

Caracterização imunofenotípica de linfócitos B de memória na deficiência de IgA e imunodeficiência comum variável*

Immunophenotypical characterization of memory B lymphocytes in IgA deficiency and common variable immunodeficiency

José de Jesus Rivas¹, Graciela A. Brocardo², Cristina Kokron³,
Luiz Vicente Rizzo⁴, Jorge Kalil⁵, Myrtes T. Barros⁶

Resumo

Objetivo: A progressão da deficiência de IgA (DIgA) para imunodeficiência comum variável (ICV) tem sido relatada, embora não constitua regra geral. Postula-se que a associação com doenças autoimunes (DAIs) constitua fator de risco para tal progressão. Embora a fisiopatologia da ICV não esteja esclarecida, a redução de células B de memória *class-switched* (CD27+IgG-IgM-) tem sido relacionada a sua maior associação com autoimunidade. Por outro lado, na DIgA a persistência de células B imaturas IgM+ IgD+ foi associada à progressão para ICV. O objetivo foi comparar em pacientes com DIgA e ICV populações de células B de memória e correlacionar estas populações celulares à presença de DAIs em ambos grupos.

Métodos: O estudo incluiu 56 pacientes adultos com DIgA ou ICV igualmente distribuídos em 4 grupos de acordo com a presença ou ausência de DAIs. As seguintes subpopulações de células B foram determinadas por citometria de fluxo de quatro cores: células B *naive* (CD19+IgM+), células B de memória *class-switched* (CD27+IgM-IgD-) e células B de memória imaturas (CD27+IgM+ ou CD27+IgD+).

Resultados: Os valores de células B *naive* e de células de memória *class-switched* foram similares nos quatro grupos estudados. Os pacientes com DIgA ou ICV e DAIs associadas apresentaram valores igualmente aumentados de células B de memória imaturas CD27+IgM+ e CD27+IgD+ quando comparados a pacientes sem autoimunidade.

Conclusões: Neste estudo foi demonstrado pela primeira vez persistência de células B de memória imaturas em pacientes adultos com DIgA e ICV associadas a doenças autoimunes. Especula-se se a persistência destas células possa constituir fator de risco para a progressão de DIgA para ICV.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2010; 33(1):23-31 imunodeficiência, deficiência de anticorpos, autoimunidade, imunodeficiência comum variável, deficiência de IgA.

Abstract

Objective: Progression from IgA deficiency (IgAD) to common variable immunodeficiency (CVID) has been reported in some patients, but is not a general rule. It is postulated if association with autoimmune diseases (AIDs) could be risk factor for such progression. While the pathophysiology of CVID remains elusive, decreased numbers of classic (class-switched) memory B cells (CD27+IgG-IgM-) was correlated with increased rates of autoimmune features. By other hand, persistence of immature B cells (IgM+ IgD+) in IgA deficiency patients was correlated to progression from DIgA to CVID. The aim of this study was to compare memory B cell subpopulations in IgAD and CVID patients, and to assess the relationship between these populations and the presence of autoimmune diseases in both group of patients.

Methods: This study included 56 adult patients with IgAD or CVID distributed in four groups according to the presence or absence of AIDs. The following B cell populations were determined by lymphocyte immunophenotyping by four-colour flow cytometry: naive B cells (CD19+IgM+), class-switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) and immature B memory cells (CD27+IgM+ or CD27+IgD+).

Results: Naive B cell and class-switched memory B cells (CD27+IgG-IgM-) numbers were similar in all groups studied. IgAD and CVID patients with associated AIDs presented higher values of immature B cells (CD27 IgM+ and CD27+ IgD+) than patients without associated AIDs.

Conclusions: This study reported for the first time the persistence of immature memory B cells in adult IgAD and CVID patients associated to autoimmune diseases. We speculate if persistence of immature B cells may constitute a risk factor for progression of IgAD to CVID.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2010; 33(1):23-31 immunodeficiency, antibody deficiency, autoimmunity, common variable immunodeficiency, IgA deficiency.

1. Mestre em Alergia e Imunopatologia da FMUSP; Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia – FMUSP
2. Farmacêutica – Mestre em Ciências Médicas – FMUSP; Disciplina de Hematologia - FMUSP
3. Doutorado em Pediatria – UNIFESP; Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia – FMUSP
4. Professor Titular de Imunologia – ICB-USP; Diretor Superintendente do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein
5. Professor Titular de Imunologia Clínica e Alergia – FMUSP; Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia - FMUSP
6. Doutorado em Microbiologia e Imunologia – UNIFESP; Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia - FMUSP

Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia, Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (LIM 60) HCFMUSP, Disciplina de Hematologia, HCFMUSP, São Paulo, Brasil .

*Trabalho agraciado com o prêmio Antônio Oliveira Lima no XXXVI Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia.

Artigo submetido em 31.03.2010, aceito em 16.06.2010.

Introdução

A deficiência de IgA (DIgA) constitui a imunodeficiência primária mais comum e sua incidência varia entre os diferentes grupos étnicos^{1,2}. É diagnosticada em indivíduos acima dos quatro anos de idade que apresentam níveis séricos de IgA menores do que 7 mg/dL e normais ou aumentados de IgG e/ou IgM³. O quadro clínico é variável, sendo detectada em 75% a 90% de indivíduos assintomáticos⁴, o que pode resultar em subestimativa de sua prevalência⁵.

Embora a maioria dos casos de DIgA seja esporádica, uma tipo de herança familiar provavelmente poligênica não restrita a alelos mendelianos pode ser reconhecida em 25% dos indivíduos afetados, o que sugere uma forte influência genética^{5,6}. Sua prevalência é similar em homens e mulheres³.

Durante a evolução clínica, alguns pacientes com DIgA podem progredir para imunodeficiência comum variável (ICV)^{1,7}, que constitui a imunodeficiência primária sintomática mais comum, diagnosticada na presença de níveis séricos baixos de IgG e IgA e/ou IgM, ao lado de valores normais ou diminuídos de linfócitos B no sangue periférico. A ICV constitui uma entidade mais grave do que a DIgA, embora ambas apresentem várias semelhanças quanto ao espectro de manifestações clínicas: infecções recorrentes ou crônicas sinopulmonares e do trato gastrointestinal, associação com doenças autoimunes (DAI) e incidência aumentada de malignidades⁸⁻¹².

Há fortes evidências de que pacientes com ICV ou DIgA apresentem um *background* genético comum ou similar com diferentes manifestações fenotípicas, sendo frequentemente implicadas a semelhança do espectro clínico, a ocorrência das duas doenças em uma mesma família e a progressão da DIgA para ICV em alguns casos¹¹⁻¹⁷. A tendência para esta progressão é maior na DIgA familiar, podendo estar associada à deleção do braço curto do cromossoma 18 e à presença de determinados haplótipos do MHC presentes tanto na DIgA como na ICV, o que sugere a existência de *loci* de susceptibilidade ainda não identificados^{18,19}.

Os possíveis fatores de risco responsáveis pela progressão não foram ainda esclarecidos, estando implicadas as infecções crônicas ou de repetição^{7,13}, a associação com deficiência de IgG2 e/ou deficiência de anticorpos anti-pneumococo¹⁴ e a presença de doenças autoimunes^{13,15,16}. Neste contexto, cabe ressaltar que alguns haplótipos do MHC amplamente associados a diversas DAIs²²⁻²⁴ também têm sido encontrados com maior frequência em pacientes com DIgA e ICV²⁵⁻²⁷.

Apesar de todos os avanços na área de biologia molecular, a fisiopatologia da DIgA e da ICV permanece apenas parcialmente conhecida. Em geral, a deficiência de IgA está associada a um número normal tanto de linfócitos B expressando IgA de superfície como de linfócitos CD4+ e CD8+ no sangue periférico, havendo evidências de que a posterior diferenciação para células produtoras de IgA esteja bloqueada⁷. Alguns mecanismos têm sido postulados, tais como função T auxiliadora inadequada, defeitos intrínsecos de linfócitos B²⁸, redução da expressão de CD40 em monócitos²⁹ e diminuição da produção de algumas citocinas^{30,31}.

Do mesmo modo, a fisiopatologia da ICV permanece pouco conhecida, estando descritas: redução de células TCD4 naive^{32,33} e de células TCD8 com alteração da relação CD4/CD8^{34,35}; diminuição da produção de IL-2³⁶⁻³⁹ ou de citocinas de perfil Th2⁴⁰⁻⁴²; disfunção de células T reguladoras^{9,43,44}. Também são descritos defeitos primários de linfócitos B abrangendo: receptores envolvidos na diferenciação e na maturação celular, especialmente mutações no CD19, assim como na geração da diversidade dos anticorpos, como o BAFF-R (B cell activating factor of the tumor necrosis factor family receptor), ICOS (*inducible costimulator of activated T cells*) e TACI (*transmembrane activator*)^{43,45}; co-

mo redução numérica de células B CD19+^{4,11,37} e de células de memória CD19+CD27+⁴⁶⁻⁵⁰.

Durante sua ontogenia, os linfócitos B coexpressando IgM e IgD são liberados da medula óssea para o sangue periférico constituindo os chamados linfócitos primordiais ou *naive* (CD19+IgM+), que ainda não tiveram contato com antígenos e, portanto, não sofreram hipermutação somática⁵¹.

Após contato com o antígeno, estas células migram para os órgãos linfóides secundários e dividem-se em subpopulações; no baço, migram para o centro germinativo, sendo denominadas células B foliculares ou para a zona marginal, constituindo as células pré-ativadas^{52,53}.

Os linfócitos do centro germinativo originam as células B de memória identificadas pelo marcador CD27. A presença ou ausência de IgM e IgD de superfície permite diferenciar as várias populações: células B de memória primordiais ou *naive* que ainda não sofreram troca de isotopo (CD19+CD27+IgM+IgD+); células B de memória imaturas com persistência de IgM (CD19+CD27+IgM+ ou apenas CD27+IgM+) ou de IgD (CD19+CD27+IgD+ ou apenas CD27+IgD+); células B de memória clássicas ou *class switched* (CD19+CD27+IgM-IgD- ou apenas CD19+CD27+), que sofreram hipermutação somática e que têm a capacidade de fazer a troca de isótopo da cadeia pesada da IgM para as demais classes de imunoglobulinas, resultando na produção de IgG, IgA ou IgE^{54,55}.

As células B da zona marginal originam linfócitos CD27+IgM+IgD+ que sofrem hipermutação somática limitada e que são capazes de produzir IgM de alta afinidade mas pequena quantidade de IgG⁵⁶. Foi demonstrado que um defeito na troca da cadeia pesada pode resultar na persistência da IgM e IgD de superfície e produção ineficiente de IgG, IgA e IgE^{52,56}.

No sangue periférico de adultos normais, as células B de memória CD27+ correspondem a 0.5 % dos linfócitos totais⁴³ e a 30-60% das células B totais, sendo que aproximadamente metade delas são células B de memória clássicas que já sofreram troca de isotopo⁵³.

Redução das subpopulações de células de memória *class-switched* (CD19+CD27+IgM-IgD-) têm sido descritas na ICV^{46,47,57,58} e em várias DAIs^{26,49,59}, tendo sido descrita correlação entre valores diminuídos desta população em pacientes com ICV e doenças autoimunes associadas^{50,60}.

Por outro lado, são raras na literatura as investigações referentes às células B de memória na DIgA. Estudos mais antigos detectaram a presença de células B imaturas (à época não caracterizadas como células de memória) no sangue periférico de pacientes com DIgA, sendo que alguns dos quais evoluíram posteriormente para ICV^{61,62}. Relatos mais recentes apresentam resultados conflitantes, descrevendo células B de memória clássicas diminuídas em crianças⁶³ e números normais em adultos com DIgA⁶⁴.

Deste modo, considerando-se: relatos da persistência de células B imaturas IgM+ IgD+ em pacientes com DIgA que evoluíram para ICV; diminuição de células B de memória CD27+ IgM- IgD- em uma proporção de pacientes com ICV e DAIs associadas; evidências de que a presença de DAIs na DIgA constitua fator de risco para a progressão para ICV, os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar quantitativamente subpopulações de linfócitos B de memória em pacientes com DIgA e ICV; 2) analisar se existe relação entre eventuais alterações numéricas de algumas populações de células B de memória e associação com DAIs nos dois tipos de imunodeficiências.

Métodos

Foram avaliados 28 pacientes com DIgA em comparação a 28 pacientes com ICV, todos em seguimento no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade

de Medicina da USP. De acordo com a associação ou não com doenças autoimunes (DAIs), os pacientes foram distribuídos em 4 grupos com 14 indivíduos cada: 1) DIgA sem doença autoimune (DIgA sem DAI); 2) DIgA com doença autoimune (DIgA com DAI); 3) ICV sem doença autoimune (ICV sem DAI); 4) ICV com doença autoimune (ICV com DAI). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP.

O diagnóstico de DIgA foi estabelecido na presença de níveis séricos de IgA menores do que 7mg/dL e níveis de IgG e de IgM normais ou elevados. O de ICV, na presença de hipogamaglobulinemia com níveis baixos (menores do que dois desvios-padrão da média para a idade) de pelo menos duas classes de imunoglobulinas: IgG e IgA e/ou IgM, após exclusão de imunodeficiências secundárias de outras etiologias. Os critérios acima foram definidos por especialistas em Imunodeficiências Primárias da WHO³ e pelo Latin American Group for Primary Immunodeficiency Diseases – LAGID⁴.

O diagnóstico das diversas doenças autoimunes obedeceu a critérios clínicos e laboratoriais recomendados pelas sociedades internacionais das especialidades envolvidas. Os exames laboratoriais foram realizados de acordo com os quadros clínicos que cada paciente apresentou durante sua avaliação e posterior evolução. No caso específico da doença celíaca, embora tenha sido feita pesquisa de anticorpos IGA anti-endomísio em todos os pacientes, o diagnóstico foi estabelecido através de biópsia da mucosa da 2ª porção do duodeno durante endoscopia digestiva alta que é considerada o padrão ouro para a doença⁶⁵. Foram excluídos do estudo pacientes com neoplasias, sob corticoterapia sistêmica prolongada, em uso de drogas citotóxicas e gestantes.

O estudo fenotípico das subpopulações linfocitárias foi realizado em amostras do sangue periférico coletadas entre

7 e 9 horas para evitar variações diurnas da população de leucócitos e processadas dentro das primeiras 24h segundo técnica descrita previamente⁴⁴. Em pacientes com ICV, as amostras foram obtidas no período imediatamente antes da infusão mensal de gamaglobulina intravenosa. Para a análise dos linfócitos B foram usados anticorpos monoclonais marcados com cromo para marcação em quatro cores: anti-CD19 IgG de rato, isotipo IgG1_k, conjugado com *Peridinin Chlorophyll Protein* (PercP), anti-IgM IgG de rato clone g20-127, isotipo IgG1 conjugado com Phycoerythrin (PE), anti-IgD IgG de rato clone IAG-2 isotipo IgG2_k conjugado com o fluoro reagente Fluorescein Isothiocyanate (FITC), anti-CD27 IgG de rato, isotipo IgG1_k conjugado com AlloPhycocyanin (APC). Todos monoclonais utilizados foram produzidos pelo laboratório Becton Dickinson – Pharmingen. As amostras foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinsons, USA), utilizando o *Software Cell Quest Pro* (Becton-Dickinson, USA).

Na análise estatística foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA (*Analsys of Variance*). Para as análises que apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) foram realizadas comparações múltiplas de Bonferroni⁶⁶ para verificar entre quais proporções ocorrem essas diferenças. Foi testada a existência de associação entre o sexo e o grupo com uso do teste do qui-quadrado⁶⁷. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Idade e gênero: não houve diferença estatisticamente significativa entre as idades dos pacientes nos grupos com DIgA e ICV ($p = 0,260$), assim como nos grupos sem DAI e com DAI ($p = 0,085$) (Tabela 1). Do mesmo modo, a distribuição dos gêneros entre os 4 grupos estatisticamente foi a mesma ($p=0,380$) (Tabela 2).

Tabela 1 - Distribuição de idade em pacientes com deficiência de IgA e imunodeficiência comum variável sem ou com doença autoimune.

Variável	Grupo	Doença autoimune	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N
Idade	DIgA	sem DAI	31,6	11,1	29,5	18,0	54,0	14
		com DAI	38,3	16,0	31,5	21,0	66,0	14
	ICV	sem DAI	35,9	16,8	28,0	18,0	75,0	14
		com DAI	42,7	12,5	39,5	26,0	66,0	14

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as idades dos pacientes nos grupos com DIgA e ICV ($p = 0,260$), assim como nos grupos sem DAI e com DAI ($p = 0,085$).

Tabela 2 - Descrição da distribuição dos gêneros em pacientes com deficiência de IgA e imunodeficiência comum variável sem ou com doença autoimune.

Grupo	Gênero				P
	F		M		
	N	%	N	%	
DIgA sem DAI	7	50,0	7	50,0	0,380
DIgA com DAI	10	71,4	4	28,6	
ICV sem DAI	6	42,9	8	57,1	
ICV com DAI	6	42,9	8	57,1	
Total	29	51,8	27	48,2	

A distribuição dos sexos entre os 4 grupos estatisticamente foi a mesma ($p=0,380$).

Associação com doenças autoimunes

Na deficiência de IgA: tireoidite (6); doença celíaca (4); artrite reumatóide (3); lúpus sistêmico (2); anemia hemolítica (1); síndrome de Sjögren (1). Três pacientes apresentavam duas doenças associadas: tireoidite/doença celíaca; artrite reumatóide/doença celíaca; artrite reumatóide/síndrome de Sjögren.

Na imunodeficiência comum variável: tireoidite (5); doença celíaca (2); vasculite sistêmica (2); vitiligo (1); síndrome de Sjögren (1); hepatite criptogênica (1); anemia hemolítica (1); anemia megaloblástica (1); púrpura plaquetopênica (1). Um dos pacientes apresentava anemia hemolítica e tireoidite.

Linfócitos B naïve (CD19+IgM+): a presença única de CD19 define a população de linfócitos B totais do sangue periférico, enquanto a co-expressão de CD19 e IgM na superfície da célula identifica os linfócitos B primordiais ou naïve. O teste de ANOVA demonstrou que não houve diferença quanto aos valores percentuais médios de linfócitos B naïve entre os grupos analisados ($p=0,61$) (Tabela 3 e Gráfico 1).

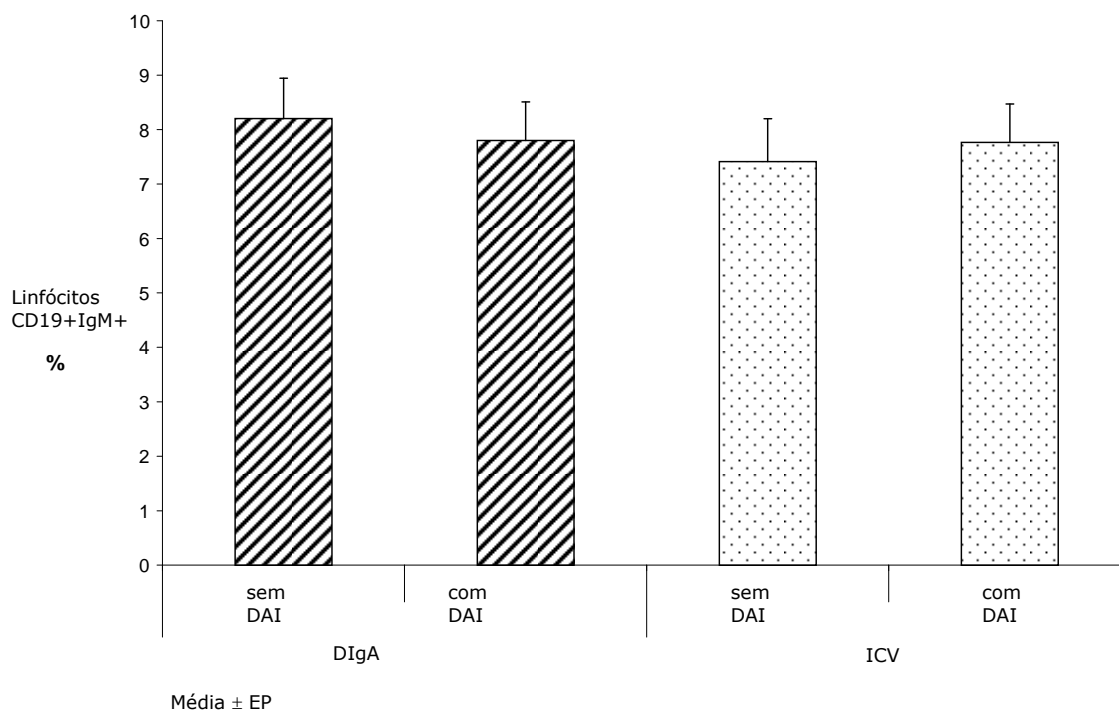
Tabela 3 - Valores percentuais médios de subpopulações de células B no sangue periférico de pacientes com deficiência de IgA e imunodeficiência comum variável sem ou com doença autoimune associada.

Linfócitos	Grupo	DAI	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N
Linfócitos ¹ CD19+ IgM+ (%)	DIgA	sem DAI	8.21	2.77	8.64	4.04	13.01	14
		com DAI	7.80	2.67	7.80	3.59	12.74	14
	ICV	sem DAI	7.42	2.94	6.69	2.26	12.90	14
		com DAI	7.77	2.65	8.50	3.08	11.26	14
Linfócitos ² CD19+ D27+ (%)	DIgA	sem DAI	3.13	1.68	3.46	0.46	6.07	14
		com DAI	2.42	1.27	2.46	0.35	4.61	14
	ICV	sem DAI	1.52	1.55	1.00	0.13	4.79	14
		com DAI	3.02	2.74	2.16	0.44	10.04	14
Linfócitos ³ CD27+ IgM+ (%)	DIgA	sem DAI	0.57	0.64	0.41	0.04	2.54	14
		com DAI	1.31	1.71	0.77	0.04	6.18	14
	ICV	sem DAI	0.62	0.97	0.28	0.01	3.67	14
		com DAI	1.72	0.99	1.94	0.10	3.01	14
Linfócitos ⁴ CD27+ IgD+ (%)	DIgA	sem DAI	0.57	0.91	0.25	0.02	3.51	14
		com DAI	1.96	1.75	1.22	0.39	6.69	14
	ICV	sem DAI	1.05	0.97	0.72	0.13	3.31	14
		com DAI	2.29	1.86	1.71	0.03	6.13	14

1-Linfócitos B primordiais ou *naive*; 2-Linfócitos B de memória que sofreram hipermutação somática ("class-switched") fenotipicamente caracterizados como CD19+CD27+IgM - IgD -; 3-Linfócitos B de memória com persistência de IgM caracterizados fenotipicamente como CD19+CD27+IgM+IgD-; 4. Linfócitos B de memória com persistência de IgD caracterizados fenotipicamente como CD19+CD27+ IgM- IgD+.

Os valores percentuais foram calculados em relação ao número de linfócitos B totais (CD19+) do sangue periférico. Os valores de referência na literatura mundial e adotados no laboratório onde os exames foram realizados são:

CD19+IgM+ = 5 -15% dos linfócitos totais; CD19+CD27+ = 2 - 8% dos linfócitos B CD19+; CD27+ IgM+ = 5-15%; CD27+IgD+ <1%.

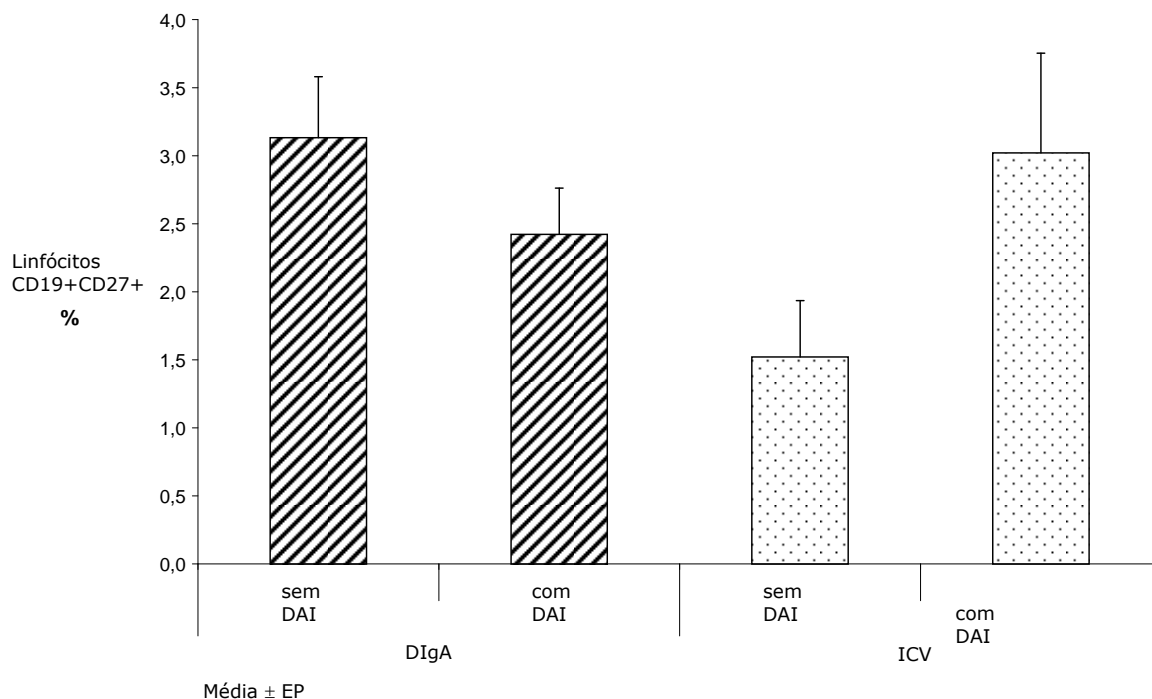
Gráfico 1 - Valores percentuais médios de células B *naive* (CD19+ IgM+) em pacientes com deficiência de IgA e com imunodeficiência comum variável sem ou com doença autoimune associada.

DIgA = deficiência de IgA; ICV = imunodeficiência comum variável; DAI = doença autoimune. Não houve diferença quanto aos valores percentuais médios de linfócitos B *naive* entre os grupos analisados ($p=0,61$)

Linfócitos B de memória clássicos (CD19+CD27+): a expressão de CD27 e ausência de IgM e de IgD de superfície caracterizam fenotipicamente os linfócitos B de memória clássicos (CD19+CD27+IgM-IgD-) que já sofreram troca de isótipo ou *class-switched*. A análise dos dados apresentados no Gráfico 2 e Tabela 3 sugere diferença quanto aos valores percentuais médios de células B de memória clássi-

cas em pacientes com DIgA e com ICV quando associadas a DAIs. Embora o teste de ANOVA tenha sido compatível com a existência de diferença entre os quatro grupos analisados ($p=0,034$), a aplicação do teste de Bonferroni para correção dos resultados não confirmou esta hipótese, que foi por isto desconsiderada sob o risco de se cometer na pesquisa um erro tipo II^{66,67}.

Gráfico 2 - Valores percentuais médios de linfócitos B de memória clássicos CD19+ CD27+ em pacientes com deficiência de IgA e com imunodeficiência comum variável sem ou com doença autoimune associada.



DIgA = deficiência de IgA; ICV = imunodeficiência comum variável; DAI = doença autoimune. Não houve diferença entre os quatro grupos analisados (ANOVA $p=0,034$) após aplicação do teste de Bonferroni para correção dos resultados.

Linfócitos B de memória com persistência de IgM (CD27+IgM+): a coexpressão de IgM e CD27 caracteriza uma subpopulação de linfócitos B imaturos denominados linfócitos B de memória com persistência de IgM e representados fenotipicamente como CD27+IgM+. Os pacientes com DIgA ou ICV e autoimunidade apresentaram valores percentuais médios maiores de linfócitos CD27+IgM+ do que pacientes sem doença autoimune, independentemente do grupo em estudo (Tabela 3 e Gráfico 3).

Linfócitos B de memória com persistência de IgD (CD27+IgD+): a coexpressão de IgD com CD27 marca uma subpopulação de linfócitos B imaturos denominados linfócitos B de memória com persistência de IgD e representados fenotipicamente como CD27+IgD+. Os valores percentuais médios de linfócitos CD27+ IgD+ nos pacientes com DAI associada à DIgA ou ICV foram maiores do que naqueles sem DAI (Tabela 3 e Gráfico 4).

Discussão

Após as infecções de repetição, as DAIs constituem as moléstias mais frequentemente associadas à ICV e DIgA. A prevalência da associação entre DIgA e DAIs/autoanticorpos varia de 7 a 36% na literatura mundial, havendo evidências de que sejam até mesmo as manifestações clínicas mais comuns nesta doença^{9,11,68}.

O papel dos linfócitos B na regulação dos mecanismos imunológicos vem sendo amplamente investigado nas últimas décadas. À semelhança do que ocorre em diversas

DAIs^{28,59,69}, têm sido relatadas alterações do compartimento de células B, especialmente de células de memória, na ICV associada ou não a manifestações de autoimunidade^{48,50,60,70}. Por outro lado, embora os pacientes com DIgA também apresentem alta prevalência de DAIs, a avaliação de células B de memória nesta imunodeficiência são escassas na literatura antiga^{61,71} ou recente^{63,64}.

Neste estudo, o objetivo foi avaliar quantitativamente subpopulações de linfócitos B de memória em pacientes com DIgA em comparação a pacientes com ICV e analisar se existe relação entre eventuais alterações numéricas de células B de memória e associação com DAIs em ambas imunodeficiências.

Os quatro grupos de estudo analisados foram homogêneos quanto à idade e gênero. A associação com DAIs foi mais frequente apenas em mulheres com DIgA (10/14). A maior prevalência de tireoidite de Hashimoto e de doença celíaca observada em ambas imunodeficiências está de acordo com relatos presentes na literatura^{4, 19,11,43,68}.

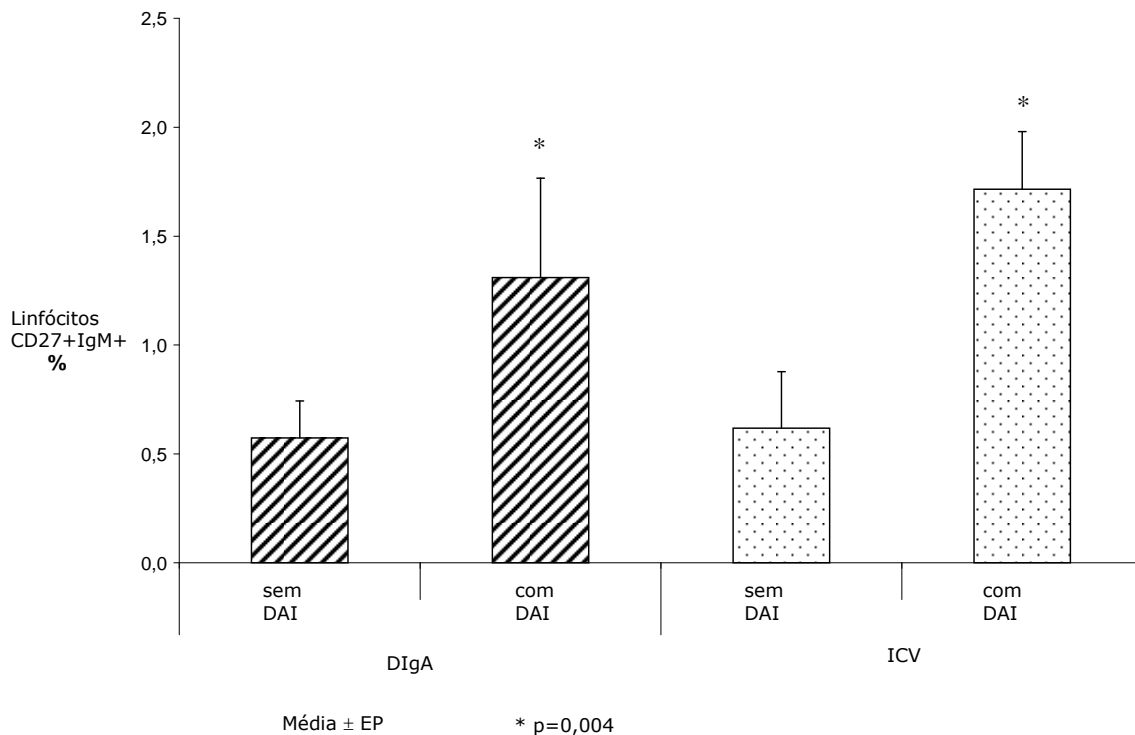
Os valores médios de linfócitos B primordiais ou *naive* (CD19+IgM+) e de linfócitos B de memória clássicos ou *class-switched* (CD19+CD27+) foram similares nos quatro grupos estudados, o que sugere não haver relação direta entre estas populações celulares e a presença de DAIs nas duas imunodeficiências analisadas. Em relação à população de linfócitos B *naive*, estes dados estão de acordo com outros relatos em pacientes com ICV^{48,50,60,70} e em adultos⁶⁴ e crianças com DIgA⁶³. Por outro lado, discordam de estudos

prévios que demonstraram redução da subpopulação de células B de memória *class-switched* (CD19+CD27+) em cerca de 50-75% dos casos de pacientes com ICV analisados^{46,47, 49, 57,58}.

Cabe ressaltar a importância da população de células B de memória *class-switched* na homeostase imunológica, uma vez que pode estar reduzida ou até mesmo ausente não apenas em outras imunodeficiências, como na síndrome de hiper-IgM^{3,4} mas também em doenças autoimunes, como lúpus sistêmico⁶⁹ e síndrome de Sjögren²⁸.

Neste contexto, estudos recentes têm relacionado a diminuição de linfócitos CD19+CD27+ em pacientes com ICV ao risco aumentado do desenvolvimento de DAIs, principalmente trombocitopenia, anemia hemolítica e anemia perniciosa^{50,60}. Uma hipótese para o desencadeamento de autoimunidade seria o aumento de células imaturas decorrentes da alteração na expressão e ativação do CD27⁷², o que sugere que este tipo de alteração participe também da fisiopatologia dessa imunodeficiência.

Gráfico 3 - Valores percentuais médios de linfócitos B de memória imaturos CD27+ IgM+ em pacientes com deficiência de IgA e com imunodeficiência comum variável sem ou com doença autoimune associada.



DIgA = deficiência de IgA; ICV = imunodeficiência comum variável; DAI = doença autoimune. Os pacientes com DIgA ou ICV com doença autoimune associada apresentaram valores percentuais médios maiores de linfócitos CD27+IgM+ do que pacientes sem doença autoimune, independentemente do grupo em estudo.

Dada a grande heterogeneidade de manifestações observadas em pacientes com imunodeficiência comum variável em várias coortes, a correlação entre as características clínicas e a presença ou ausência de células de memória clássicas ou *class-switched* foi escolhida como um dos parâmetros de classificação da doença em três propostas recentes^{48,50,60}.

Warnatz *et al.* demonstraram que a redução acentuada da população de células de memória clássica ou *class-switched* estava associada à maior prevalência de esplenomegalia e doenças autoimunes⁵⁰. Piqueras *et al.* não confirmaram totalmente estes achados, encontrando maior associação da redução de células B CD27+IgM-IgD- com a presença de esplenomegalia, proliferação linfóide e doença granulomatosa⁴⁸. Finalmente, uma terceira proposta de classificação unificando as duas anteriores tendo por base dados obtidos durante um estudo europeu multicêntrico que avaliou 303 pacientes ("Euroclass Trial"), baseou-se na redução acentuada de células B de memória *class-switched* associada preferencialmente à doença granulomatosa crônica, à esplenomegalia e às citopenias autoimunes⁶⁰.

No presente estudo, o percentual médio de células de memória *class-switched* foi similar em pacientes com ICV

com ou sem DAIs associadas. Em pacientes com ICV, a redução desta subpopulação celular parece indicar a existência de distúrbio funcional no centro germinativo dos órgãos linfoides secundários⁴⁶, que pode estar associado ao tempo de evolução da doença. É possível que esta disfunção instale-se progressivamente e seja decorrente do estímulo antigênico crônico desencadeado por infecções recorrentes ou à desregulação do sistema imunológico associada à etiopatogenia de doenças autoimunes.

Reforçando esta hipótese, existe o relato de crianças com ICV que desenvolveram alterações do compartimento de células B de memória similares às encontradas em adultos durante a evolução da doença, principalmente após os 5 anos de idade. Adicionalmente, foi observada redução do percentual daquela população celular durante o período de observação clínica de crianças pequenas aparentemente imunocompetentes nas quais posteriormente foi diagnosticada imunodeficiência comum variável⁶³.

Nesta casuística de indivíduos adultos, não foi possível realizar um cálculo preciso do tempo decorrido entre o início das manifestações clínicas e a participação no estudo. O tempo médio de doença estimado foi de 23,3 anos, não se podendo descartar a possibilidade de que ao longo da

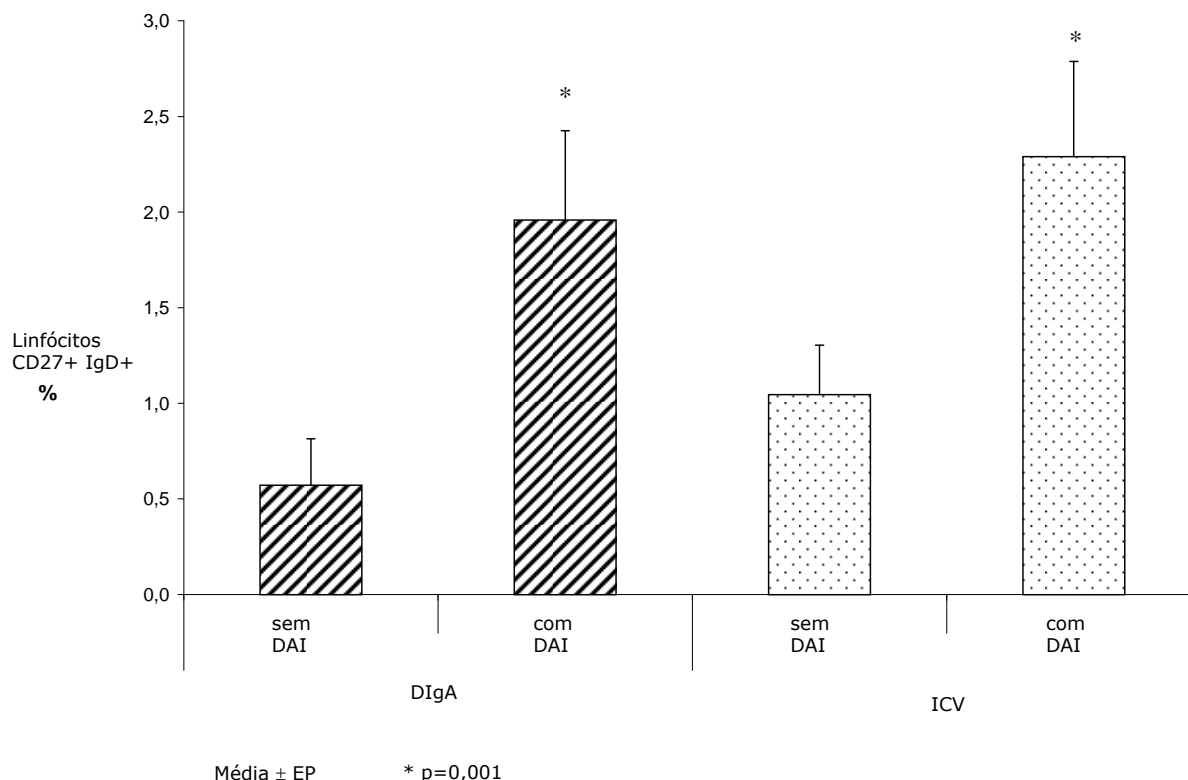
evolução alguns pacientes venham a apresentar alteração do compartimento de células B de memória clássicas e manifestações de autoimunidade.

Há fortes evidências na literatura de que a ICV e a DIgA constituam doenças polares de um mesmo espectro de deficiências imunológicas, incluindo os relatos ocasionais de pacientes com DIgA que evoluíram para ICV. Entre os possíveis fatores de risco implicados nesta progressão^{7,10,15} encontra-se a associação com doenças autoimunes^{13,20,43}. Reforçando esta correlação, existem observações de que

alguns haplótipos do MHC amplamente associados a um grande número de DAIs também têm sido detectados com maior frequência na DIgA e na ICV²²⁻²⁷

Desde que estudos prévios de literatura têm sugerido relação entre a diminuição de subpopulações de células B de memória e presença de DAIs em pacientes com ICV, um dos objetivos deste estudo foi investigar se alterações do mesmo tipo ocorrem em pacientes com DIgA associada ou não à autoimunidade.

Gráfico 4 - Valores percentuais médios de linfócitos B CD27+ IgD+ em pacientes com deficiência de IgA e com imunodeficiência comum variável sem ou com doença autoimune associada.



DIgA = deficiência de IgA; ICV = imunodeficiência comum variável; DAI = doença autoimune. Os valores percentuais médios de linfócitos CD27+ IgD+ nos pacientes com DAI associada à DIgA ou ICV foram maiores do que naqueles sem DAI.

Independentemente do tipo de imunodeficiência analisada, foram observados valores percentuais médios maiores de células B de memória imaturas CD27 IgM+ e CD27 IgD+ nos pacientes que apresentavam associação com DAIs. Uma vez que durante o processo de maturação os linfócitos B passam a expressar IgM e/ou IgD de superfície em co-expressão com CD27, constituindo células B de transição que se comportam como células imaturas incapazes de fazer a troca para outras classe de anticorpos⁵¹, a interpretação destes achados aponta para uma possível relação entre a persistência de células B de memória imaturas e a presença de autoimunidade em pacientes com DIgA e ICV.

Estes dados não confirmam os de Litzman *et al.* em adultos com DIgA nos quais não foram detectadas alterações em vários estágios de desenvolvimento de linfócitos B similares às relatadas na ICV; deve ser ressaltado que estes autores não analisaram em separado a associação com doenças autoimunes⁶⁴. Também não estão de acordo com os de Bukowska-Straková *et al.* que analisaram apenas crianças e observaram diminuição da subpopulação de células

B de memória *class-switched* similares às descritas em crianças com ICV⁶³.

Por outro lado, os achados deste estudo podem estar relacionados a relatos mais antigos que demonstraram no sangue periférico de uma porcentagem de indivíduos com deficiência de IgA células B coexpressando IgA, IgM e IgD, que é similar à expressão observada em linfócitos B do sangue do cordão umbilical⁶². Estas alterações são compatíveis com uma parada na maturação dos linfócitos e, interessante, alguns dos pacientes nos quais foram descritas evoluíram posteriormente para ICV^{62,71}. Esses trabalhos foram realizados nas décadas de 70 e 80, não estando assim esclarecido se os linfócitos descritos representavam células B imaturas ou uma subpopulação de linfócitos de memória imaturos (CD27+IgM+ IgD+).

Neste estudo, foi demonstrada pela primeira vez persistência de células B de memória imaturas em pacientes adultos com deficiência de IgA e imunodeficiência comum variável associadas a doenças autoimunes. Especula-se se a persistência destas células possa constituir fator preditivo da progressão da deficiência de IgA para imunodeficiência comum variável.

Referências

- Cunningham-Rundles C. Primary Immunodeficiency Diseases, 1596-1604 In: Cecil Textbook of Medicine. Eds. Goldman, L & Ausiello, D, 2004, 22nd ed.
- Carneiro-Sampaio MM, Carbonare SB, Rozentraub RB, de Araujo MN, Riberiro MA, Porto MH. Frequency of selective IgA deficiency among Brazilian blood donors and healthy pregnant women. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1989;17:213-6.
- Notarangelo L, Casanova JL, Conley ME, Chapel H, Fischer A, Puck J, *et al.* Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee Meeting in Budapest, 2005. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(4):883-96.
- Leiva LE, Zelazco M, Oleastro M, Carneiro-Sampaio M, Condino-Neto A, Costa-Carvalho B, *et al.* Primary immunodeficiency diseases in Latin America: the second report of the LAGID registry. *J Clin Immunol* 2007;27(1):101-8.
- Koskinen S. Long-term follow-up of health in blood donors with primary selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2006; 16(3): 165-170
- Koskinen S, Tolo H, Hirvonen M, Koistinen J. Long-term persistence of selective IgA deficiency in healthy adults. *J Clin Immunol* 1994;14(2):116-9.
- Grecco O. Manifestações clínicas de atopia na deficiência de IgA. São Paulo, 1996. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- Bonilla FA, Geha RS. Update on Primary Immunodeficiency Diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:S435-41.
- Carneiro-Sampaio M, Coutinho A. Tolerance and autoimmunity: lessons at the bedside of primary immunodeficiencies. *Adv Immunol* 2007;95:51-82.
- Jacob CMA, Pastorino AC, Fahl C, Carneiro-Sampaio M, Monteiro RC. Autoimmunity in IgA Deficiency: Revisiting the Role of IgA as a Silent Housekeeper. *J Clin Immunol* 2008; 28 (Suppl 1):S56-S61
- Kokron CM, Errante PR, Barros MT, Baracho GV, Camargo MM, Kalil J, *et al.* Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. *An Acad Bras Cienc* 2004;76:707-26.
- Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999;92: 34-48.
- Aghamohammadi A, Mohammadi J, Parvane N, Rezaei N, Moin M, Espanol T, *et al.* Progression of Selective IgA Deficiency to Common Variable Immunodeficiency. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;147:87-92.
- Carvalho Neves Forte W, Ferreira De Carvalho Junior F, Damasceno N, Vidal Perez F, Gonzales Lopes C, Mastroti RA. Evolution of IgA deficiency to IgG subclass deficiency and common variable immunodeficiency. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2000;28:18-20.
- Espanol T, Catala M, Hernandez M, Caragol I, Bertran JM. Development of a common variable immunodeficiency in IgA-deficient patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:333-35.
- Gutierrez MG, Kirkpatrick CH. Progressive immunodeficiency in a patient with IgA deficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;79:297-301.
- Rivas JJ, Kokron CM, Rizzo LV, Kalil Filho JE, Barros MT. Ocorrência Familiar da Deficiência de IgA. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 2005;29.
- Bayry J, Hermine O, Webster DA, Lévy Y, Kaveri SV. Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. *Trends Mol Med* 2005;11(8):370-6.
- Schäffer AA, Salzer U, Hammarström L, Grimbacher B. Deconstructing common variable immunodeficiency by genetic analysis. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17(3):201-12.
- Guerra CV. Dosagem de IL-5, IL-6, IL-10 e TGF- β na Deficiência de IgA. São Paulo, 2002. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- Vorechovsky I, Webster AD, Hammarstrom L. Mapping genes underlying complex disorders: progress on IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Adv Exp Med Biol* 2001; 495:183-90.
- Behan PO. Immune disease and HLA associations with myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1980;43:611-21.
- Candore G, Lio D, Colonna Romano G, Caruso C. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions. *Autoimmun Rev* 2002; 1:29-35.
- Ploski R, Ek J, Thorsby E, Sollid LM. On the HLA-DQ ($\alpha 1 * 0501, \beta 1 * 0201$) -associated susceptibility in celiac disease: a possible gene dosage effect of DQB1 * 0201. *Tissue Antigens* 1993;41:173-77.
- Schroder HW Jr, Zhu ZB, March RE, Campbell RD, Berney SM, Nedospasov SA, *et al.* Susceptibility locus for IgA deficiency and common variable immunodeficiency in the HLA-DR3, B8, A1 haplotype. *Mol Med* 1998;4:72-86.
- Cobain TJ, French MA, Christiansen FT, Dawkins RL. Association of IgA deficiency with HLA A28 and B14. *Tissue Antigens* 1983;22:151-54.
- Hammarstrom L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 2000;120:225-31.
- Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi AM, Feist E, Scholze J, *et al.* Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002;46(8):2160-71.
- Kowalczyk D, Macura-Biegun A, Zembala M. The expression of CD40 on monocytes of children with primary humoral immunodeficiencies. *Pediatr Res* 2006;59:816-19.
- Marconi M, Plebani A, Avanzini MA, Maccario R, Pistorio A, Duse M, *et al.* IL-10 and IL-4 co-operate to normalize in vitro IgA production in IgA deficient patients. *Clin Exp Immunol* 1998; 112:528-32.
- Benitez JMB, Barros RT, Guerra CV, Rizzo LV, Voronik V, Kokron CM, *et al.* Comparação da secreção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) entre pacientes com nefropatia da IgA e deficiência de IgA. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 2004;27(3):82-93.
- Farrant J, Spickett G, Matamoros N, Copas D, Hernandez M, North M, *et al.* Study of B and T cell phenotypes in blood from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Immunodeficiency* 1994;5:159-69.
- Lebranchu Y, Thibault G, Degenne D, Bardos P. Abnormalities in CD4+ T lymphocyte subsets in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 61:83 -92.
- Holm AM, Aukrust P, Aandahl EM, Muller F, Tasken K, *et al.* Impaired secretion of IL -10 by T cells from patients with common variable immunodeficiency -involvement of protein kinase A type I. *J Immunol* 2003;170:5772 -7.
- Jaffe JS, Strober W, Sneller MC. Functional abnormalities of CD8+ T cells define a unique subset of patients with common variable immunodeficiency. *Blood* 1993;82:192-201.
- Cunningham-Rundles C, Bodian C, Ochs HD, Martin S, Reiter-Wong M, Zhuo Z. Long-term low-dose IL-2 enhances immune function in common variable immunodeficiency. *Clinical Immunol* 2001;100:181-90.
- Cunningham-Rundles C, Kazbay K, Hassett J, Zhou Z, Mayer L. Brief report: Enhanced humoral immunity in common variable immunodeficiency after long-term subcutaneous polyethylene glycol-conjugated interleukin 2. *N Engl J Med* 1994;331:918-21.
- Cunningham-Rundles C, Mayer LM, Sapira E, Mendelsohn L. Restoration of immunoglobulin secretion in common variable immunodeficiency by in vitro treatment with polyethylene glycol conjugated human recombinant interleukin- 2. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 64:46-56.
- Eisenstein EM, Jaffe JS, Strober W. Reduced interleukin-2 (IL-2) production in common variable immunodeficiency is due to a primary abnormality of CD4+ T cell differentiation. *J Clin Immunol* 1993;13:247-58.
- Ferrer JM, Iglesias J, Hernandez M, Matamoros N. Alterations in interleukin secretion (IL-2 and IL-4) by CD4 and CD4CD45RO cells from common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clin Exp Immunol* 1995;102:286-9.
- Pastorelli G, Roncarolo MG, Touraine JL, Peronne G, Tovo PA, de Vries JE. Peripheral blood lymphocytes of patients with common variable immunodeficiency (CVI) produce reduced levels of interleukin -4, interleukin -2 and interferon -gamma, but proliferate normally upon activation by mitogens. *Clin Exp Immunol* 1989;78:334.
- Sneller MC, Strober W. Abnormalities of lymphokine gene expression in patients with common variable immunodeficiency. *J Immunol* 1990;144:3762-9.
- Etzioni A. Immune deficiency and autoimmunity. *Autoimm Rev* 2003;2:364-9.
- Genre J, Errante PR, Kokron CM, Toledo-Barros M, Câmara NO, Rizzo LV. Reduced frequency of CD4(+)CD25(HIGH)FOXP3(+)

- cells and diminished FOXP3 expression in patients with Common Variable Immunodeficiency: A link to autoimmunity? *Clin Immunol* 2009;132:215-21.
45. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, *et al.* TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nature Genetic* 2005;37(8):829-34.
 46. Agematsu K, Futatani T, Hokibara S, Kobayashi N, Takamoto M, Tsukada S, *et al.* Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2002;103(1):34-42.
 47. Ko J, Radigan L, Cunningham-Rundles C. Immune competence and switched memory B cells in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2005;116:37-41.
 48. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevreton S, *et al.* Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol* 2003;23:385-400.
 49. Salzer U, Grimbacher B. Common variable immunodeficiency: The power of costimulation. *Semin Immunol* 2006;18:337-46.
 50. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braum M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, *et al.* Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM--IgD) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002;99:1544-51.
 51. Abbas A K, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. 6 ed. Philadelphia: WB Saunders. 2007.
 52. Martin F, Kearney JF. Positive selections from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19 and BTK. *Immunity* 2000;12:39-49.
 53. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordie C, *et al.* Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a pre-diversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 2004;104:3647-54.
 54. Vodjgani M, Aghamohammadi A, Samadi M, Moin M, Hadjati J, Mirahmadian M, *et al.* Analysis of class-switched memory B cells in patients with common variable immunodeficiency and its clinical implications. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17(5):321-8.
 55. Wortis HH, Berland R. Cutting edge commentary: origins of B-1 cells. *J Immunol*. 2001;166:2163-2166.
 56. Oliver AM, Martin F, Gartland GL, Carter RH, Kearney JF. Marginal zone B cell exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol* 1997;27:2366-74.
 57. Alachkar H, Taubenheim N, Haeney MR, Durandy A, Arkwright PD. Memory switched B cell percentage and not serum immunoglobulin concentration is associated with clinical complications in children and adults with specific antibody deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2006;120:310-18.
 58. Brouet JC, Chedeville A, Ferman JP, Royer B. Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol* 2000;30:2516-20.
 59. Richards S, Morgan G, Hillmen P. Immunophenotypic analysis of B cells in PNH: insights into the generation of circulating naive and memory B cells. *Blood* 2000;96:3522-28.
 60. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, *et al.* The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2007;11:77-85.
 61. Conley ME, Cooper MD. Immature IgA B cells in IgA-deficient patients. *N Engl J Med* 1981;305(9):495-7.
 62. Gathings WE, Lawton AR, Cooper MD. Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans. *Eur J Immunol* 1977;7(11):804-10.
 63. Bukowska-Straková K, Kowalczyk D, Baran J, Siedlar M, Kobylarz K, Zembala M. The B-cell compartment in the peripheral blood of children with different types of primary humoral immunodeficiency. *Ped Res* 2009;66:28-34.
 64. Litzman J, Vlková M, Pikulová Z, Stikarovská D, Lokaj J. T and B lymphocyte subpopulations and activation/differentiation markers in patients with selective IgA deficiency. *Clin Exp Immunol* 2007;147(2):249-54.
 65. Villalta D, Alessio MG, Tampoia M, Tonutti E, Brusca I, Bagnasco M, *et al.* Diagnostic Accuracy of IgA Anti-Tissue Transglutaminase Antibody Assays in Celiac Disease Patients with Selective IgA Deficiency. *Ann NY Acad Sci* 2007;1109:212-20.
 66. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. (1996). *Applied Linear Statistical Models*. 4. ed. Illinois: Richard D. Irwing. 1408p.
 67. Bussab e Morettin, 1987. *Estatística Básica*. 4a. ed. São Paulo: Atual. 321p.
 68. Barros MT, Rivas JJ, Rizzo LV, Kalil Filho JE, Kokron CM. Autoimmunity in IgA deficient patients. *Clinics* 2007;62:S66.
 69. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, *et al.* Disturbed peripheral B lymphocytes homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2000;165:5970-79.
 70. Haymore BR, Mikita CP, Tsokos GC. Common variable immune deficiency (CVID) presenting as an autoimmune disease: role of memory B cells. *Autoimm Rev* 2008;7:309-12.
 71. Gathings WE, Lawton AR, Cooper MD. Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans. *Eur J Immunol* 1977;7(11):804-10.
 72. Nagumo H, Agematsu K, Kobayashi N, Shinozaki K, Hokibara S, Nagase H, *et al.* The different process of class switching and somatic hypermutation; a novel analysis by CD27(-) naive B cells. *Blood* 2002;99(2):567-75.

Correspondência:
 Myrthes T Barros
 Rua Caiubi, 372, apto 111
 05010-000 - São Paulo - SP
 Fone: 0XX-21-3676.0485
 E-mail: myrtb@uol.com.br