

Gisele Vanessa Baracho

ASPECTOS MOLECULARES DA
IMUNODEFICIÊNCIA COMUM E VARIÁVEL:
PAPEL DE X-BOX BINDING PROTEIN 1 (XBP-1),
UM FATOR DE TRANSCRIÇÃO ESSENCIAL NA
DIFERENCIAÇÃO DE PLASMÓCITOS

São Paulo
2006

Gisele Vanessa Baracho

ASPECTOS MOLECULARES DA
IMUNODEFICIÊNCIA COMUM E VARIÁVEL:
PAPEL DE X-BOX BINDING PROTEIN 1 (XBP-1),
UM FATOR DE TRANSCRIÇÃO ESSENCIAL NA
DIFERENCIAÇÃO DE PLASMÓCITOS

Tese de Doutorado apresentada
ao Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de concentração:
Imunologia

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

São Paulo
2006

Gisele Vanessa Baracho

ASPECTOS MOLECULARES DA
IMUNODEFICIÊNCIA COMUM E VARIÁVEL:
PAPEL DE X-BOX BINDING PROTEIN 1 (XBP-1),
UM FATOR DE TRANSCRIÇÃO ESSENCIAL NA
DIFERENCIAÇÃO DE PLASMÓCITOS

Tese de Doutorado apresentada
ao Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

São Paulo
2006

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

© reprodução total

Baracho, Gisele Vanessa.

Aspectos moleculares da imunodeficiência comum e variável: papel de X-box binding protein 1 (XBP-1), um fator de transcrição essencial para a diferenciação de plasmócitos / Gisele Vanessa Baracho. -- São Paulo, 2006.

Orientador: Luiz Vicente Rizzo.

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

Versão do título para o inglês: Molecular aspects of common variable immunodeficiency: a role for X-box binding protein 1 (XBP-1), a key transcription factor for plasma cell differentiation.

Descritores: 1. Imunodeficiência 2. CVID 3. XBP-1 4. IRE-1 alpha 5. Resposta de estresse celular 6. Linfócitos B I. Rizzo, Luiz Vicente II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB059/2006

Aos meus pais Guilherme e Lourdes

que apesar de todas as dificuldades,
apoiaram e sempre confiaram
nas minhas decisões

À minha irmã Janaina

pela compreensão e pela força
nos momentos mais
complicados de nossas vidas

Ao meu querido Axel

por sempre estar presente
e compartilhar objetivos tão
nobres que nos guiarão para
a mais completa felicidade

Aos meus sogros Horstpeter e Mabel

por cuidarem de mim como filha
e pelo exemplo de dignidade
e dedicação ao ensino e pesquisa

Aos meus familiares

por me acolherem com
tanto carinho e confiarem
nos meus esforços

Ao meu padrinho José

(09/08/1939 a 21/04/2006)

*Acreditei que você tiraria de letra e em breve estaria comigo.
Eu não pude te ver nem ouvir suas histórias pela última
vez por causa deste trabalho que sempre foi motivo
de orgulho para você. Se mais esta etapa está concluída foi
graças a você. Sinto muito por não estar aqui para te agradecer.
Nunca irei me esquecer que só consegui por causa de você.*

Agradecimentos

Ao Dr. Luiz Vicente Rizzo pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório na presença de pós-graduandos e pós-doutorandos tão estimulantes.

Às Dras. Cristina Kokron e Myrthes Toledo Barros do Serviço de Imunologia e Alergia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo que juntamente com Dr. Rizzo e equipe acompanharam cuidadosamente os pacientes analisados neste estudo e viabilizaram as colheitas de amostras.

À Dra. Maristela Martins de Camargo do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela colaboração frutífera.

Ao Dr. Júlio Aliberti do Departamento de Imunologia do Duke University Medical Center (Durham, NC, USA) onde foram analisadas lâminas por microscopia confocal.

Ao Dr. Paolo Zanoto e a pós-graduanda Juliana Velasco do Departamento de Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo por nos permitir utilizar o seqüenciador automático de seu laboratório.

Aos membros da minha Banca de Qualificação Dra. Lourdes Isaac, Dr. Antônio Condino Neto e Dr. Gustavo Amarante-Mendes do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela análise criteriosa do trabalho e sugestões.

Ao Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo por compartilhar conosco seus conhecimentos e manter as portas de seu laboratório sempre abertas para utilizarmos equipamentos e materiais sempre que necessário. E a todos os seus estudantes por nos receberem gentilmente e sempre dispostos a nos ajudar, além da amizade e respeito ao longo dos vários anos que trabalhamos juntos.

Ao nosso ex-técnico de laboratório Ulisses Rodrigues da Silva por sempre estar disposto a ajudar, pelas várias vezes que necessitamos de sua colaboração para

realizar as colheitas de sangue de voluntários e por nos auxiliar no manuseio de certos equipamentos do laboratório.

Aos estudantes do laboratório, Adriana Vallochi, Alessandra Commodaro, Angela Falcai, Ivo Marguti, Jean Estige, Julieta Genre, Lilia Rios, Luciana de Deus, Natália Nepomuceno, Paolo Errante, Rafael Larocca, Tatiana Takiishi pelo tempo de convivência, os quais sem dúvida foram fundamentais para o nosso amadurecimento científico. E a nossa “secretária” Laudicéia de Almeida por sua disposição e eficiência com que resolve qualquer problema.

Aos amigos pós-graduandos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo que ao longo dos últimos dez anos foram grandes amigos e ótimas companhias nos momentos mais inusitados.

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

Aos funcionários Moisés e André por sua amabilidade e aos demais funcionários do Instituto Ciências Biomédicas IV, da portaria, segurança e limpeza por zelarem pelo nosso bem estar dentro deste Instituto.

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

Abreviaturas

APC: *do inglês* "Antigen Presenting Cells", célula apresentadora de antígeno

PBMC: *do inglês* "Peripheral Blood Mononuclear Cells", Células Mononucleares de Sangue Periférico

BCR: *do inglês* "B Cell Receptor", receptor de célula B

CD: *do inglês* "Cluster of Differentiation", grupo de diferenciação

CVID: *do inglês* "Common Variable Immunodeficiency", Imunodeficiência Comum e Variável

DNA: *do inglês* "Deoxyribonucleic Acid, ácido deoxirribonucléico

cDNA: DNA complementar

EBV: *do inglês* "Epstein Barr Virus", vírus Epstein Barr

B-EBV: células B imortalizadas por EBV

HIGM: *do inglês* "Hiper-IgM Syndrom", Síndrome da Hiper-IgM

HLA: *do inglês* "Human Leucocyte Antigen", antígeno de leucócitos humanos

Ig: Imunoglobulina

mlg: Ig de membrana

IVIg: Ig intravenosa

IL-: interleucina

LPS: lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

MEF: *do inglês* "Mouse Embryonic Fibroblast", fibroblastos embrionários de camundongos

MHC: *do inglês* "Molecule Histocompatibility Complex", molécula do complexo principal de histocompatibilidade

MHC-I: MHC do tipo 1

MHC-II: MHC do tipo 2

PBS: "Phosphate Buffer Saline"

PHA: *do inglês* "Phytohemagglutinin A", fitohemaglutinina A

RE: retículo endoplasmático

mRNA: *do inglês* “message Ribonucleic Acid, ácido ribonucleico mensageiro

TAP: tapsigargina

TBS: *do inglês* “Tris Buffered Saline”

XLA: *do inglês* “X-Linked Agammaglobulinemia”, Agamaglobulinemia ligada ao X

Resumo

A Imunodeficiência Comum Variável (CVID) é uma deficiência primária humana caracterizada por hipogamaglobulinemia e infecções recidivantes, principalmente do trato respiratório. Os pacientes podem apresentar uma série de outras anormalidades no sistema imune tais como, números reduzidos de células de memória, déficit na resposta linfoproliferativa contra antígenos e mitógenos, produção diminuída de citocinas e defeitos na expressão de moléculas de adesão e ativação.

A caracterização molecular da CVID foi feita em um pequeno grupo de pacientes, revelando que a ausência de imunoglobulinas pode ser causada por defeitos nos mecanismos de ativação e/ou sobrevivência de linfócitos B. Estudos com modelos animais mostraram que a diferenciação terminal de linfócitos B em plasmócitos, depende da ativação do fator de transcrição X-box binding protein 1 (XBP-1). Os animais deficientes de XBP-1 apresentaram hipogamaglobulinemia e outras alterações que são semelhantes às características de pacientes com CVID. Desse modo, investigamos a possibilidade de que defeitos na expressão de XBP-1 poderiam estar associados a hipogamaglobulinemia observada na CVID.

A análise de lisados de células mononucleares de sangue periférico de 22 pacientes com CVID e 24 doadores saudáveis revelou a presença das proteínas não-processada, de 33 kDa (p33-XBP-1) e processada, de 54 kDa (p54-XBP-1). Porém, em um determinado paciente, designado de P8, a expressão da proteína de 54 kDa mostrou-se significativamente reduzida. Enquanto em indivíduos normais e nos demais pacientes, p54-XBP-1 correspondeu a 30-35% do total de XBP-1 em P8 essa expressão ficou abaixo de 10%.

Por meio de RT-PCR, foi observado um aumento de até 80% nos níveis de mRNA p33-XBP-1 no paciente P8. Em contrapartida, a expressão de mRNA de p54-XBP-1 estava reduzida em comparação com controle saudável. Observamos ainda um acúmulo de IgM no retículo endoplasmático de células de P8 e níveis reduzidos de IgM em sobrenadantes de culturas de células B imortalizadas com o vírus Epstein Barr (EBV), em relação às culturas de indivíduo saudável.

Todo o cDNA de XBP-1 do paciente P8 foi seqüenciado, sem que pudéssemos identificar qualquer mutação em sua seqüência. Da mesma forma, a região que origina o sítio de interação de IRE-1 α para posterior clivagem das moléculas de mRNA de XBP-1, também foi seqüenciada a partir de DNA genômico, sem revelar alterações.

Através da imortalização de linfócitos B com EBV obtivemos culturas celulares com mais de 90% de células CD19⁺, sem contaminação de outras populações de linfócitos e/ou monócitos. Além de constituir uma importante fonte de material para estudos futuros, essas culturas possibilitaram uma análise dinâmica da via de IRE-1 α /XBP-1. Por *western blot*, verificou-se uma redução significativa na expressão de p54-XBP-1 nas células dos pacientes em comparação aos controles. Além disso, o tratamento com tapsigargina, um indutor de estresse do retículo endoplasmático, levou a um aumento na expressão de IRE-1 α , que foi significativamente maior em células de controles do que nas dos pacientes com CVID.

Em conjunto, os nossos dados corroboram a hipótese que defeitos no processamento de mRNA podem prejudicar a geração das proteínas XBP-1 ativas (54 kDa) e conseqüentemente a secreção de imunoglobulinas. Isso nos permite sugerir que, em pelo menos um grupo de pacientes, defeitos na via de IRE-1 α /XBP-1 podem estar relacionados a um dos principais aspectos da CVID, a hipogamaglobulinemia.

Abstract

Common Variable Immunodeficiency is a primary human immunodeficiency characterized by hypogammaglobulinemia and recurrent infections, mainly of the respiratory tract. The patients can also present other immune-related abnormalities, including reduced numbers of memory cells, defects in the lymphoproliferative responses against antigens and mitogens, diminished cytokine production and reduced levels of some activation and adhesion molecules in the cell surface.

The molecular characterization of CVID was first made in a small group of patients, revealing that the absence of immunoglobulins can be a consequence of defects in the activation and/or survival mechanisms of B lymphocytes. Studies with animal models showed that the terminal B lymphocyte differentiation in antibody-producing plasma cells depends on the activation of the transcription factor X-Box Binding Protein 1 (XBP-1). XBP-1-deficient animals present hypogammaglobulinemia and other dysfunctions that are similar to those observed in CVID. Therefore we investigated the possibility that defects in XBP-1 expression could be related to human CVID.

The analysis of peripheral blood mononuclear cell lysates from 22 CVID patients and 24 healthy donors revealed the presence of the 33 kDa unprocessed and 54 kDa processed forms of the protein (p33-SBP-1 and p54-XBP-1, respectively). However in one particular patient, denoted by P8, expression of the 54 kDa form was significantly reduced. While in normal individuals and other patients, p54-XBP-1 corresponds to 30-35% of the total XBP-1 protein, in P8 this expression was below 10%.

By RT-PCR, we observed an 80% increase of the p33-XBP-1 mRNA levels in this patient. On the other hand expression of p54-XBP-1 mRNA levels was reduced in

relation to normal individuals. We also observed accumulation of IgM in the endoplasmic reticulum of P8 cells and reduced IgM levels in B cells that were immortalized with Epstein Barr virus (EBV), in comparison to cells derived from normal individuals.

Although we sequenced the entire XBP-1 cDNA of patient P8, we were not able to identify any mutation that could explain the reduction in p54-XBP-1 levels. Likewise the region that generates the interaction site for IRE-1 α was sequenced in the patient's genomic DNA and no mutation was found.

Homogeneous cultures in which more than 90% of the cells were CD19⁺, not contaminated by other lymphocytes or monocytes were obtained by EBV-immortalization of B lymphocytes from the patients. Besides constituting an important source of material for future studies, these cultures allowed a dynamic analysis of the IRE-1 α /XBP-1 pathway. We observed by western blot a significant reduction of in the expression of p54-XBP-1 in the patients' cells in comparison with controls. Treatment of these cells with tapsigargin, an inducer of endoplasmic reticulum stress, lead to an increase in the expression of IRE-1 α that was more intense in the controls' than in the patients' cells.

Taken together, our results corroborate the hypothesis that an impairment in the mRNA processing can affect the generation of active 54 kDa XBP-1 molecules and, consequently, production of immunoglobulins. We therefore suggest that, at least in a group of patients, defects in the IRE-1 α /XBP-1 pathway can be related to hypogammaglobulinemia, a major aspect of CVID.

*PARA SER GRANDE, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.*

Ricardo Reis (Fernando Pessoa)

Dedicatórias
Agradecimentos
Lista de abreviaturas
Resumo
Abstract
Epígrafe

Sumário

I - Introdução	26
I.1 - Imunodeficiência Comum Variável.....	26
I.2 - Aspectos moleculares da diferenciação de linfócitos B Implicações de defeitos nessas vias na Imunodeficiência Comum e Variável.....	34
I.2.1 - Defeitos na sinalização mediada por linfócitos T.....	34
I.2.2 - Defeitos na sinalização mediada por linfócitos B.....	42
I.2.3 - Participação de XBP-1 na diferenciação de linfócitos B.....	47
II - Objetivos	57
III - Materiais e Métodos	59
III.1- Pacientes.....	59
III.2- Isolamento de células.....	60
III.3 - SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	61
III.4- Extração de RNA total.....	63
III.5 - <i>Reverse-transcription polymerase chain reaction</i> (RT-PCR).....	63
III.5.1- <i>Nested</i> RT-PCR.....	65
III.6 - Análise de densitometria.....	66
III.7- Microscopia Confocal.....	67
III.8 - Extração de DNA genômico e PCR.....	68
III.9 - Clonagem de produtos de PCR.....	69
III.10 – Transformação.....	69
III.10.1- Preparo de bactérias competentes DH5 α	69
III.10.2 - Transformação de bactérias competentes.....	70
III.10.3 - Purificação dos plasmídeos contendo os insertos.....	70
III.11 - Seqüenciamento.....	71
III.12 - Imortalização de linfócitos B com vírus <i>Epstein Barr</i> (EBV).....	72
III.13- Análise de citometria de fluxo.....	72
III.14 - ELISA.....	73
III.15 - Estimulação de estresse celular.....	74
IV - Resultados	76
V - Discussão	100
VI - Conclusões	117
Referências Bibliográficas.....	119
Glossário	

I - Introdução

I.1 - Imunodeficiência Comum Variável

As imunodeficiências primárias são doenças raras, com uma incidência estimada de 1 em cada 5.000 indivíduos na população geral se somadas como um conjunto de doenças. Contudo, este valor poderia aumentar se as populações em acompanhamento clínico e de hospitais fossem consideradas. Por se tratar de doenças raras o diagnóstico nem sempre é óbvio, o que faz com que os pacientes recebam atendimento médico em diferentes especialidades antes que seja confirmado o quadro de imunodeficiência. Essa demora pode ser fatal nos casos em que os indivíduos desenvolvem doenças crônicas graves que poderiam ser evitadas através de tratamento precoce e adequado [CUNNINGHAM-RUNDLES, 2003].

Os sucessivos episódios infecciosos constituem a característica principal das imunodeficiências primárias. Considerando-se que as infecções são comuns, sobretudo durante a infância, independentemente da presença de defeitos no sistema imune, o diagnóstico com base no aparecimento deste sintoma representa outra dificuldade para a identificação dos pacientes. Além disso, os imunodeficientes podem manifestar inicialmente outras doenças, tais como alergias, doenças auto-imunes e linfoproliferativas.

Existem mais de 100 imunodeficiências descritas e cada vez mais se investiga os genes associados a estas doenças. Os benefícios desse entendimento são amplos, em particular porque auxiliam na classificação e diagnóstico mais precisos, incluindo diagnóstico pré-natal e possibilitando a investigação de novas estratégias de tratamento como a terapia gênica. Além disso, o estudo de doenças congênitas tem contribuído na identificação de novos genes relacionados às funções efetoras do

sistema imune, bem como para o esclarecimento de mecanismos que garantem a homeostase do sistema e impedem o surgimento de doenças auto-imunes e alergias [FISCHER, 2004]. Nesse sentido, o estudo com imunodeficientes, embora apresente muitas limitações, possui vantagens em relação à utilização de animais de experimentação, pois mostra as conseqüências "reais" de defeitos em moléculas específicas [FISCHER, 2004; NOTARANGELO *et al.*, 2004].

Outro aspecto importante de estudos *in vivo* seja com imunodeficientes ou com animais deficientes (*knockout*) para determinados genes é a possibilidade dos conhecimentos gerados serem aplicados no tratamento e compreensão de desordens imunológicas associadas a fatores não genéticos. Alguns fatores, como por exemplo, o uso de drogas imunossupressoras nas quimioterapias, malnutrição, condições ambientais extremas e certas infecções virais são capazes de desencadear um quadro de imunodeficiência, caracterizando uma imunodeficiência secundária, ou agravar as doenças de natureza congênita [SHEARER *et al.*, 2004].

Entre as imunodeficiências primárias, as deficiências de anticorpos correspondem a 50-65% dos casos. Aqui é importante notar que o diagnóstico de um déficit na produção de anticorpos é muito mais simples que o de qualquer função celular, seja ela de imunidade inata ou adquirida.

A deficiência de IgA (DIgA) é a de maior incidência na população podendo chegar a 1 em cada trezentas pessoas, a despeito de nem sempre ser sintomática. A Imunodeficiência Comum e Variável (CVID) perde em incidência apenas para a DIgA e é possível que ambas as patologias correspondam em alguns pacientes a um espectro da mesma doença ou defeito genético [KOKRON *et al.*, 2004]. Até o momento foram identificadas poucas mutações em genes específicos de linfócitos B, responsáveis pelas deficiências de anticorpos [NOTARANGELO *et al.*, 2004] e além do que discutiremos aqui foram apresentados novos trabalhos no 11 th Meeting of the

European Society for Immunodeficiencies (2004), inclusive descrevendo as bases moleculares da CVID [FRANCO JOSE *et al.* 2004].

Embora seja uma doença conhecida desde a década de 50 [JANEWAY *et al.*, 1953], ainda não foi possível estabelecer parâmetros consensuais para a classificação de pacientes com CVID. Sendo assim, antes da conclusão do diagnóstico de CVID é importante excluir a presença de outras síndromes, tais como Agamaglobulinemia ligada ao X (XLA), Síndrome da Hiper-IgM (HIGM), doença linfoproliferativa ligada ao X (síndrome de Duncan) ou até um prolongamento da imunodeficiência fisiológica da infância quando o diagnóstico é feito durante a segunda infância. A identificação de marcadores genéticos para várias destas doenças, incluindo CVID tem auxiliado o diagnóstico preciso e precoce.

Além de hipogamaglobulinemia, pacientes com CVID podem apresentar números reduzidos de linfócitos B, um sintoma característico de pacientes com XLA. Portanto, em pacientes do sexo masculino, principalmente os jovens, a distinção das duas deficiências era difícil, até a descoberta das bases moleculares da XLA [WESTON *et al.*, 2001]. Atualmente, sabe-se que cerca de 80-90% dos pacientes com XLA são portadores de mutações no gene da tirosina kinase de Bruton (*btk*), o que viabilizou o emprego de testes genéticos para a caracterização desta deficiência [BONILLA & GERA, 2003].

Pacientes com CVID podem apresentar níveis normais de IgM o que também ocorre na HIGM. Contudo, a distinção dessas duas deficiências já pode ser feita através de critérios moleculares graças à identificação, em pacientes com HIGM, de mutações em pelo menos quatro genes distintos: *CD40*, *CD154*, *AICDA* (“activation-induced cytidine deaminase”) e *UNG* (“uracil-DNA glycosylase”). Os dois primeiros são moléculas co-estimuladoras essenciais para a mudança de classe de imunoglobulinas e os demais também estão envolvidos no processo de recombinação e, ainda, no

mecanismo de hipermutação somática dos segmentos variáveis dos genes de imunoglobulinas [FISCHER, 2004].

Outra complicação em termos de diagnóstico de CVID deve-se ao fato de uma parcela dos pacientes desenvolverem sintomas tardiamente e, como o nome sugere, de intensidade variável. Nesses casos torna-se imprescindível a exclusão de fatores ambientais secundários que poderiam desencadear a hipogamaglobulinemia, como por exemplo o uso de medicações anti-convulsivantes [SPICKET, 2001].

Os critérios diagnósticos estabelecidos para a classificação de portadores de CVID são basicamente a presença de infecções bacterianas recidivantes e de níveis séricos de IgG e IgA abaixo da média, de acordo com a faixa etária. Critérios adicionais incluem ausência ou baixa produção de isohemaglutininas específicas para antígenos ABO e déficit na resposta de anticorpos contra antígenos de vacinas [CUNNINGHAM-RUNDLES, 2003, KOKRON *et al.*, 2004].

A CVID é a mais freqüente imunodeficiência primária na qual os pacientes desenvolvem sintomas, por isso recebe a designação de "comum" (a deficiência seletiva de IgA é a mais prevalente, porém, a maioria dos indivíduos não manifesta sintomas clínicos). O nome "variável" simboliza a heterogeneidade da doença, que pode se manifestar clinicamente por meio de diferentes desordens, entre elas trombocitopenia autoimune, pneumonias de repetição, sinusite crônica, inflamação nas articulações e doenças gastrointestinais. Uma vez estabelecida a doença, os sintomas associados a CVID tendem a agravar-se, sendo raros os casos em que ocorre a regressão dos sintomas. A idade de manifestação da doença também é variável, embora o pico de apresentação seja na infância e início da vida adulta [SPICKETT *et al.*, 2001]. As mulheres, de modo geral, desenvolvem os sintomas mais tardiamente do que os homens, porém a taxa de sobrevivência dos pacientes após o

diagnóstico da CVID é semelhante, independente do sexo [CUNNINGHAM-RUNDLES & BODIAN, 1999].

Assim como os portadores de deficiência de subclasses de IgG ou de IgA, pacientes com CVID apresentam comprometimento da resposta humoral antígeno-específica, particularmente aquela direcionada contra polissacarídeos capsulares bacterianos [CUNNINGHAM-RUNDLES & BODIAN, 1999; SNELLER, 2001; SPICKETT *et al.*, 2001].

As infecções sinopulmonares constituem os sintomas mais freqüentes das deficiências de anticorpos e são provocados por patógenos habitualmente encontrados no trato respiratório, tais como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. No caso das deficiências seletivas de anticorpos, os sintomas são mais amenos do ponto de vista clínico com ocorrência de indivíduos assintomáticos, porém, o acompanhamento por longo tempo destes pacientes tem demonstrado um aumento da ocorrência de infecções de vias respiratórias provocando sinusites e broncopneumonias, em relação a indivíduos saudáveis [CUNNINGHAM-RUNDLES, 2003].

Os pacientes com CVID, em particular, podem apresentar outras infecções sugestivas de defeitos em células T, como aquelas provocadas por *Pneumocystis carinii*, *Herpes zoster* e *Mycobacterium avium*. Tais doenças foram detectadas em um número menor de indivíduos com CVID e não foram correlacionadas ao número de linfócitos T ou ao índice de proliferação destas células [CUNNINGHAM-RUNDLES *et al.*, 1999].

Nos pacientes com CVID também são freqüentes doenças gastrointestinais causadas por parasitas ou vírus que provocam diarréia crônica com ou sem mal-absorção e perda de peso. Outras causas de diarréia são os processos inflamatórios típicos da Doença de Crohn e linfomas, os quais acometem principalmente pacientes do sexo masculino. Nas mulheres há uma maior incidência de hiperplasia nodular

linfóide intestinal [CUNNINGHAM-RUNDLES & BODIAN, 1999], um dos sintomas típicos de HIGM, caracterizado pelo aumento de tamanho de Placas de Peyer. Este aumento é proporcionado por má formação de centros germinativos causada por alterações nos processos de recombinação e hipermutação somática [BONILLA & GEHA, 2003].

Aproximadamente 10% dos pacientes com CVID desenvolvem asma e rinite com sintomatologia semelhante à observada nos indivíduos atópicos, porém sem a presença de IgE [BONILLA & GEHA, 2003]. Em nossa casuística a porcentagem de pacientes com asma e CVID está próxima dos 15% e uma parcela ainda maior de pacientes sofre de rinite [KOKRON *et al.*, 2004 e Tabela 1]. Por razões desconhecidas, os indivíduos também manifestam uma variedade de desordens auto-imunes, incluindo anemia hemolítica, trombocitopenia, artrite reumatóide e anemia perniciosa, sendo que as mulheres apresentam maior predisposição a essas manifestações [CUNNINGHAM-RUNDLES & BODIAN, 1999; KNIGHT & CUNNINGHAM-RUNDLES, 2006].

As doenças granulomatosas ocorrem em 10% dos casos de CVID diagnosticados no Brasil e normalmente são acompanhadas por esplenomegalia e linfadenopatia [KOKRON *et al.*, 2004]. A evolução e persistência da doença podem levar ao aparecimento de tumores, principalmente linfomas não-Hodgkin [CUNNINGHAM-RUNDLES & BODIAN, 1999; SPICKETT *et al.*, 2001]. Há uma maior incidência de carcinoma gástrico em pacientes com CVID que pode estar associado à atrofia gástrica ou a uma mais intensa colonização de *Helicobacter pylori* [SPICKETT *et al.*, 2001].

O tratamento profilático padrão dos pacientes com CVID consiste em infusões intravenosas periódicas (em intervalos de 15 a 30 dias) de imunoglobulinas (IVIg), visando manter os níveis séricos de anticorpos entre 400 e 600 mg/dL. Embora essa

terapia não seja adequada ou eficiente para amenizar os vários sintomas associados a CVID, um estudo envolvendo mais de 200 pacientes mostrou evidências de que o tratamento com IVIGs reduz a incidência de algumas das infecções mais comuns nestes pacientes. No entanto, dependendo do grau de comprometimento de órgãos, como nas lesões pulmonares graves (bronquiectasias), os pacientes podem não obter maiores benefícios com o tratamento à base de IVIGs [CUNNINGHAM-RUNDLES & BODIAN, 1999].

As medicações (IVIGs) disponíveis no mercado possuem diferenças mínimas na sua composição, mas que podem causar reações adversas nos pacientes se utilizados alternadamente. Os níveis de IgA ou IgG podem variar de um produto para outro de tal maneira que pacientes com total ausência de IgA, por exemplo, deve ser tratado com um produto com baixas concentrações de IgA para evitar a produção de anticorpos anti-IgA. A aplicação incorreta do medicamento pode ainda aumentar a formação de imunocomplexos com antígenos frequentemente encontrados nos pacientes devido à persistência das infecções [SPICKETT *et al.*, 2001].

O tratamento apropriado com imunoglobulinas evita o uso de antibióticos como medida profilática, contudo, os imunodeficientes necessitam de doses mais altas de antibióticos e períodos mais longos de tratamento para a resolução de um quadro infeccioso [SPICKETT *et al.*, 2001].

Embora aumente o risco de infecções, alguns pacientes necessitam de tratamento com corticosteróides, em associação às infusões de imunoglobulinas, para controlar as reações auto-imunes. Em alguns casos os pacientes não respondem ao tratamento fazendo-se necessária a esplenectomia, pois por conta do hiperesplenismo, as moléculas IgG infundidas e derivados do sangue (plaquetas e hemácias) podem ser rapidamente eliminados. Os pacientes com CVID submetidos à

esplenectomia também possuem maior risco de infecções e de morte por infecção [CUNNINGHAM-RUNDLES & BODIAN, 1999; SPICKETT *et al.*, 2001].

Até o momento somente umas poucas alterações genéticas especificamente relacionadas com a CVID foram identificadas; por outro lado, conhecem-se diversas anormalidades nas funções imunes de linfócitos T e B. A identificação dessas alterações tem permitido um avanço no estabelecimento de parâmetros para diagnóstico e classificação de pacientes em subgrupos homogêneos, facilitando o reconhecimento de grupos de risco, além de proporcionar melhor entendimento da fisiopatologia da doença [CASTIGLI & GERA, 2006].

Somado ao testes sorológicos, a investigação de subpopulações de células no sangue periférico de pacientes com CVID tem auxiliado no diagnóstico e no prognóstico da doença [WARNATZ *et al.*, 2002]. Em um grupo de pacientes, por exemplo, os sintomas mais graves da doença estavam presentes naqueles indivíduos que apresentaram os menores números de células T CD4⁺ e de linfócitos B [SPICKETT, 2001]. Já no estudo de Cunningham-Rundles & Bodian (1999) os indivíduos que faleceram mais cedo foram aqueles que no momento do diagnóstico da doença apresentaram os menores níveis de IgG no soro e as menores porcentagens de células B periféricas, sendo este último aspecto o principal fator de risco de vida para os imunodeficientes descritos neste trabalho.

I.2 - Aspectos moleculares da diferenciação de linfócitos B. Implicações de defeitos nessas vias na Imunodeficiência Comum e Variável

I.2.1 - Defeitos na sinalização mediada por linfócitos T

Os linfócitos T regulam a atividade de células B e de outras células apresentadoras de

antígenos (APCs, "antigen presenting cells") via interação célula-célula, através de moléculas de superfície e citocinas. As citocinas liberadas pelos linfócitos T, assim como a ativação de moléculas presentes na sua membrana celular são provedoras de sinais essenciais que influenciam na proliferação celular (por exemplo, IL-2, IL-5 e IL-6), proteção contra apoptose (IL-4), diferenciação dos linfócitos B em células de memória ou plasmócitos (IL-6 e IL-10) [RANDALL *et al.*, 1993] e mudança de classe de imunoglobulinas (como IL-4, que aumenta a produção de IgE) [ARPIN *et al.*, 1995]. Deste modo, as causas moleculares das deficiências de anticorpos podem ser decorrentes de defeitos primários tanto nas próprias células B como nas células T.

Os pacientes com disfunções de células T, embora descritos somente em estudos mais recentes, aparentemente constituem a maioria dos casos de CVID [SNELLER, 2001]. Em nossa casuística esses pacientes representam mais de 70% dos casos com essa imunodeficiência [KOKRON *et al.*, 2004]. Entre as anormalidades de células T encontradas nos pacientes com CVID destaca-se a reduzida produção de várias citocinas, incluindo IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ , além da baixa resposta proliferativa a mitógenos e antígenos [SNELLER, 2001].

Nos soros de pacientes com CVID a expressão da IL-10, citocina produzida principalmente por monócitos, macrófagos e células T, pode estar elevada devido à ativação persistente destas células. Portanto, é possível que alguns dos sintomas observados nos pacientes sejam decorrentes de imunossupressão causada pela ação de IL-10. Por outro lado, a observação de que linfócitos T de pacientes estimulados *in vitro* produziam quantidades menores de IL-10 do que células de indivíduos saudáveis sugeriu que a ação parácrina da citocina seria mais importante para a ativação do linfócito B do que a citocina circulante [ZHOU *et al.*, 1998].

A estimulação do receptor da célula T (TCR) pelo antígeno gera sinais intracelulares que podem ser estimuladores ou resultar na deleção ou anergia das células T. Muitos destes sinais são mediados por proteínas tirosinas-quinases (PTKs) que fosforilam as cadeias polipeptídicas do complexo CD3- ξ , o qual se encontra associado ao TCR. Em alguns pacientes com CVID foi detectada uma menor capacidade de recrutamento e ativação de tirosina quinases, tais como ZAP-70 [MAJOLINI *et al.*, 1997; BONCRISTIANO *et al.*, 2000] e Lck sendo que, neste último caso, o paciente também apresentou linfopenia de células T CD4⁺ [SAWABE, 2001].

A linfopenia de CD4 e a inversão da razão CD4⁺/CD8⁺ no sangue periférico estão particularmente associadas às principais complicações clínicas da CVID, tais como esplenomegalia, doenças granulomatosas e auto-ímmunes. Em indivíduos saudáveis a inversão da razão CD4⁺/CD8⁺ pode ocorrer em virtude da expansão oligoclonal de células CD8⁺CD28⁻ durante infecções virais crônicas e subclínicas. Embora o mecanismo não tenha sido elucidado, acredita-se que essas células possam contribuir para a regulação da resposta imune através de sua atividade citotóxica.

Em subgrupos de pacientes com CVID o aumento de populações oligoclonais de linfócitos T CD8⁺, assim como em indivíduos saudáveis, pode estar relacionado à presença de infecções virais e a citotoxicidade destas células provavelmente contribui para a redução no número de outras células do sistema imune nos pacientes [SERRANO *et al.* 2000]. Porcentagens significativamente maiores de células CD8⁺/HLA-DR⁺ expressando perforina e com fenótipo diferenciado de células efetoras (CCR7/CD45RA⁺) também foram detectadas em um grupo de pacientes. Paralelamente às alterações em células T esse grupo de pacientes também apresentou números reduzidos de células B CD27⁺ no sangue periférico [VIALARD *et al.*, 2006].

A investigação de populações de células reguladoras em pacientes com CVID tem sido considerada devido à alta incidência de doenças auto-imunes nestes pacientes (23%) [KNIGHT & CUNNINGHAM-RUNDLES, 2006]. Em humanos e modelos animais os linfócitos T CD4 com alta expressão de CD25 (a cadeia alpha do receptor de IL-2) são consideradas reguladoras da resposta imune e podem estar relacionadas com a etiopatogenia da auto-imunidade. Em um subgrupo de pacientes com CVID, as porcentagens de células T CD4/CD25^{high} no sangue periférico estavam reduzidas em comparação ao grupo de controles; este fenótipo foi associado à maior incidência de doenças auto-imunes [LOPES DA SILVA *et al.*, 11 th Meeting of European Society for Immunodeficiencies].

Alguns dos distúrbios na resposta celular, observados em pacientes com CVID, são causados por defeitos nas APCs e prejudicam a comunicação destas células com os linfócitos T. Uma série de estudos tentaram demonstrar a presença de possíveis defeitos nas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) expressas na superfície da APC, já que os pacientes investigados apresentavam as vias de transdução de sinais mediadas pelo TCR/CD3- ξ perfeitamente normais. Nesse grupo de pacientes com CVID não foram detectadas anormalidades estruturais no MHC-II que pudessem prejudicar a ligação e/ou a apresentação dos antígenos aos linfócitos T CD4⁺ [THON *et al.*, 1997^a]. Contudo, um outro grande estudo mostrou que em muitos pacientes há ligação genética da doença com o locus de MHC, porém os genes envolvidos não foram identificados [SCHROEDER *et al.*, 1998].

A apresentação de antígenos envolve a participação de sinais co-estimuladores mediados por receptores presentes na superfície dos linfócitos e de APCs. Como mencionado com detalhes mais adiante há grupos de pacientes com CVID portadores de mutações em determinadas moléculas co-estimuladoras, as quais são

importantes para o desenvolvimento da resposta imune humoral. Em linhas gerais, o segundo sinal é fundamental para a ativação plena das células T, pois induz a proliferação, síntese de citocinas e ativa as funções auxiliaadoras da resposta humoral, tais como a mudança de classe de imunoglobulinas e a diferenciação dos linfócitos B em células de memória ou plasmócitos [SCHWARTZ, 2001].

Com relação às células apresentadoras, as células dendríticas de pacientes com CVID apresentaram uma baixa expressão de uma série de moléculas co-estimuladoras, tais como CD40, CD80, CD83 e CD1a e *in vitro* secretavam níveis reduzidos de IL-12 em comparação às células de indivíduos saudáveis [JAGADEESH *et al.*, 2004]. Por outro lado, os níveis de IL-12 podem estar aumentados nos soros de pacientes com CVID e isto não foi relacionado às variantes polimórficas de IL-12p40 normalmente encontradas na população [MARTINEZ-POMAR *et al.*, 2006]. Além de estimulação de linfócitos T, células dendríticas maduras podem ativar linfócitos B via interação de CD40 e induzir a diferenciação de plasmócitos na presença de IL-2 [BANCHEREAU *et al.*, 2000]. As células dendríticas plasmocitóides estimulam preferencialmente a diferenciação de linfócitos Th2, o que também favorece a resposta de linfócitos B. Apesar dos níveis elevados de IL-12, a qual é característica da resposta Th1, nos pacientes não foram observadas alterações nas populações plasmocitóides [MARTINEZ-POMAR *et al.*, 2006]. Portanto, direta ou indiretamente, defeitos na sinalização mediada por células dendríticas podem afetar o crescimento e secreção de imunoglobulinas.

A primeira proteína co-estimuladora identificada em células T foi o CD28, que é expresso constitutivamente na membrana celular. Os seus ligantes, B7-1 e B7-2, podem ser induzidos na superfície de APCs e o sinal estimulador produzido pela interação entre CD28 e B7-1 ou -2 resulta na proliferação da célula T, no aumento da produção de citocinas, principalmente IL-2 e na expressão de outras moléculas de

superfície. Os efeitos de CD28 são contrabalanceados por outra molécula denominada CD152 (CTLA-4) que pode ser induzida na célula T e também interage com B7-1 e B7-2 [SCHWARTZ, 2001].

Em alguns pacientes com CVID foi observada uma deficiência nas funções dependentes da interação dos sinais estimuladores derivados do TCR e de CD28, como a produção de IL-2 e a expressão de CD40-ligante (CD154) [THON *et al.*, 1997^b]. A co-estimulação de linfócitos T frescos de pacientes com CVID com anticorpos anti-CD28 e anti-TCR ou anti-CD3 foi capaz de restaurar a resposta proliferativa e a produção de IL-2 e IFN- γ . Na presença de antígeno toxóide ao invés de anti-TCR o mesmo não foi constatado, indicando que o sinal co-estimulatório pode ser liberado pelo CD28, entretanto, o seu sinal não é capaz de corrigir o defeito na proliferação e produção de citocinas nas células T dos pacientes com CVID [FISCHER *et al.*, 1994].

Recentemente foi identificado um terceiro membro da família CD28/CTLA-4, a proteína co-estimuladora induzível (ICOS). A ICOS é expressa especificamente em linfócitos T e interage com um ligante específico, o B7H, o qual é expresso constitutivamente em células B e macrófagos [BEIER *et al.*, 2000]. Essa interação aumenta a expressão de CD154 e induz a proliferação das células T [RILEY *et al.*, 2001]. Porém, a manutenção do crescimento destas células a longo prazo depende dos sinais produzidos pelo CD28, o qual além de gerar um forte sinal mitogênico, aumenta a expressão de genes anti-apoptóticos, como *bcl-X_L* e estabiliza o mRNA para IL-2, sendo esta citocina essencial para expansão e manutenção dos linfócitos [RILEY *et al.*, 2001]. De modo semelhante ao CD28, a ICOS também exibe efeitos anti-apoptóticos sobre as células T e induz a síntese de uma variedade de citocinas, as quais medeiam funções importantes na regulação da atividade dos linfócitos B [BEIER *et al.*, 2000].

Animais deficientes de ICOS apresentaram grande comprometimento na resposta de anticorpos contra antígenos T-dependentes, os níveis de IgE foram indetectáveis e os níveis de IgG1 e IgG2a específicas reduzidos [McADAM *et al.*, 2001; TAFURI *et al.*, 2001] e observa-se um grande comprometimento na formação de centros germinativos na resposta secundária [DONG *et al.*, 2001].

O perfil de citocinas gerado pela via de sinalização de ICOS sugere uma forte ligação desta molécula com o desenvolvimento de um fenótipo T_H2 por células T ativadas. Algumas dessas citocinas também são induzidas em resposta aos estímulos mediados por CD28 como, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF. No entanto, a molécula ICOS destaca-se por induzir a produção de IL-10 e, ao contrário do CD28, não possui papel relevante na produção de IL-2 [BEIER *et al.*, 2000].

Os efeitos da superprodução de IL-10 em resposta ao estímulo de ICOS podem variar, dependendo da localização e tipo de APC a interagir com as células T. Nas zonas ricas em células T, a maior expressão de IL-10 poderia diminuir a habilidade das células dendríticas em apresentar antígenos e com isso induzir a apoptose destas células [LUDEWIG *et al.*, 1995]. Por outro lado, nos centros germinativos a IL-10 poderia levar à diferenciação das células B em plasmócitos [CHOE & CHOI, 1998]. Esta última hipótese apoia-se no fato de camundongos transgênicos para o ligante de ICOS, apresentarem números elevados de plasmócitos [YOSHINAGA *et al.*, 1999].

A primeira descrição de um defeito molecular definido em CVID, relatada em um estudo recente, mostrou uma alteração no gene *ICOS*. Em quatro portadores de CVID foi detectada a deleção de 443 nucleotídeos nesse gene que levou à perda de segmentos de mRNA correspondentes aos exons 2 e 3 e à geração de um códon de parada que impediu a expressão da proteína na superfície das células dos pacientes [GRIMBACHER *et al.*, 2003]. A mesma mutação foi mapeada no DNA genômico de 13 pacientes pertencentes a nove famílias e em outros 181 indivíduos não-relacionados.

A deleção foi identificada em cinco indivíduos de duas das nove famílias totalizando um grupo de nove pacientes com deficiência de ICOS [SALZER *et al.*, 2004].

Associada à deficiência de ICOS os pacientes apresentaram números reduzidos de linfócitos B de memória e baixas concentrações séricas de IgM e outras classes de imunoglobulinas devido à má formação de centros germinativos que pode estar relacionada à baixa produção de IL-10 pelas células T [GRIMBACHER *et al.*, 2003; WARNATZ *et al.*, 2006]. Os modelos animais apresentaram características um pouco diferentes, porém os resultados observados nos pacientes humanos, evidenciaram a importância da interação ICOS e B7H para a expansão de células de memória e geração de plasmócitos de longa vida.

A memória imunológica representa o resultado de uma série de interações celulares dirigidas por moléculas de superfície e citocinas. Em indivíduos saudáveis, o compartimento de células de memória é gerado juntamente com as células responsáveis pela eliminação dos antígenos. Contudo, ao final da resposta imune, o número de linfócitos ativados é reduzido por um mecanismo fisiológico de morte celular (apoptose) que garante a homeostase e contribui para impedir a geração de células auto-imunes [LENARDO, 1991; REFAELI *et al.*, 1998].

Diferentes mecanismos podem desencadear a apoptose de linfócitos B e T ativados ou mesmo de células virgens de tal maneira que a sobrevivência destas células depende do balanço intracelular adequado de moléculas pro- e anti-apotóticas. A expressão dessas moléculas em linfócitos está intimamente relacionada à ação de diferentes citocinas e a ativação de receptores de superfície entre eles ICOS [BEIER *et al.*, 2000]. Portanto, defeitos nessas vias de sinalização também podem estar envolvidos em patologias, tais como linfopenia e interação deficiente de linfócitos B e T.

Os pacientes com CVID podem apresentar linfopenia de células B e T no sangue periférico. No caso de células B, o aumento na expressão de Fas (CD95) e a diminuição na expressão de CD38, um marcador de células B em estágios avançados de diferenciação que induz sinais protetores da apoptose, podem ser responsáveis pela morte acentuada destas células [GUO & SAXON, 1995; SAXON *et al.*, 1995]. Estudos *in vitro* mostraram uma maior taxa de apoptose de células T CD4⁺ de pacientes do que de indivíduos saudáveis após a estimulação com fitohemaglutinina A (PHA). Possivelmente, as células dos pacientes sejam mais susceptíveis à morte devido à maior expressão de Fas na superfície de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) destes pacientes [ERRANTE *et al.*, 2004]. A morte de linfócitos induzida pela ativação com PHA foi reduzida nas culturas celulares de pacientes com CVID que foram cultivadas na presença de leptina recombinante, sugerindo que este hormônio pode servir de agente imunoterapêutico [GOLDBERG *et al.*, 2005].

1.2.2 - Defeitos na sinalização mediada por linfócitos B

A maturação efetiva de linfócitos B depende de sinais gerados pela ligação de seu receptor (BCR) ao antígeno específico e da interação destes sinais com aqueles induzidos por moléculas co-estimuladoras. Em pacientes com XLA e agamaglomulinemias autossômicas recessivas, os linfócitos B não alcançam nem mesmo o estágio de pré-B devido às alterações genéticas em componentes do próprio BCR, como a cadeia pesada μ , a cadeia leve $\lambda 5$ e o co-receptor $Ig\alpha$. Mutações nas proteínas sinalizadoras BLNK (SP-65) e BTK, cuja ativação depende dos sinais de BCR, também bloqueiam a geração de pré-B [FISCHER, 2004].

Os grupos de pacientes CVID com alterações na expressão de moléculas co-

estimuladoras, tais como B7-2 (CD86) [DENZ *et al.*, 2000] e CD27 [BROUET *et al.*, 2000], apresentam células B com um fenótipo imaturo, incapazes de fazer mudança de classe de imunoglobulinas. O B7-2 exerce função co-estimuladora ao se ligar à molécula de CD28 e a interação de CD27 e CD70 (expresso em linfócitos T) está envolvida na diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos.

A molécula CD27 pertence à superfamília de receptores semelhantes ao TNF (“Tumor necrosis factor receptor” - TNFR). As interações entre os membros dessa família e seus ligantes geram sinais que desencadeiam a expansão clonal e sobrevivência de células B, T e dendríticas aumentando a eficiência da resposta imune. Ao mesmo tempo, certas interações modulam a resposta através da indução de morte celular, como aquela mediada pela interação de Fas e Fas-ligante.

Os linfócitos B expressam pelo menos outros três TNFR diferentes, BAFFR (“B cell-activating factor receptor”), TACI (“transmembrane activator and CAML interactor”) e BCMA (“B cell maturation protein A”). A expressão de TACI é mais alta no subgrupo de células B CD27⁺ e a presença de BCMA é restrita às populações de células B diferenciadas, ou seja, plasmócitos e linfócitos B de centros germinativos [Ng *et al.*, 2004; AVERY *et al.*, 2003].

BAFFR, TACI e BCMA apresentam um ligante comum encontrado em células dendríticas e macrófagos conhecido como BAFF, BLyS, THANK, TALL-1 ou zTNF4. Os animais com deficiência de BAFF possuem números reduzidos de células B nos órgãos linfóides periféricos e montam uma resposta de anticorpos fraca contra antígenos T-dependentes e independentes. Os camundongos com deficiência de BAFFR possuem um fenótipo um pouco diferente, pois não manifestam problemas graves em relação à resposta humoral T-independente [SHULGA-MORSKAYA *et al.*, 2004].

O seqüenciamento do gene de BAFFR (*TNFRSF13C*) identificou 3 variantes deste

receptor presente em pacientes com CVID e indivíduos saudáveis. As mutações não afetaram a expressão gênica nem protéica de BAFFR, sugerindo que as variantes representavam novas variantes polimórficas do gene BAFFR [LOSI *et al.*, 2005].

Um déficit grave na resposta contra antígenos T-independentes foi vista em camundongos deficientes de TACI, os quais desenvolveram ainda doenças linfoproliferativas e auto-ímmes. A presença conjunta dessas patologias, imunodeficiência, linfoproliferação e auto-ímmidade nos camundongos deficientes levou ao estudo de possíveis mutações no gene que codifica TACI (*TNFRSF13B*) em pacientes com CVID.

O gene foi mapeado em 162 indivíduos, incluindo 135 não relacionados e 27 de famílias com casos múltiplos. Ao final do estudo foram caracterizados 3 famílias e 10 indivíduos com mutações em *TNFRSF13B*. As famílias A, B e C apresentaram as mutações S144X, C104R e A181E, respectivamente. Entre os 135 pacientes esporádicos foram identificados 2 portadores da mutação C104R, 5 heterozigotos e 1 homozigoto para a mutação A181E, 1 com a mutação S194X e outro com a R202H [SALZER *et al.*, 2005].

As mutações S144X, C104R não impediram a ligação de TACI a BAFF, mas a um segundo ligante conhecido como APRIL ("a proliferation-inducing ligand"). Na presença de citocinas apropriadas, APRIL e BAFF induzem a recombinação somática das cadeias de imunoglobulinas, no entanto, em células dos pacientes com deficiência de TACI, sinais de recombinação não foram detectados, como a passagem de C μ para C γ e conseqüente produção de IgG. A ausência de TACI também prejudicou a capacidade proliferativa das células B dos pacientes em resposta a estimulação com IgM e APRIL [SALZER *et al.*, 2005].

As porcentagens de linfócitos B maduros no sangue periférico podem ser normais e a capacidade de produzir anticorpos *in vitro* estar preservada, evidenciando que os

possíveis defeitos sobre os linfócitos B podem afetar estágios mais tardios do seu desenvolvimento. Portanto, nesses grupos de pacientes com CVID a hipogamaglobulinemia resulta, principalmente, de defeitos na geração de números suficientes de plasmócitos funcionais.

Recentemente foi demonstrada a importância da presença de números normais de células B de memória no sangue periférico para a formação de plasmócitos. Nesse sentido é interessante notar que os números de células B de memória CD27⁺ estão reduzidos na maioria dos grupos de pacientes com CVID estudados. Uma classificação baseada na contagem de células B de memória mostrou que um grupo de indivíduos contendo menos de 0,4% de células CD27⁺IgM⁻IgD⁻ no sangue periférico podia ser subdividido em dois grupos com base na expressão de CD21. Um deles possuía porcentagens normais de células B CD21⁻(<20%), já o outro se caracterizou pela alta porcentagem destas células (>20%) que foi correlacionada à ocorrência de esplenomegalia e citopenias auto-imunes [WARNATZ *et al.*, 2002].

No nosso grupo de estudo verificamos que alguns pacientes com CVID apresentaram uma contagem normal de células CD27⁺ bem como de seu ligante CD70⁺ no sangue periférico, porém, vimos que após estimulação *in vitro* com fitohemaglutinina A (PHA) estas populações de células diminuíam em uma taxa mais acelerada nas culturas de pacientes do que de indivíduos saudáveis [ERRANTE *et al.*, 2004]. A variação no número de células B de memória pode estar atrelada a alterações na expressão de marcadores de linfócitos T. Naqueles pacientes com CVID com números reduzidos de células maduras de memória (CD27⁺ e CD21⁺) foram detectados, por exemplo, baixa expressão de CD27, CD62L e CD45RA e alta expressão de CD29, HLA-DR e CD45RO em células T CD4⁺ [VLKOVA *et al.*, 2006].

A produção e secreção de imunoglobulinas de alta afinidade por linfócitos B de memória e plasmócitos, respectivamente, depende do processo de hipermutação

somática que ocorre nos centros germinativos, depois do reconhecimento de antígenos específicos. Em pacientes com CVID as taxas de hipermutação nos segmentos variáveis tanto das cadeias pesadas [BONHOMME *et al.*, 2000] como de cadeias leves [ANDERSEN *et al.*, 2004] podem ser reduzidas quando comparadas ao padrão de mutação de indivíduos saudáveis ou de outros pacientes com CVID.

No estudo realizado por Bonhomme *et al.* (2000) foram detectados níveis reduzidos de mutação nos transcritos VH3-23 de IgG em 23% dos pacientes analisados. O fato de analisar transcritos de cadeias leves ($V_{\kappa}A27$), sem limitar o estudo a um único isótipo de Ig, possibilitou que Andersen *et al.* (2004) detectassem o defeito em uma proporção maior de pacientes (77%). Nesses pacientes houve uma boa correlação entre o grau de mutação nas cadeias leves e a susceptibilidade às infecções graves do trato respiratório [ANDERSEN *et al.*, 2004].

Os pacientes com baixa taxa de mutação no segmento VH3-23 desenvolveram os sintomas da doença mais tarde em relação aos pacientes com padrão normal de mutação [BONHOMME *et al.*, 2000]. A mesma correlação não foi obtida nas análises de cadeias leves [ANDERSEN *et al.*, 2004], contudo, ambos os estudos estavam de acordo com o fato de que a taxa de mutação somática não varia ao longo da vida e, portanto, define um subgrupo de pacientes com CVID e provavelmente serve de critério prognóstico da doença.

A análise de plasmócitos em linfonodos obtidos de biópsias de pacientes com CVID e controles saudáveis permitiu a distinção de subpopulações celulares que foram utilizadas para a classificação dos pacientes. Ao contrário de indivíduos saudáveis, nos linfonodos do grupo de pacientes não foram detectadas as populações de células em estágio mais avançado de diferenciação, as quais expressam baixos níveis de Blimp-1 (“B-lymphocyte-induced maturation protein 1”) e níveis elevados de Sindecin (Blimp^{low}/Sindecin-1^{high}). Em adição, os pacientes

apresentaram números mais elevados de células precursoras de plasmócitos (Blimp-1⁺/Syndecan-1⁻) em relação aos contorles [TAUBENHEIM *et al.*, 2005]. Portanto, essa seria mais uma evidência de que o bloqueio da diferenciação terminal de plasmócitos pode causar a deficiência de anticorpos.

I.2.3 - Participação de XBP-1 na diferenciação de linfócitos B

Os fenômenos envolvidos na ativação e maturação dos linfócitos B foram extensivamente estudados e trabalhos recentes têm esclarecido aspectos importantes da sinalização que controla a diferenciação de células B ativadas em plasmócitos. Esse processo depende da expressão harmônica e coordenada de diferentes fatores de transcrição. O produto do gene *PAX-5* ("paired box gene 5"), o BSAP ("b-cell lineage-specific activator protein"), mantém a célula B ativada através da indução de CD19, da mudança de classe de imunoglobulinas e de sinais de proliferação. Em adição, reprime genes relacionados à diferenciação celular, como *XBP-1* ("X-box binding protein 1") [REIMOLD *et al.*, 1996]. Sinais de diferenciação gerados por citocinas, anti-CD40 ou LPS induzem a expressão de Blimp-1, esta molécula por sua vez inibe diretamente a expressão de BSAP e reprime a função de c-Myc, permitindo que as células parem o ciclo celular e comecem a sofrer diferenciação [LIN *et al.*, 1997]. No entanto, embora a repressão de BSAP por Blimp-1 seja necessária, não é suficiente para ativar *XBP-1* [LIN *et al.*, 2002; **Figura 1**].

Os mecanismos que medeiam a secreção de anticorpos foram descritos a partir de estudos com subpoulações de linfócitos (células B2 esplênicas) e um comportamento significativamente diferente pode ser visto em células B1 derivadas de peritônio. As células B1 secretam anticorpos espontaneamente e apresentam uma baixa expressão dos fatores de transcrição *BCL-6* (*B-cell leukemia/lymphoma-6*) e

PAX-5. No entanto, mesmo na ausência dos seus repressores a expressão de *Blimp-1* e *XBP-1* está reduzida nestas células, as quais devem possuir um controle transcricional de diferenciação particular além de distinto daquele observado em células B2 [TUMANG *et al.* 2005].

As funções imunológicas de *XBP-1* foram inicialmente estudadas em linhagens de mieloma humano, nas quais se verificou aumento de proliferação de plasmócitos malignos proporcional à expressão de *XBP-1* induzida por IL-6 [WEN *et al.*, 1999]. A mais alta expressão de transcritos de *XBP-1* também foi detectada em infiltrados de plasmócitos presentes em doenças inflamatórias, como artrite reumatóide e em culturas primárias de linfócitos B de camundongos estimuladas com anti-CD40 ou LPS [REIMOLD *et al.*, 2001]. O efeito de *XBP-1* sobre a biologia dos linfócitos B tornou-se ainda mais evidente após a demonstração de que animais quiméricos deficientes de *XBP-1* e *RAG* (*XBP-1^{-/-}RAG-2^{-/-}*) apresentavam profundos defeitos na imunidade humoral protetora [REIMOLD *et al.*, 2001].

Os linfócitos B dos camundongos quiméricos *XBP-1^{-/-}/RAG-2^{-/-}* mostraram-se menos diferenciados, pois apresentaram uma expressão aumentada de *c-myc* e menor expressão da cadeia J de imunoglobulinas, sendo que esta última é necessária para a geração de plasmócitos secretores de IgM e IgA. No entanto, a re-introdução de *XBP-1* às células, *in vitro*, induziu proliferação, mudança de classe de imunoglobulinas, expressão de moléculas de superfície e secreção normal de citocinas, demonstrando, desta maneira, que o *XBP-1* é essencial para a formação dos plasmócitos. Endossando estes resultados, não foram encontrados plasmócitos nos tecidos linfóides dos camundongos quiméricos previamente imunizados. Conseqüentemente, esses animais secretavam níveis baixos de imunoglobulinas e não foram capazes de controlar a infecção pelo poliovírus dependente de células B [REIMOLD *et al.*, 2001].

A diferenciação de plasmócitos, *in vivo* e *in vitro*, depende de sinais mediados por citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13). Agora também está claro que a expressão de XBP-1 é requerida para a diferenciação de plasmócitos induzida por esses estímulos envolvendo um mecanismo conhecido como UPR (“unfolded protein response”) ou resposta de estresse [GASS *et al.*, 2002; IWAKOSHI *et al.*, 2003a; IWAKOSHI *et al.*, 2003b].

A UPR consiste em uma resposta da célula ao acúmulo de proteínas malformadas no interior do retículo endoplasmático (RE). As vias de sinalização ativadas por esse estresse regulam e desencadeiam a expressão de genes, principalmente de chaperonas, cujos produtos propiciam o dobramento, processamento, transporte e degradação adequados de proteínas recém-sintetizadas no RE. As alterações no lúmen do RE são percebidas por três proteínas-quinases ancoradas na membrana, as quais desencadeiam as diferentes vias da UPR. Uma dessas vias regula negativamente a síntese protéica e inicia-se através da fosforilação de eIF2 (“eucariotic translation initiation factor 2”) pela quinase PERK (“Pancreatic-enriched ER kinase”) [LEE *et al.*, 2003; HAMPTON, 2003].

Os fatores de transcrição XBP-1 e ATF6 são responsáveis pelas outras duas vias da UPR e transcrevem grupos de genes de chaperonas alvos semelhantes [LEE *et al.*, 2003]. O próprio ATF6 possui atividade fosforilativa e se torna ativo sob estresse enquanto que a sinalização mediada por XBP-1 depende de uma serina-treonina quinase ancorada na membrana do RE, a IRE1- α (“Inositol-Requiring 1 protein kinase”) **[Figura 2]**.

A IRE-1 α é uma proteína transmembrana do tipo 1, cuja metade N-terminal situa-se no lúmen do RE e os domínios de quinase e endoribonuclease no lado citoplasmático. Em situações de estresse, a IRE-1 α se oligomeriza e ativa suas

funções de endoribonuclease por autofosforilação [HAMPTON, 2003]. O substrato específico da IRE-1 α é o mRNA de XBP-1, o qual foi identificado por estudos independentes em células de mamíferos e com *Caenorhabditis elegans* [CALFON *et al.*, 2002; IWAKOSHI *et al.*, 2003].

A UPR foi primordialmente descrita em *Saccharomyces cerevisiae* e neste organismo a IRE-1 α é denominada de IRE1p e seu substrato homólogo ao XBP-1 é conhecido como Hac1. Nos fungos as outras duas vias de estresse não são ativadas e, portanto, a via de sinalização mediada por IRE-1/XBP-1 é a mais conservada filogeneticamente entre os metazoários [CALFON *et al.*, 2002].

Ambas as endoribonucleases IRE-1 α e IRE1p promovem a clivagem e remoção de um pequeno íntron do mRNA de seus genes alvos. Em seguida, os fragmentos a 5' e 3' são religados dando origem à molécula de mRNA processada. Em células de mamíferos, a IRE-1 α remove um fragmento de 26 pb do mRNA de XBP-1, enquanto que em *C. elegans* 23 pb são removidos. O íntron é flanqueado por nucleotídeos, cujo pareamento cria os sítios de clivagem de IRE-1 α , devido a uma modificação na estrutura secundária do mRNA. Essa estrutura é constituída basicamente por duas alças contendo sete resíduos e cada uma sendo sustentada por um segmento de nucleotídeos pareados [CALFON *et al.*, 2002].

O íntron presente em Hac1 de fungos bloqueia intensamente a síntese protéica e com isso somente as formas processadas de mRNA são expressas nestes organismos. Já nos demais eucariotos a forma não-processada é capaz de codificar uma proteína de 33 kDa e com 267 aminoácidos. O processamento do mRNA dá origem a um segundo quadro de leitura, cuja tradução culmina na proteína de 54 kDa e 371 aminoácidos. As porções N-terminais das proteínas de XBP-1 são idênticas, porém as seqüências de aminoácidos são distintas a partir do sítio de

clivagem [CALFON *et al.*, 2002; **Figura 3**].

Em modelos murinos, a proteína de 54 kDa está altamente expressa nos linfócitos B em diferenciação, sugerindo, portanto, que existe uma correlação entre o processamento de mRNA de XBP-1 no contexto de ativação do UPR e a diferenciação terminal dos linfócitos B. A IL-4 tem se mostrado importante nesse aspecto, pois aumenta a expressão de transcritos processados de XBP-1 em culturas primárias de células B. Além disso, na presença de IL-4 também se constatou a ativação de outros genes da UPR [IWAKOSHI *et al.*, 2003].

Em determinados tipos celulares, somente o XBP-1 processado transloca-se para o interior do núcleo e se liga aos seus domínios específicos para induzir a transcrição gênica. Há indícios de que as formas não-processadas executam funções que podem ser diferentes daquelas de p-XBP-1 e seu acúmulo inibe o desempenho de XBP-1 ativo podendo levar as células à morte por apoptose. Tal informação demonstra que a expressão das formas processadas de XBP-1 protege contra a apoptose induzida por estresse no RE [LEE *et al.*, 2003a; IWAKOSH *et al.*, 2003]. Portanto, esse fato ajuda a explicar a persistência de certos tipos de tumores de plasmócitos que acumulam altos níveis de espécies processadas de XBP-1 [LEE *et al.*, 2003b].

O bloqueio da via IRE-1 α /XBP-1 com inibidores de proteasomo diminui a geração de formas processadas de XBP-1 o que pode estar relacionado à maior taxa de apoptose de certas células tumorais. Isto levanta uma possibilidade de terapia para alguns tipos de tumores, além de colocar a via de sinalização mediada por IRE-1 α /XBP-1 como alvo no tratamento de doenças humanas afetando inclusive o sistema imune [LEE *et al.*, 2003b].

A forma p33-XBP-1 é naturalmente menos estável que p54, o que já se sabia

desde a sua descrição em *C. elegans*. A porção C-terminal da proteína, a qual difere de p54 apresenta sinais de ubiquitinação e mecanismos independentes do proteasoma também contribuem para acelerar a degradação de p33. A instabilidade intrínseca de p33 deve modular a atividade da UPR, no sentido de evitar a produção exacerbada de p54 e as conseqüências da ativação excessiva de estresse celular. Por outro lado, o mRNA não-processado que origina p33 é altamente expresso, garantindo a presença constante da proteína [TIROSH *et al.*, 2006]. A taxa de expressão elevada sugeriu a importância de p33 na transcrição gênica. A construção de mutantes de p33, capazes de permanecer por mais tempo no citoplasma do que a proteína selvagem, mostrou a sua capacidade de ativar chaperonas distintas daquelas induzidas por p54 [TIROSH *et al.* 2006].

Através da comparação de um amplo perfil de genes expressos em células XBP-1^{-/-} e selvagens, uma série de moléculas dependentes de XBP-1 foram identificadas. Um dos genes identificados foi o da IL-6, o que poderia explicar parte das funções de XBP-1 relacionadas à diferenciação de células B em plasmócitos, uma vez que as funções desta citocina são semelhantes àquelas mediadas por XBP-1 [IWAKOSHI *et al.*, 2003a]. O XBP-1 regula modestamente a sua própria transcrição, de BiP e ATF6 α e é essencial para a transcrição das chaperonas agindo no retículo ERdj4, p58^{IPK}, HEDJ (aumentam a atividade de ATPase no retículo), PDI-P5 (formação de pontes dissulfeto) e RAMP4 (glicosilação e estabilização de proteínas em resposta ao estresse). Algumas dessas controlam a expressão de cochaperonas que ativam proteínas Hsp70 residentes no retículo [LEE *et al.*, 2003b].

Ao contrário de Hac1, as funções de XBP-1 vão além da indução da maquinaria secretora de proteínas no contexto de estresse celular. A expressão ectópica de XBP-1 em diferentes linhagens de células B mostrou a importância deste fator de transcrição na expressão de genes relacionados com o aumento da síntese protéica e

do tamanho das células, não apenas devido à expansão do RE, mas também de outras organelas citoplasmáticas, além de regular vários estágios da maquinaria de secreção de proteínas [SHAFFER *et al.*, 2004]. A expressão de XBP-1 também foi relacionada ao aumento na transcrição de genes que promovem a degradação de proteínas no contexto da UPR, como EDEM [LEE *et al.* 2003a].

A função primordial da ativação de XBP-1 é a síntese e, sobretudo, a secreção de IgM. Na ausência de XBP-1 há um nível basal de transcrição de cadeias μ e, portanto, a síntese de IgM não é totalmente dependente da ativação de XBP-1 [TIROSH *et al.*, 2005]. A reconstituição de células B de camundongos *XBP-1^{-/-}/RAG^{-/-}* com a forma ativa de XBP-1 restaura a produção de IgM, uma vez que XBP-1 causa modificações pós-transcricionais relevantes para o transporte e secreção de desta imunoglobulina [IWAKOSHI *et al.*, 2003a; TIROSH *et al.*, 2005].

Animais deficientes de XBP-1 apresentam números reduzidos de plasmócitos e conseqüentemente de anticorpos e déficit na resposta imune humoral [REIMOLD *et al.*, 2001]. Essas características são semelhantes àsquelas observadas em pacientes com CVID, de tal maneira que defeitos na via da UPR mediada por IRE-1 α /XBP-1 podem estar relacionados com o aparecimento de pelo menos um dos sintomas encontrados nestes pacientes, a hipogamaglobulinemia.

II - Objetivos

Avaliação da expressão gênica e protéica do fator de transcrição XBP-1 em linfócitos de sangue periférico de pacientes com CVID e indivíduos saudáveis.

Análise do efeito de estresse celular sob a ativação de XBP-1 em células B imortalizadas de pacientes com CVID e indivíduos saudáveis.

Correlacionar os defeitos na produção de imunoglobulinas em pacientes com CVID e a ativação de XBP-1.

III - Materiais e Métodos

III.1- Pacientes

Os pacientes portadores de CVID foram diagnosticados de acordo com os critérios definidos pelo PAGID (www.pagid.org) e são oriundos do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O acompanhamento dos pacientes e as colheitas do material foram feitos sob a responsabilidade dos Doutores Luiz Vicente Rizzo, Cristina Kokron e Myrthes Toledo Barros. A retirada de sangue ocorreu sempre em pacientes sem infecções presentes e recentes e imediatamente antes de receber reposição intravenosa de imunoglobulinas. A maioria dos pacientes é branca, do sexo masculino e maior de 18 anos de idade. A idade média é 34,6 anos (entre 12 e 76 anos) e o tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico da CVID é de 10,5 anos (entre 6 meses e 31 anos). A tabela abaixo fornece outras informações sobre os pacientes **[Tabela 1]**. Atualmente a nossa casuística é de setenta e quatro pacientes em seguimento, uma das cinco maiores do mundo (considerando-se pacientes vivos e em seguimento).

Tabela 1: Parâmetros clínicos e imunológicos de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável*

Média de gamaglobulina sérica pré-tratamento (mg/ dL)	Isótipo IgG IgA IgM	Pacientes 247,2 ± 177,8 37,57 ± 89,55 28,71 ± 42,29
Manifestações clínicas (% de pacientes)	Enfermidades	Principais manifestações
	1. Infecções recidivantes no trato respiratório superior	<i>Pneumonias (90%) Sinusites (82%) Otites (32%)</i>
	2. Doenças gastrointestinais (46%) 3. Doenças autoimunes (18%)	<i>Vitiligo, anemia perniciosa, psoríase, artralgia, artrite anemia hemolítica autoimune</i>
	4. Neoplasias (9%)	<i>Adenocarcinoma de estômago, linfoma de célula T</i>
	5. Infecções oportunistas (13,7%) 6. Doenças atópicas	<i>Rinite (32%) Asma (14%)</i>
	7. Bronquiectasia (32%) 8. Esplenomegalia (18%) 9. Linfadenopatia e hiperplasia linfóide (9%)	

*Pacientes do Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (n=22)

III.2- Isolamento de células

As células mononucleares de sangue periférico (PMBC) foram isoladas empregando-se IsoLymph (Gallard-Schlesinger Industries, Carle Place, NY, USA). O procedimento foi adaptado do protocolo do fabricante, o qual em linhas gerais, seguiu da seguinte maneira: 10 mL de sangue total diluído v/v em PBS (“phosphate buffer saline”) foram adicionados gentilmente a 10 mL de IsoLymph em um tubo suficiente para 50 mL, formando-se duas fases. Após centrifugação de $974 \times g$ a 20°C por 10 min foi gerado o gradiente do qual foi colhida a fase intermediária contendo as células

mononucleares. As células foram transferidas para um tubo novo, ressuspensas para 50 mL em PBS e centrifugadas a $450 \times g$ e 10°C por 10 min. O precipitado celular foi lavado seqüencialmente duas vezes nas mesmas condições de centrifugação descritas acima e o número de células obtidas foi determinado após coloração com Azul de Tripán (0,02%) e contagem em Câmara de Newbaver.

III.3 - SDS-PAGE e *Western blot*

Células recém extraídas com IsolympH (2×10^6), as quais denominamos de *ex vivo*, foram lisadas em 100 μL de volume final de tampão da amostra [2x concentrado: Tris-HCl 100 mM (pH 6,8); 5 % de β -mercaptoetanol; 0,2% de azul de bromofenol e 20% de glicerol] diluído v/v. Inibidores de proteases foram adicionados ao tampão imediatamente antes da lise das células. As células também foram cultivadas por 48 h em estufa a 37°C e com 5% de CO_2 na presença ou não de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS). As células em cultura foram lisadas diretamente nas placas com tampão de amostra e, assim como aquelas obtidas *ex vivo*, foram aquecidas por 5 min a 95°C , transferidas para o gelo e outro volume de inibidores de proteases foi adicionado. Os lisados foram estocados a -20°C até o momento de serem separados por eletroforese em gel de SDS-PAGE.

Os lisados protéicos foram aplicados em gel de poliacrilamida e bis-acrilamida (30:1) desnaturante, o qual foi submetido à eletroforese em tampão de corrida contendo Tris-base 25 mM; glicina 250 mM e 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS). A corrida procedeu-se inicialmente a 80 V até as amostras passarem do gel de empacotamento (5% de solução de acrilamida) para o gel de corrida (12% de solução

de acrilamida). Então, a corrida passou a ser efetuada a 100 V até o azul de bromofenol sair do gel.

As proteínas separadas nos géis de SDS-PAGE foram transferidas para membranas de PVDF (Hybond-P, Amershan Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) por eletrotransferência em tampão contendo glicina 39 mM; Tris base 48 mM; 0,037% de SDS e 20% de metanol. Em seguida, as membranas foram bloqueadas por pelo menos 12 h a 4°C em TBS-tween pH 7,5 ("Tris Buffered Saline"- NaCl 150 mM; Tris-base 50 mM e 0,05% de tween 20) contendo 5% de leite em pó desnatado.

Uma vez bloqueadas, as membranas foram incubadas com soro de coelho anti-XBP-1 humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) [diluído 1:200 em TBS-blotto-tween (TBS-tween contendo 5% de leite) e 0,05% de azida sódica] por pelo menos 12 h a 4°C. Após duas lavagens de 10 min, sob agitação, em TBS-tween, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 h com anticorpo monoclonal anti-IgG1 de coelho conjugado com fosfatase alcalina (diluído 1:1000 em TBS-blotto-tween). Depois das lavagens (4 vezes de 15 min em TBS-tween, sob agitação), a revelação das proteínas específicas foi feita empregando-se ECL-plus (Amershan Pharmacia Biotech) seguida à exposição das membranas ao filme de autorradiografia.

As membranas foram incubadas por 30 min em solução contendo Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,7); β -mercaptoetanol 100 mM e 2% de SDS para remoção de anticorpos anti-XBP-1 e em seguida, remarcadas com monoclonal anti-actina humana (Amershan Pharmacia Biotech, diluído 1:10000 em TBS-blotto-tween e 0,05% de azida sódica). A actina foi utilizada como referência à quantidade de proteínas aplicada nos géis.

III.4- Extração de RNA total

PBMC (2×10^6 ou 1×10^7) *ex vivo* foram precipitados por centrifugação a $240 \times g$ e 4°C e ressuspendidos em 1 mL de Trizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA); já as células mantidas em cultura foram extraídas das placas com o próprio reagente Trizol. Os tubos permaneceram a 70°C negativos e quando o momento da extração de RNA total os mesmos foram colocados à temperatura ambiente. A separação dos ácidos nucleicos procedeu-se seguida à adição de 200 μL de clorofórmio p.a. e de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de glicogênio aos tubos, os quais foram incubados por 3 min à temperatura ambiente, manualmente agitados por inversão durante 15 s e centrifugados por 15 min a $12000 \times g$ e 4°C . À fase superior aquosa foi adicionado um volume igual de isopropanol para precipitar as moléculas de RNA. Os tubos permaneceram à temperatura ambiente por 1 h e, em seguida, foram centrifugados por 10 min a $12000 \times g$ e 4°C . Os precipitados de RNA foram lavados com 1 mL de etanol a 75% após centrifugação por 5 min a $7500 \times g$ e 4°C . Os precipitados foram ressuspendidos em água livre de DNase e RNase e a concentração foi determinada através de leitura da densidade óptica ($\lambda=260$ nm). Cada 1 μg de RNA total foi tratado com 1 U de DNase I no tampão da enzima 1x [Tris-HCl 20 mM (pH 8,4); MgCl_2 2mM e KCl 50 mM], para eliminação de possível contaminação das amostras com DNA. Em seguida, a integridade do RNA total foi verificada através de corrida eletroforética das amostras a 40 V em gel de agarose a 1,2%.

III.5 - Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Inicialmente, 200 ng de RNA total foram incubados juntamente com dNTPs 500 μM (Invitrogen Corporation) e 500 ng/ μL de oligo (dT)₁₂₋₁₈ por 5 min a 65°C . Os tubos

foram transferidos para o gelo, onde se acrescentou tampão da enzima 1x [Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM] e DTT 20 mM. Então, os tubos foram incubados a 42°C por 2 min e novamente colocados no gelo onde foi feita a adição de 1 µl da transcriptase reversa SuperScript II RNase H⁻ (Invitrogen Corporation). Desta forma, a produção da primeira fita de cDNA correspondente ao mRNA poliadenilado foi realizada no volume final de 20 µL durante 50 min a 42°C. Em seguida, a reação foi inativada por aquecimento a 70°C por 15 min.

As reações de PCR foram preparadas em 25 µL de volume final contendo 1,5 µL de cDNA; dNTPs 200 µM; 400 µM de cada oligonucleotídeo; tampão da enzima 1x [Tris-HCl 20 mM (pH 8,4); KCl 50 mM]; MgCl₂ 1,5 mM e 5 U de *Taq* polimerase platinum (Invitrogen Corporation). As reações foram aquecidas a 94°C por 2 min para desnaturação dos cDNAs e ativação da *Taq* platinum, a qual é fabricada conjugada a moléculas de anticorpos.

Os ciclos de amplificação de cada gene estudado foram realizados nas seguintes condições: *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)* - 29 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a 50°C e 30 s a 72°C; *XBP-1* total e não-processado- 35 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 50°C e 1 min a 72°C; *IRE-1α* - 35 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 58°C e 1 min a 72°C; *p-XBP-1*: 35 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C. Uma extensão final de 10 min a 72°C foi realizada e os tubos foram mantidos a 4°C no termociclador. Os produtos foram analisados após eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado com 1 µg/mL de brometo de etídeo. As formas processadas e não-processadas de cDNA de *XBP-1* foram separadas em gel de agarose 1000 a 3% preparada em tampão Tris-borato (TBE) 1x concentrado (Tris-base 89,2 mM; Ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM). A corrida eletroforética foi realizada a 5 V/cm em

tampão TBE 1x por 10 h e temperatura ambiente. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados estão listadas na **Tabela 2**.

Para que pudéssemos verificar diferenças semi-quantitativas de mRNA, os produtos de RT-PCR foram analisados na fase exponencial de amplificação (fase log). Para isso, diluições diferentes de cDNA (0,5; 1; 1,5 e 2 μ L) e número crescente de ciclos foram empregados e os ciclos nos quais as reações atingiram seu platô foram descartados. O platonamento ou saturação das reações de RT-PCR podem ocultar diferenças significativas nas quantidades de mRNA em diferentes amostras, de tal maneira que, em gel de agarose, observamos bandas com mesma intensidade. Portanto, no nosso estudo, o número de ciclos estabelecidos para a amplificação de cada gene refletia as diferenças na quantidade de cDNA entre as amostras.

III.5.1- *Nested* RT-PCR

O cDNA completo de XBP-1 foi amplificado em duas reações seqüenciais de PCR. Primeiramente, as reações de PCR foram preparadas em 25 μ L de volume final contendo 1,5 μ L de cDNA; dNTPs 200 μ M; 400 μ M de cada oligonucleotídeo (F3 e R3); tampão da enzima 1x [Tris-HCl 20 mM (pH 8,4); KCl 50 mM]; MgCl₂ 1,5 mM e 5 U de *Taq* platinum High Fidelity (Invitrogen Corporation). As reações foram aquecidas a 94°C por 2 min e em seguida foram empregados 35 ciclos de: 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min. Os produtos obtidos desta primeira reação (1 μ L) foram amplificados nas mesmas condições acima e na presença dos oligonucleotídeos F4 e R3.

Tabela 2: Seqüência e posição no cDNA dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR.

nome	5'	seqüência	3'	posição
<i>GAPDH</i>				
F		TCT CTG CTC CTC CTG TTC GAC		2 - 22
R		GGA TCT CGC TCC TGG AAG ATG		319 - 339
<i>XBP-1</i>				
F1		AAA CAG AGT AGC AGC TCA GAC TGC		285-308
F2		TCT GCT GAG TCC GCA GCA G		529-573
F3		GGT GCG TAG TCT GGA GCT AT		31-50
F4		*caattgATG GTG GTG GTG GCA G		49-64
R1		TAC CAA GCC CCT AGT CTT AGA GAT AC		854-879
R2		CAG CAC TCA GAC TAC GTG CAC CTC TG		542-567
R3		**ctcgagTTA GAC ACT AAT CAG CT		1189-1205
<i>IRE-1α</i>				
F		CGG CCT TTG CAG ATA GTC TC		518-537
R		ACG TCC CCA GAT TCA CTG TC		724-743

As seqüências dos oligonucleotídeos estão numeradas pelas posições dos nucleotídeos no cDNA. Os oligonucleotídeos que se ligaram à fita complementar (3'→ 5') estão designados pela letra F ("forward") e aqueles que se ligaram à fita molde (5'→ 3') pela letra R ("reverse"). Número de acesso ao "GenBank": *GAPDH*- NM002046.2; *XBP-1*- NM005080.2 e AB076384.1; *IRE-1 α* - AF059198. Sítios de restrição para *Mfe* I (*) e *Xho* I (**) discriminados em letras minúsculas.

III.6 - Análise de densitometria

As fotografias de géis de agarose corados com brometo de etídeo e autorradiografias foram reproduzidas no aparelho "Alpha Scan Imaging Densitometer" (Alpha Innotech Corporation, Johannesburg, S.A.) e a intensidade das bandas foi analisada por densitometria no programa "Alpha Ease 5.x" usando-se os valores de densidade integrada (IDV) calculados pela função "spot density". As intensidades das bandas dos produtos de interesse foram normalizadas com base na intensidade dos produtos de referência (*ACTINA* ou *GAPDH*) e os valores obtidos foram apresentados em tabelas e/ou em gráficos. As porcentagens foram calculadas considerando os

indivíduos com os maiores valores de intensidade como 100%. A comparação estatística entre os grupos de pacientes e controles saudáveis foi realizada empregando-se o teste *t* não-paramétrico de Mann-Whitney e considerando o nível de significância $p < 0,05$. A comparação entre grupos que receberam drogas (tapsigargina) ou não (ver item III.15) foi realizada empregando-se o teste *t* pareado e o nível de significância $p < 0,05$ foi considerado. Os resultados foram apresentados em gráficos de barra, cujos eixos *y* exibiram as médias dos valores de intensidade seus respectivos erros-padrão.

III.7- Microscopia Confocal

PBMC de doadores saudáveis e pacientes com CVID foram cultivados na presença de 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS por 48 h em estufa a 37°C e com 5% de CO₂. As células foram removidas da placa com PBS 1x, centrifugadas a 240 $\times g$ por 5 min e ressuspendidas em PBS na concentração de 1×10^5 células/200 μL . Dois volumes de 100 μL de cada amostra de paciente e controle foram aplicados em câmaras apropriadas para centrifugação em Cytospin a 600 rpm por 10 min e à temperatura ambiente. As lâminas que receberam as células foram previamente revestidas com poli-lisina (1:10) e após centrifugação as células foram fixadas com acetona gelada. As lâminas foram enviadas ao laboratório do Dr. Júlio Aliberti do Departamento de Imunologia da Duke University Medical Center (Durham, NC, USA) onde foram marcadas com anticorpos anti-human-IgM-Alexa Fluor 488 (Fluorescência verde - Molecular Probes - Invitrogen Corporation) e anti-BiP/GRP78-AlexaFluor 546 (Fluorescência vermelha - Molecular Probes - Invitrogen Corporation), seguido de marcação nuclear com DAPI (Fluorescência azul - Molecular Probes - Invitrogen Corporation). Micrografias foram adquiridas no aumento de 400x usando Apotome

Microcope System (Zeiss). Análise das imagens e sobreposição das fluorescências foram realizadas com o software Axiovision 4.2 (Zeiss), ilustrado através de painéis de cores únicas ou sobreposição das três cores.

III.8- Extração de DNA genômico e PCR

PBMCs foram ressuspensos em 1 mL de Trizol para obtenção de RNA total. Após centrifugação, a fase aquosa contendo RNA foi removida e o restante congelado a -20°C. Para extração de DNA, os tubos foram descongelados a temperatura ambiente e 300 µL de etanol 100% foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas por inversão, incubadas 2-3 min à temperatura ambiente e centrifugadas a 2000 × g por 5 min a 4°C. Os precipitados foram lavados 2 vezes com uma solução de 0,1 M de citrato de sódio em 10% de etanol. Entre cada lavagem os tubos foram mantidos por 30 min a temperatura ambiente e centrifugados como anteriormente. Os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de etanol 75%, incubados por 20 min e centrifugados. O etanol foi removido e o DNA diluído em NaOH 8 mM. Depois de uma incubação de 12 h a 4°C sob agitação branda a leitura da concentração foi feita por espectrofotometria no $\lambda = 260$ nm.

O DNA genômico (100 ng) foi empregado em reações de PCR para amplificação de um segmento do gene *XBP-1* de 736 pb, utilizando a combinação de oligonucleotídeos F5 – 5' CTTGGGCACTTGAAGCTGTT – 3' e R1 e 5 U de *Taq* polimerase (Invitrogen Corporation), nas seguintes condições: 95°C por 1 min; 35 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min; 72°C por 10 min.

III.9- Clonagem de produtos de PCR

Os produtos de PCR foram subclonados no vetor pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega Corporation, San Luis Obispo, CA, USA) seguindo as orientações do fabricante. A reação de ligação foi preparada em um volume final de 10 µL contendo tampão de ligação 1x, 3 Weiss units de T4 DNA ligase, 50 ng do vetor pGEM-T Easy (3 kb) e concentração adequada de DNA. As reações foram incubadas por 12 h a 4°C para obtenção do número máximo de transformantes.

III.10- Transformação

III.10.1- Preparo de bactérias competentes DH5α

Uma colônia de células foi transferida de uma placa com meio sólido de cultura para 4 mL de meio SOB líquido [2% de bacto-triptona; 0,5% de extrato de levedura; NaCl 10 mM; KCl 2,25 mM e MgCl₂ 10 mM, o qual foi adicionado somente no momento do uso] e incubadas por 12 h a 37°C e 300 rpm. Decorrido este tempo, 1 mL desta cultura foi inoculada em 100 mL de meio Psi pH 7,6 (1:100), o qual contém 2% de bacto-triptona; 0,5% de extrato de levedura e MgSO₄ 20 mM.

As células foram incubadas a 37°C sob aeração e 300 rpm até a densidade óptica no comprimento de onda a 600 nm alcançar 0,5. Em seguida, foram transferidas para tubos de 50 mL gelados e mantidas no gelo por 15 min. Após centrifugação a 4°C e 4000 × g por 5 min, os precipitados foram ressuspensos em 0,4 volumes de TfbI (pH 5,8) [KOAc 30 mM; RbCl 100 mM; CaCl₂ 10 mM; MnCl₂ 50 mM e 15% de glicerol (v/v)] e mantidos no gelo por 15 min. As células novamente

foram precipitadas como descrito acima e ressuspendidas em 0,04 volumes de TfbII (pH 6,5) [MOPS 10 mM; CaCl₂ 75 mM; RbCl 10 mM e 15% de glicerol (v/v)].

Alíquotas de 100 µL das bactérias foram colocadas em tubos de 1,5 mL bem gelados e submetidas a um congelamento rápido deixando os tubos por 1 min em uma mistura de gelo seco e etanol. As bactérias foram, então, estocadas a -70°C até o momento do uso.

III.10.2 - Transformação de bactérias competentes

As bactérias foram retiradas do congelador a -70°C e deixadas no gelo até o descongelamento. Um total de 50 µL de células competentes foram misturados com 2 µL de reação de ligação (pGEM/cDNA) e após 30 min no gelo as bactérias foram submetidas a um choque térmico de 42°C por 90 s e logo em seguida foram retornadas ao gelo. Antes do seu plaqueamento, as bactérias foram incubadas a 37°C em 1 mL de meio de cultura SOC (SOB contendo MgCl₂ 10 mM e glicose 20 mM) por 40 min sob agitação branda de 224 rpm.

As placas de cultura para seleção das colônias continham 25 mL de SOB suplementado com MgCl₂ 10 mM e 50 µg/mL de ampicilina. Cada placa foi inoculada com 200 µL de bactérias e depois de 16 h a 37°C, as colônias foram coletadas e transferidas isoladamente para tubos de cultura contendo SOC.

III.10.3 - Purificação dos plasmídeos contendo os insertos

As colônias cresceram 12 h a 37°C sob agitação (300 rpm) em 2 mL de meio de cultura SOC contendo 50 µg/mL de ampicilina. Um volume de 100 µL foi transferido

para um tubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 50 μ L de fenol e 50 μ L de clorofórmio. Os tubos foram vortexados por 10 s e centrifugados a $12000 \times g$ e 4°C por 1 min. Após a centrifugação, uma alíquota de 10 μ L da fase superior foi aplicada em gel de agarose para a detecção de clones contendo os insertos.

O DNA plasmidial de bactérias contendo clones positivos foi purificado utilizando o kit Concert Rapid Plasmid Mini System, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen Corporation). Antes do seqüenciamento, a presença e tamanho dos insertos foi verificada através da digestão dos plasmídeos com *Eco* RI. Para tal, 200 ng do plasmídeo purificado foram incubados por 1 h a 37°C na presença de 0,2 U de *Eco* RI (Invitrogen Corporation) e tampão da enzima 1x [Tris-Cl 50 mM (pH 8,0); MgCl_2 10 mM e NaCl 100 mM]. A reação foi observada em gel de agarose a 0,8% após coloração com brometo de etídeo.

III.11 - Seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas no volume de 20 μ L contendo 500 ng do pGEM/DNA purificado; 3,2 pmoles do oligonucleotídeo universal (pUC/M13 F: "forward" 5' GTTTTCCCAGTCACGACC 3' ou pUC/M13R: "reverse" 5' GTGATAGCTGTTTCCTG 3'); 2 μ L da enzima (kit "ABI PRISM BygDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction with AmpliTaq DNA Polymerase, FS", Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e seu respectivo tampão. Usando o termociclador GeneAmp 9600 (Perkin-Elmer Inc., Boston, MA, USA) os DNAs foram seqüenciados após 40 ciclos de: 10 s a 96°C , 5 s a 50°C e 4 min a 60°C . Em seguida, os produtos foram precipitados com isopropanol a 75%, dissolvidos e aplicados no gel de seqüenciamento de um seqüenciador automático localizado no Departamento de

Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e colocado gentilmente à disposição pelo Dr. Paulo Zanoto. As seqüências de nucleotídeos foram analisadas comparando-as com a seqüência de DNA selvagem depositada no "GenBank" [número de acesso NM_005080], utilizando-se o programa BLAST e/ou alinhando a seqüência ao DNA genômico.

III.12 - Imortalização de linfócitos B com vírus *Epstein Barr* (EBV)

PBMCs foram isolados com Isolymphe ou obtidos a partir de amostras criopreservadas. As células ($0,5$ a 1×10^7) foram ressuspensas em $1800 \mu\text{L}$ de meio RPMI (Invitrogen Corporation) contendo 20% de soro bovino fetal (SBF - Hyclone, Logan, UT, USA), 2 mM de L-glutamina e 100 UI/mL de solução de penicilina e estreptomicina (v/v). A suspensão de células foi transferida para placas de 12 poços e $200 \mu\text{L}$ de sobrenadante de vírus EBV ($100 \mu\text{L}/\text{mL}$) foram adicionados. Depois de 48 h de cultura em estufa de CO_2 a 5% e 37°C , 2 mL de meio RPMI completo foram adicionados aos poços e as placas foram mantidas por mais 3 dias em cultura antes da primeira troca de meio. As células foram nutridas a cada dois dias trocando-se pelo menos $2/3$ do meio. Após 30 dias, aproximadamente, as células foram transferidas para uma garrafa de cultura de 25 cm^2 e mantidas em meio RPMI suplementado com 10% SBF. Amostras de cada repique de células foram congeladas em solução de SBF contendo 10% de dimetilsulfóxido.

III.13- Análise de citometria de fluxo

PBMCs *ex vivo* ou células transformadas por EBV foram marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromos. As células foram ressuspendidas em PBS contendo 1% de soro humano Ab⁺ (Hyclone) e 0,01% de azida sódica. Em seguida, 5×10^5 células foram separadas para marcação com os anticorpos de interesse ou para servir de controle negativo (células sem marcação). Células marcadas com anticorpos não-relacionados também foram utilizadas como controles negativos (controle isotópico). As células foram incubadas com os anticorpos por 30 min no gelo e em seguida foram feitas duas lavagens sucessivas para retirada de anticorpos excedentes. A fluorescência emitida pelas células foi detectada no equipamento FACS Scalibur (Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA) e os dados foram analisados no software Cell Quest ou WinMDI. PBMCs utilizados para transformação com EBV foram marcados com anti-CD3PerCP/CD4FITC/CD8PE (Becton and Dickinson) e anti-CD3FITC/CD19PE/CD45CyCr (Becton and Dickinson). As células transformadas foram marcadas com anti-CD3CyCr/CD19FITC (Becton and Dickinson) 30 e/ou 60-90 dias após a transformação.

III.14 – ELISA

As células B-EBV (5×10^5) foram mantidas em garrafas de 25 cm² e em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 7 dias. Os sobrenadantes foram removidos e diluídos 50 ou 100 vezes em meio de cultura RPMI. Um volume de 200 µL de RPMI ou dos sobrenadantes foram distribuídos em quadruplicatas em uma placa de 96 poços previamente coberta com anticorpos anti-IgM humana. A cobertura das placas foi feita incubando-a por 18 h e 4°C com anti-IgM diluída 1:1000 em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,5 M (pH 9,6). As placas foram lavadas 5 vezes com

tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% Tween 20 e 0.01% thimerosal) e submetidas ao bloqueio dos sítios não cobertos pelos anticorpos PBS-Tween contendo 3% de gelatina por 2 h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente antes da adição dos sobrenadantes.

Após incubação de 2 h à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 5 vezes e aos poços foram adicionados 100 μ L do anticorpo secundário conjugado com peroxidase, diluído 1:2000. Após 1 hora de incubação, sob as mesmas condições das amostras, as placas foram lavadas 5 vezes e o substrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB) (DiaSorin) foi adicionado. Entre cinco e trinta minutos após a adição do substrato, a reação foi interrompida adicionando-se 50 μ l de H₃PO₄ 1M. A leitura das absorbâncias (λ = 450/630 nm) procedeu-se no leitor de ELISA SpectraMax 190 da Molecular Devices (Mountain View, CA, EUA) e o programa SOFTmaxPro para determinação dos títulos dos anticorpos.

III.15- Estimulação de estresse celular

PBMCs ou linfócitos imortalizados por EBV (2×10^6 células) foram ressuspensos em 400 μ L de meio de cultura RPMI contendo apenas 2 mM de L-glutamina e 100 UI/mL de gentamicina e cultivados em uma placa de 48 poços. Uma hora após cultura em estufa de CO₂ a 5% e 37°C, foi adicionada a droga inibidora de Ca⁺ ATPase, taspigargina (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) na concentração final de 300 nM, 500 nM ou 1 μ M. Um poço contendo células não recebeu a droga. Depois de 3, 8 ou 16 h em cultura a placa foi centrifugada a $250 \times g$ por 2 min a 4°C e os sobrenadantes foram descartados. As células foram, então, lisadas com 200 μ L de Trizol reagente para obtenção de RNA total a posteriori.

IV- Resultados

As células mononucleares obtidas *ex vivo* a partir de sangue total de indivíduos normais e de portadores de CVID foram analisadas por *Western blot* após SDS-PAGE e marcação com soro policlonal anti-XBP-1 humano. Através dessa análise a banda de ~30 kDa correspondente à forma não-processada de XBP-1 (p33) foi identificada em todos os pacientes e controles investigados, sendo que nenhuma diferença quantitativa ou qualitativa foi observada **[Figura 4]**.

A banda de ~50 kDa representa a forma processada de XBP-1 (p54) e não foi simples de ser analisada, pois podia ser observada somente em alguns *blots*. Esse fato pode ser consequência de uma menor afinidade do anticorpo por esse produto ou da rápida degradação da proteína nas amostras de PBMCs. Nos experimentos nos quais a banda p54 pôde ser observada **[Figuras 4A e 4B]**, a análise de densitometria mostrou que esta proteína correspondia a uma porcentagem média de 34% ($n=13$) do total (p33+p54) de proteínas XBP-1 **[Figuras 4C e 4D]**. Diferentemente dos demais indivíduos, a banda de 54 kDa do paciente P8 não representava mais do que 10% do total. A detecção de actina (proteína de 45 kDa) foi utilizada para normalização da intensidade das bandas reveladas nas autorradiografias e quantificadas por densitometria **[Figura 4B]**.

Na figura 4A pode-se observar uma banda de ~25 kDa junto à proteína de 33 kDa no controle C7. Entretanto, a banda não estava presente em extratos de células obtidos de novas colheitas de sangue (dados não mostrados) de modo que pode se tratar de um artefato do experimento. O mesmo fenômeno pode ser visto em amostras de outros indivíduos em *blots* diferentes.

A proteína p33 foi detectada em culturas de PBMCs de 48 h. Porém a intensidade da banda foi de 46 a 78% menor do que a de células analisadas *ex vivo*. Nas células em cultura a p54 foi claramente detectada, sendo que a intensidade da banda foi semelhante em células cultivadas somente em meio de cultura (controle) ou tratadas com LPS por 48 h **[Figuras 5A e 5B]**. Portanto, o surgimento de p54 foi independente da adição de LPS às culturas celulares e a diminuição de p33 nas culturas pode representar a conversão de XBP-1 não-processado para processado.

RNA total obtido a partir de PBMCs de pacientes e controles foram empregados em reações de RT-PCR semi-quantitativo para análise da expressão gênica de *XBP-1*. Os cDNAs foram amplificados com duas combinações distintas de oligonucleotídeos. A primeira combinação (F1 e R1) é capaz de amplificar dois produtos, um derivado do mRNA XBP-1 não-processado (*np-XBP-1*) com 594 pb e outro correspondente ao mRNA XBP-1 processado (*p-XBP-1*) que possui 26 pb a menos (568 pb). A segunda combinação (F1 e R2) amplifica apenas o mRNA não-processado, pois o oligonucleotídeo R2 corresponde em pares de bases àqueles 26 nucleotídeos que são eliminados durante o processamento do mRNA de XBP-1 **[Figura 6A]**.

Analisando a primeira reação (F1 e R1) em gel de agarose não foi possível distinguir os produtos de cDNA *p* e *np* (568 pb e 594 pb, respectivamente) devido à sua proximidade em pares de bases. Portanto, esses foram analisados em conjunto por densitometria e nenhuma diferença entre a intensidade das bandas de pacientes e controles foi observada. Usando a combinação de oligonucleotídeos F1-R2, o produto correspondente ao mRNA não-processado (*np-XBP-1*, 282 pb) foi detectado em todos os pacientes (*n*=10) e controles (*n*=8) analisados, porém, a intensidade do produto

gerado em P8 foi maior do que a dos demais indivíduos em duas amostras diferentes de RNA total **[Figuras 6B e 6C]**.

RNA total foi obtido a partir de nova colheita de sangue de P8 para re-avaliação da expressão de *XBP-1* **[Figura 7]**. Além de P8 a análise de densitometria dos amplificadores *np-XBP-1* (282 pb) foi realizada com amostras de P3, P18, C2 e C20 já analisadas anteriormente e foram incluídas no estudo amostras de P1, P2, P5, P11, P19, P20, P21, P22 e C1, C3, C4, C12, C21. Após normalização das intensidades dos produtos de RT-PCR, com base nos níveis de expressão de *GAPDH*, foi constatado que a expressão de produtos *np-XBP-1* de P8 era 30-90% maior do que em controles e pacientes utilizados na comparação **[Figura 7]**. Este resultado associado ao fato de p54 ter sido fracamente detectada nos extratos celulares de P8 sugeriu que P8 poderia apresentar defeitos nos mecanismos de processamento de mRNA de *XBP-1* que poderiam prejudicar a geração de mRNA processado e conseqüente de p54.

Na tentativa de verificar se realmente existia algum déficit na produção de espécies processadas de transcritos de *XBP-1* em P8, os produtos *p* e *np* (568 pb e 594 pb) obtidos com a combinação de oligonucleotídeos F1-R1 foram analisados em gel de agarose 1000 a 3% (ver Materiais e Métodos), cuja resolução permite a separação eficiente destes produtos, depois da corrida eletroforética. Os produtos de RT-PCR (*np* e *p*)-*XBP-1* de 6 indivíduos saudáveis (C2, C3, C8, C9, C20, C22) e sete pacientes com CVID (P1, P2, P5, P8, P10, P11, P22) foram submetidos a esta análise. Os produtos *p-XBP-1* (568 pb) não foram detectados em duas amostras diferentes de cDNA de P8 e, em contrapartida, as intensidades dos produtos *np-XBP-1* (282 ou 594 pb) foram no mínimo 30% maiores do que a de outros pacientes e controles **[Figuras 8A e 8B]**.

A expressão das formas *np*-XBP-1 foi até 70% maior em células B transformadas com vírus *Epstein Barr* do que em PBMCs (C3) e formas processadas de mRNA não foram detectadas nestas linhagens celulares. Verificamos ainda que outras células purificadas a partir de sangue periférico (linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺) expressavam somente as formas *np*-XBP-1 **[Figura 8B]**.

Uma combinação de oligonucleotídeos (F2-R1) **[Figura 6A]** que amplifica apenas a espécie processada de mRNA de XBP-1 (*p*-XBP-1) foi utilizada para análise da expressão deste transcrito em duas concentrações diferentes de cDNA obtido a partir de PBMCs *ex vivo*. As intensidades dos produtos de RT-PCR (350 pb) foram analisadas por densitometria e deste modo constatou-se em P8 que a intensidade das bandas de 350 pb era 20 a 40% menor do que a de indivíduo controle (C6) confirmando a menor expressão de *p*-XBP-1 **[Figura 8C]**.

Os PBMCs do paciente P8 **[Figura 9, painel à esquerda]** e do controle C2 **[Figura 9, direita]** foram lavados e centrifugados para aderência das células em lâminas. As células foram fixadas, os núcleos revelados com DAPI e foram feitas marcações com anti-IgM e anti-Bip/GRP78 (uma chaperona envolvida no dobramento de proteínas dentro do retículo endoplasmático). As lâminas foram então analisadas por microscopia confocal. Nas células do paciente P8 com CVID verificou-se a sobreposição completa das imagens compostas pela marcação de IgM e GRP78. Em contrapartida, nas células de C2 a IgM não estava restrita ao retículo, aparecendo em outros compartimentos celulares. Este resultado corroborou com a hipótese de que falhas nos mecanismos de geração de mRNA *p*-XBP-1 e conseqüentemente da proteína ativa p54 podem estar envolvidos com a deficiência de anticorpos em pacientes com CVID.

O cDNA completo de XBP-1 de P8 e 19 nucleotídeos da 5'-UTR foram seqüenciados. Os produtos de PCR foram purificados de gel de agarose e clonados no vetor pGEM-T-Easy (Promega) usando T-ligase. Bactérias competentes DH5 α foram transformadas com esses plasmídeos pelo método do choque térmico. As bactérias transformadas foram semeadas em placas de Petri e as colônias resultantes foram expandidas e submetidas a uma preparação rápida (Rap-prep) para detecção daquelas que continham o fragmento de XBP-1. O DNA plasmidial dos clones positivos foram então purificados e os tamanhos dos insertos confirmados após digestão dos plasmídeos purificados com *Eco* RI (dados não mostrados). Aqueles plasmídeos contendo os insertos de interesse foram seqüenciados empregando-se os oligonucleotídeos M13 F e M13 R (específicas dos plasmídeos), de tal maneira que as fitas de DNA foram seqüenciadas em ambos os sentidos. Ao longo dos nucleotídeos analisados não foi detectada nenhuma alteração que pudesse explicar a falha no processamento das moléculas de mRNA de XBP-1 pela IRE-1 α (dados não mostrados).

A partir de DNA genômico de P8 também foi seqüenciado um segmento considerado crítico na interação de IRE-1 α e XBP-1 para geração do transcrito processado [LEE *et al.*, 2002]. A combinação de oligonucleotídeos (F5 e R1) foi utilizada para amplificar 736 pb do gene *XBP-1* entre os nucleotídeos 27516779 e 27516043 no cromossomo 22 ou 527 e 583 no cDNA (n^o de acesso no "GenBank" NM_005080). A seqüência de DNA *XBP-1* de P8 previamente clonada em pGEM-T-Easy foi comparada com a seqüência de DNA selvagem depositada no "GenBank" (chr22:27515103-27521114) após o sequenciamento dos nucleotídeos. Na seqüência representativa apresentada estão destacados os nucleotídeos que compõem o sítio de ligação da enzima e aqueles que são eliminados para dar origem ao mRNA *p-XBP-*

1. Nesta região também não foi encontrada nenhuma alteração na seqüência de nucleotídeos de P8 **[Figura 10]**.

A dependência da atividade de endonuclease da IRE-1 α para o processamento de mRNA de XBP-1 levou-nos a investigar sua expressão em PBMCs do paciente P8. Para isso, pelo menos duas amostras diferentes de cDNA de P8 foram usadas na amplificação de IRE-1 α e, em ambas, as intensidades dos produtos de RT-PCR foram semelhantes às de outros pacientes e controles (dados não mostrados).

Em linhagens celulares e em células primárias murinas, a ativação de IRE-1 α e conseqüente processamento de transcritos de XBP-1 podem ser induzidos através de tratamento com LPS e drogas que induzem estresse no retículo endoplasmático, como taspigargina. Portanto, uma possível maneira de detectar defeitos nesta via seria analisando a taxa de conversão de moléculas de XBP-1 não-processadas em processadas após a estimulação das células com drogas específicas *in vitro*.

A estimulação de PBMCs por 2 h com 1 μ M de taspigargina aumentou as quantidades de cDNAs de IRE-1 α no indivíduo controle C2 (100%) e em menor grau em P8 (36%) **[Figura 11A e 11B]**, sendo este efeito dose dependente como observado usando células de um terceiro indivíduo (C24) **[Figura 11C]**.

A imortalização de linfócitos B de P8 viabilizou número suficiente de células para a realização dos experimentos de estimulação e dosagem de imunoglobulinas *in vitro*. A imortalização foi feita com sobrenadantes contendo vírus *Epstein Barr* gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Antônio Condino Neto do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo. Tendo em vista que alguns pacientes com CVID podem apresentar deficiência de células B [ERRANTE *et al.*, 2004; WARNATZ *et al.*, 2002], os PBMCs antes de serem utilizados na transformação foram analisados por

citometria de fluxo com relação a expressão de CD19. Em indivíduos saudáveis, 5 a 7% dos linfócitos no sangue periférico eram CD19⁺ **[Figura 12A]**. Essas células foram cultivadas em duplicatas sendo que, inicialmente, células de 5 indivíduos foram transformadas, mas ao final do processo somente células de 3 controles foram viáveis (C2, C25 e C26).

Como não foi possível a colheita de sangue do paciente P8 bem como de outros pacientes com CVID e tendo um protocolo bem estabelecido de transformação e cultura de células, PBMCs congelados de P8 e de outros 7 pacientes foram empregados para transformação. Devido ao número limitado de células, não foi possível a realização de uma fenotipagem inicial como aquela realizada nos indivíduos utilizados como controles. Ao final de 30 dias, células de 5 desses pacientes (P4, P9, P11, P24 e P25) passaram para a fase de repique.

A evolução da transformação celular foi acompanhada ao microscópio óptico e, logo a partir da primeira semana de cultura, os primeiros sinais de proliferação celular foram observados. Ao final de 30 dias de cultura, as células formaram grandes "grumos" resultantes da intensa proliferação e por citometria de fluxo a expressão de CD19 nestas populações foi investigada. Em gráficos de tamanho ("forward scatter" - FSC) por granulosidade ("side scatter" - SSC) verificou-se que as células transformadas tornaram-se maiores (blastos) do que os linfócitos *ex vivo* **[Figuras 12B vs 12A]** e por meio de análise da emissão de fluorescência foi verificado que nas amostras de controles 95% das células eram CD19⁺. Além disso, foi constatado que outras populações de células, tais como CD14⁺ (dados não mostrados) e CD3⁺ já não estavam mais presentes nas culturas **[Figura 12B]**. As células foram repicadas periodicamente e após 2-3 meses de cultura a expressão de CD19 permaneceu constante (dados não mostrados). A análise de citometria de fluxo de células de P8

revelou um menor número de células CD19⁺ do que nos controles (75% vs 95%) enquanto que em outro paciente com CVID (P24) o número de células foi semelhante ao observado em células do controle saudável (95%) **[Figura 12B]**.

As células de P8 demoraram mais do que o habitual para entrarem em fase de repique. Somente depois de 2 meses, em placa de 12 poços, que as células puderam ser transferidas, inicialmente, para uma placa de 6 poços e, em seguida, para garrafas. Uma indicação da menor taxa de proliferação celular em relação às culturas de indivíduos normais foi a presença de "grumos" menores de células. A taxa de proliferação celular foi medida através de ensaio de incorporação de ³H-Timidina às células transformadas por EBV após 16 h de cultura. Deste modo, foi observado que existia uma cinética de proliferação diferente entre os indivíduos, o que dificultou a comparação dos valores obtidos da incorporação do radioisótopo (dados não mostrados).

Os experimentos subseqüentes foram realizados empregando-se células com mais de 60 dias de transformação, cujo fenótipo já se encontrava bem estabelecido. Inicialmente, as células foram colocadas em cultura por 7 dias e os sobrenadantes foram colhidos e usados puros ou diluídos 50 ou 100 vezes para dosagem de IgM não-específica através de ensaio de imunoenzimático (ELISA). Deste modo, detectou-se níveis reduzidos de IgM nos sobrenadantes de células de P8 em comparação com aqueles do indivíduo saudável C2 **[Figura 13]**.

A expressão de XBP-1 em células B-EBV foi investigada por *Western blot*. Os dados confirmaram uma menor expressão da proteína p54 nas células de P8 **[Figuras 14A, 14B]**. Empregando-se células B-EBV, ao invés de PBMCs, também foi possível detectar a mesma alteração na expressão de p54 em amostras de outros pacientes com CVID (P23, P24, P25 e P26). Em relação aos controles C2, C25 e C26, além da

baixa expressão de p54 uma maior proporção de formas p33 foi observada nos pacientes, o que pode representar o acúmulo desta proteína **[Figura 14A]**. No mesmo *blot* observa-se ainda um indivíduo com CVID (P24) que apresentava um padrão eletroforético diferente dos demais pacientes e controles. Na amostra analisada, uma banda maior que p54 e outra menor (identificadas por asteriscos) foram reveladas, sugerindo que este paciente pode apresentar um defeito molecular distinto daquele observado em P8 e nos demais pacientes **[Figura 14A]**.

Como mencionado anteriormente, nos linfócitos transformados foram detectados altos níveis de mRNA *np*-XBP-1, porém as formas processadas não foram visualizadas em gel de agarose 1000 **[Figura 8B]**. Essas células foram cultivadas na presença ou não de diferentes concentrações de tapsigargina (TAP) por 3, 8 ou 16 h. Em seguida, a expressão das moléculas *p*-XBP-1 foi analisada por RT-PCR com a combinação de oligos F2-R1. Em 3 experimentos diferentes, os produtos *p*-XBP-1 de 350 pb foram detectados nas células tratadas com 300 nM da droga por 3 h, enquanto que nas culturas sem droga os produtos de RT-PCR foram fracamente visualizados **[Figura 15A]**. Doses maiores ou períodos mais longos de cultura ocasionaram a morte acentuada das células. Esses dados mostraram então que células B transformadas com o vírus *Epstein Barr* expressavam *np*-XBP-1 e a indução de estresse de retículo induzia a expressão da forma processada.

Em células dos pacientes P8, P23, P24, P25 e P26, o estresse causado pela TAP aumentou as quantidades de produtos de RT-PCR de *p*-XBP-1 em até 10% (P23), contudo, esta proporção foi inferior àquela observada nos controles C2 e C25, nos quais os aumentos foram de 34 e 23%, respectivamente **[Figuras 15A e 15B]**. As variações de expressão obtidas com relação a *np*-XBP-1 nas linhagens celulares não foram significativas. As mesmas amostras de cDNA foram analisadas quanto a

expressão de mRNA de IRE-1 α e do mesmo modo verificou-se que o tratamento com TAP induziu quantidades menores dos produtos de RT-PCR nos pacientes com CVID quando comparadas aos controles **[Figura 16A e 16B]**. Além disso, verificou-se que no grupo de pacientes a expressão de IRE-1 α foi reduzida em comparação com o grupo de indivíduos saudáveis **[Figura 16 B - gráfico à direita]**. Esses dados confirmam que o estresse no retículo endoplasmático aumenta a expressão de IRE-1 α e induz a geração de mRNA *p*-XBP-1 em células humanas. Entretanto, em células B de pacientes com CVID, a taxa de geração dessas moléculas foi menor do que nos indivíduos saudáveis investigados, mostrando que a ativação da via de sinalização mediada por IRE-1 α /XBP-1 pode estar afetada nestes pacientes.

V - Discussão

Os portadores de CVID são reconhecidos devido à sua grande susceptibilidade às infecções piogênicas recidivantes causadas pela deficiência de anticorpos protetores circulantes. Dados importantes da literatura têm demonstrado que a deficiência de anticorpos pode estar associada a defeitos primários nas próprias células B ou aos linfócitos T, haja visto que a geração de imunidade humoral requer a cooperação efetiva destes dois tipos celulares [SPICKETT *et al.*, 2001].

Dispomos atualmente de 54 pacientes diagnosticados com CVID no Serviço de Alergia e Imunologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, uma das dez maiores casuísticas do mundo, considerando-se pacientes vivos e em andamento. Os pacientes têm sido caracterizados por meio de critérios imunológicos, o que nos permitirá a distinção de subgrupos e o levantamento de dados significativos que possam vir a nortear a terapêutica e melhorar a qualidade de vida dos mesmos. Além disso, a descrição de possíveis alterações genéticas ou funcionais pode trazer resultados importantes para a compreensão da fisiopatogenia da CVID.

Em nosso estudo abordamos aspectos da imunologia das células B e T, a fim de encontrar marcadores para esta doença. Em comparação com indivíduos normais, encontramos pelo menos dois grupos distintos entre nossos pacientes com CVID. Um deles foi caracterizado pela redução nos números de células B no sangue periférico e o outro pela deficiência de células T. Esse último corresponde a cerca de 70% dos pacientes e é caracterizado pela menor resposta linfoproliferativa e baixa expressão de citocinas e de marcadores de ativação tais como, CD25, CD69, CD70 e CD152. Outros estudos *in vitro* também revelaram uma maior taxa de apoptose de linfócitos T

CD4⁺ de pacientes, talvez em decorrência da maior expressão de Fas (CD95) sobre a superfície de PBMCs estimulados [ERRANTE *et al.*, 2004].

Em um grupo de 38 pacientes com CVID a resposta proliferativa contra antígenos e mitógenos foi restituída através da adição de leptina a culturas de células destes pacientes. A leptina apresenta propriedades funcionais semelhantes às de determinadas citocinas como modular a resposta e imune e conferir proteção contra apoptose. De fato, o tratamento conferiu ainda proteção aos linfócitos dos pacientes da morte induzida por ativação, em parte por aumentar a produção de IL-4 e IL-2. Além disso, os níveis de leptina nos soros dos pacientes foram reduzidos em comparação com indivíduos saudáveis da mesma idade, sexo e massa corpórea, sugerindo que a leptina pode estar envolvida nos defeitos celulares observados neste grupo de pacientes com CVID [GOLDBERG *et al.*, 2005]. A leptina é um hormônio importante na modulação da atividade da insulina e nos pacientes com CVID foi constatada uma resistência moderada à insulina, porém não havia correlação entre os baixos níveis de leptina e a perda abrupta de peso observada em alguns dos pacientes com CVID [FERRARONI *et al.*, 2005].

Em um grupo de pacientes foi investigada a ação de BLYS sobre a produção de anticorpos e proliferação de células B *in vitro*. Os pacientes não apresentaram defeitos na expressão de BLYS ou de seu receptor na superfície celular, mas, a adição da proteína recombinante às culturas de células dos pacientes aumentou a produção de IgM e a resposta linfoproliferativa [STEWART *et al.*, 2003].

Esses estudos sugerem que BLYS assim como leptina podem constituir agentes imunoterapêuticos nas patologias relacionadas à deficiência de anticorpos. Nesse sentido, a caracterização dos defeitos funcionais afetando linfócitos B de pacientes com CVID tem auxiliado bastante, contudo, somente a caracterização

genética da doença é capaz proporcionar o reconhecimento de alvos e o estabelecimento de agentes terapêuticos precisos.

Nos últimos dois anos os primeiros defeitos genéticos associados à Imunodeficiência Comum e Variável, incluindo em ICOS, TACI, BAFF-R e CD19 foram identificados. A mais recente descrição molecular da CVID mostrou uma mutação no gene *TNFRSF13B*, o qual codifica TACI. A mutação em homozigose foi associada a um grau mais severo da doença e os heterozigotos desenvolveram alguns dos sintomas tais como, hipogamaglobulinemia demonstrando que em humanos as mutações em TACI apresentam penetrância variável [SALZER *et al.*, 2005].

A deleção em homozigose no gene *ICOS* foi relatada em um número menor de indivíduos e foi a primeira descrição molecular da CVID [GRIMBACHER *et al.*, 2003 e SALZER *et al.*, 2004]. A presença desta mutação foi testada em 38 de nossos pacientes [KOKRON *et al.*, 2004], nos quais o produto de RT-PCR correspondente ao gene selvagem de *ICOS* foi amplificado [Anexo 1], confirmando a ausência deste defeito genético nos pacientes analisados.

A ativação de ICOS é um dos sinais responsáveis pela diferenciação terminal de células B em plasmócitos, em parte devido à sua importância para a produção de IL-10. Além do papel bem definido de ICOS, uma série de defeitos funcionais afetando os estágios terminais de diferenciação da célula B têm sido reportados em pacientes com CVID, entre eles, a expressão diminuída de CD27 [WARNATZ *et al.*, 2002] e a baixa taxa de hipermutação somática nos centros germinativos [BONHOMME *et al.*, 2000; ANDERSEN *et al.*, 2005].

Corroborando esses fatos observou-se em biópsias de linfonodos de pacientes centros germinativos grandes e hiperplásicos, cujas células expressavam níveis elevados de BCL-6, um fator de transcrição que controla negativamente a expressão

de Blimp-1 e outros genes envolvidos com a diferenciação terminal de linfócitos B em plasmócitos. Ao contrário dos controles, nos linfonodos dos pacientes havia números mais elevados de células Blimp-1⁺/Syndecan-1⁻, que foram consideradas como células precursoras pelos autores deste estudo e não foram detectados plasmócitos maduros Blimp-1^{low}/Syndecan-1^{high}, sendo esta a primeira evidência de que o bloqueio na diferenciação terminal dos linfócitos B pode causar CVID. O fato das células dos pacientes com CVID expressarem Blimp-1 reforça, ainda, a importância de sinais *downstream* de Blimp-1 para a geração de plasmócitos funcionais, por exemplo, a sinalização mediada pelo fator de transcrição XBP-1 [TAUBENHEIM *et al.*, 2005].

Os transcritos de XBP-1 são altamente expressos em linhagens de mieloma humano [WEN *et al.*, 1999], em plasmócitos obtidos a partir de infiltrados de doenças inflamatórias como artrite reumatóide, bem como em linhagens e culturas primárias de linfócitos B ativados com anti-CD40 ou LPS. Além disso, observa-se uma deficiência grave de anticorpos em camundongos quiméricos *XBP-1^{-/-}/RAG-2^{-/-}*, devido aos números reduzidos de plasmócitos nos tecidos linfóides destes animais [REIMOLD *et al.*, 2001]. Sobre esses aspectos pacientes com CVID apresentam características semelhantes às observadas nos animais deficientes de XBP-1 entre elas, a hipogamaglobulinemia e a baixa resistência às infecções contra patógenos T dependentes e independentes.

Para investigar a associação de defeitos na sinalização mediada pelo fator de transcrição XBP-1 e a CVID, PBMCs de pacientes foram extraídos para investigação das expressões protéica e gênica deste fator de transcrição. Através de marcação com antisoro anti-XBP-1 foi detectada uma banda de ~30 kDa em amostras de células *ex vivo* de indivíduos saudáveis e pacientes com CVID. Nos modelos murinos e em linhagens celulares humanas, este produto corresponde em tamanho à proteína

codificada pelo mRNA de XBP-1 não-processado (p33 kDa), enquanto que os transcritos submetidos a um evento de *splicing* codificam a proteína de 54 kDa [CALFON *et al.*, 2002].

As principais funções de XBP-1 na biologia dos linfócitos B têm sido atribuídas à proteína de 54 kDa. Isto porque, ambos os eventos, processamento de mRNA de XBP-1 e expressão da molécula de 54 kDa, estão intimamente relacionados à diferenciação de células B *in vitro*. Através do uso de diferentes estímulos de diferenciação, tais como IL-5, IL-6 ou LPS observou-se um aumento concomitante na abundância de transcritos de cadeias pesadas (μ) e leves (κ) de imunoglobulinas e de mRNA da forma processada de XBP-1 [GASS *et al.*, 2002].

Partindo desse princípio, passamos a testar o efeito do LPS sobre a produção de XBP nas células de pacientes e controles normais. Nas culturas houve uma redução na expressão da proteína de 33 kDa em relação às células *ex vivo* e uma clara predominância do produto de 54 kDa em relação à banda de 33 kDa. Essa observação constituiu uma forte evidência de que houve a conversão da produção da proteína XBP-1 de 33 kDa para a de 54 kDa. Contudo, os sinais responsáveis por isso não sabemos, pois, a conversão foi igualmente constatada em células tratadas ou não com LPS.

A mudança para a forma de 54 kDa reflete o rearranjo na maquinaria transcricional que direciona o processamento de mRNA XBP-1. Com base em nossos resultados, embora o produto de 54 kDa tenha sido detectado em PBMCs em cultura, isto não foi relacionado a um maior aumento nos níveis de mRNA de XBP-1 neste mesmo tempo de cultura (48 h) (dados não mostrados).

A análise de *Western blot* a partir de células *ex vivo* revelou um paciente (P8), cuja produção da proteína de 54 KDa era reduzida em comparação aos outros

pacientes e controles. Através de RT-PCR também foi constatada a redução na expressão das moléculas processadas de mRNA de XBP (*pXBP-1*), as quais codificam a proteína de 54 kDa. Por outro lado, havia uma expressão aumentada de formas não-processadas de mRNA em diferentes amostras de cDNA do paciente P8. Em conjunto, esses dados sugeriram a presença de falhas no processamento das moléculas de mRNA de XBP-1, levando ao acúmulo de mRNA *npXBP-1* e, em contrapartida, à diminuição de mRNA *pXBP-1* e de seu produto, a proteína p54.

A ausência de p54 e o acúmulo de p33 tem implicação biológica importante que foi bem caracterizada através de uma série de estudos *in vitro*. Primeiramente, foi notado que a presença de p54 protegia células tumorais da apoptose. Células de mieloma, por exemplo, concomitante às quantidades aumentadas de p54, apresentaram altos níveis dos transcritos processados, o que foi associado à proteção contra a morte [LEE *et al.*, 2003b].

Com base nessas observações, mutantes que são incapazes de sofrer *splicing* pela IRE-1 α foram construídos e transfectados em fibroblastos de embriões de camundongos (MEF). Nessas células as espécies mutantes de mRNA se acumularam exercendo um efeito dominante-negativo, uma vez que a p33 formava dímeros entre si ou mesmo com ATF6 α por meio de seus domínios zipper-leucina, comprometendo as funções de ambos fatores de transcrição, p54-XBP-1 e ATF6 e tornando as células mais susceptíveis à morte por apoptose [LEE *et al.*, 2003b].

Apesar de não termos avaliado a susceptibilidade das células de nossos pacientes aos estímulos apoptóticos, aparentemente, o acúmulo de transcritos não-processados não está comprometendo a sobrevivência de linfócitos B CD19⁺ no sangue periférico do paciente P8. Com base em análises de citometria de fluxo, em amostras de P8 os números de células B CD19⁺ (15,83%) e CD19⁺/CD27⁺ (2,17%)

no sangue periférico estavam dentro da faixa de normalidade [ERRANTE *et al.*, 2004].

Vale ressaltar neste momento que entre os imunodeficientes em estudo, há um grupo que apresenta deficiência de células B CD19⁺, sendo que alguns pacientes apresentaram menos de 1% destas células no sangue periférico. Há ainda um subgrupo de pacientes com expressão reduzida de CD27 na superfície de células B CD19⁺ de sangue periférico e um estudo cinético mostrou a maior diminuição de CD27 e CD70 em linfócitos CD3⁺ dos pacientes com CVID do que controles normais, após estimulação com PHA [ERRANTE *et al.*, 2004].

O paciente P8 embora possuísse números normais de células B no sangue periférico, apresentou os níveis séricos de IgM (111 e 150 mg/dL, duas análises) e IgG (546 mg/dL) abaixo da média normal para a faixa etária do paciente (17 anos). Os níveis séricos de pelo menos dois isótipos de imunoglobulinas estavam reduzidos em todos os pacientes com CVID estudados, independente do subgrupo ao qual pertenciam. Esses resultados reforçam aqueles da literatura mostrando que células B de pacientes com CVID embora em números normais não sejam capazes de produzir anticorpos *in vivo* e *in vitro*.

In vivo, distúrbios no processamento de proteínas no RE estão implicados no aparecimento de vários tipos de doenças neurodegenerativas e vasculares, por causa da morte celular induzida pelo acúmulo de proteínas [IWAWAKI *et al.*, 2003]. A proteção conferida por p54-XBP-1 no sentido de evitar o acúmulo de proteínas no RE, foi demonstrada em determinadas linhagens de linfócitos B. A princípio, verificou-se que a presença de XBP-1 era importante para o controle da expressão de componentes da via de degradação de proteínas no RE [LEE *et al.*, 2003a]. Uma análise mais criteriosa empregando-se plasmócitos obtidos da estimulação de células

B primárias, mostrou que XBP-1 pode acionar mecanismos que garantem a sobrevivência das células, contudo ao invés de promover a degradação estimula o transporte e secreção de proteínas do RE [TIROSH *et al.*, 2005].

A síntese de IgM em altos níveis e sobretudo na secreção destas moléculas, são dependentes de modificações pós-transcricionais exercidas por XBP-1 [TIROSH *et al.*, 2005]. Porém, tais modificações são praticamente restritas à IgM e não a outras glicoproteínas, sendo, portanto, esta via de ativação a mais importante para a maturação do linfócito B em plasmócito e sobrevivência destas células a longo-termo,

Em células do imunodeficiente P8 havia um maior número de moléculas de IgM no interior do RE do que em células do controle C2, como observado através da justaposição de imagens geradas por microscopia confocal de células marcadas com anti-IgM e anti-GRP78 (“glucose-regulated protein 78 ou BiP- “binding protein”). Assim como no soro, os níveis de IgM em sobrenadantes de culturas de células B de P8 estavam reduzidos, contribuindo para a hipótese de que defeitos na geração de XBP-1 ativo podem prejudicar a secreção de IgM.

O seqüenciamento do cDNA não-processado de XBP-1 em amostras de P8 não revelou nenhuma modificação na seqüência de nucleotídeos que justificasse a deficiência na expressão de XBP-1. Um fragmento no DNA genômico compreendendo o sítio de *splicing* pela IRE-1 α também foi seqüenciado e novamente nenhuma alteração foi encontrada. Portanto, o defeito molecular associado ao déficit na geração de p54 ainda não foi determinado e isto levanta a possibilidade de que a via de ativação mediada por IRE-1 α /XBP-1 pode estar sendo indiretamente modulada por defeitos em outros mecanismos envolvidos com a síntese e secreção de Ig.

De fato, vários trabalhos têm mostrado que assim como XBP-1 é fundamental para a síntese e secreção de IgM, o acúmulo de cadeias μ constitui um dos principais eventos para ativação de IRE-1 α e subsequente *splicing* de mRNA de XBP-1 em células B. A análise sob esse ponto de vista, sugere que o padrão de expressão de XBP-1, pode ser alterado por defeitos moleculares não relacionados, os quais eventualmente possam vir a prejudicar a síntese de IgM. Por exemplo, determinadas mutações nos componentes Ig α /Ig β , impedem a ligação destas moléculas às cadeias pesadas de mIg, sendo assim, a IgM recém-sintetizada se acumula no RE ao invés de se associar e ser translocada por BiP até a membrana plasmática [HENDERSHOT & KEARNEY, 1988; FOY & MATSUUCHI, 2001; WOLFGAN *et al.*, 2004].

Em PBMCs *ex vivo* do paciente P8 e de outros imunodeficientes, a expressão de mRNA de IRE-1 α foi analisada e diferenças entre o pacientes e controles não foram detectadas. Contudo, nessa condição, defeitos na expressão de IRE-1 α na célula B podem estar “mascarados”, devido à mistura com outras populações de células, as quais expressam a proteína constitutivamente [TIRASOPHON *et al.*, 1998]. Além disso, esses resultados não excluem a possibilidade de mutações nesta molécula causarem falhas no processamento das espécies não-processadas de XBP-1 no paciente P8.

Defeitos dessa natureza foram observados em linhagens de células de mamíferos transfectadas com mutantes de IRE-1 α . Mutações pontuais criadas nos domínios catalíticos do gene selvagem demonstraram que a integridade dos domínios quinase e de endonuclease de IRE-1 α são igualmente importantes para a geração de complexos da enzima com as moléculas de RNA [BERTOLOTTI *et al.*, 2001]. A atividade fosforilativa funcional é requerida, ainda, para a regulação dos

níveis ou da estabilidade de mRNA de IRE-1 α , de tal maneira que foi observado um acúmulo destas moléculas em células transfectadas com proteínas contendo mutações no domínio quinase [TIRASOPHON *et al.*, 1998].

In vitro a análise funcional de IRE-1 α , pode ser simulada através do tratamento de células com drogas que induzem estresse de retículo endoplasmático, já que sob estas condições a atividade endonucleolítica da enzima é ativada e, com isso, espécies processadas de XBP-1 são geradas [CALFON *et al.*, 2002; GASS *et al.*, 2002; IWAKOSHI *et al.*, 2003 (1)]. O tratamento dos PBMCs com taspigargina aumentou a expressão de IRE-1 α em relação às células não-estimuladas, sendo que no paciente P8 o efeito foi modestamente inferior ao observado no controle (C2).

Estes estudos têm sido realizados com linfócitos primários purificados a partir de baço de camundongos [IWAKOSHI *et al.*, 2003 (1)] ou MEFs [LEE *et al.*, 2003a; CALFON *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2003b], com linhagens de células de outros mamíferos, tais como AR42J de pâncreas de rato [BERTOLOTTI *et al.*, 2001], 293T de rim embrionário humano (HEK) [BERTOLOTTI *et al.*, 2001; IWAWAKI *et al.*, 2004] e por fim com linhagens tumorais humanas, como mielomas [LEE *et al.*, 2003b], linfomas de células B (CH12) [GASS *et al.*, 2002] e neuroblastomas (SHSY5Y) [KAKIUCHI *et al.*, 2003].

Linfócitos B imortalizados foram utilizados em um estudo que reportou uma mutação polimórfica no promotor de XBP-1. Além disso, com estas células foi possível investigar o efeito do estresse celular promovido pela taspigargina na síntese de mRNA processado de XBP-1 [KAKIUCHI *et al.*, 2003]. Deste modo, um protocolo de estimulação de células dos pacientes com CVID com drogas foi estabelecido para demonstrar que as alterações observadas são dependentes de estresse celular, além de tornar possível a detecção de falhas no processamento de mRNA de XBP-1.

Ao compararmos a expressão de *XBP-1* derivado de PBMCs *ex vivo* e de linfócitos B imortalizados verificamos que as espécies processadas não estavam presentes na célula transformada, o mesmo foi constatado em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, purificados com esferas magnéticas a partir de PBMCs.

As culturas de células B imortalizadas foram geradas a partir da infecção com o vírus *Epstein Barr* (EBV), o qual penetra no linfócito via CD21 (CR2) e integra seu material genético ao genoma da célula. Essas células podem apresentar uma expressão variável de marcadores de superfície que são reflexos do estágio de diferenciação dos linfócitos B no momento da transformação [WROBLEWSKI *et al.*, 2002]. As células depois de 2 meses de transformação foram positivas para CD19 e negativas para CD3 e CD14. Nos controles e em um paciente com CVID (P24) CD19 estava presente em 95% das células já em P8 a expressão foi observada em apenas 75% das células. No entanto, como mencionado anteriormente, no sangue periférico de P8 os números de células CD19⁺ eram normais. Portanto, a diferença observada, se for significativa, sugere que a expressão de CD19 depende de mecanismos que possam estar alterados nas células imortalizadas deste paciente.

Em células imortalizadas de um subgrupo de pacientes com CVID os níveis basais de expressão de CD19, bem como de CD20, CD23, CD25, CD40, CD62L/Leu-8 e CD79b/B-29 não foram diferentes daqueles observados em linhagens de células B derivadas de indivíduos saudáveis. Porém, havia uma redução na expressão de CD38, um marcador de células B em estágios avançados de diferenciação, acompanhada de níveis reduzidos de IgG e IgA nos sobrenadantes destas células. Ao contrário dos nossos resultados, nesse grupo de pacientes os níveis de IgM nos sobrenadantes e nos soros foram semelhantes aos dos controles, refletindo a incapacidade das células destes indivíduos de desenvolver o fenótipo

mais avançado de maturação [GUO & SAXON, 1995].

Os linfócitos B de pacientes com CVID, sejam células frescas ou imortalizadas, podem ser mais susceptíveis à morte por apoptose devido a uma maior expressão de Fas e a diminuição de CD38 pode contribuir para este fenômeno, já que esta molécula induz sinais protetores da morte [GUO & SAXON, 1995]. A contagem diferencial com azul de Tripán mostrou que ao final de 24 ou 48 h, o número de células viáveis em culturas de controles normais era maior do que de pacientes (dados não mostrados), sugerindo a maior susceptibilidade das células dos pacientes à morte.

Concomitantemente, observou-se uma taxa de proliferação basal de células imortalizadas dos pacientes inferior a dos controles. Como havia uma acentuada diferença na cinética de proliferação de células de cada um dos indivíduos, não foi possível até o momento comparar os resultados da marcação com ^3H -timidina. A baixa taxa de proliferação e maior índice de morte provavelmente contribuíram para os baixos níveis de IgM não-específica detectada nos sobrenadantes de culturas de células dos pacientes. Porém, não se pode desprezar a possibilidade de uma parcela das células que sofreram transformação ter perdido a capacidade de produzir anticorpos *in vitro*, o que pode ter vindo acompanhado ou não da perda de expressão de moléculas de superfície, tais com CD19, CD20, HLA-DR e CD40 [WROBLEWSKI *et al.*, 2002].

A secreção de IgM está diretamente relacionada à expressão de p54-XBP-1 [TIROSH *et al.* 2005]. Sendo assim, os níveis reduzidos da Ig nos sobrenadantes de células imortalizadas de P8 podem estar associados à menor produção desta proteína em relação às células de controles, como certificado por *Western blot*. A geração de p54 é dependente de *splicing* de mRNA de *npXBP-1* e corroborando esta

hipótese, paralela à redução de p54 foi detectada uma banda mais intensa correspondente à p33-XBP-1.

Interessantemente, em células imortalizadas de outros três pacientes também foi observada a baixa expressão de p54. As amostras foram preparadas com o mesmo número de células B-EBV viáveis e frescas de pacientes e controles, já que nas culturas de células dos pacientes havia um maior número de células mortas. No paciente P24 o perfil eletroforético de XBP-1 mostrava a menor expressão da forma ativa p54 e duas outras bandas, as quais não estavam presentes em células dos controles e outros pacientes investigados. Portanto, P24 pode apresentar um defeito molecular distinto de P8 e dos demais pacientes com CVID.

A análise da expressão de *npXBP-1* em células B-EBV mostra a prevalência destas moléculas de mRNA em relação às formas processadas. Nota-se que a indução de estresse com TAP não foi capaz de causar alterações significativas nas quantidades de produtos de RT-PCR de *npXBP-1*. De acordo com a literatura, a expressão de *npXBP-1* é constitutiva e a grande maioria das moléculas de mRNA de XBP-1 permanecem na forma não-processada mesmo sob a condição de *splicing* de mRNA de XBP-1 induzido por estresse. A alta expressão gênica pode representar um mecanismo de compensação tendo em vista que p33 é rapidamente degradada e, ao mesmo tempo, é responsável pela ativação de genes do UPR [TIROSH *et al.*, 2006].

Mesmo em condições fisiológicas a taxa de degradação de p33 supera a de síntese. Isto caracteriza um mecanismo intrínseco de controle da resposta de estresse celular após a intensa síntese de anticorpos, por exemplo [TIROSH *et al.*, 2006]. Em células B-EBV a detecção de moléculas *pXBP-1* foi possível apenas após a indução de estresse com TAP e o tratamento aumentou ainda a expressão de

mRNA de IRE-1 α . Como observado no gel de agarose, o aumento relativo observado nos pacientes foi menor do que nos controles, sugerindo que estes últimos responderam melhor ao estímulo.

A baixa expressão de IRE-1 α em células dos pacientes com CVID após estimulação com TAP pode ter contribuído para a menor produção de mRNA de *pXBP-1*. Ainda não foi verificado em nosso estudo o efeito da estimulação com TAP sob a produção das proteínas XBP-1 bem como de seus genes alvos. Os estudos *in vitro* descritos na literatura mostram, claramente, a ação desse tipo de droga sobre a transcrição, tradução e ativação de XBP-1 e os estudos de TIROSH *et al.* (2006) mostraram que p33-XBP-1, assim como p54, pode ativar genes característicos do UPR, inclusive aqueles que não dependem de *splicing* de XBP-1, tais como *BiP* e *CHOP*. Previamente, já havia sido demonstrado que a via IRE-1 α /XBP-1 não era fundamental para expressão das chaperonas BiP, CHOP e GRP94 (“glucose-regulated protein 94”) [LEE *et al.*, 2003a], por outro lado, foram descobertos pelo menos dois genes específicos desta via de ativação, as chaperonas ERdj4 e p58^{IPK} [LEE *et al.*, 2003a]

A atividade transcricional de XBP-1 pode aumentar a expressão do próprio *npXBP-1*, como demonstrado em estudos com linhagens de células [LEE *et al.*, 2003a] e o mesmo fenômeno pode ser observado em certas infecções virais. A proteína NSB4 de HCV mostrou-se capaz de aumentar a expressão de XBP-1, bem como de ativar a UPR através de *splicing* de XBP-1 ou ativação de ATF6 [ZHENG *et al.*, 2005]. Embora não caracterizada para infecções de células B com EBV, possivelmente a transformação celular provocada pelo vírus contribua para o aumento nos níveis de mRNA de XBP-1 observado nas células imortalizadas em comparação com PBMCs (figura 12). Nas células dos controles foi observada ainda

uma maior proporção relativa de p54 (figura 11) em comparação com PBMCs (figura 1), a qual pode estar associada à transformação pelo vírus.

Nossos resultados apontam pelo menos três evidências que corroboram para a hipótese de que existem falhas de processamento de mRNA de XBP-1 no paciente P8: a expressão reduzida da proteína processada de 54 kDa, a quantidade maior de moléculas de mRNA não-processadas aumentando a razão não-processado/processado e o acúmulo maior de cadeias de imunoglobulinas no interior do RE. A análise de XBP-1 em células B imortalizadas mostrou que outros pacientes com CVID podem apresentar defeitos na via mediada por IRE-1 α /XBP-1, uma vez que as células dos pacientes apresentaram uma menor expressão da proteína XBP-1 ativa e responderam pior à indução de estresse celular do que os controles.

As conseqüências de tais alterações incluiriam falhas na exportação, processamento e degradação de proteínas, sobretudo de imunoglobulinas, dada a importância da via de estresse mediada por IRE-1 α /XBP-1 para o desenvolvimento de linfócitos B em plasmócitos.

VI - Conclusões

A baixa expressão da proteína XBP-1 ativa pode ser causada por um defeito no *splicing* de mRNA de XBP-1 pela IRE-1 α .

Defeitos na sinalização mediada pela via XBP-1/IRE-1 α pode resultar no acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático. Isto explicaria os níveis reduzidos de IgM nos sobrenadantes de culturas de células B e nos soros de pacientes com COVID.

Nossos resultados reforçam a importância da via XBP-1/IRE-1 α para o desenvolvimento terminal de células B em células especializadas na secreção de altos níveis de anticorpos.

Glossário

ATF6 α : *do inglês* “Activating Transcription Factor 6”

BCL-6: *do inglês* “B Cell Leukemia/Lymphoma-6”

BiP: *do inglês* “Binding Protein”, proteína de ligação

Blimp-1: *do inglês* “B-lymphocyte-induced maturation protein 1”

BTK ou *btk*: *do inglês* “Bruton’s tirosine kinase”, tirosina quinase de Bruton

BSAP: “B-cell lineage-Specific Activator Protein”)

ICOS: *do inglês* “Inducible Costimulator”, coestimuladora induzível

ICOSL: ligante de ICOS

IRE-1 α : *do inglês* “Inositol-Requiring-1 α ”

PAX-5: *do inglês* “Paired Box Gene 5”

XBP-1: *do inglês* “X-box Binding Protein – 1”

np-XBP-1: XBP-1 não-processado

p-XBP-1: XBP-1 processado

