	IQ
01	47/M	A	1,8
02	13/M	A	2,1
08	39/M	A	1,6
14	41/M	C	2,4
18	24/F	C	2,8
23	37/F	A	2,4
29	45/M	A	1,8
31	17/M	A	2,4
33	47/F	C	2,1
34	25/M	B	2,3
35	39/M	D	2,3

8.7. **Tabela 10.** Dados populacionais e IQ dos controles selecionados para o estudo da sinalização celular.

Controle	Idade/sexo	IQ
s	44/M	5,5
a	31/M	4,1
r	17/M	4,8
o	37/F	2,6
n	30/M	3,6
l	26/F	2,2
f	35/M	9,8