

ANA LÍDIA BRAGA AMORAS

**ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA EXPRESSÃO
DOS RECEPTORES FC γ E COMPLEMENTO EM
MONÓCITOS DE PACIENTES COM
AGAMAGLOBULINEMIA LIGADA AO X E
IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL**

CAMPINAS

Unicamp

2009

ANA LÍDIA BRAGA AMORAS

**ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA EXPRESSÃO
DOS RECEPTORES FC γ E COMPLEMENTO EM
MONÓCITOS DE PACIENTES COM
AGAMAGLOBULINEMIA LIGADA AO X E
IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Pediatria

ORIENTADORA: *Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela*

CAMPINAS

Unicamp

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

Am68a Amoras, Ana Lúcia Braga
Análise por citometria de fluxo da expressão dos receptores Fcy e complemento em monócitos de pacientes com agamaglobulinemia ligada ao X e imunodeficiência comum variável / Ana Lúcia Braga Amoras. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Maria Marluce dos Santos Vilela
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Monócitos. 2. Citometria de fluxo. 3. Imunodeficiência comum variável. I. Sobrenome, Nome. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Flow cytometry analysis of the expression of Fcy and complement receptors in monocytes of X-linked agammaglobulinaemia and common variable immunodeficiency patients

Keywords: • Monocytes
• Flow cytometry
• Common variable immunodeficiency

Titulação: Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente

Área de concentração: Pediatria

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Marluce dos Santos Vilela

Prof. Dr. Pércio Roxo Júnior

Prof^a. Dr^a. Anete Sevciovic Grumach

Prof^a. Dr^a. Adyléia Aparecida Dalbo Contreras Toro

Prof^a. Dr^a. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand-Metze

Data da defesa: 18-12-2009

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Ana Lidia Braga Amoras

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Marluce dos Santos Vilela

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Pérsio Roxo Júnior

Professor (a) Doutor (a) Adyléia Aparecida Dalbo Contreras Toro

Professor (a) Doutor (a) Irene Gyongyver Heidemarie Lorand-Metze

Professor (a) Doutor (a) Anete Sevciovic Grumach

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/12/2009

DEDICATÓRIA

A Deus,

*Amigo fiel e companheiro de
todas as jornadas*

Aos meus filhos

*Paula, Arthur, Luisa, Edmond e Mariana
que são a expressão visível do enorme
amor que Deus tem mim.*

Ao meu querido Edmond

*pela ajuda
para que eu chegasse até aqui.*

A minha mãe Lydia (in memorian)

*onde você estiver,
essa tese é para você.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela, educadora maravilhosa e única, que confiou no meu trabalho dando-me a oportunidade e a honra de tê-la como orientadora; que me ensinou muitas lições profissionais, mas, acima de tudo, me ensinou muito sobre a vida. Obrigada por não ter desistido de mim.

Ao Prof. Dr. Marcos Nolasco da Silva, pelo apoio, incentivo e ajuda nos momentos mais difíceis deste trabalho.

À Noemia Mie Orii pelo auxílio na padronização da técnica.

À Simone Corte-Batista-Souza-Lima que muito me ajudou na padronização da técnica e durante todo o experimento, demonstrando sempre muito boa vontade.

À equipe de enfermagem do Hospital das Clínicas - Unicamp, pela ajuda na coleta do material biológico dos pacientes.

Aos pacientes, que mesmo diante da aflição e incerteza de sua condição física, sentem-se orgulhosos em colaborar para o avanço nos estudos da imunodeficiência primária.

Aos voluntários pela confiança e colaboração.

Ao meu pai Paulo, aos meus irmãos Paulo, Ana Paula, Ana Cláudia e Socorro e a minha querida sobrinha Roberta, obrigada pelo amor de vocês.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização desta etapa.

À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

“Sonhe aquilo que você quiser.

*Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida.*

E nela só se tem uma chance de fazer aquilo que se quer.

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce,
dificuldades para fazê-la forte,*

*Tristeza para fazê-la humana e
esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas,
elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram,
para aqueles que se machucam,
para aqueles que buscam e tentam sempre e
para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que
passam em suas vidas.*

*O futuro mais brilhante é
baseado num passado intensamente vivido.*

*Você só terá sucesso na vida quando
perdoar os erros e as decepções do passado.*

*A vida é curta,
mas as emoções que podemos deixar
duram uma eternidade.”*

(Clarice Lispector)

Recentemente, demonstramos defeitos na fagocitose e quimiotaxia de monócitos em pacientes com agamaglobulinemia ligada ao X (ALX) e imunodeficiência comum variável (ICV). Existem poucos dados da expressão *in vivo* dos receptores para a região constante de imunoglobulina G (IgG) (FcγR) e receptores de complemento (RC) nesses pacientes. O objetivo deste estudo foi investigar a expressão dos FcγR e RC nos monócitos de pacientes com ALX e ICV e compará-la com controles saudáveis. Amostras de sangue total foram obtidas de 10 pacientes com ALX, 12 com ICV e 18 controles saudáveis. O fenótipo dos monócitos foi determinado por citometria de fluxo de células marcadas com CD14⁺. A expressão dos receptores de superfície FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), CR1 (CD35) e CR3 (CD11b e CD18) foi medida através da determinação da proporção de células CD14⁺ para cada receptor e pela densidade do receptor. Comparado ao controle, observou-se uma porcentagem significativamente maior de monócitos CD16⁺ e CD35⁺ nos pacientes com ALX ($P=0,002$ e $P=0,007$, respectivamente). A expressão da intensidade de fluorescência relativa (IFR) do FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16) foi significativamente mais baixa nos monócitos de pacientes com ICV em comparação aos controles ($P=0,001$ e $P=0,035$, respectivamente).

Pacientes com ALX, que possuem redução na tirosina quinase de Bruton (Btk) mostraram porcentagens normais ou maiores de monócitos expressando CD16⁺ e CD35⁺. Esses resultados indicam que a expressão dos receptores Fc e complemento não são suficientes para o bom desempenho da função de fagocitose sugerindo que a deficiência fagocitária desses indivíduos pode resultar de defeitos nos mecanismos de transdução intracitoplasmática mediados por Btk. Além disso, a expressão reduzida de CD16⁺ e CD32⁺ nos monócitos de pacientes com ICV, que possuem Btk normal, sugere fortemente que a expressão dos receptores é independente de Btk e que a alteração dos receptores vistas nesse

pacientes pode ser responsável pela deficiência na função fagocitária dos monócitos desses pacientes.

Palavras-chave: receptores CR1 (CD35), CR3 (CD11b, CD18), monócitos, Fcγ, citometria de fluxo, imunodeficiência comum variável e agamaglobulinemia ligada ao X.

Recently we reported that monocyte phagocytosis and chemotaxis are impaired in X-linked agammaglobulinaemia (XLA) and common variable immunodeficiency (CVI) patients. Few data exist on the *in vivo* expression of receptors for the constant region of immunoglobulin (IgG) (FcγR) and complement receptors (CR) in these patients. The objective of this study was to investigate the expression of FcγR and CR on monocytes from XLA and CVI patients and compare it to that of healthy controls. Whole blood samples were obtained from 10 patients with XLA, 12 with CVI and 18 healthy controls. Monocyte phenotype was determined by flow cytometry with gating on CD14⁺ cells. Surface expression of FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16), CR1 (CD35) and CR3 (CD11b and CD18) was measured by determination of the proportion of CD14⁺ cells positive for each receptor and by receptor density. Compared to controls, a significantly higher percentage of CD16⁺ and CD35⁺ monocytes from XLA ($P=0.002$ and $P=0.007$, respectively) were observed. The relative fluorescence intensity (RFI) expression of FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) were significantly lower on CVI monocytes compared to controls ($P=0.001$ and $P=0.035$, respectively). XLA patients, who have a reduction of Bruton's tyrosine kinase (Btk), showed normal or increased percentages of monocytes expressing Fcγ and complement receptors. These results indicate that the expression of Fcγ and complement receptors are not sufficient to a good perform of the phagocytosis function and suggests that the impaired phagocytosis observed in XLA patients could be due to defects of intracytoplasmatic transduction mechanisms Btk mediated. Furthermore, the reduced expression of CD16⁺ and CD32⁺ on monocytes from CVI patients, who have a normal expression of Btk, strongly suggests that the expression of these receptors is independent of Btk and the impaired phagocytosis observed in the CVI patients could be due the receptors alterations on the monocytes of these patients.

Keywords: CR1 (CD35), CR3 (CD11b, CD18) receptors, monocytes, Fcγ, flow cytometry, common variable immunodeficiency, X-linked agammaglobulinaemia.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALX:	Agamaglobulinemia ligada ao X
BCR:	B cell receptor
Btk:	Bruton's tyrosine kinase
C3:	Proteína do sistema complemento
C3b:	Produto de ativação de C3
C3bi:	Produto de ativação de C3 inativado pelo Fator I
CD:	Cluster of differentiation
CR:	Complement receptor
CVI:	Common variable immunodeficiency
FcγR:	Receptor para o fragmento Fc da imunoglobulina G
FITC:	Fluorescein Isothiocyanate
HLA:	Human Leukocyte Antigens
ICV:	Imunodeficiência comum variável
IFR:	Intensidade de fluorescência relativa
IgG:	Imunoglobulina G
IL-R:	Interleukin receptor
MBL:	Mannose bind lectin

MHC:	Major histocompatibility complex
MIF:	Mediana da intensidade de fluorescência
mRNA:	RNA mensageiro
NK:	Natural Killer
OMIN:	“On line Mendelian Inheritance in Man”
PE:	Phycoerithrin
PerCP:	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
PH:	Pleckstrin homology domain
SH1:	Src homology 1 domains
SH2:	Src homology 2 domains
SH3:	Src homology 3 domains
TH:	Tec homology domain
TH2:	T-cell helper 2
TLR:	Toll-like Receptor
TNF:	Tumor Necrosis Factor

	Pág.
Tabela 1: Características clínicas e laboratoriais de pacientes com agamaglobulinemia ligada ao X.....	71
Tabela 2: Características clínicas e laboratoriais de pacientes com imunodeficiência comum variável.....	72
Tabela 3: Porcentagem de monócitos com expressão dos receptores Fcy e complemento de pacientes com ICV e ALX comparado com controle normal.....	74
Tabela 4: Intensidade de fluorescência relativa (IFR) da expressão dos receptores Fcy e complemento em monócitos de pacientes com ALX e ICV comparados com controles normais.....	75

	Pág.
Figura 1: Esquema simplificado do desenvolvimento dos linfócitos B e as respectivas proteínas envolvidas neste processo.....	33
Figura 2: Modelo esquemático mostrando a estrutura da família Tec kinase.....	37
Figura 3: Modelo esquemático das vias de sinalização da Btk.....	40
Figura 4: Comparação da expressão dos receptores $Fc\gamma$ (1A, 1B, 1C) e de complemento (1D, 1E, 1F), mensurados através das porcentagens de monócitos positivos, entre pacientes com ALX, ICV e controles normais.....	78
Figura 5: Comparação da expressão dos receptores $Fc\gamma$ (2A, 2B, 2C) e de complemento (2D, 2E, 2F), mensurados através da intensidade de fluorescência relativa, entre pacientes com ALX, ICV e controles normais.....	81

	Pág.
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1- INTRODUÇÃO.....	29
2- OBJETIVOS.....	57
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3.1- Planejamento experimental.....	63
3.1.1- Seleção de Pacientes e Controles.....	63
3.1.1.1- Grupo de Pacientes.....	63
3.1.1.2- Grupo Controle.....	64
3.2- Procedimento experimental.....	64
3.2.1- Coleta de Amostras de Sangue.....	64
3.3- Métodos laboratoriais do protocolo de pesquisa.....	65
3.3.1- Separação celular e análise da expressão do Btk em monócitos por citometria de fluxo.....	65
3.3.2- Análise da expressão dos receptores Fcy e complemento em monócitos por citometria de fluxo.....	65
3.3.3- Descrição do ensaio.....	66
3.3.4- Estatística.....	67

4- RESULTADOS.....	69
5- DISCUSSÃO.....	83
6- CONCLUSÕES.....	93
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
8- APÊNDICES.....	121

1- INTRODUÇÃO

As deficiências predominantemente de anticorpos, são as mais frequentes no grupo das imunodeficiências primárias. Estas deficiências envolvem defeitos nas proteínas que estão envolvidas no processo de maturação do linfócito B, com consequente paralisação do desenvolvimento destes linfócitos (Kumar et al., 2006). Dentre as deficiências de anticorpos temos as agamaglobulinemias que compreendem afecções com herança recessiva ligada ao X ou autossômica recessiva.

A Agamaglobulinemia Ligada ao X ou Doença de Bruton (ALX OMIM 300300), é causada por mutações na tirosina quinase de Bruton citoplasmática (Btk) (Tsukada et al, 1993; Vetrie et al, 1993), as quais estão associadas à redução na Btk mRNA, proteína Btk e atividade das quinases (Futani et al., 1998).

A ALX corresponde a 85% das imunodeficiências com defeito precoce no desenvolvimento de linfócitos B (Conley et al., 2005) e é considerada o protótipo das imunodeficiências humorais, cujo defeito fundamental está limitado à linhagem de linfócitos B (Gaspar & Conley, 2000).

A ALX caracteriza-se por estar associada a infecções bacterianas recorrentes e enterovirais. Apresenta fenótipo clássico de menos de 2% de linfócitos B maduros no sangue periférico e ausência quase completa de todos os isótipos de imunoglobulinas. Fenótipos atípicos têm sido identificados, com início tardio dos sintomas e concentrações mais elevadas de imunoglobulinas, demonstrando que a ALX é uma entidade com ampla heterogeneidade clínica e imunológica (Gaspar & Conley, 2000; Teimourian et al., 2008).

Além do comprometimento dos linfócitos B, tem sido descrito neutropenia acentuada em mais de 25% desses pacientes (Hermaszewski & Webster, 1993; Farrar, Rohrer & Conley, 1996; Kanegane et al., 2005; Aghamohammadi et al., 2009), provavelmente pela endotoxemia observada nas infecções graves ou reflexos da produção de células mielóides em situação de stress. Estudos prévios demonstraram recuperação da neutropenia após infusão

de gamaglobulina endovenosa (Farrar, Rohrer & Conley, 1996; Plo et al, 1999; Aghamohammadi et al., 2009).

Btk está expressa nos linfócitos B e também em células mielóides, como mastócitos (Kawakami et al., 1994; Smith et al., 1994), monócitos/macrófagos (De Weers et al., 1993; Smith et al., 1994; Geneviev et al., 1994; Futatani et al, 2001; Conley et al, 2005; Kanegane et al, 2005; Rodriguez et al., 2007; Taneichi et al., 2008), neutrófilos (Lachance, Levasseur & Naccache, 2002), células dendríticas (Gagliardi et al., 2003; Taneichi et al., 2008), eritrócitos (Smith et al., 1994; Whyatt et al., 2000), plaquetas (Quek, Bolen & Watson, 1998), células-tronco hematopoiéticas pluripotentes e células neuronais primárias (Yang et al., 1997), exceto linfócitos T e plasmócitos (Tsukada et al., 1993; Vetrie et al, 1993).

A ALX apresenta padrão de herança do tipo recessiva ligada ao X e o defeito genético tem sido identificado por mutações nos cinco domínios (PH, TH, SH3, SH2 e SH1) da Btk (Nomura et al., 2000), determinando uma ineficiente expansão de linfócitos pré-B em estágios tardios dos linfócitos B ou diferenciação incompleta dos linfócitos B precursores em linfócitos pré-B (Futatani et al., 1998).

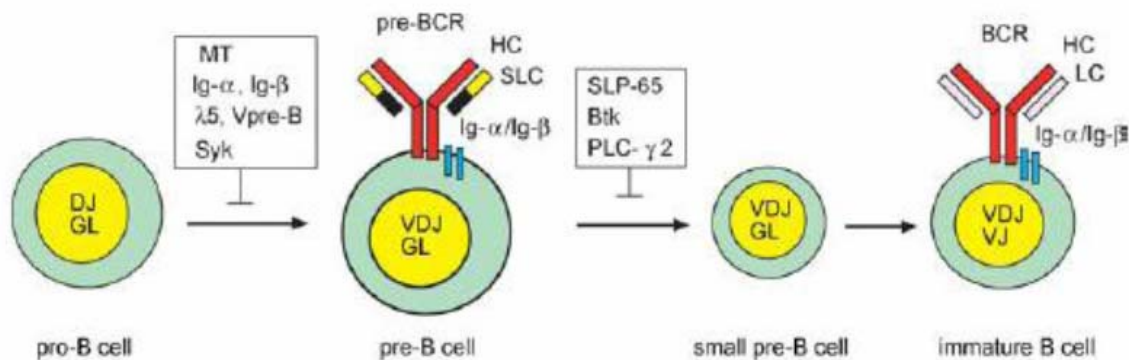


Figura 1- Esquema simplificado do desenvolvimento dos linfócitos B e as respectivas proteínas envolvidas neste processo. De forma simplificada, o rearranjo do gene da cadeia pesada nos linfócitos pró-B resulta na expressão do receptor dos linfócitos pré-B (pré-BCR) e, conseqüentemente, a expressão dos linfócitos pré-B. Rearranjo produtivo das cadeias leves nos pequenos linfócitos pré-B levam a expressão do receptor dos linfócitos B (BCR) nos linfócitos B imaturos (Jumaa et al., 2005).

A descoberta das mutações no gene que codifica a Btk, responsáveis pela ALX, revelou o papel da Btk no desenvolvimento e função dos linfócitos B (Tsukada et al., 1993; Vetrie et al., 1993).

O gene da Btk está identificado e mapeado na porção média do braço longo do cromossoma X (Xq21.3-22), o qual é constituído por 19 exons e possui 37,5 Kb de extensão (Hagemann et al., 1994; Rohrer et al., 1994; Sideras et al., 1994; Ohta, et al., 1994). Dos 19 exons, 18 são responsáveis pela codificação de uma proteína pertencente à família das tirosinas quinases - Src - denominada “Bruton’s Tyrosine Kinase” (Btk). Esta proteína está diretamente envolvida no desenvolvimento e maturação dos linfócitos B.

A Btk, é um membro da família Tec da proteína tirosina quinase que inclui Tec I e Tec II, Bmx (bone marrow kinase on the X chromosome, também denominada Etk), Rlk (resting lymphocyte kinase, também denominada Txk), Itk (IL-2-inducible T cell kinase, também denominada Emt), e Dsrc 28C (Mano et al., 1990; Mano et al., 1993; Yamada et al., 1993; Tanaka et al., 1993; Siliciano, Morrow & Desiderio, 1992; Hairern et al., 1994; Tamagnone, et al., 1994; Hu et al., 1995; Spatuzza et al., 2008), com importante função na imunidade inata e adaptativa.

Elas recebem este nome devido à proteína Tec ter sido a primeira quinase a ser isolada. As quinases da família Src são geralmente ancoradas à membrana celular por meio de uma porção lipídica localizada na região N-terminal e têm, em comum, 5 domínios estruturais: PH (pleckstrin homology domain); TH-BTK (Tec homology domain); SH3 (Src homology 3 domains); SH2 (Src homology 2 domains) e o domínio catalítico da tirosina quinase (SH1-Kinase) (Xu et al., 1997; Nore et al., 2000; Vihinen et al., 2000; Smith et al., 2001; Gauld et al., 2002).

A proteína Btk está intimamente envolvida na sinalização do receptor de linfócito B (Brunner, Muller & Wirth, 2005), regulando a sobrevivência, ativação, proliferação e diferenciação da linhagem de linfócitos B. Tem envolvimento também com vários outros receptores como Fc-R, IL-3R, IL-5R e IL-6R, IL-10R, receptor colágeno, receptor eritropoietina e receptor Toll-like (TLR) (Kawakami et al., 1994; Sato et al., 1994; Matsuda et al., 1995; Go et al., 1990; Quek et al., 1998; Schmidt et al., 2004; Jefferies et al., 2003), sugerindo um papel na diferenciação, proliferação e apoptose de outras linhagens celulares além dos linfócitos B (Uckun, 2007).

A função da Btk nas demais células de linhagem hematopoiética, permanece incompletamente definida (Brunner, Müller & Wirth, 2005). Provavelmente, Btk tem funções análogas durante o desenvolvimento e funcionamento da linhagem mielóide, afetando no resultado de vários eventos infecciosos e inflamatórios não infecciosos (Mangla et al., 2004).

Tem se demonstrado que a Btk é ativada por estimulação do receptor de linfócitos B (BCR), e estudos bioquímicos em células deficientes desta proteína demonstraram que Btk é um importante regulador da mobilização de cálcio induzido por BCR (Takata et al., 1996; Fluckiger et al., 1998; Lisa A et al., 2004; Freedman, 2006). Por conseguinte, as células com prejuízo ou deficiente ativação da Btk, tem demonstrado virtualmente falta de mobilização do cálcio intracelular dependente do BCR (Fluckiger et al., 1998). A ativação da Btk leva a um aumento dos níveis de fosfatidil inositol (IP3), depleção dos estoques de cálcio intracelular e aumento do influxo de cálcio extracelular (Fluckiger et al., 1998, Lindvall et al., 2005).

O domínio pleckstrin homology (PH), geralmente encontrado em proteínas sinalizadoras eucarióticas, possui aproximadamente 100 aminoácidos e ocorre em muitas proteínas envolvidas na sinalização intracelular e na constituição do citoesqueleto celular. Apesar da função deste domínio ainda não estar totalmente esclarecida, existem várias hipóteses, como tendo sítio de ligação das subunidades β - δ da proteína heterotrimétrica G; de lipídios; dos resíduos de serina ou treonina, de proteínas quinases C e de ancoragem da proteína a superfície celular (Hyvönen & Saraste, 1997; Shen & Vihinen, 2004; Vihinen et al., 2000).

O domínio TH contém uma sequência específica (motif) de ligação de zinco com cisteína e histidina conservadas, e geralmente está localizada na porção C-Terminal do domínio PH. A estrutura cristalográfica desta região demonstra que os segmentos de uma sequência específica (motif) denominada Btk interagem com os domínios PH, e a esta interação denominou-se Tec homology (TH)-(Btk-PH). Os oito resíduos localizados na porção extrema do domínio Btk-PH possuem um núcleo hidrofóbico, que aparentemente é importante para a estabilidade da proteína. Os 27 resíduos da porção N-terminal de TH são altamente conservados e são seguidos de uma região rica em prolina. O domínio TH, contendo as regiões Btk e prolina, não é encontrado nas outras proteínas da família da tirosina quinase, além da proteína Btk, e pode ser o marcador mais importante desta proteína quinase citoplasmática (Xu et al., 1997; Smith et al., 2001; Sheb & Vihinen, 2004).

O Src homology 3 (SH3) liga-se a regiões ricas em prolina e em aminoácidos hidrofóbicos das proteínas alvo. Este domínio é formado por aproximadamente 50 resíduos de aminoácidos e são encontradas em uma grande variedade de proteínas intracelulares ou associadas à membrana, como nas várias proteínas com atividade enzimática, nas proteínas adaptadoras sem seqüências catalíticas e nas proteínas do citoesqueleto (Vihinen et al., 1994; Vihinen et al., 2000; Nore et al., 2000).

O domínio Src homology 2 (SH2) é constituído de aproximadamente 100 aminoácidos, e funciona como módulos regulatórios de sinalização de cascatas intracelulares, interagindo com elevada afinidade aos peptídeos alvo de fosfotirosina contendo uma sequência-específica. A ligação dos domínios SH2 as fosfotirosinas é um mecanismo crucial para o recrutamento intracelular de moléculas de sinalização para o receptor (Vihinen et al., 2000; Guo et al., 2005).

O domínio quinase está presente numa extensa família de proteínas que compartilham de um núcleo catalítico conservado comum com as proteínas quinases serina/treonina e tirosina. Há um grande número de regiões com aminoácidos conservados no domínio catalítico da proteína quinase (Vihinen et al., 2000).

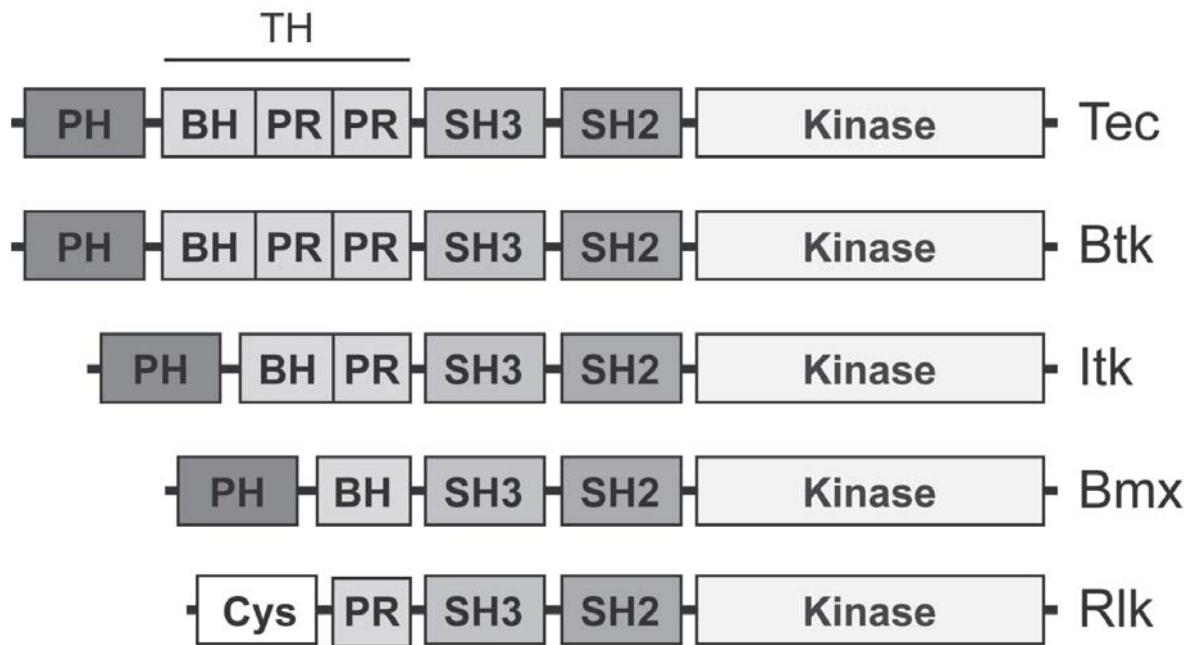


Figura 2- Modelo esquemático mostrando a estrutura da família Tec kinase. O domínio homólogo pleckstrin (PH) localizado na porção N-terminal da molécula é o mais característico da família Tec kinase (com exceção da Rlk). Os domínios PH são capazes de se ligarem a fosfolipídios (ou proteínas) e são envolvidos no recrutamento das Tec kinases para a membrana. O domínio PH é seguido pelo domínio homólogo Tec (TH) e pelos domínios homólogos Src (SH) SH3 e SH2, que interagem com uma sequência rica em prolina ou se ligam a sequências contendo tirosinas fosforiladas, respectivamente. O domínio TH é formado pelo homólogo Btk (motif) e por uma ou duas regiões ricas em prolina, e tem sido implicado na autoregulação das Tec kinases. Rlk perde o domínio PH e o Btk motif e representa uma família Tec kinase atípica (Köprülü & Ellmeier, 2009).

A Btk é fosforilada por Syk ou Lyn da família das tirosinas quinases Src, na posição Y551 no domínio quinase, promovendo sua atividade catalítica e resultando na autofosforilação do resíduo Y223 no domínio SH3 (Rawlings et al.,

1996). Embora a fosforilação de Y223 pareça não ter influência na atividade catalítica da Btk, ela impede a ligação de WASP (Wiskott Aldrich Syndrome Protein) e aumenta a afinidade para Syk (Morrogh et al., 1999). Concomitantemente, a ativação de Syk resulta na fosforilação de SLP-65, que é o elemento central da sinalização de pré-BCR e BCR. A fosforilação de SLP-65 provém sítios para várias proteínas sinalizadoras incluindo Grb2, Vav, Nck, PLC- γ 2, Btk e a subunidade Ig α do complexo pré-BCR e BCR (Jumaa et al., 2005; Kersseboom et al., 2006).

Resíduos de tirosina reúnem-se dentro de supostas sequências ativadoras (motif) de imunoreceptores de tirosina na porção citoplasmática dos heterodímeros de Ig α /Ig β que são fosforilados por membros das famílias quinases Src, criando segmentos de sítios de ligação para receptores de tirosina quinase e proteínas adaptadoras. Em adição, como resultado de ativação de fosfoinositídeo-3-quinase (PIK-3), níveis de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) na parte interna da membrana movimentam-se, conduzindo, através do domínio PH, a translocação da proteína Btk para a membrana plasmática (Salim et al., 1996); Scharenberg et al., 1998; Mohamed et al., 1999).

A ativação da Btk também pode ocorrer após a estimulação de diversos receptores de superfície celular (Nore et al., 2000). O primeiro evento ocorre na membrana plasmática, onde membros da família quinase fosforilam Btk no resíduo de tirosina (Y551), importante na ativação do “loop” do domínio quinase, seguido da autofosforilação do resíduo Y223 no domínio quinase (Kersseboom et al., 2006). Após esta etapa, a Btk fosforilada recruta a proteína adaptadora de ligação de células B (BLNK) junto com a fosfolipase C- γ 2 (PLC- γ 2) na membrana plasmática, trazendo para bem perto da proteína Syk, onde a fosforilação da tirosina ocorre em ambas as proteínas (Rodriguez et al., 2001; Guo et al., 2005).

A fosforilação e subsequente ativação de PLC- γ 2 conduzem a hidrólise de fosfoinositídeo Ptdins (4,5) P2 para a produção de Ins (1,4,5) P3 e diaciglicerol (DAG) causando a mobilização de cálcio e ativando a proteína quinase C (PKC), respectivamente (Guo et al., 2004). Em células deficientes ou com baixa

expressão da Btk tem se mostrado ocorrer a parada de mobilização de cálcio intracelular dependente de BCR. Acredita-se que a sinalização na membrana plasmática por Btk, ocorrer em ambiente rico em colesterol e esfingolipideo.

A sinalização da Btk na membrana plasmática também envolve eventos no citoplasma e núcleo. Com isto, a transdução de sinal envolvendo Btk tem sido mostrada na ativação da transcrição do fator nuclear regulador Kb (NFkB), em seguida do envolvimento da BCR e lipopolissacarideo, e da estimulação dos receptores toll-like (Bajpai et al., 2000; Horwood et al., 2003; Schmidt et al., 2006). Além disso, os fatores de transcrição parecem ser alvos diretos da Btk, reiterando seu papel na expressão e regulação destes genes (Yang et al., 1997) e que através de modulação direta da atividade de pequenas GTPases, a Btk pode induzir remodelamento do citoesqueleto nas células estimuladas (Inabe et al., 2002).

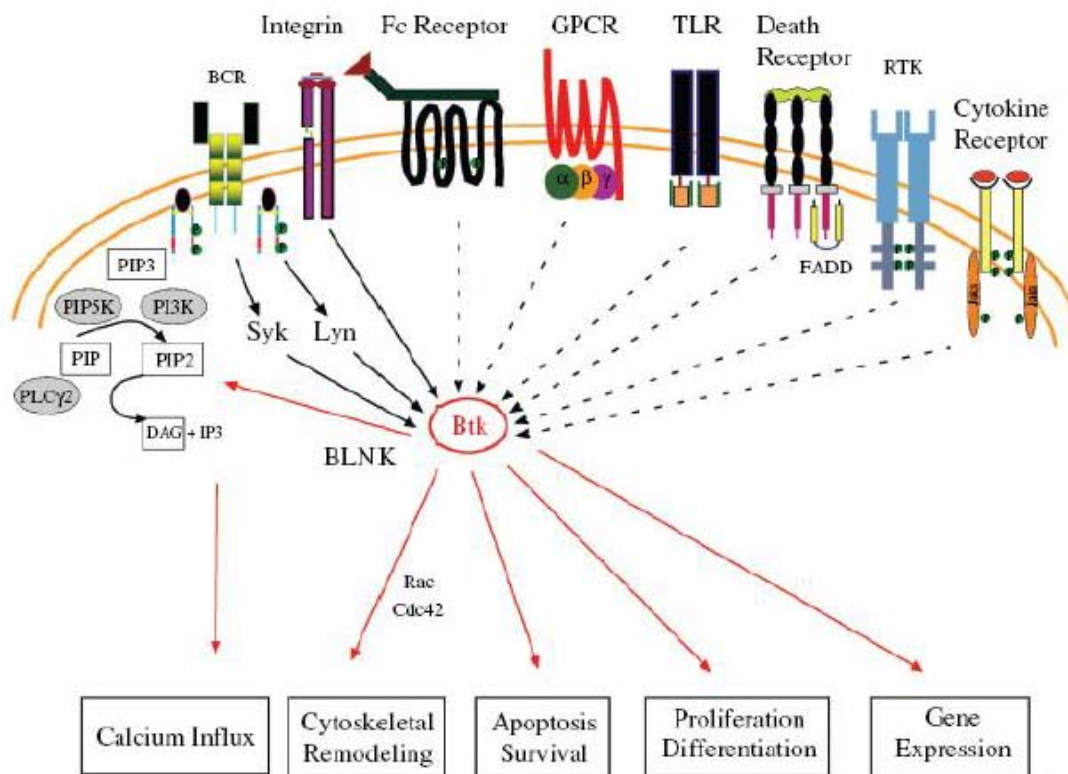


Figura 3- Modelo esquemático das vias de sinalização da Btk. Devido à estrutura multimodular da proteína Btk e das diversas moléculas que podem interagir com ela, é de prever que esta quinase provoca múltiplas vias de sinalização, gerando efeitos pleiotrópicos. RTK-Receptor de Tirosina Quinase - BCR, GPCR, Receptor proteína G, TLR. Setas interrompidas representam vias de sinalização que ainda não são completamente elucidadas (Lindvall et al., 2005).

Mutações nos diferentes sítios dos domínios destas proteínas levam ao comprometimento da atividade protéica, afetando a maturação das células B e levando ao quadro de ALX.

As mutações encontradas no gene Btk pelos diferentes grupos de estudo são muito heterogêneas, geralmente particulares para cada família, com predomínio das localizadas no domínio quinase (Rodriguez et al., 2001).

Já foram descritas mais de 600 mutações únicas para este gene. Um terço das mutações são do tipo “missensses” e estas são encontradas principalmente no domínio quinase do gene, embora também tenham sido identificadas em todos os outros domínios, com exceção do SH3. Também foram identificados “stop codons” precoces, deleções e inserções ao longo de toda a extensão do gene. Embora a maior parte das mutações tenha sido encontrada nos exons, 12% das mutações foram identificadas em sítios de “splicing”. Somente uma mutação foi encontrada na região promotora do gene, e esta mutação resulta em alterações significativas do gene Btk. Além das mutações, também foram detectadas inversões, duplicações e inserções retrovirais (Conley, Rohrer & Minegishi, 2000; Valiaho et al., 2006).

As mutações são variáveis e há fraca correlação entre genótipo e fenótipo. 84% das mães e 16% das avós maternas foram carreadoras da mutação encontrada nos descendentes, indicando origem muito recente.

Apesar do grande número descrito de fenótipos e mutações, ainda é impossível fazer uma correlação fenótipo-genótipo definitiva, demonstrando que outros fatores, além das mutações genéticas possam influenciar no curso clínico, como sugerido em outras imunodeficiências.

A Imunodeficiência Comum Variável (ICV, OMIM 240500) é uma imunodeficiência complexa cujos defeitos moleculares e imunológicos na maioria dos pacientes permanecem desconhecidos. É caracterizada por infecções recorrentes, provavelmente devido a um bloqueio na diferenciação de células B, levando a uma redução dos níveis séricos de IgG (geralmente <3g/L) e IgA (<0,05g/L). Em metade dos pacientes níveis de IgM também estão reduzidos (<0,3g/L) (Hammarström, Vorechovsky & Webster, 2000; Luis, 2003; Geha et al., 2007). O número de linfócitos B circulantes é reduzido ou normal, com adequada proliferação a estímulos antigênicos, mas falha na diferenciação em plasmócitos.

Sua incidência é cerca de 1:10.000 a 1:50.000; afeta homens e mulheres em várias idades, sendo mais frequente na segunda ou terceira décadas da vida (Who, 1999; Cunningham & Ponda, 2005).

A ICV e a deficiência de IgA podem representar duas variantes fenotípicas em um espectro associado com o mesmo defeito molecular (Hammarström & Smith, 2007). A maioria dos pacientes tem número normal de linfócitos B, porém *in vitro* falham na produção de hipermutações somáticas, diferenciação em plasmócitos, e no “switching” das classes de linfócitos B de memória. Falhas na ativação de linfócitos T parecem estar relacionadas ao ambiente de citocinas- Th1, desfavorável na produção de anticorpos, sugerindo uma explicação para a falta relativa de células B antígeno específica (Cambronero et al., 2000; Braig et al., 2003).

Alguns genes susceptíveis tem sido observados, porém a maioria dos pacientes com ICV não tem mutações nos genes conhecidos (Schäffer et al., 2005). Em casos de ICV aparentemente monogênicos, cinco genes parecem sofrer mutação: ICOS (Inducible costimulator) no 2q (Grimbacher et al., 2003), CD19 no 16p (van Zelm et al., 2004; Franco et al., 2004), TNFRSF13C no 22q, os quais codificam o receptor BAFF (B-cell-activating factor) (Warnatz et al., 2004), TNFRSF13B no 17p codificam a proteína TACI (Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin-ligand interactor) (Castigli et al., 2005; Salzer et al., 2005) e Msh5 (Sekine et al., 2007).

Por essas razões, a ICV é presumivelmente um grupo heterogêneo de doenças com etiologias distintas (Wood et al., 2007). Diversidade clínica, como o desenvolvimento de doença pulmonar e gastrointestinal (Amoras, 2001; Thickett et al., 2002; Zullo et al., 1999; Daniels et al., 2007; Tarzi et al., 2009), autoimune (Spickett et al., 1997; Mechanic, Dikman & Cunningham, 1997; Cunningham-Rundles, 2002; Etzioni, 2003; Michel et al., 2004; Chapel et al., 2008; Cunningham-Rundle, 2008; Lopes-da-Silva & Rizzo, 2008; Agarwal & Cunningham-Rundles, 2009; Bussone & Moutho, 2009), granulomatosa (Bates et al., 2004; Morimoto & Routes, 2005), e/ou malignidade

(Gompels et al., 2003; Chua, Quinti & Grimbacher, 2008), também sugerem outras diferenças moleculares e/ou genéticas entre os pacientes (Schroeder, Schroeder & Sheikh, 2004).

Um amplo espectro de anormalidades imunológicas tem sido relacionado com a redução dos níveis de imunoglobulinas séricas observada nos pacientes com ICV, tais como defeito na maturação de células-B, incluindo hipermutação somática alterada (Levy et al., 1998), defeito na sinalização membrana-célula (Eisenstein & Strober, 1995), anormalidades nos linfócitos T, com redução na expressão das moléculas de membrana (CD40 ligande, ICOS, L-selectina) (Grimbacher et al., 2003), produção de citocina prejudicada (Pastorelli et al., 1989) e redução na produção de linfócitos T de memória antígeno específica (Kondratenko et al., 1997).

A imunidade humoral não mediada por anticorpos parece ter uma função crítica na defesa do hospedeiro na ICV. É provável que as lectinas ligantes de manose (MBL), que opsonizam patógenos e ativam complemento de maneira independente do anticorpo, assumam uma importância na defesa imune compensatória na ICV (Mullighan, Marshall & Welsh, 2000).

O conjunto de defeitos do sistema imune inato observado nos pacientes com ICV, como alteração na diferenciação e maturação das células dendríticas, com redução na expressão de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e antígeno leucocitário humano (HLA-DR) e produção de IL-12, resultando em prejuízo na ativação e proliferação de linfócitos T (Levy et al., 1998; Eisenstein & Strober, 1995; Grimbacher et al., 2003; Pastorelli et al., 1989; Kondratenko et al., 1997; Bayry et al., 2005); anormalidade no circuito TNF-IL 12-IFN- γ em monócitos; hiperatividade crônica e aumento do stress oxidativo dos monócitos devido a persistente ativação do sistema TNF (Aukrust, Müller & Froland, 1994; Aukrust et al., 1996); aumento da IL-12 em monócitos que induz IFN- γ em células T *in vitro* e polarização da resposta imune TH1 (Cambronero et al., 2000); apresentação e processamento anormal de antígenos pelos fagócitos (Eibl et al., 1982; Eibl et al., 1982; Farrant et al., 1985; Lebranchu et al., 1991; Rump et al., 1997); redução da

fagocitose de monócitos mediada pelos receptores de complemento CR1 e CR3 (Amoras et al., 2003) e do número absoluto de células natural killer (NK) no sangue periférico (Aspalter et al., 2000), possibilita a hipótese de que o sistema imune inato esteja envolvido na patogênese da ICV.

A predisposição genética e defeitos múltiplos tanto no sistema imune inato e adaptativo, podem contribuir cumulativamente para a heterogeneidade clínica apresentada pelos pacientes com ICV.

O desafio primário do sistema imune inato é a discriminação entre componentes do próprio organismo com um grande número de patógenos, utilizando receptores toll like e receptores fagocíticos, como o receptor de manose, de complemento e receptores Fcy. Eles diferem em sua estrutura, afinidade de ligação para IgG, distribuição celular e sinalização (Heijnen & van de Winkel, 1997).

Esses receptores são efetivos na ligação, internalização e destruição das partículas opsonizadas (Aderen & Underhill, 1999). Monócitos também expressam altos níveis de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) classe II, o qual tem uma função crucial na apresentação do antígeno para células T CD4+.

A quimiotaxia é uma forma especial de locomoção em resposta a sinais químicos, através dos quais, os fagócitos respondem de forma orientada e se movem em direção a um gradiente de concentração do atraente, que podem ser fatores quimiostáticos e quimiocinéticos, como peptídeos, leucotrienos B4 e C5a (Wilkinson, 1987).

As integrinas dos fagócitos (macrófagos e leucócitos polimorfonucleares) mediam funções fundamentais na resposta inflamatória. As selectinas mediam adesão e rolamento do monócito no endotélio e as L-selectinas e CD11b tem-se mostrado importantes na migração de monócitos para os sítios inflamatórios (Pattarroyo, 1994; Ugarova & Yacubenco, 2001; Hespanhol & Mantovani, 2002).

Um segundo passo necessário para que ocorra a firme adesão do monócito ao endotélio, envolvem outras moléculas de adesão como CD11a, CD11b, CD18 e VLA-4 (very late antigen) nos monócitos, e CD54 (moléculas de adesão intercelular 1) e moléculas de adesão da célula vascular 1 nas células endoteliais. O terceiro passo consiste na transmigração do monócito para o espaço subendotelial (Vignola, 1998).

A aderência do monócito às células endoteliais é modulada pelo endotelim-1 através do envolvimento do Src (p60src), quinases JAK 1-like e fator de crescimento do endotélio vascular, através da expressão aumentada do flt-1 pelos monócitos (Vignola, 1998).

A fagocitose é iniciada pela interação dos ligantes na superfície das partículas ($>0,5 \mu\text{m}$) com os receptores específicos na superfície dos fagócitos como integrinas CR1 e CR3, receptores de anticorpos para IgE, IgA e IgG e receptores para carboidratos (receptor de manose ou receptor β -glucana) (Moura, Verheul & Marx, 1997).

O receptor de manose reconhece os oligossacárides fucose e manose, presentes em um amplo espectro de bactérias, vírus, fungos e parasitas, e media a fagocitose do organismo (Stahl & Ezekowitz, 1998). É um receptor de cadeia única com uma pequena cauda citoplasmática e um domínio extracelular incluindo 8 domínios ligantes de carboidratos lectina-like. A cauda citoplasmática é fundamental para as funções endocíticas e fagocíticas do receptor. Pouco se sabe sobre os sinais que determinam a fagocitose (Ezekowitz et al., 1990, Stahl & Ezekowitz, 1998).

Na fagocitose via receptor de manose, além dos sinais fagocíticos mediando a internalização das partículas, também são gerados sinais pró-inflamatórios, como a IL-1 β , IL-6, GM-CSF, TNF- α e IL-12 (Stein & Gordon, 1991; Garner et al., 1994; Yamamoto, Klein & Friedman, 1997; Shibata, Metzger & Myrvik, 1997).

A MBL interage com a manose associada a proteases serinas (MASP 1 e 2), ativando as vias clássica e alternativa do complemento, podendo também ligar-se a receptores fagocitários, resultando em opsonização, fagocitose e lise celular (Matsushita & Fujita, 1992; Nepomuceno et al., 1997), constituindo dessa forma um importante componente da resposta imune inata em humanos.

Baixa produção de alelos MBL está associada a risco aumentado de infecções, principalmente quando há comprometido do sistema imune adaptativo (Mullighan, Marshall & Welsh, 2000). O gene MBL humano encontra-se no cromossoma 10 e, três polimorfismos únicos nos nucleotídeos do exon 1 do gene MBL tem sido identificados, nos codons 52 (Arg→Cys), 54 (Gly→Asp) e 57 (Gly→Glu) (Mullighan, Marshall & Welsh, 2000).

Durante a fagocitose de zimosan mediada pelo receptor de manose, o citoesqueleto de actina se mobiliza ao redor do fagossoma recém formado e proteínas como as F-actina, talina, PKC α , MARCKS e miosina I são recrutadas (Allen & Aderem, 1996). Na fagocitose via receptor de manose, não são recrutadas a vinculina e a paxilina, ao contrário do que se observa na fagocitose via receptor do complemento e Fc. Reforçando dessa forma, a noção de que os diversos receptores fagocíticos enviam diferentes sinais para o citoesqueleto de actina e iniciam diferentes mecanismos de internalização (Allen & Aderem, 1996).

Durante o processo de fagocitose, ocorre cooperação entre os receptores Fc e receptores do complemento, mesmo na ausência de complemento (Jones & Brown, 1996). Assim como, cooperação entre as diferentes classes de Fc γ R, desencadeando ativação e funções biológicas (Van de Winkel & Anderson, 1991).

A ingestão de partículas pelos receptores do complemento pode ser induzida pela proteína quinase C (PKC), PMA, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF) (Pommier et al., 1983, Wright, Cragmyle & Silverstein, 1983, Wright & Griffin, 1985).

Embora todos os tipos de fagocitose necessitem de polimerização da actina no local de ingestão (Allen & Aderem, 1996), estudos realizados por microscopia eletrônica demonstraram que a fagocitose de macrófagos mediada por complemento (Allen & Aderem, 1996), é um processo relativamente passivo, que ocorre através de uma variação do modelo clássico de “zipper”; onde as partículas opsonizadas pelo complemento parecem entrar na célula com formação de pequeno ou nenhum pseudópode (Allen & Aderem, 1996).

A internalização de partículas mediada pelo receptor do complemento necessita de microtúbulos intactos, e é acompanhada pelo acúmulo de vesículas abaixo do fagossoma formado, sugerindo que o tráfego de membrana têm uma função importante na fagocitose mediada via receptor do complemento (Allen & Aderem, 1996). A fagocitose mediada pelo complemento não provoca a liberação de mediadores inflamatórios, tal qual os metabólitos do ácido aracdônico e reativos intermediários do oxigênio (Wright, Craigmyle & Silverstein, 1983, Aderem et al., 1985).

Os componentes C3 do complemento, C3b e C3bi, tem como função primária a opsonização. O C3bi pode ser reconhecido por pelo menos 3 diferentes receptores de membrana plasmática, o CR2 (CD21), encontrado primariamente em linfócitos B, o CR3 (CD11b/CD18) em fagócitos e linfócitos, e o CR4 (CD11c/CD18) encontrado primariamente em macrófagos, monócitos e neutrófilos (Brown, 1991). Está bem estabelecido, que os receptores do complemento em monócitos humanos podem mediar independentemente a fagocitose de partículas opsonizadas por C3b e C3bi (Wright, Craigmyle & Silverstein, 1983).

O receptor de complemento CR3 (CD11b/CD18, Mac-1) é um receptor heterodímero multifuncional membro da família das integrinas ($\beta 2$ integrina), composto de uma cadeia α (CD11b, 165 KDa) e β (CD18, 95 KDa). O seu principal ligante é o C3bi, gerado pela clivagem de C3b mediada pelo fator I, mas podem reconhecer outros ligantes como o fibrinogênio,

e proteínas que contém na sua sequência ácido aspártico-arginina-glicina e lipopolissacarídeos (Larson & Springer, 1990; Sutterwala, Rosenthal & Mosser, 1996; Isolauri et al., 1997). Ca_2^+ e Mg_2^+ parecem ter função na ligação do C3bi ao CR3 (Larson & Springer, 1990; Brown, 1991). O CR3, com exceção do C3bi, requer ativação celular para que haja ligação. A ativação com o forbol éster aumenta a ligação do CR3 ao C3bi (Brown, 1991)

A integrina CD11b/CD18 está envolvida em várias funções desencadeadas pelo $\text{Fc}\gamma\text{R}$, incluindo ligação via $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ em eosinófilos, migração dos fagócitos e adesão ao endotélio, fagocitose mediada por monócitos e polimorfonucleares (PMN) e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Larson & Springer, 1990; Brown, 1991)

O receptor de complemento CR1 (CD35) é uma molécula polimórfica, com diferentes pesos moleculares: 160, 190, 220, 250, 285 KDa, composta de uma única cadeia de proteína transmembrana, um grande domínio extracelular de ligação do complemento lectina-like e um pequeno domínio citoplasmático com 43 aminoácidos, encontrado na superfície de membrana dos eritrócitos, neutrófilos, linfócitos B, monócitos e algumas células NK. Liga-se com alta afinidade a C3b dimérica e baixa afinidade a C3b monomérica, C4b e C3bi (Kalli, Aheam & Fearon, 1991; Aderem & Underhill, 1999). É também, um receptor para a lectina ligante de manose, um membro da família das colectinas.

O receptor CR1 tem como principais funções a intensificação da fagocitose de partículas recobertas pelos componentes C3b e C4b, clareamento de imunocomplexos e regulação da ativação do sistema. A ativação fagocitária é necessária para que haja ingestão via receptor CR1. O mecanismo molecular envolvido nesta ativação não está totalmente esclarecido (Brown, 1991; Vidarsson & van de Winkel, 1998).

Na fagocitose mediada pelos receptores Fc, ocorre no local da ingestão e internalização da partícula, a polimerização da actina, saída da actina do fagossoma, o qual amadurece através de uma série de eventos de fusão e cisão

com componentes da via endocítica, culminando na formação de fagolisossomas maduros.

Não está totalmente esclarecido, se somente a polimerização da actina é suficiente para determinar a emissão de pseudópodes e internalização das partículas, ou se também há necessidade do envolvimento de motores moleculares. O acúmulo de miosina II no copo fagocítico de macrófagos e neutrófilos que ingeriram leveduras, sugere que ela pode agir como um motor mecânico durante a internalização das partículas (Stendahl et al., 1980). Miosina I, miosina V e miosina IX se localizam juntamente com a F-actina na formação de fagossomos, sugerindo que podem facilitar a ingestão (Allem & Aderem, 1995, Swanson et al., 1998).

Esse processo de fagocitose induz a transdução de sinais, ativação de múltiplas proteínas tirosina quinases (Indik et al., 1995), aumento do fosfatidilinositol e do metabolismo do ácido aracdônico (Greenberg, Chang, & Silverstein, 1993; Moura, Verheul & Marx, 1997). As proteínas tirosina quinases iniciam a sinalização de membros da superfamília das imunoglobulinas.

Os FcγR, específicos para praticamente todos os isótipos de imunoglobulinas, são expressos em uma ampla variedade de células, mediando um grande número de respostas celulares, como clareamento de imunocomplexos, geração de superóxido, fagocitose de células e microorganismos opsonizados por IgG, regulação da proliferação de linfócitos e secreção de anticorpos, citotoxicidade celular dependente de anticorpos, produção e secreção de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 e IL-6), "varredura" de imunocomplexos circulantes e incremento na apresentação de antígenos, com conseqüente modulação da resposta imune (Herra, Keane & Whelan, 1996; Mejorada & Rosales, 1998, Bournazos et al., 2009, Rittirsch et al., 2009).

O grupo heterogêneo de receptores que se ligam à porção Fc das imunoglobulinas (FcγR) no homem, promove ligação entre o sistema imune inato e adaptativo (Van de Winkel & Anderson, 1991). Os FcγRs ligam-se especificamente

a IgG e são subdivididos em quatro subclasses. FcγRI (CD64), FcγRIII (CD16) e FcγRIV são receptores ativadores, enquanto o FcγRII (CD32) media funções inibitórias. A resposta celular é determinada pelo balanço entre sinais ativadores (ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif) e inibidores (ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) (Rittirsch et al., 2009).

Os FcγRs dividem-se em 2 classes principais, os envolvidos com funções efectoras e os que transportam imunoglobulinas através das barreiras epiteliais. Os receptores que mediam fagocitose em macrófagos humanos pertencem aos da classe de ativação e incluem os FcγRI, FcγRIIa e FcγRIII (Ravetch, 1997).

Os FcγR pertencem à superfamília das imunoglobulinas, e são codificados por genes localizados no braço longo do cromossomo 1, na banda q23-24 (Qiu et al., 1990). Os genes do FcγRI são compostos de 6 exons, 2 codificando o sinal peptídico, 1 exon para cada domínio de ligação da imunoglobulina e 1 exon para as regiões transmembrana e citoplasmática (Van de Winkel & Anderson, 1991; Van de Winkel & Capel, 1993). Os genes do receptor Fcγ surgem via duplicação gênica, divergência e recombinação, e apresentam algumas características estruturais comuns.

Os FcγR diferem de outros receptores do gene da superfamília das imunoglobulinas, como os receptores de linfócitos T (TCR) e de linfócitos B (BCR), por fagocitarem partículas opsonizadas por IgG (Indik, et al., 1995). Monócitos e macrófagos humanos expressam preferencialmente FcγRI e FcγRIIa, embora alguns possam expressar o FcγRIII, ligando-se a IgG1 e IgG3 com alta (FcγRI), baixa (FcγRII) e intermediária (FcγRIII) afinidades (Isolauri et al., 1997).

O FcγR embora não possua intrínseca atividade tirosina quinase, seus domínios citoplasmáticos contém pelo menos um par da sequência contendo tirosina (YXXL), ligados ao domínio SH2 que facilitam a interação com as proteínas tirosinas quinases celulares (Indik et al., 1995). A transdução de sinais

extracelulares para o núcleo celular através de receptores de superfície não catalíticos, é dependente da interação entre PTKs citoplasmáticas e seqüências de tirosinas no domínio citoplasmático do receptor.

O FC γ RI (CD64) é uma glicoproteína com peso molecular de 72KDa, que se liga preferencialmente a IgG monomérica e constitutivamente expresso em monócitos e macrófagos, podendo ter sua expressão induzida pelo interferon gama (IFN- γ) em neutrófilos e eosinófilos e pelo fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) em neutrófilos. O número de receptores varia de $15-40 \times 10^3$ em monócitos e 10^5 em macrófagos, e apresentam 4 isotipos: FC γ RIa, FC γ RIb1, FC γ RIb2 e FC γ RIc (Van de Winkel & Anderson, 1991).

O FC γ RI é a única classe de receptores que se liga a IgG monomérica com alta afinidade, apresentando especificidade para as subclasses IgG3, IgG1 e IgG4 em ordem decrescente de afinidade (Van de Winkel & Anderson, 1991). Apresentam 3 diferentes cDNAs que codificam uma região extracelular de 292 aminoácidos com 3 domínios de ligação da imunoglobulina, uma região transmembrana com 21 aminoácidos e cauda citoplasmática, cada uma com 61 (cDNAs p135 e p90) ou 31 (cDNAs p98/X2) aminoácidos. O terceiro domínio extracelular de ligação da imunoglobulina é exclusivo do FC γ RI, não sendo observado nos receptores FC γ RII e FC γ RIII (Van de Winkel & Capel 1993).

O FC γ RII (CD32), é uma glicoproteína com pelo menos 6 isotipos: FC γ RIIa1, FC γ RIIa2, FC γ RIIb1, FC γ RIIb2, FC γ RIIb3 e FC γ RIIc (Van de Winkel & Anderson, 1991), com peso molecular variando entre 37 a 43 KDa. É um receptor de baixa afinidade, que interage somente com imunoglobulinas de forma complexa ou polimérica. Vários tipos celulares expressam esse receptor, como monócitos (todas as formas de FC γ RII), neutrófilos (FC γ RIIa e c), células B e mastócitos (FC γ RIIb).

Todos os isotipos de FC γ RII são similares, diferenciando-se somente em suas regiões extracelulares. Apresentam uma região extracelular com cerca de 180 aminoácidos que contém 2 domínios de ligação do Fc, uma região transmembrana com 27 a 29 aminoácidos e cauda citoplasmática com 44 a 76 aminoácidos. Os FC γ RIIa e FC γ RIIC humano apresentam uma cauda citoplasmática contendo 2 YXXL ITAM motifs (immunoglobulin gene family tyrosine activation motif) similares aos encontrados nos receptores de células B e T (Van de Winkel & Anderson, 1991). O FC γ RIIb humano é um receptor inibitório, que não contém ITAM motifs e que não participa do processo de fagocitose (Ravetch, 1994; Odin, et al., 1991).

O FC γ RII é codificado por 3 genes (FC γ RII A, B e C) , localizados no cromossomo 1q23-24 (Qiu et al., 1990). A cauda citoplasmática do FC γ RII é codificada por 3 exons distintos (C1, C2 e C3), que o difere dos genes dos receptores FC γ RI e FC γ RIII, os quais são codificados por exons de uma região citoplasmática/transmembrana combinada (Van de Winkel & Capel, 1993).

O FC γ RIII (CD16), um receptor de baixa afinidade para IgG complexa, está presente em apenas 10% dos monócitos circulantes (Clarkson & Ory, 1988) e existe em duas formas: FC γ RIIIa e FC γ RIIIb. O FC γ RIIIa é um receptor transmembrana com média afinidade para IgG, com peso molecular de 50-65 KDa, presente em monócitos, macrófagos, células NK e algumas células T. É o principal receptor ativador para células NK, mediando a citotoxicidade dependente de anticorpos.

O FC γ RIIIb é um receptor de baixa afinidade para IgG, com peso molecular de 48 KDa, expresso principalmente em neutrófilos e eosinófilos (Isolauri et al., 1997; Moallem et al., 2000) e encontrado em 2 variantes alélicas, chamados NAN1 (Neutrophil Antigen 1) e NAN2 (Neutrophil Antigen 2). Provavelmente, não media a citotoxicidade celular dependente de anticorpos, por não desencadear sinal de transdução.

O $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ é codificado por 2 genes localizados no cromossomo 1q23-24. Os produtos de ambos os genes codificam proteínas da região extracelular com cerca de 190 aminoácidos.

A interação dos ligantes resulta em reação cruzada dos receptores, causando fosforilação das tirosinas nos ITAMs. O $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ e $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ tem domínios de ligação extracelular Fc similares aos do $\text{Fc}\gamma\text{IIa}$, mas faltam ITAMs em suas caudas citoplasmáticas. Por esse motivo, para que haja expressão e sinalização apropriada, esses receptores necessitam interagir com um dímero das subunidades γ ($\text{Fc}\gamma\text{RI}$ e $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$) ou subunidades ζ ($\text{Fc}\gamma\text{IIa}$), que são pequenas proteínas transmembrana que contém o ITAM necessário para a transdução de sinais (Anderson et al., 1990; Takai et al., 1994).

A ligação dos receptores $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ ou RIII resulta em reação cruzada e fosforilação da tirosina dos domínios ITAM de suas subunidades γ (Ravetch, 1994). O mecanismo pelo qual receptores $\text{Fc}\gamma$ estimulam a polimerização da actina e indução da formação de fagossomos não é totalmente conhecido. Entretanto, parece haver participação das fosfatidilinositol 3 (PI-3) quinase, família Rho da GTPase, proteína quinase C e motor de proteínas (Aderem & Underhill, 1999).

Recentes evidências sugerem a participação da PI-3 quinase na cascata de sinalização dos receptores fagocíticos. A PI-3 quinase cataliza a fosforilação na posição D-3 do anel inositol do fosfatidilinositol (PI), PIP e PIP₂, e é ativada por vários receptores tirosina quinase que desencadeiam a polimerização da actina (Toker & Cantley, 1997).

A reação cruzada do $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ e $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ aumenta a atividade da PI 3-quinase (PI3K), e a fagocitose mediada via receptor Fc é impedida por inibidores específicos da PI 3-quinase (wortmanina ou LY294002) (Ninomiya, et al., 1994; Araki, Johnson & Swanson, 1996). Estudos realizados por Swanson et al., 1998 indicam que a wortmanina e LY294002 PI não inibem a formação do copo fagocítico dependente de actina, porém previnem o fagossoma

de migrar atrás das partículas. Isto sugere que a PI3K pode participar da via de sinalização dependente da syk, crítica para fagocitose mediada pelo receptor Fc γ .

As GTPases, membros da família Rho, regulam o citoesqueleto de actina em resposta a vários sinais extracelulares (Hall, 1998). O preciso mecanismo pelo qual essas GTPases regulam a estrutura actina-F, ainda não foi bem definido. Porém, tem sido implicada uma variedade de reguladores do citoesqueleto incluindo o PIP 5-quinase (PIP5K) e miosina II (Hall, 1998). Membros da família ARF da GTPases tem função na maioria dos eventos de tráfego de membrana.

A fagocitose induzida pelos Fc γ Rs está intimamente relacionada com a produção e secreção de moléculas pró-inflamatórias, como os reativos intermediários de oxigênio e metabólitos do ácido aracdônico (Aderem et al., 1985, Wright & Silverstein, 1983).

A expressão do Fc γ R pode ser afetada por vários fatores, como lipoproteínas de baixa densidade, citocinas e hormônios. O IFN- γ aumenta a expressão do FC γ RI *in vivo* e *in vitro* em monócitos e PMN, e o G-CSF aumenta de forma específica o nível de FC γ RI em neutrófilos, mas não em monócitos. O TGF- β determina aumento do FC γ RIIIa em monócitos, o TNF- α redução específica do FC γ RIIIb e a IL-4 diminuição das 3 classes de receptores Fc. A IL-6 aumenta a citotoxicidade celular dependente de anticorpos mediada pelo Fc γ RI, e o IFN- γ aumenta a citotoxicidade mediada pelo Fc γ RII, sem afetar a expressão desse receptor de IgG (Van de Winkel & Anderson, 1991).

Previamente, demonstramos que monócitos obtidos de pacientes com ALX e ICV apresentavam quimiotaxia reduzida e defeito na fagocitose mediada pelos receptores Fc γ , e de complemento CR1 e CR3 comparado com monócitos obtidos de doadores saudáveis (Amoras, 2001; Amoras et al., 2003). Esses receptores são muito efetivos na sinalização, internalização e destruição de partículas opsonizadas (Aderem & Underhill, 1999). Eles diferem em sua estrutura,

afinidade de ligação pela IgG, distribuição celular e sinalização (Heijnen & van de Winkel, 1997). A função da Btk na via de sinalização da fagocitose permanece ainda não esclarecida (Lindvall et al., 2005). Além do mais, monócitos de pacientes com ICV exibem concentrações normais de Btk, sugerindo que outras vias de sinalização podem ter função nas deficiências de quimiotaxia e fagocitose.

Existem poucos ou ausência de dados sobre a expressão de receptores Fcy e complemento na fagocitose de pacientes com ALX e ICV. Para investigar se a alteração observada na fagocitose foi atribuída a diferenças no número desses receptores, nós investigamos a sua expressão nos monócitos de pacientes com ALX e ICV comparados a controles saudáveis.

2- OBJETIVOS

Avaliar a expressão dos receptores Fcy e de complemento em monócitos de pacientes com ALX e ICV, comparados com controles saudáveis, a fim de investigar se a redução na fagocitose e quimiotaxia observada em estudo anterior (Amoras, 2001; Amoras et al., 2003) foi atribuída à alteração no número desses receptores.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Planejamento experimental

3.1.1- Seleção de pacientes e controles

3.1.1.1- Grupo de pacientes

Foi quantificada a expressão dos receptores Fcγ e complemento em monócitos do sangue periférico de 10 pacientes com ALX e 12 com ICV regularmente matriculados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), setor de Imunologia-Alergia, em comparação com 18 voluntários saudáveis não pareados por sexo e idade com os pacientes.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Consentimento informado foi obtido de todos os pacientes e controles normais.

O diagnóstico de ICV foi feito de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (Who, 1999). O diagnóstico de ALX foi baseado na redução da expressão da proteína Btk nos monócitos, redução significativa dos níveis séricos de todas as classes de imunoglobulinas, e do número de células B circulantes ($CD19^+ < 2\%$). Durante o estudo, todos os pacientes faziam terapia de reposição com gamaglobulina endovenosa (GGEV). As amostras de sangue foram coletadas até 1 semana antes da administração de GGEV. Não houve evidência de manifestações autoimunes, granulomatosas, ou câncer em nenhum paciente. Durante a coleta de sangue para investigação dos receptores, nenhum dos indivíduos apresentava infecção aguda.

Foram usados anticorpos monoclonais, para avaliação da expressão dos receptores para a região constante de IgG, FCγRI (CD64), FCγRII (CD32), FCγRIII (CD16), e para as frações do complemento C3b e C3bi, CR1 (CD35) e CR3 (CD11b/CD18) em monócitos, para estudo da quimiotaxia e fagocitose.

Os procedimentos realizados neste trabalho não acarretaram nenhum risco aos pacientes e as informações sobre a identidade dos pacientes foram mantidas em sigilo, com observação de todos os princípios constantes da Declaração de Helsinki, formulada em Veneza, 1983.

3.1.1.2- Grupo controle

Como controles para quantificação da expressão dos receptores de superfície para Fcy e RC foram utilizados sangue de 18 voluntários sadios não pareados por sexo e idade com os pacientes.

Foi feito anamnese para seleção de voluntários sadios, sendo excluído indivíduos em vigência de infecção, uso de medicamentos ou transfusão de sangue ou derivados nos últimos 30 dias.

3.2- Procedimento experimental

3.2.1- Coleta de amostras de sangue

Amostras de sangue venoso dos pacientes e dos controles sadios foram coletadas por meio de punção venosa periférica e imediatamente armazenado em tubos de polipropileno estéril contendo ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) (1,5mg EDTA/1ml sangue) como anticoagulante, para detecção dos antígenos de superfície.

3.3- Métodos laboratoriais do protocolo de pesquisa

3.3.1- Separação celular e análise da expressão do Btk em monócitos por citometria de fluxo

A expressão do Btk foi avaliada para confirmar o diagnóstico de ALX. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram separadas do sangue venoso heparinizado através de gradiente de Ficoll-Hypaque. As PBMC foram lavadas três vezes em solução salina tamponada por fosfato (PBS) pH 7,4 e incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD14 marcado com Ficoeritrina (PE) (IgG2a;Dako, Japan) por 20 minutos em gelo, para discriminar monócitos de outras células. Os monócitos foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS por 15 min em temperatura ambiente, e permeabilizados com Triton 0,1% X-100 em solução salina tri-tamponada pH 7,4, com 1mg/ml de soro bovino albuminado por 5 min. Essas células foram incubadas com 2µg/ml do anticorpo monoclonal anti-BTK (48–2H) ou controle IgG1 (Dako, Japan) por 20 minutos no gelo, em seguida foram novamente lavadas e incubadas com uma diluição 1:2000 do anticorpo anti mouse IgG1 incubados com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) por 20 minutos no gelo. As células coradas foram analisadas pelo citometro de fluxo de duas cores (EPICS XL-MCL®; Coulter Corp., Hialeah, FL, USA) (Futatani et al., 1998).

3.3.2- Análise da expressão dos receptores Fcγ e complemento em monócitos por citometria de fluxo

O fenótipo dos monócitos foi realizado por análise das amostras de sangue total por citometria de fluxo, com demarcação seletivo nas células CD14-positivas. Foi avaliada a expressão de superfície dos receptores Fcγ RI (CD64), RII (CD32) e RIII (CD16), receptores de complemento CR1 (CD35) e CR3 (CD11b/CD18).

3.3.3- Descrição do ensaio

Para análise dos receptores de complemento, foi primeiramente incubado 100µl de sangue total por tubo com 20µl de IgG humana por 5 minutos e após corado com os seguintes fluorocromos conjugados com anticorpos monoclonais: 5µl de anti-CD14 PerCy5, 20µl de anti-CD 18 PE, 20µl de anti-CD35 FITC e 10µl de anti-CD11b FITC.

Para análise dos receptores Fc, foi incubado diretamente 100µl de sangue total por tubo com os seguintes fluorocromos conjugados com anticorpos monoclonais: 5µl de anti-CD14 PerCy5, 10µl de anti-CD64 PE, 10µl de anti-CD32 FITC, 10µl de anti-CD16 FITC.

Foi também incubado 100µl de sangue total e corado com 5µl de isotipo controle diretamente conjugado para FITC, PE e PECy5. Os controles isotípicos apropriados foram usados para definir populações celulares positivas e negativas.

Após 20 minutos de incubação em gelo, as células vermelhas foram lisadas (Optlyse C[®], Coulter) nos tubos contendo sangue total para análise dos receptores de complemento, Fcy e isotipo controle. Subsequentemente, as células foram lavadas duas vezes em PBS com soro bovino fetal 1% e azida sódica 0,1% e fixadas em paraformaldeído 1%. Todos os controles isotípicos (FITC/PE) e fluorocromo conjugado com mAbs (FITC/PE/PerCy5) foram obtidos da Immunotech (Marseille, France).

O fenótipo dos monócitos foi determinado por citometria de fluxo de amostras de sangue total, com demarcação das células CD14 positivas. Durante a análise por citometria de fluxo, foi detectado autofluorescência de monócitos em FL1, sem diferenças entre ALX, ICV e amostras controles.

As posições do citometro foram ajustadas com o objetivo de manter os monócitos não corados ou corados com isotipo controle na primeira década da escala logarítmica para cada canal de fluorescência. Como as posições foram

estabelecidas, mantivemos o mesmo para todas as amostras do estudo (pacientes e controles).

A fração de células marcadas positivamente foi determinada através da comparação com o seu isotipo controle. O número de receptor por célula [(Mediana da intensidade de fluorescência (MIF))] foi mensurado para cada amostra, junto com a porcentagem dos eventos positivos para cada marcador.

A expressão dos receptores foi mensurada através da determinação da proporção de monócitos CD14+ para cada receptor acima, e pela densidade de receptores, que foi determinada pelo cálculo da intensidade de fluorescência relativa (IFR), que foi obtido pela divisão da mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de cada população celular positiva pela MIF do isotipo controle não marcado.

Os dados foram adquiridos no citometro de fluxo Coulter Epics XL[®]. Pelo menos 5×10^3 de eventos CD14+ foram obtidos para cada amostra.

3.3.4- Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa SPSS versão 7.5.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os dados foram expressos em medianas e extremos.

A significância estatística das diferenças entre o grupo de pacientes e controle normal foi realizada pelo teste de Mann-Whitney (nível de significância, $p < 0,05$).

4- RESULTADOS

4.1- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes

Todos os 10 pacientes com ALX eram do sexo masculino, com idades variando entre 2,6 e 28,3 anos (mediana, 19,6). O grupo com ICV tinha oito pacientes do sexo feminino e quatro masculino, com idade variando entre 10,6 e 57,9 anos (mediana, 38,3). A idade dos 18 controles variou entre 22 e 58 anos (mediana, 29), e 11 eram do sexo masculino.

As principais características clínicas e imunológicas dos pacientes estão relatadas nas Tabelas 1 e 2 (Amoras, 2001).

Tabela 1- Características clínicas e laboratoriais de pacientes com agamaglobulinemia ligada ao X

Paciente	Idade em anos no diagnóstico	IgM Sérica mg/dL*	IgG Sérica mg/dL*	IgA Sérica mg/dL*	células B CD19%
EOB	6	15	109	7	0,0
AHO	14	15	203	53,9	0,04
AAAJ	7	10	240	0,6	0,0
RCJ	8	3,4	54	0,0	0,19
RJF	2	2	22	2	0,0
AJAV	10	0,0	150	20	0,0
FFL	6	0,0	0,0	3,0	0,04
MHPF	1	18	198	0,0	0,09
MD	4	26,8	86,2	<23,4	0,0
DSM	4	182	<30	0,0	1,0

*Níveis séricos de imunoglobulinas na idade do diagnóstico

Tabela 2- Características clínicas e laboratoriais de pacientes com imunodeficiência comum variável

Paciente	sexo	Idade em anos ao diagnóstico	IgM Sérica mg/dL*	IgG Sérica mg/dL*	IgA Sérica mg/dL*	Células B CD19+
VAM	F	17	8,3	256	8,2	10,45
FJO	M	13	1,8	100	0,0	11,93
JMC	M	27	2,0	85	0,0	18,0
AFB	F	22	10	566	< 6,0	16,7
MRC	F	16	14	797	< 6,0	3,6
RSB	F	19	10	400	0,0	10,1
LMD	F	26	11,6	477	< 6,6	20
VDC	F	32	24	284	<22	10,8
JDC	M	23	14,4	817	< 6,6	22,9
APM	F	14	16	722	< 25	7,74
CDFM	M	12	9,2	536	<6,0	9,3
RLGF	F	5	13	428	<6,0	13

*Níveis séricos das imunoglobulinas na idade do diagnóstico

4.2- Expressão dos receptores de superfície Fcy e Complemento em monócitos de pacientes com ICV e ALX

A porcentagem de monócitos foi similar para pacientes com ALX, ICV e controles saudáveis.

Pacientes com ALX comparados com controles normais, demonstraram aumento na porcentagem dos receptores CD16⁺ (mediana: 11,9% vs 6%, $p=0,002$), CD35⁺ (mediana: 95,7% vs 84,2%, $p=0,007$) e CD11b (mediana: 100% vs 99,8, $p=0,001$). Entretanto, sem demonstrar diferença significativa entre os pacientes com ALX e controles ou pacientes com ALX e pacientes com ICV em relação à densidade dos receptores que são mensurados através da intensidade de fluorescência relativa (IFR).

Comparando pacientes com ALX e ICV, observamos uma porcentagem aumentada do receptor CD11b monócitos CD14+ em pacientes com ALX em relação ao pacientes com ICV (mediana 100% vs 99,8%, $p=0,008$, respectivamente). Entretanto, não houve diferença significativa nas intensidades relativas de fluorescência entre os dois grupos.

Pacientes com ICV comparados com controles normais não demonstraram diferenças na porcentagem de monócitos expressando receptores Fcγ e de complemento. Entretanto, demonstraram redução na densidade do receptor para CD16 (mediana: IFR 9 vs 14,42, $p=0,03$) e CD32 (mediana: IFR 38,5 vs 67,8, $p=0,001$).

Observamos expressão similar dos receptores de complemento entre doadores, ALX e ICV para os receptores CD35 (mediana IFR 11,0; 10,5 e 8,0); CD18 (mediana IFR 26,0; 31,3 e 21,0) e CD11b (mediana IFR 26,5; 32,1 e 24,2), e também para o receptor FcγRI-CD64 (mediana IFR 106,5; 99,4 e 110,3).

Os resultados descritos acima estão resumidos nas Tabelas 3 e 4 e Figuras 4 e 5.

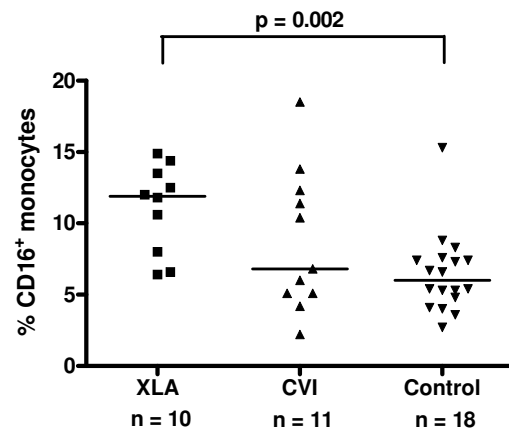
Tabela 3- Porcentagem de monócitos com expressão dos receptores Fcy e complemento de pacientes com ICV e ALX comparado com controle normal. Resultados dados em mediana e extremos

Paciente	CD64 (FcyRI)	CD32 (FCyRII)	CD16 (FCYRIII)	CD35 (CR1)	CD11b (CR3)	CD18 (CR3)
XLA	100 (100-100)	100 (99,8-100)	11,9 (6,4-14,9)	95,7 (62,1-98,6)	100 (99,6-100)	100 (94,8-100)
CVI	100 (99,9-100)	100 (97,9-100)	6,8 (2,2-18,5)	91,6 (67,5-99,5)	99,7 (99,4-99,9)	99,4 (74,9-99,8)
Controle (C)	100 (92,4-100)	100 (99,7-100)	6,0 (2,7-15,3)	84,2 (61,8-93,8)	99,8 (99,0-100)	99,9 (94,6-100)
p-valor XLA x C	0,232	0,265	0,002	0,007	0,001	0,193
p-valor CVI x C	0,331	0,917	0,363	0,695	0,820	0,219
p-valor XLA x CVI	0,758	0,381	0,132	0,131	0,008	0,702

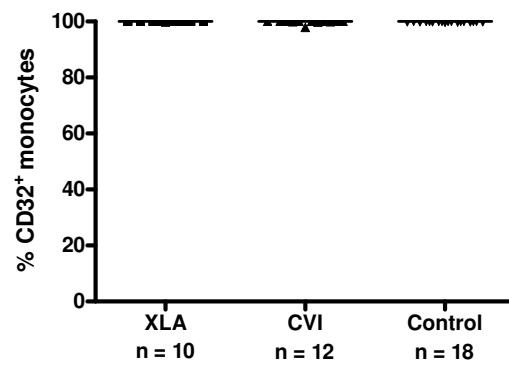
Tabela 4- Intensidade de fluorescência relativa (IFR) da expressão dos receptores Fcy e complemento em monócitos de pacientes com ALX e ICV comparados com controles normais. A IFR é obtida pela divisão da mediana da intensidade de fluorescência da amostra (MIF) pela mediana da amostra negativa marcada com isotipo controle.

Paciente	CD64 (FcγRI)	CD32 (FcγRII)	CD16 (FcγRIII)	CD35 (CR1)	CD11b (CR3)	CD18 (CR3)
XLA	99,4 (46,8-426)	66,7 (14,2-174,3)	9,0 (3,8-50)	10,5 (5,0-59,0)	32,1 (13,0-165)	31,3 (5,2-103)
CVI	110,3 (55,7-211)	38,5 (19,7-89,6)	9,0 (2,5-17)	8,0 (3,6-13,6)	24,2 (15,4-45)	21,0 (12-51,3)
Controle (C)	106,5 (57,0-202)	67,7 (33-215)	14,4 (4,6-43)	11,0 (5,3-28)	26,5 (10,6-95)	26,0 (11,5-87)
p-valor** XLAxC	0,738	0,832	0,494	0,702	0,738	0,862
p-valor** CVIxC	0,649	0,001	0,035	0,134	0,569	0,198
p-valor** XLAxCVI	0,918	0,080	0,314	0,175	0,918	0,310

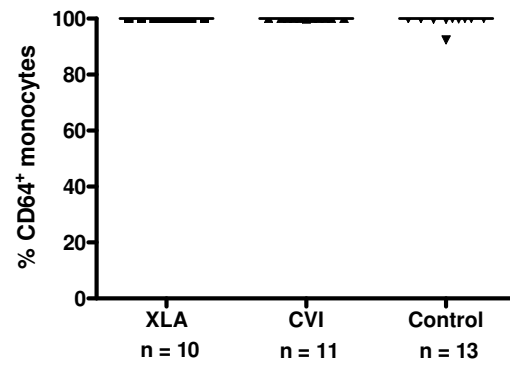
1A



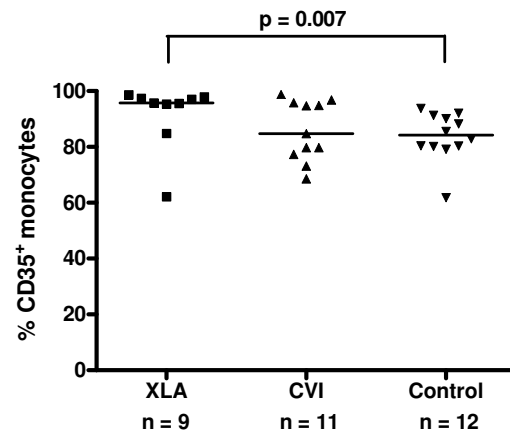
1B



1C



1D



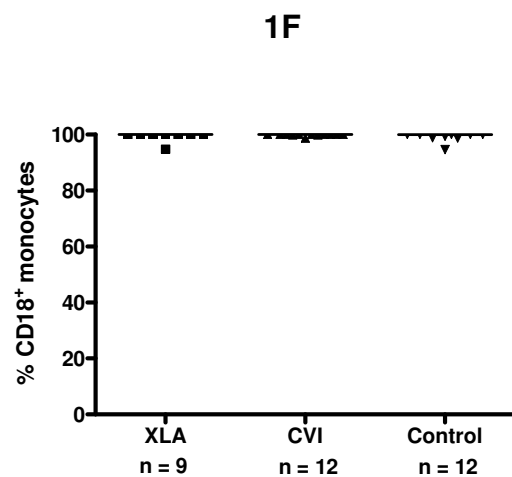
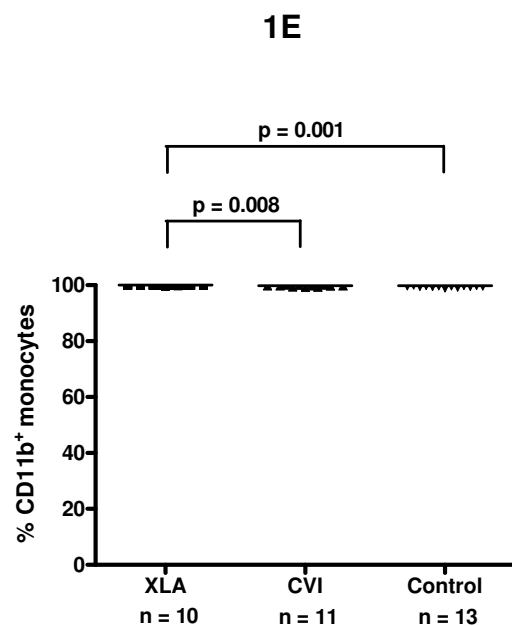
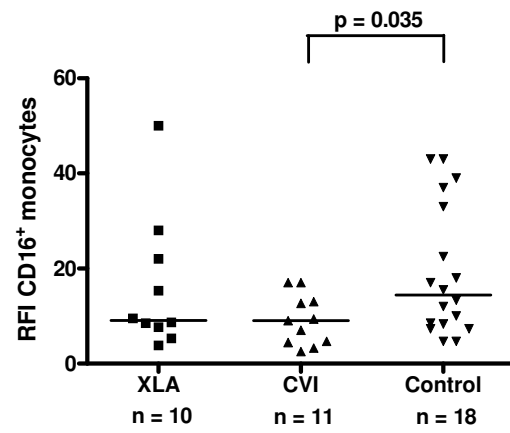
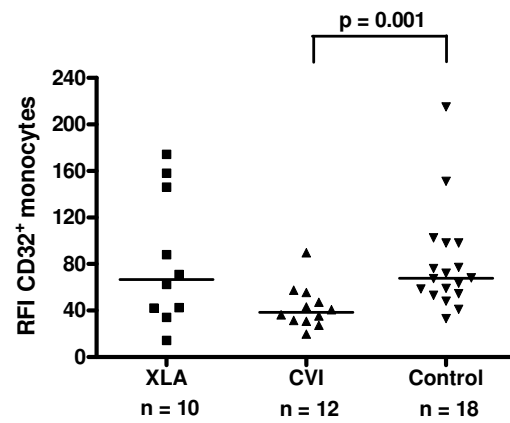


Figura 4- Comparação da expressão dos receptores $Fc\gamma$ (1A, 1B, 1C) e de complemento (1D, 1E, 1F), mensurados através das porcentagens de monócitos positivos, entre pacientes com ALX, ICV e controles normais.

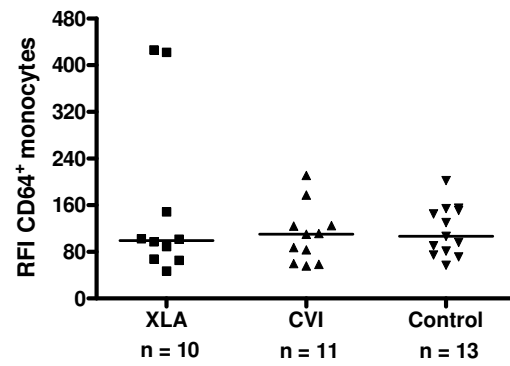
2A



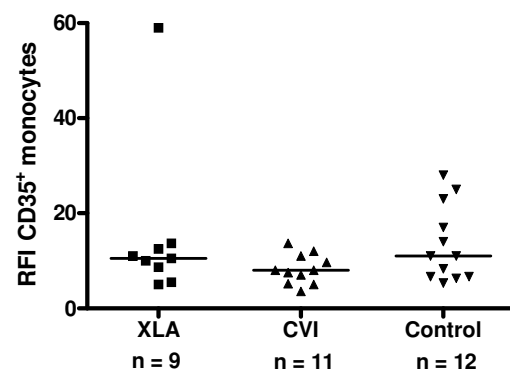
2B



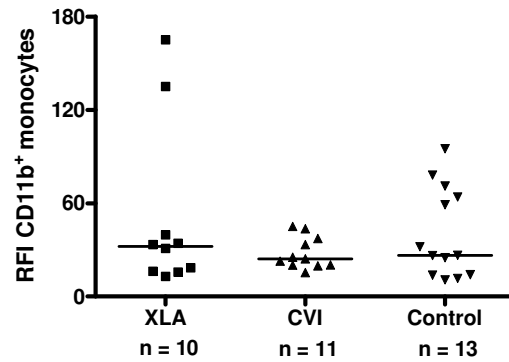
2C



2D



2E



2F

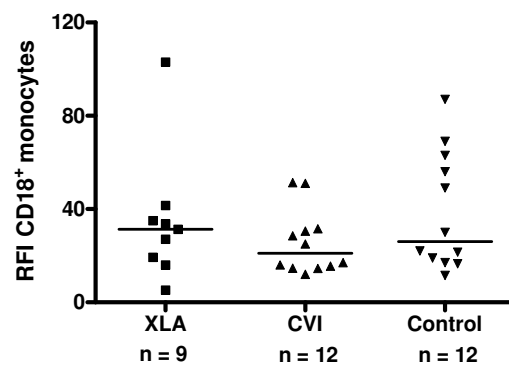


Figura 5- Comparação da expressão dos receptores $Fc\gamma$ (2A, 2B, 2C) e de complemento (2D, 2E, 2F), mensurados através da intensidade de fluorescência relativa, entre pacientes com ALX, ICV e controles normais.

5- DISCUSSÃO

Apesar de extensivas pesquisas realizadas, permanece pobremente entendida a complexidade da regulação e interação entre a imunidade inata e adaptativa. Sugere-se que a resposta imune adaptativa seja controlada pela imunidade inata, e vice-versa (Fearon & Locksley, 1996, Schnare et al., 2001, Kim et al., 2007).

A fagocitose é uma forma especial de endocitose realizada por monócitos/macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Constitui uma importante função efetora que envolve além dos receptores Fc para IgG, IgE e IgA uma variedade de outros receptores como as integrinas CR1 e CR3 e receptores de carboidratos, como os de manose ou o β -glucan (Moura, Verheul & Marx, 1997; Abdollahi-Roodsaz et al., 2007; NimmerJahn & Ravetch, 2008; Köprülü & Ellmeier, 2009).

A família Tec kinase (Bmx, Btk, Itk, Rlk e Tec) é um grupo de moléculas sinalizadoras estimuladas durante a ativação dos macrófagos. Entretanto, muito pouco se sabe sobre a função da família Tec quinase na linhagem de células mielóides (Köprülü & Ellmeier, 2009) e o mecanismo molecular através do qual os Fc γ Rs desencadeiam a ingestão das partículas opsonizadas também permanece incompletamente compreendido. Entretanto, estudos anteriores indicam que a sinalização via receptor Fc γ compartilham elementos com receptores antigênicos das células T e B.

A função da família Tec quinase no processo fagocítico, foi inicialmente sugerido por Amoras et al., 2003, que estudando monócitos de pacientes com ALX e ICV, observaram redução na quimiotaxia e fagocitose de monócitos em indivíduos com ALX, e sugeriram que esses achados poderiam ser devido a defeitos dos mecanismos de transdução citoplasmática mediada pela Btk ou redução da expressão dos receptores Fc γ e complemento na superfície dos monócitos. Nesse contexto, Jongstra-Bilen et al., 2008, estudaram em células da linhagem RAW 264.7 de macrófagos peritoneais murinos, a função detalhada da Tec e Btk durante a fagocitose mediada por Fc γ Rs, e sugeriu que a família Tec quinase participa durante a fase inicial de ingestão, ativando a Mac-1 e após a formação do fagossoma, quando Btk e Tec tem funções distintas.

Os pacientes com ALX demonstraram um aumento significativo das porcentagens dos receptores $CD14^+CD16^+$ e $CD14^+CD35^+$ em relação aos controles (Figura 4). Entretanto, a densidade do receptor na membrana destas células foi similar entre os grupos (Figura 5). Embora não tenhamos realizado coloração simultânea com $CD16$ $CD14$ $CD64$, observamos que virtualmente 100% dos monócitos $CD14^+$ são também $CD64^+$, motivo pelo qual é razoável assumir que monócitos $CD16^+$ em amostras de sangue de nossos pacientes são também $CD14^+CD64^+$.

Em humanos, monócitos “clássicos” $CD14^{high}CD16^{low}$ expressam CCR2, $CD64$ ($Fc\gamma RI$) e $CD62L$ (L-selectina), enquanto que os monócitos “não clássicos” $CD14^{low}CD16^{high}$ não expressam CCR2 e apresentam altos níveis de MHC-II e $Fc\gamma RII$ ($CD32$) (Tacke & Randolph, 2006). A molécula de adesão leucocitária $CD62L$, media o rolamento e interação com o endotélio e o CCR2 (Tacke & Randolph, 2006).

Entretanto, um terceiro subgrupo tem sido descrito como $CD14^+CD64^+CD16^+$, combinando características de células dendríticas típicas (elevada produção de IL-12 e expressão de HLA-DR) e monócitos (morfologia monocítica e elevada atividade fagocítica) (Grage-Griebenow, Flad & Ernst, 2001; Gordon & Taylor, 2005).

A demonstração em nosso estudo de que pacientes com ALX apresentam aumento da expressão de receptor Fc de baixa afinidade ($CD16$), os quais mediam fagocitose e citotoxicidade dependentes de anticorpos (ADCC), abre a discussão da atividade funcional da terapia de reposição de imunoglobulina na eficiência da fagocitose e ADCC através dos monócitos com deficiência da Btk.

Podemos também reforçar achados anteriores de que a deficiência da Btk não está envolvida na diferenciação e maturação de células dendríticas (Gagliardi et al., 2003), através da demonstração de número normal ou aumentado dos receptores $CD14^+CD16^+$ e $CD14^+CD35^+$ em pacientes com XLA.

Por outro lado, observamos que a quimiotaxia e fagocitose de monócitos estavam reduzidos em pacientes com XLA (Amoras, 2001; Amoras et al., 2003), sugerindo que esses achados podem ser devidos a defeitos nos mecanismos de transdução citoplasmática mediada pela Btk.

A demonstração da porcentagem normal ou aumentada em monócitos do receptor CD35 em pacientes com ALX, não foi relatado anteriormente. A integridade da expressão do CD35 pode ser importante para evitar aumento na incidência de doenças por complexos imunes em pacientes com ALX.

A ativação dos mastócitos através dos receptores Fc da IgE parece ser dependente da funcionalidade da Btk (Hata, Kawakami & Inagaki, 1998; Kawakami, Kitaura & Satterthwaite, 2000; Setoguchi et al., 1998). Algumas respostas plaquetárias (Quek, Bolen & Watson, 1998; Tibbles, Vassilev & Uckun, 2002; Mukhopadhyay et al., 1999; Mukhopadhyay et al., 1999; Mukhopadhyay et al., 2002), funções de macrófagos (Horwood, Mahon & McDaid, 2003; Jefferies, Doyle & Brunner, 2003) e algumas respostas dos granulócitos polimorfonucleares neutrófilos (Lachance, Levasseur & Naccache, 2002; Gilbert, Levasseur & Desaulniers, 2003; Kanegane et al., 2005) estão comprometidas na ausência da Btk funcional.

Foi também demonstrado em pacientes portadores de ALX, envolvimento da Btk na transdução do sinal dos receptores toll like induzida por lipopolissacárides resultando redução na produção de TNF- α (Horwood et al., 2003; Brunner, Muller & Wirth, 2005) e redução no recrutamento dos neutrófilos (Kanegane et al., 2005) e em ratos XID (Mangla, et al 2004).

Gagliardi et al., 2003, não observaram evidências de influência da Btk na diferenciação, produção de citocinas, maturação e apresentação de antígeno em células dendríticas.

Taneichi et al., 2008, sugerem que a Btk pode ser necessária para a sinalização via receptor toll-like nas células dendríticas e que falha na sinalização desses receptores pode ser parcialmente responsável pela ocorrência de

infecções graves bacterianas e virais. Porém, mais estudos serão necessários para elucidar a função da Btk nestas células.

Todos os receptores Fcy e de complemento induzem rearranjo no citoesqueleto de actina, levando a internalização de partículas (Aderem & Underhill, 1999). A Btk pode induzir remodelamento do citoesqueleto em células estimuladas sugerindo novamente que a regulação do citoesqueleto mediada pela Btk pode ter relevância fisiológica para a quimiotaxia e fagocitose (Nore et al., 2000; Inabe et al., 2002).

Embora as funções dos monócitos na ALX permaneçam desconhecidas, esses dados em conjunto sugerem que a proteína Btk em monócitos pode ter alguma função na resposta imune (Kanegane et al., 2005, Perez de Diego et al., 2006).

Além dos diversos fenótipos da ALX, existem diferenças nos mecanismos moleculares que induzem fagocitose (Aderem & Underhill, 1999). A ativação da tirosina quinase tem sido reconhecida em uma etapa precoce (Hackam et al., 1997), porém a função individual das quinases na sinalização da fagocitose ainda precisa ser determinada (Suzuki et al., 2000).

Dada a estrutura multimodular da proteína Btk e a multitude das moléculas de sinalização que com ela podem interagir, é esperado que esta quinase desencadeie múltiplas vias de sinalização e gerem efeitos pleiotrópicos. As vias de sinalização envolvendo os receptores Fc, GPCR, toll-like, de morte celular, RTK e citocinas ainda não são completamente elucidadas.

Sugerimos através desses dados que a Btk não está envolvida na expressão desses receptores e que a terapia de reposição de imunoglobulina pode assegurar a função fagocítica eficiente em monócito. Porém, a participação de Btk na via de transdução do sinal do processo fagocítico precisa ser investigada. Possivelmente, diferentes tipos de enzimas e fosforilação de proteínas possam estar envolvidas, especialmente quando diferentes receptores desencadeiam o processo.

Em nosso estudo, não podemos estabelecer uma diferença significativa da intensidade de fluorescência relativa (IFR) na expressão dos receptores CD64, CD35, CD18 e CD11b entre os três grupos. Entretanto, em contraste com a ALX, os pacientes com ICV mostraram uma redução significativa da IFR de monócitos expressando os receptores FcγRIII (CD16) e FcγRII (CD32) em relação aos controles saudáveis.

A expressão dos receptores CD64, CD32 e CD16 está diretamente relacionada ao seu estado de ativação (Heijnen & Van de Winkel, 1997). Níveis reduzidos da expressão do CD16 na superfície celular após estimulação ocorrem devido a internalização do receptor e liberação do receptor solúvel da superfície celular (Heijnen & van de Winkel, 1997).

Em contraste com nossos resultados, foi relatado previamente um aumento na expressão dos monócitos CD14⁺CD16⁺ de pacientes com ICV, um fenômeno que pode ser relacionado à terapia de reposição de imunoglobulina nesses pacientes (Dunne, Feighery & Whelan, 1996).

Em nosso estudo, todos os pacientes estavam sob terapia de reposição mensal de gamaglobulina endovenosa, porém as amostras de sangue foram coletadas imediatamente ou no dia anterior a infusão da gamaglobulina, o que reduz a possibilidade de interferência da gamaglobulina em nossos resultados.

Eibl et al., 1982 demonstraram falhas dos macrófagos teciduais no processamento e apresentação do antígeno em pacientes com ICV que podem estar associadas a alterações de resposta imune celular e humoral, demonstrando dessa forma que o sistema fagocitário mononuclear funciona como elo entre a resposta imune inata e adaptativa.

A função apresentadora de antígenos das células dendríticas tem sido relatada como normal na ICV (Thon et al., 1997; Fischer et al., 1994). Entretanto, foi observada alteração na diferenciação e maturação de subgrupos de células

dendríticas mielóides no sangue periférico desses pacientes (Viallard et al., 2005) com redução na expressão das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e HLA-DR (Bayry et al 2005; Cambronero et al, 2000; Braig et al, 2003; Viallard et al., 2005).

Os processos são complexos com feedback positivo e negativo entre as células, incluindo a regulação das moléculas sinalizadoras de superfície (Gollob et al., 1996) e a produção de citocinas. Evidências de desregulação nas interações entre células T e monócitos envolvendo IL-12 e IFN- γ em pacientes com ICV tem sido descrito (Cambronero et al, 2000). Dados recentes sugerem uma função crítica para as células dendríticas na geração de plasmócitos secretores de imunoglobulinas (Viallard et al 2005) e seu envolvimento na origem de alguns grupos de ICV.

Yu et al., 2009 observaram defeitos na sinalização dos TLR7 e TLR9 de células B e células dendríticas de pacientes com ICV, prejudicando a função das células B nesses pacientes.

Os resultados do presente estudo oferecem importantes descobertas sobre estes dados, promovendo evidência de que a fagocitose alterada nos pacientes com ICV pode ocorrer devido à redução desses receptores, os quais possuem função crítica na interação entre imunocomplexos e receptores Fc γ de monócitos/macrófagos (Hepburn, Mason & Davies, 2004).

Embora as porcentagens de monócitos CD11b⁺ (CR3) tenham sido significativamente diferentes entre ALX, ICV e o grupo controle, consideramos este fato sem significância fisiológica, devido aos valores serem muito similares, todos próximos a 100%. Todos os grupos mostraram similar porcentagem do receptor CD18⁺CD14⁺ e da sua expressão, mensurada através da intensidade de fluorescência relativa de integrinas. As integrinas são outro grupo de proteínas presentes na membrana celular que mediam algumas funções fisiológicas dos fagócitos na inflamação (Ugarova & Yacubenco, 2001; Hespanhol & Mantovani, 2002).

Tomados em conjunto, os resultados relatados acima, mostram um padrão geral de normalidade dos receptores Fc e de complemento, confirmando as observações clínicas de que pacientes com ALX e ICV se beneficiam com a terapia de reposição com gamaglobulina por via endovenosa.

6- CONCLUSÕES

- o presente estudo oferece importante insight das sub populações de monócitos;
- os pacientes com ALX, os quais têm redução da Btk, apresentaram porcentagem normal ou aumentada de monócitos expressando receptores Fcy e de complemento. Esses achados dão suporte à hipótese de que a fagocitose ineficientes, previamente relatadas em pacientes com ALX, pode resultar de defeitos nos mecanismos de transdução intracitoplasmática mediados por Btk;
- a expressão reduzida de CD16+ e CD32+ nos monócitos de pacientes com ICV, que possuem Btk normal, sugere fortemente que a expressão dos receptores é independente de Btk e que alteração dos receptores vistas nesse pacientes pode ser responsável pela deficiência na função fagocitária dos monócitos na ICV.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aderem AA, Wright SD, Silverstein SC, Cohn ZA. Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resistant peritoneal macrophages. *J Exp Med*. 1985;161:617-622.

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*. 1999;17:593-623.

Agarwal S, Cunningham-Rundles C. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Resp*. 2009;9(5):347-352.

Aghamohammadi A, Cheraghi T, Rezaei N, Kanegane H, Abdollahzede S, Talaei-Khoei M et al. Neutropenia associated with X-linked Agammaglobulinemia in an Iranian referral center. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2009;8(1):43-47.

Allen LAH, Aderem A. A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J Exp Med*. 1995; 182:829-840.

Allen LAH, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol*. 1996;8:36-40.

Anderson P, Caligiuri M, O'Brien C, Manley T, Ritz J, Schlossman SF. Fc gamma receptor type III (CD16) is included in the zeta NK receptor complex expressed by human natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:2274-2278.

Amoras AL. Caracterização Clínica e Imunológica de Pacientes com Imunodeficiência Comum Variável [Dissertação-Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual Campinas; 2001.

Amoras AL, Kanegane H, Miyawaki T, Vilela MM. Defective Fc-CR1 and CR3-mediated monocyte phagocytosis and chemotaxis in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia patients. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2003;13:181-188.

Amoras AL, Silva MTN, Zollner RL, Kanegane H, Miyawaki T, Vilela MMS. Expression of Fcγ and complement receptors in monocytes of X-linked agammaglobulinaemia and common variable immunodeficiency patients. *Clin Exp Immunol*. 2007;150:422-428.

Araki N, Johnson MT, Swanson JA. A role for phosphoinositide 3 kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol*. 1996;135:1249-1260.

Aspalter RM, Sewell WAC, Dolman K, Farrant J, Webster ADB. Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol*. 2000;121: 506-514.

Aukrust P, Müller F, Froland SS. Enhanced generation of reactive oxygen species in monocytes from patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 1994;97:232-238.

Aukrust P, Lien E, Kristoffersen AK, Müller F, Haug CJ, Espevik T et al. Persistent activation of the tumor necrosis factor system in a subgroup of patients with common variable immunodeficiency-possible immunologic and clinical consequences. *Blood*. 1996;87:674-681.

Bajpai UD, Zhang K, Teutsch M, Sen R, Wortis HH. Bruton's tyrosine kinase links the B cell receptor to nuclear factor kappaB activation. *J Exp Med*. 2000; 191:1735-1744.

Bayry J, Hermine O, Webster DA, Levy Y, Kaveri SV. Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. *TRENDS in molecular medicine*. 2005;11(8):370-76.

Bates CA, Ellison MC, Lynch DA, Cool CD, Brown KK, Routes JM. Granulomatous -lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;14:415-421.

Braig DU, Schäffer AA, Glocker E, Salzer U, Warnatz K et al. Linkage of autosomal dominant common variable immunodeficiency to chromosome 5p and evidence for locus heterogeneity. *Hum Genet.* 2003;112:369-378.

Brown EJ. Complement receptors and phagocytosis. *Curr Opin Immunol.* 1991;3: 76-82.

Brunner C, Müller B, Wirth T. Bruton's tyrosine kinase is involved in innate and adaptive immunity. *Histol Histopathol.* 2005;20:945-55.

Bussone G, Mouthon L. Autoimmune manifestations in primary immune deficiencies. *Autoimmun Rev.* 2009;8(4):332-336.

Cambroner O, Sewell WA, North ME, Webster AD, Farrant J. Up-regulation of IL-12 in monocytes: a fundamental defect in common variable immunodeficiency. *J Immunol.* 2000;164:488-494.

Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Raschid R, Bonilla F, Schneider L et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat. Genet.* 2005;37:829-834.

Chapel H, Lucas M, Lee M. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood.* 2008;112(2):277-286.

Chua I, Quinti I, Grimbacher B. Lymphoma in common variable immunodeficiency: interplay between immune dysregulation, infection and genetics. *Curr Opin Hematol.* 2008;15(4):368-374.

Clarkson SB, Ory PA. CD16. Developmentally regulated IgG Fc receptors on cultured human monocytes. *J Exp Med.* 1988;167:531-7.

Conley ME, Rohrer J, Minegishi Y. X-linked agammaglobulinemia. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2000;19:183-204.

Conley MH, Broides A, Trujillo VH, Howard V, Kanegane HZ, Miyawaki T et al. Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development. *Immunological reviews*. 2005;203:216-231.

Cunningham-Rundles C. Hematologic complications of primary immune deficiencies. *Blood Rev*. 2002;16:61-64.

Cunningham-Rundles C, Ponda PP. Molecular defects in T-and B-cell primary immunodeficiency diseases. *Nature*. 2005;5:880-892.

Cunningham-Rundles C. Autoimmune manifestations in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2008;28(1):S42–S45.

Daniels JA, Lederman HM, Maitra A, Montgomery EA. Gastrointestinal tract pathology in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a clinicopathologic study and review. *Am J Surg Pathol*. 2007; 31(12):1800-1812.

De Weers M, Verschuren MC, Kraakman ME, Mensink RG, Schuurman RK, VAN Dongen JJ et al. The Bruton's tyrosine kinase gene is expressed throughout B cell differentiation, from early precursor B cell stages preceding immunoglobulin gene rearrangement up to mature B cell stages. *Eur J Immunol*. 1993;23:3109-3114.

Dunne J, Feighery C, Whelan A. Beta-2 microglobulin, neopterin and monocytes Fc gamma receptors in opportunistic infections of HIV-positive patients. *Br J Biomed Sci*. 1996;53:263-269.

Eibl MM, Mannhalter JW, Zielinski CC, Ahmad R. Defective Macrophage T-Cell Interaction in Common Varied Immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol*. 1982;22:316-322.

Eibl MM, Mannhalter JW, Zlabinger G, Mayr WR, Tilz GP, Ahmad R, Zielinski CC. Defective macrophage function in a patient with common variable immunodeficiency. *N Engl J Med*. 1982;307:803-806.

Eisenstein EM, Strober W. Evidence for a generalized signaling abnormality in B cells from patients with common variable immunodeficiency. *Adv Exp Med Biol.* 1995;371 B:699-704.

Etzioni A. Immune deficiency and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews.* 2003;2: 364-369.

Ezekowitz RA, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domain and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med.* 1990;172:1785-1794.

Farrant J, Bryant AE, Lever AML, Edwards AJ, Knight SC, Webster ADB. Defective low-density cells of dendritic morphology from the blood of patients with common variable hypogammaglobulinaemia: low immunoglobulin production on stimulation of normal B cells. *Clin Exp Immunol.* 1985;61:189-194.

Farrar JE, Rohrer J, Conley ME. Neutropenia in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996;81:271-276.

Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 1996;272:50-53.

Fischer MB, Hauber I, Wolf HM, Vogel E, Mannhalter JW, Eibl MM. Impaired TCR signal transduction, but normal antigen presentation, in a patient with common variable immunodeficiency. *Br J Haematol.* 1994;88(3):520-526.

Fluckiger AC, Li Z, Kato RM, Wahl MI, Ochs HD, Longnecker R et al. Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation. *EMBO J.* 1998;17:1973-1985.

Franco JL. Common variable immunodeficiency (CVID) due to a homozygous mutation in the CD19 gene. The XI Meeting of the European Society for Immunodeficiency. Versailles (Abstract # B 71), 2004.

Freedman BD. Mechanisms of Calcium Signaling and Function in Lymphocytes. *Immunology*. 2006;26(2):97-111.

Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kunikata T, Arai S. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from x-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood*. 1998;91:595-602.

Futatani T, Watanabe C, Baba Y, Tsukada S, Ochs HD. Bruton's tyrosine kinase is present in normal platelets and its absence identifies patients with X-linked agammaglobulinaemia and carrier females. *Br J Haematol*. 2001;114(1):141-9.

Gagliardi MC, Finocchi A, Orlandi P, Cursi L, Cancrini C, Moschese V et al. Bruton's tyrosine kinase defect in dendritic cells from X-linked agammaglobulinaemia patients does not influence their differentiation, maturation and antigen-presenting cell function. *Clin Exp Immunol*. 2003;133:115-122.

Garner RE, Rubanowice K, Sawyer RT, Hudson JA. Secretion of TNF-alpha by alveolar macrophages in response to *Candida albicans* mannan. *J Leuk Biol*. 1994;55:161-168.

Gaspar H.B, Conley ME. Early B cell defects. *Clin Exp Immunol*. 2000; 119: 383-389.

Gauld SB, Dal Porto JM, Cambier JC. B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and diseases. *Science*. 2002;296:1641-1642.

Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Ficher A et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(4):776-794.

Gilbert C, Levasseur S, Desaulniers P. Chemotactic factor-induced recruitment and activation of Tec family kinases in human neutrophils, II: effects of LFM-A13, a specific Btk inhibitor. *J Immunol*. 2003;170:5235-5243.

Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W. Interleukin 10: a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *Clin Exp Med*. 1990;172:1625-1631.

Gollob JA, Li J, Kawasaki H, Daley JF, Groves C, Reinherz EL et al. Molecular interaction between CD58 and CD2 counter-receptors mediates the ability of monocytes to augment T cell activation by IL-12. *J Immunol*. 1996; 157(5): 1886-1893.

Gompels MM, Hodges E, Lock RJ, Angus B, White H, Larkin A. Lymphoproliferative disease in antibody deficiency: a multicentre study. *Clin Exp Immunol*. 2003;134:314-320.

Gordon S, Taylor P. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:953-964.

Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 2001; 69:11-20.

Greenberg S, Chang P, Silverstein SC. Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Exp Med*. 1993;177:529-534.

Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol*. 2003;4:261-268.

Guo S, Wahl MI, Witte ON. Mutational analysis of the SH2-kinase linker region of Bruton's tyrosine kinase defines alternative modes of regulation for cytoplasmic tyrosine kinase families. *Int Immunol*. 2005;18:79-87.

Hackam DJ, Rotstein OD, Schreiber A, Zhang WJ, Grinstein S. Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fc gamma receptors in macrophages. *J Exp Med*. 1997;186(6):955-966.

Hairer N, Ohta Y, Lewis JE, Fu SM, Kroisel P, Litman GW. TXK, a novel human tyrosine kinase expressed in T cells shares sequence identity with Tec family kinase and maps to 4p12. *Hum Mol Genet.* 1994;3:897-901.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998;279:509-514.

Hagemann TI, Chen Y, Rosen FS, Kwan SP. Genomic organization of the Btk gene and exon scanning for mutations in patients with X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mol Genet.* 1994;3:1743-1749.

Hammarström L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 2000;120:225-31.

Hammarström L, Grimbacher B. Mutations in TNFRSF13B, which encodes TACI, are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet.* 2005;37:820-828.

Hammarström L, Smith CIE. Genetic approach to common variable immunodeficiency and IgA deficiency. In: *Primary Immunodeficiency Diseases*. 2nd Ed. A Molecular and Genetic Approach. *Ochs HD, Smith CIE, Puck JM* (Eds). Oxford University Press, New York, USA, 2007;313-325.

Hata D, Kawakami Y, Inagaki N. Involvement of Bruton's tyrosine kinase in Fc epsilon RI dependent mast cell degranulation and cytokine production. *J Exp Med.* 1998;187:1235-1247.

Heijnen IA FM, Van de Winkel JGJ. Human IgG Fc receptors. *Int Rev Immunol.* 1997;16:29-55.

Hermaszewski RA, Webster ADB. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med.* 1993;86:31-42.

Hespanhol MR, Mantovani B. *Braz J Méd Biol Res.* 2002;35(3):383-389.

Hepburn AL, Mason JC, Davies KA. Expression of Fcγ and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2004;43:547-554.

Horwood NJ, Mahon T, McDaid JP, Campbell J, Mano H, Brennan FM et al. Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor α production. *J Exp Med*. 2003;197:1603-1611.

Hu Q, Davidson D, Schwartzberg PL, Macchiarini F, Lenardo MJ, Bluestone JA et al. Identification of Rlk, a novel protein tyrosine kinase with predominant expression in the T cell lineage. *J Biol Chem*. 1995;270:1928-1934.

Inabe K, Ishiai M, Scharenberg AM, Freshney N, Downward J, Kurosaki T. Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. *J Exp Med*. 2002;195:189-200.

Indik ZK, Park JG, Pan XQ, Schreiber AD. Induction of phagocytosis by a protein tyrosine kinase. *Blood*. 1995;85(5):1175-1180.

Isolauri E, Peltö L, Nuutila J, Majamaa H, Lilius EM, Salminen S. Altered expression of IgG and complement receptors indicates a significant role of phagocytes in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99 (5):707-713.

IUIS Primary immunodeficiency diseases: an Update. Report of an IUIS Scientific Committee International Union of Immunological Societies. *Clin Exp Immunol*. 2003;132: 9-15.

Jefferies CA, Doyle S, Brunner C. Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappa B activation by Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2003;278:26258-26264.

Jones SL, Brown EJ. Functional cooperation between Fc γ receptors and complement receptors. In: Van de Winkel JGJ, Capel PJA. *Phagocytes in human IgG Fc receptors*. Austin, Texas, R.G. Landes Company, 1996;149-163.

Jongstra-Bilen J, Puig CA, Hasija M, Xiao H, Smith CI, Cybulsky MI. Dual functions of Bruton's tyrosine kinase and Tec kinase during Fc γ receptor-induced signaling and phagocytosis. *J Immunol*. 2008;181(1):288-98.

Jumaa H, Hendriks RW, Reth M. B cell signaling and tumorigenesis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:415-445.

Kalli KR, Aheam JM, Fearon DT. Interaction of iC3b with recombinant isotypic and chimeric forms of CR2. *J Immunol.* 1991;147:590-594.

Kanegane H, Taneichi H, Nomura K, Futatani T, Miyawaki T. Severe Neutropenia in Japanese Patients with X-Linked Agammaglobulinemia. *J Clin Immunol.* 2005;25:490-495.

Kawakami Y, Yao L, Miura T, Tsukada S, Witte ON, Kawakami T. Tyrosine phosphorylation and activation of Bruton tyrosine kinase upon Fc epsilon RI cross-linking. *Mol Cell Biol.* 1994;14:5108-5113.

Kawakami Y, Kitaura J, Satterthwaite AB. Redundant and opposing functions of two tyrosine kinases, Btk and Lyn, in mast cell activation. *J Immunol.* 2000;165:1210-1219.

Kersseboom R, Ta VBT, Zijlstra E, Middendorp S, Jumma H, Lobo PF et al. Bruton's Tyrosine Kinase and SLP-5 regulate pré-B cell differentiation and the induction of Ig light chain gene rearrangement. *J Immunol.* 2006;176:4543-4552.

KIM KD, ZHAO J, AUH S, Yang X, Du P. Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nat Med.* 2007;13:1248-1252.

Kondratenko I, Amlot PL, Webster AD, Farrant J. Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVI) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. MRC Immunodeficiency Group. *Clin Exp Immunol.* 1997;108:9-13.

Köprülü AD, Ellmeier W. The Role of Tec Family Kinases in Mononuclear Phagocytes. *Critical Reviews in Immunology.* 2009; 29(4):317-333.

Kumar A, Teuber SS, Gershwin ME. Current perspectives on primary immunodeficiency diseases. *Clin Dev Immunol.* 2006;13:223-259.

Lachance G, Levasseur S, Naccache PH. Chemotactic factor-induced recruitment and activation of Tec family kinases in human neutrophils: implication of phosphatidylinositol 3-kinases. *J Biol Chem*. 2002;277:21537-21541.

Larson RS, Springer TA. Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev*. 1990;114:181-217.

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.

Levy Y, Gupta N, Le Deist F, Garcia C, Fischer A, Weill JC et al. Defect in IgV gene somatic hypermutation in common variable immuno-deficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:13135-13140.

Lindvall JM, Blomberg KE, Väliaho J, Vargas L, Heinonen JE, Berglöf A et al. Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol Rev*. 2005; 203:200-215.

Lisa A, Humphries C, Sommer K, Kipp K, Kato RM, Griffith N et al. Tec Kinases Mediate Sustained Calcium Influx via Site-specific Tyrosine Phosphorylation of the Phospholipase C-Src Homology 2-Src Homology 3 Linker. *J Biol Chem*. 2004;279(36):37651-37661.

Lopes-da-Silva S, Rizzo LV. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2008;28(1),S46-S55.

Mangla A, Khare A, Vineeth V, Panday NN, Mukhopadhyay A, Ravindran B et al. Pleiotropic consequences of bruton tyrosine kinase deficiency in myeloid lineages lead to poor inflammatory responses. *Blood*. 2004;104(4):1191-1197.

Mano H, Ishikawa F, Nishida J, Hirai H, Takaku F. A novel protein-tyrosine kinase tec, is preferentially expressed in liver. *Oncogene*. 1990;5:1781-1786.

Mano H, Mano K, Tang B, Koehler M, Yi T, Gilbert DJ et al. Expression of a novel form of Tec kinase in hematopoietic cells and mapping of the gene to chromosome 5 near Kit. *Oncogene*. 1993;8:417-424.

Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med*. 1992;176:1497-1502.

Matsuda T, Takahashi-Tezuka M, Fukada T, Okuyama Y, Fujitani Y, Tsukada S et al. Association and activation of Btk and Tec tyrosine kinases by gp130, a signal transducer of the interleukin-6 family of cytokines. *Blood*. 1995;85:627-633.

Mechanic LJ, Dikman S, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Ann Intern Med*. 1997;127(8):613-617.

Mejorada GS, Rosales C. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol*. 1998;63:521-533.

Michel M, Chanet V, Galicier L, Ruivard M, Levy Y, Hermine O. Autoimmune thrombocytopenic purpura and common variable immunodeficiency: analysis of 21 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2003; 83:254-263.

Moallem HJ, Kalayci O, Homel P, Fikrig S, Chice S, Durkin H et al. Expression of Fcγ1 (CD64) on polymorphonuclear leucocytes during progression to acquired immunodeficiency syndrome in perinatally human immunodeficiency virus-infected children. *Scand J Immunol*. 2000;52:184-189.

Mohamed AJ, Nore BF, Christensson B, Smith CL. Signalling of Bruton's Tyrosine Kinase, BTK. *Scand J Immunol*, 1999;49:113-118.

Morimoto Y, Routes JM. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005;5(5):370-375.

Moura E, Verheul AFM, Marx JJM. Evaluation of the role of Fcγ and complement receptors in the decreased phagocytosis of hereditary haemochromatosis patients. *Scand J Immunol*. 1997;46:399-405.

Mukhopadhyay S, Sahoo PK, George A, Bal V, Rath S, Ravindran B. Delayed clearance of filarial infection and enhanced Th1 immunity due to modulation of macrophage APC functions in xid mice. *J Immunol*. 1999;163:875-883.

Mukhopadhyay S, George A, Bal V, Ravindran B, Rath S. Bruton's tyrosine kinase deficiency in macrophages inhibits nitric oxide generation leading to enhancement of IL-12 induction. *J Immunol.* 1999;163:1786-1792.

Mukhopadhyay S, Mohanty M, Mangla A. Macrophage effector functions controlled by Bruton's tyrosine kinase are more crucial than the cytokine balance of T cell responses for microfilarial clearance. *J Immunol.* 2002;168:2914-2921.

Mullighan CG, Marshall SE, Welsh KI. Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol.* 2000;51:111-122.

Nepomuceno RR, Henschen-Edman AH, Burgess WH, Tenner AJ. cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR (P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis *in vitro*. *Immunity.* 1997;6:119-126.

Ninomiya N, Hazeki K, Fukui Y, Seya T, Okada T, Hazeki UIM. Involvement of phosphatidyl inositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem.* 1994;269:22732-22737.

Nomura K, Kanegane H, Karasuyama H, Tsukada S, Agematsu K, Murakami G et al. Genetic defect in human X-linked agammaglobulinemia impedes a maturational evolution of pro-B cells into a later stage of pre-B cells in the B-cell differentiation pathway. *Blood.* 2000;96:610-617.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:34-47.

Nore BF, Vargas L, Mohamed AJ, Brandén LJ, Bäckesjö CM, Islam TC et al. Redistribution of Bruton's tyrosine kinase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho-family GTPases. *Eur J Immunol.* 2000;30:145-154.

Notarangelo L, Casanova JL, Fischer A, Puck J, Rosen F, Seger R et al. Primary immunodeficiency diseases: an update. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(3):677-687.

Odin JA, Edberg JC, Painter CJ, Kimberly RP, Unkeless JC. Regulation of phagocytosis and $[Ca^{2+}]_i$ flux by distinct regions of an Fc receptor. *Science*. 1991;254:11785-1788.

Ohta Y, Haire RN, Litman RT, Fu SM, Nelson RT, Kratz J et al. Genomic organization and structure of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase: localization of mutations associated with varied clinical presentations and course in X chromosome-linked agammaglobulinemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:9062-9066.

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;78:334-340.

Patarroyo M. Adhesion molecules mediating recruitment of monocytes to inflamed tissue. *Immunobiology*. 1994;191:474-477.

Perez de Diego R, Granados EL, Pozo M, Rodriguez C, Sabina P, Ferreira A et al. Bruton's tyrosine kinase is not essential for LPS-induced activation of human monocytes. *Allergy Clin Immunol*. 2006;117(6):1462-1469.

Plo RF, Garcia RMC, Ferreira CA, Fontan CG. Neutropenia as early manifestation of x-linked agammaglobulinemia. report on 4 patients. *An Esp Pediatr*. 1999;51:235-240.

Pommier CG, Inada S, Fries LF, Takahashi T, Frank MM, Brow EJ. Plasma fibronectin enhances phagocytosis of opsonized particles by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med*. 1983;157:1844-1854.

Qiu WQ, de Bruin D, Brownstein BH, Pearse R, Ravetch JV. -Organization of the human and mouse low-affinity $Fc\gamma R$ genes: duplication and recombination. *Science*. 1990;248:732-735.

Quek LS, Bolen J, Watson SP. A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Curr Biol*. 1998;8:1137-1140.

Ravetch JV. Fc receptors: rubor redux. *Cell*. 1994;78:553-560.

Ravetch JV. Fc receptors. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:121-125.

Rittirsch D, Flierl MA, Day DE, Nadeau BA, Zetoune FS, Sarma JV et al. Cross-Talk between TLR4 and FcγReceptor III (CD16) Pathways. *PLoS Pathog*. 2009;5(6):e1000464.

Rodriguez MCG, Lopez-Granado E, Cerdan AF, Casariego GF. Molecular analysis of Bruton's Tyrosine Kinase gene in Spain. *Hum Mutat*. 2001;19:84.

Rodriguez RG, Readinger JA, Viorritto IC, Mueller KL, Houghtling RA, Schwartzberg PL. Tec kinases, actin, and cell adhesion. *Immunological reviews*. 2007;218:15-61.

Rohrer J, Parolini O, Belmont JW, Conley ME. The genomic structure of human BTK, the defective gene in X-linked agammaglobulinemia. *Immunogenetics*. 1994;40:319-324.

Rump JA, Jahreis A, Schlesier M, Stecher S, Peter HH. A double-blind, placebo-controlled, crossover therapy study with natural human IL-2 (nhu IL-2) in combination with regular intravenous gammaglobulin infusions in 10 patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 1997;110:167-173.

Salim K, Bottomley MJ, Querfurth E, Zvelebil MJ, Gout I, Scaife R et al. Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J*. 1996;15(22):6241-6250.

Salzer U, Chapel HM, Webster ADB, Pan-Hammarström Q, Schmidt-Graeff A, Schlesier M et al. Mutations in TNFRSF13B, which encodes TACI, are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet*. 2005;37:820-828.

Sanchez-Mejorada G, Rosales C. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol.* 1998;63(5):521-33.

Sato S, Katagiri T, Takaki S, Kikuchi Y, Hitoshi Y, Yonehara S et al. IL-5 receptor-mediated tyrosine phosphorylation of SH2/SH3-containing proteins and activation of Bruton's tyrosine and Janus 2 kinases. *J Exp Med.* 1994;180:2101-2111.

Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2001;2:947-950.

Sekine H, Ferreira RC, Pan-Hammarström Q. Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(17): 7193-7198.

Setoguchi R, Kinashi T, Sagara H, Hirosawa K, Takatsu K. Defective degranulation and calcium mobilization of bone-marrow derived mast cells from Xid and Btk-deficient mice. *Immunol Lett.* 1998;64:109-118.

Schäffer AA, Pfannstiel J, Webster ADB, Plebatino A, Hammarström L, Grimbacher B. Analysis of families with common variable immunodeficiency (CVID) and IgA deficiency suggests linkage of CVID to chromosome 16q. *Hum Genet.* 2006;118(6):725-729.

Scharemborg AM, El-Hilal O, Fruman DA, Beitz LO, Li Z, Lin S. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *EMBO J.* 1998;17:1961-1972.

Schmidit NW, Thieu VT, Mann BA, Ahyi ANN, Kaplan MH. Bruton's Tyrosine Kinase is required for TLR-induced IL-10 production. *J Immunol.* 2006; 177:7203-7210.

Schmidit U, Van Den Akker E, Parren-Van Amelsvoort M, Litos G, De Bruijn M. Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled protection against TRAIL in erythroid progenitors. *J Exp Med.* 2004;199:785-795.

Schroeder Jr HW, Schroeder III HW, Sheikh SM. The complex genetics of common variable immunodeficiency. *J Investig Med*. 2004;52:90-103.

Shen B, Vihinen M. Conservation and covariance in PH domain sequences: physicochemical profile and information theoretical analysis of XLA-causing mutations in the Btk PH domain. *Protein Eng Des Sel*. 2004;17(3):267-276.

Shibata Y, Metzger WJ, Myrvik QN. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: Mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. *J Immunol*. 1997;159:2462-2467.

Siliciano JD, Morrow TA, Desiderio SV. Itk, a T-cell-specific tyrosine kinase gene inducible by interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:11194-11198.

Sideras P, Muller S, Shiels H, Jin H, Khan WN, Nilsson I et al. Genomic organization of mouse and human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) loci. *J Immunol*. 1994;153:5607-5617.

Smith CI, Baskin B, Humire-Greiff P, Zhou JN, Olsson PG, Maniar HS et al. Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol*. 1994;152:557-565.

Smith CL, Islam TC, Mattsson PT, Mohamed AJ, Nore BF, Vihinen M. Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in others species. *Bioessays*. 2001;23:436-446.

Spatuzza C, Schiavone M, Di Salle E, Janda E, Sardiello M, Fiume G et al. Physical and functional characterization of the genetic locus of IBtk, an inhibitor of Bruton's tyrosine kinase: evidence for three protein isoforms of IBtk. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(13):4402-4416.

Spickett GP, Farrant J, North ME, Zhang J, Morgan L, Webster ADB. Common variable immunodeficiency: how many diseases? *Immunol. Today*. 1997;18 (7):325-328.

Stahl PD, Ezekowitz RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:50-55.

Stendahl OL, Hartwig JH, Brotschi EA, Stossel TP. Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *J Cell Biol*. 1980;84:215-224.

Stein M, Gordon S. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur J Immunol*. 1991;21:431-437.

Sutterwala FS, Rosenthal LA, Mosser DM. Cooperation between CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18) in the binding of complement-opsonized particles. *J Leuk Biol*. 1996;59:883-890.

Suzuki T, Kono H, Hirose N, Okada M, Yamamoto K, Honda Z. Differential involvement of Src family kinase in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J Immunol*. 2000;165(1):473-82.

Swanson JA, Johnson MT, Beningo K, Post P, Mooseker M, Araki N. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J Cell Sci*. 1999;112(3):307-316.

Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*. 2006;211:609-618.

Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch JV. FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell*. 1994;76:519-529.

Takata M, Kurosaki T. A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2. *J Exp Med*. 1996;184:31-40.

Taneichi H, Kanegane H, Sira MM, Futatani T, Agematsu K, Sako M et al. Toll-like receptor signaling is impaired in dendritic cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol*. 2008;126(2):148-154.

Tamagnone L, Lahtinen I, Mustonen T, Virtaneva K, Francis F, Muscatelli F et al. BMX, a novel nonreceptor tyrosine kinase gene of the BTK/ITK/TEC/TKX family located in chromosome Xp22.2. *Oncogene*.1994;9:3683-3688.

Tanaka n, Asao H, Ohtani K, Nakamura M, Sugamura K. A novel human tyrosine kinase gene inducible in T cells by interleukin 2. *FEBS Lett*.1993;324:1-5.

Tarzi MD, Grigoriadou S, Carr SB, Kuitert LM, Longhurst HJ. Clinical immunology review series: an approach to the management of pulmonary disease in primary antibody deficiency. *Clin Exp Immunol*. 2009;155(2):147-155.

Teimourian S, Nasser S, Pouladi N, Yeganeh M, Aghamohammadi A. Genotype-phenotype correlation in Bruton's tyrosine kinase deficiency. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008;30(9):679.

Thickett KM, Kumararatne DS, Banerjee AK, Dudley R, Stableforth DE. Common variable immune deficiency: respiratory manifestations, pulmonary function and high-resolution CT scan findings. *QJM*. 2002; 95:655-662.

Thon V, Eggenbauer H, Wolf HM, Fischer MB, Litzman J, Lokaj J et al. Antigen presentation by common variable immunodeficiency (CVID) B cells and monocytes is unimpaired. *Clin Exp Immunol*. 1997;108(1):1-8.

Tibbles H, Vassilev A, Uckun FM. A dual function anti-leukemic agent with anti-thrombotic activity. *Leuk Lymphoma*. 2002;43:1121-1127.

Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*. 1997;387:673-676.

Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human Xlinked agammaglobulinemia. *Cell*. 1993;72:279-290.

Uckun F, Ozer Z, Vassilev A. Bruton's tyrosine kinase prevents activation of the anti-apoptotic transcription factor STAT3 and promotes apoptosis in neoplastic B-cells and B-cell precursors exposed to oxidative stress. *Brit J Haemat*. 2007;136:574-589.

Ugarova TP, Yacubenco VP. Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;936:368-385.

Väliäho J, Smith CI, Vihinen M. BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat*. 2006;27(12):1209-1217.

Van de Winkel JGJ, Anderson CL. Biology of Human Immunoglobulin G Fc Receptors. *J Leuk Biol*. 1991;49:511-524.

Van de Winkel JGJ, Capel PJA. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today*. 1993;14:215-221.

Van Zelm MC - Novel humoral immunodeficiency caused by a CD19 defect. The XIth Meeting of the European Society for Immunodeficiency, Versailles (Abstract #B27); Franco JL et al (2004) common variable immunodeficiency (CVID) due to a homozygous mutation in the CD19 gene. The XIth Meeting of the European Society for Immunodeficiency, Versailles (Abstract #B71).

Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the *src* family of protein-tyrosine kinases. *Nature*. 1993;361:226-233.

Viallard JF, Camou F, Andre M, Liferman F, Moreau JF, Pellegrin JL et al. Altered dendritic cell distribution in patients with common variable immunodeficiency. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(5): R1052-5.

Vidarsson G, Van de Winkel JGJ. Fc receptor and complement receptor-mediated phagocytosis in host defence. *Curr Opin Infect Dis*. 1998;11:271-278.

Vignola AM, Gjomarkaj M, Arnoux B, Bousquet J. Monocytes: Updates on cells and cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101:149-152.

Vihinen M, Vetrie D, Maniar HS, Ochs HD, Zhu Q, Vorechovsky I et al. Structural basis of chromosome X-linked agammaglobulinemia: A tyrosine kinase disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:12803-12807.

Vihinen M, Belohradsky BH, Haire RN, Holinsk FE, Kwan SP, Lappalainen I et al. Btk base, mutation database for X-linked agammaglobulinemia (XLA). Nucl Acids Res. 1997;25:166-171.

Vihinen M, Mattsson PT, Smith CIE. Bruton`s Tyrosine Kinase (BTK) in x-linked agammaglobulinemia (XLA). Front Biosci. 2000;5:d917-928.

Yang W, Desiderio S. Bap-135, a target for Bruton`s tyrosine kinase in response to B cell receptor engagement. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:604-609.

Yamada N, Kawakami Y, Kimura H, Fukamachi H, Baier G, Altman A et al. Structure and expression of novel protein-tyrosine kinases, EMB and EMT in hematopoietic cells. Biochem Biophys Res Commun. 1993;192:231-240.

Yamamoto Y, Klein TW, Friedman H. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin - 1 beta (IL-1beta), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP-1beta), MIP-2, KC responses, caused by attachment of Candida Albicans to macrophages. Infect Immun. 1997; 65:1077-1082.

Yu JE, Knight AK, Radigan L, Marron TU, Zhang L, Sanchez-Ramón S et al. Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol. 2009;124(2):349-356.

Warnatz K. Finally Found: human BAFF-R deficiency causes CVID. The XIth Meeting of the European Society for Immunodeficiency, Versailles (Abstract #B27), 2004.

Whyatt D, Lindeboom F, Karis A, Ferreira R, Milot E, Hendriks R et al. An intrinsic but cell nonautonomous defect in GATA-1- over expressing mouse erythroid cells. Nature. 2000;406:519-524.

Wood P, Stanworth S, Burton J. Recognition, clinical diagnosis and management of patients with primary antibody deficiencies: a systematic review. Clin Exp Immunol. 2007;149(3),410-423.

Wright SD, Craigmyle LS, Silverstein SC. Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b and C3bi mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J Exp Med*. 1983;158:1338-1343.

Wright SD, Silverstein SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med*. 1983;158:2016-2023.

Wright SD, Griffin FM Jr. Activation of phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis. *J Leuk Biol*. 1985;38:327-329.

Wilkinson PC. Leucocyte locomotion: Behavioural mechanisms for accumulation. *J Cell Sci*. 1987;8:103-119.

Who Scientific Group. Primary immunodeficiency diseases. *Clin Exp Immunol*. 1999;118 (Suppl. 1):1-28.

Xu W, Harrisson SC, Eck MJ. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature*. 1997;385:595-602.

Zullo A, Romiti A, Rinaldi V, Vecchione A, Tomao S, Aiuti F et al. Gastric pathology in patients with common variable immunodeficiency. *Gut*. 1999;45:77-81.

8- APÊNDICES

Expression of Fcγ and complement receptors in monocytes of X-linked agammaglobulinaemia and common variable immunodeficiency patients

A. L. B. Amoras,* M. T. N. da Silva,*

R. L. Zollner,* H. Kanegane,[†]

T. Miyawaki[†] and M. M. S. Vilela*

**Center for Investigation in Pediatrics, Department of Pediatrics, State University of Campinas Medical School, Campinas, SP, Brazil, and [†]Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, Japan*

Summary

Recently we reported that monocyte phagocytosis and chemotaxis are impaired in X-linked agammaglobulinaemia (XLA) and common variable immunodeficiency (CVI) patients. Few data exist on the *in vivo* expression of receptors for the constant region of immunoglobulin (IgG) (FcγR) and complement receptors (CR) in these patients. The objective of this study was to investigate the expression of FcγR and CR on monocytes from XLA and CVI patients and compare it to that of healthy controls. Whole blood samples were obtained from 10 patients with XLA, 12 with CVI and 18 healthy controls. Monocyte phenotype was determined by flow cytometry with gating on CD14⁺ cells. Surface expression of FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16), CR1 (CD35) and CR3 (CD11b and CD18) was measured by determination of the proportion of CD14⁺ cells positive for each receptor and by receptor density. Compared to controls, a significantly higher percentage of CD16 and CD35⁺ monocytes from XLA ($P = 0.002$ and $P = 0.007$, respectively) were observed. The relative fluorescence intensity (RFI) expression of FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) were significantly lower on CVI monocytes compared to controls ($P = 0.001$ and $P = 0.035$, respectively). XLA patients, who have a reduction of Bruton's tyrosine kinase (Btk), showed normal or increased percentages of monocytes expressing Fcγ and complement receptors. CVI patients, who have normal expression of Btk, showed reduced expression of CD16 and CD32 on monocytes. Inefficient chemotaxis and phagocytosis, reported previously in XLA patients, could be due to defects of cytoplasmic transduction mechanisms.

Keywords: CR1 (CD35), CR3 (CD11b, CD18) receptors, monocytes, Fcγ, flow cytometry, common variable immunodeficiency, X-linked agammaglobulinaemia

Accepted for publication 24 August 2007
Correspondence: M. M. dos Santos Vilela,
Center for Investigation in Pediatrics, Pediatrics
Department, State University of Campinas
Medical School, Campinas, Rua Tessália Vieira
de Camargo, 126, Campinas, São Paulo, CEP
13083-887, Brazil.
E-mail: marluce@fcm.unicamp.br

Introduction

X-linked agammaglobulinaemia, or Bruton's disease, is caused by mutations in cytoplasmic Bruton's tyrosine kinase (Btk), which are associated with a reduction in Btk mRNA, Btk protein and kinase activity [1–3]. This defect results in a blockage of the expansion of pre-B cells into later B cell stages or incomplete differentiation of B cell precursors to pre-B cells [3]. XLA is characterized by recurrent bacterial and enteroviral infections with a paucity of circulating B cells ($\leq 1\%$) and a marked reduction in serum levels of all immunoglobulin isotypes.

Of note is that in normal individuals Btk is expressed in most haematopoietic lineages, except for T cells and plasma

cells [4–9]. Despite its crucial role in B cell receptor (BCR)-dependent calcium mobilization, Btk functions in all cells, except B cells, remain defined incompletely [10]. Btk is likely to play analogous functions during the development and functioning of the myeloid lineage, affecting the outcome of many infectious as well as non-infectious inflammatory events [11].

Common variable immunodeficiency (CVI) is due probably to the block in B cell differentiation, which leads to insufficient serum IgG and IgA levels. In half the patients IgM levels are also reduced [12,13]. CVI is characterized by recurrent infections and normal numbers of B cells in peripheral blood, but the basic immunological and molecular defects of the majority of patients remain unknown. The

genetic predisposition and multiple defects in both innate and adaptive compartments of the immune system might thus account cumulatively for the heterogeneous symptoms displayed in CVI.

Monocytes from CVI patients can exhibit chronic hyperactivity and enhanced oxidative stress due to abnormalities in the tumour necrosis factor (TNF)–interleukin (IL)-12–interferon (IFN)-γ circuit, which might contribute to autoimmune disorders, granuloma formation, impaired T cell proliferation and natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity [14].

Previously, we demonstrated that monocytes obtained from XLA and CVI patients displayed a decreased chemotaxis and defective Fcγ, complement receptor (CR) CR-1 and CR3-mediated phagocytosis compared to monocytes obtained from healthy donors [15]. All these receptors are very effective in binding, internalizing and destroying opsonized particles [16]. They differ in their structure, binding affinity for IgG, cell distribution and downstream signalling [17]. Btk function in phagocytosis signalling pathways is not yet clarified [18]. Moreover, monocytes from CVI patients exhibit normal concentration of Btk, suggesting that other signalling pathways may have a role in these phagocytosis and chemotaxis deficiencies.

Few or no data exist on the expression of specific Fcγ and complement receptors in phagocytes of XLA and CVI patients. In order to investigate whether the observed alteration in phagocytosis was attributable to differences in the number of these receptors, we investigated their expression on monocytes from XLA and CVI patients compared to healthy controls.

Materials and methods

Patients and controls

Ten patients with XLA and 12 with CVI, followed at the Pediatric Immunology Division at the State University of Campinas Medical School Hospital, and 18 healthy volunteers participated in the study.

The diagnosis of CVI was carried out according to the criteria of the World Health Organization expert group for primary immunodeficiency diseases [19]. Diagnosis of XLA was based on the decreased expression of Btk proteins in monocytes, markedly reduced levels of all major classes of immunoglobulins and circulating B cell numbers (<1%). At the time of the study, all patients were receiving replacement therapy with intravenous immunoglobulin (IVIg). The blood samples were collected before the administration of IVIg. There was no evidence of autoimmune disorders, granulomatous diseases or neoplasias in any patient. At the time of the investigation, none of them had acute infection.

Cell isolation and flow cytometry analysis of Btk expression in monocytes

Btk expression was evaluated to confirm the diagnosis of XLA. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated from heparinized venous blood by a Ficoll-Hypaque gradient. PBMC were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and stained with phycoerythrin (PE)-labelled anti-CD14 monoclonal antibody (mAb) DakoCytomation, Glostrup, Denmark for 20 min on ice to discriminate monocytes from other cells. The cells were fixed (4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature) and permeabilized [0.1% Triton X-100 in Tris-buffered saline pH 7.4, with 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) for 5 min]. These cells were reacted with 2 µg/ml of anti-Btk (48-2H) or control IgG1 (Dako) mAb for 20 min on ice, washed and incubated further with a 1 : 2000 dilution of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG1 antibody (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) for 20 min on ice. Stained cells were analysed by two-colour flow cytometry (Epics XL-MCL®; Coulter Corp., Hialeah, FL, USA) [3].

Flow cytometry analysis of Fcγ and complement receptors (CR) expression in monocytes

Venous blood was collected into ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) tubes for detection of surface antigens. To analyse the CRs whole blood (WB) was incubated first with 20 µl of human IgG for 5 min and then 100 µl of WB per tube were labelled with the following fluorochrome-conjugated mAbs: anti-CD14 PEcy5, anti-CD64 PE, anti-CD32 FITC, anti-CD16 FITC, anti-CD 18 PE, anti-CD35 FITC and anti-CD11b FITC. Appropriate isotype controls were used to define positive and negative cell populations. After incubation for 20 min on ice red blood cells were lysed (Optilyse®; Coulter) and washed twice in PBS with 1% fetal calf serum (FCS) and 0.1% sodium azide. All fluorochrome-conjugated mAbs and isotype controls were obtained from Immunotech (Marseille, France).

Monocyte phenotype was determined by flow cytometric analysis of whole blood samples, with gating on CD14-positive cells. Surface expression of FcγRI (CD64), RII (CD32) and RIII (CD16), complement receptors CR1 (CD35) and CR3 (Cd11b/CD18) was determined. During flow cytometric analysis, monocyte autofluorescence was detected on the FL1 channel, without differences between XLA, CVI or control samples. Cytometer settings were adjusted with the aim of keeping unstained or isotype control-stained monocytes (from a monocyte gate set by forward and lateral light scatter) in the first decade of the logarithmic scale for each fluorescence channel. As the settings were established, they were kept the same for all study samples (patients and controls). Receptor expression was measured by determination of the proportion of CD14⁺

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of X-linked agammaglobulinaemia patients.

Patient	Age in years at diagnosis	Serum IgM mg/dl*	Serum IgG mg/dl*	Serum IgA mg/dl*	B cells CD19 %	Patient Btk expression monocytes%	Mother Btk expression monocytes %
EOB	6	15	109	7	0.0	25.6	51.1
AHO	14	15	203	53.9	0.04	70.2	58.5
AAAJ	7	10	240	0.6	0.0	26.3	49
RCJ	8	3.4	54	0.0	0.19	13.3	39.8
RJF	2	2	22	2	0.0	97	97
AJAV	10	0.0	150	20	0.0	9.0	22.4
FFL	6	0.0	0.0	3.0	0.04	9.0	53.8
MHPF	1	18	198	0.0	0.09	39	96
MD	4	26.8	86.2	< 23.4	0.0	4.5	29.2
DSM	4	182	< 30	0.0	1.0	86.4	97.9

*Serum immunoglobulin levels at the age of diagnosis. Btk: Bruton's tyrosine kinase.

monocyte positive for each of the receptors above. Receptor density was determined by calculation of relative fluorescence intensity (RFI), the division of the median fluorescence intensity (MFI) of each positive cell population by the MFI of the negative control sample. Data were acquired on a Coulter Epics XL® flow cytometer. At least 5×10^3 of CD14⁺ events were acquired for each sample.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using *SPSS* software version 7.5.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data were expressed as medians and extremes. Statistical estimation of the difference between disease groups and normal controls was performed by Mann–Whitney test (significance level, $P < 0.05$).

The study was approved by the Committee for Ethics in Research of the State University of Campinas Medical School. Informed consent was obtained from the patients and healthy controls.

Results

Clinical and laboratory features of patients

All 10 patients with XLA were male, with ages varying from 2.6 to 28.3 years (median, 19.6). The CVI group had eight female and four male patients, with ages varying from 10.6 to 57.9 years (median, 38.3). The ages of the 18 control subjects varied from 22 to 58 years (median, 29), and 11 were male. The main clinical and immunological characteristics of the patients are reported in Tables 1 and 2.

Surface expression of Fcγ and CR on monocytes from XLA and CVI patients

Comparing XLA with normal controls, there was a higher percentage of CD16⁺ (median, 11.9% *versus* 6%, $P = 0.002$), CD35⁺ (median, 95.7% *versus* 84.2%, $P = 0.007$) and CD11b⁺ (median, 100% *versus* 99.8%, $P = 0.001$) positive monocytes in XLA. However, there were no significant differences

Table 2. Clinical and laboratory characteristics of common variable immunodeficiency patients.

Patient	Sex	Age in years at diagnosis	Serum IgM mg/dl*	Serum IgG mg/dl*	Serum IgA mg/dl*	B cells CD19%
VAM	F	17	8.3	256	8.2	10.45
FJO	M	13	1.8	100	0.0	11.93
JMC	M	27	2.0	85	0.0	18.0
AFB	F	22	10	566	< 6.0	16.7
MRC	F	16	14	797	< 6.0	3.6
RSB	F	19	10	400	0.0	10.1
LMD	F	26	11.6	477	< 6.6	20
VDC	F	32	24	284	< 22	10.8
JDC	M	23	14.4	817	< 6.6	22.9
APM	F	14	16	722	< 25	7.74
CDFM	M	12	9.2	536	< 6.0	9.3
RLGF	F	5	13	428	< 6.0	13

*Serum immunoglobulin levels at the age of diagnosis. F, female, M, male.

between XLA and controls or XLA and CVI regarding receptor density as measured by RFI. Patients with XLA showed a higher percentage of CD11b⁺ (median, 100% versus 99.8%, $P = 0.008$) in relation to CVI. Patients with CVI, compared to normal controls, showed a lower receptor density for CD16⁺ (median RFI 9 versus 14.42, $P = 0.03$) and CD32⁺ (median, RFI 38.5 versus 67.8, $P = 0.001$) positive monocytes. There were no significant differences between CVI and controls regarding the percentages of monocytes expressing FcγR and CR. The results above are summarized on Figs 1 and 2.

Discussion

In this study, we carried out a phenotypic analysis of monocytes using flow cytometry, comparing cells from XLA and CVI patients to those of healthy controls. The XLA patients showed a significantly higher percentage of CD14CD16⁺ and CD14CD35⁺ monocytes in relation to the controls (Fig. 1). However, the receptor density was similar among the groups (Fig. 2).

Peripheral blood monocytes are a heterogeneous population of circulating precursors for tissue macrophages and dendritic cells (DCs). In humans, classical CD14⁺CD16⁻ monocytes express CCR2, CD64 (FcγRI) and CD62L (L-selectin), whereas 'non-classical' CD14^{low} CD16⁺ monocytes lack CCR2 and have higher levels of MHC-II and FcγRII (CD32) [20].

However, a third subset has been described, which is characterized as being CD14⁺CD64⁺CD16⁺. Although we did not perform simultaneous multicolour staining, as virtually 100% of CD14⁺ monocytes are also CD64⁺, it is reasonable to assume that CD16⁺ monocytes in our patient samples were also CD14⁺CD64⁺. This subset of monocytes has been described as combining features of typical dendritic cells [high IL-12 production and expression of human leucocyte antigen D-related (HLA-DR)] and monocytes (monocytic morphology, high phagocytic activity) [21,22].

The presence of this population in XLA, with normal or increased numbers, reinforces previous findings that the Btk defect is not involved in DC differentiation and maturation [23]. On the other hand, we observed that chemotaxis and phagocytosis of monocytes appeared reduced in XLA patients [15], suggesting that these findings could be due to defects in Btk-mediated cytoplasmic transduction mechanisms. The activation of tyrosine kinases has been recognized as an early step [24], although the role of individual kinases in phagocytosis signalling is still to be determined [25]. Btk can induce cytoskeletal remodeling in stimulated cells, further suggesting that cytoskeletal regulation mediated by Btk may be of physiological relevance for phagocytosis and chemotaxis [26,27]. All FcγR and CR induce rearrangements in the actin cytoskeleton that lead to the internalization of the particle. Accordingly, the cells that are impaired or deficient in Btk activation have been shown

to lack BCR-dependent intracellular calcium mobilization almost totally [28].

Here we demonstrated that the percentages of monocytes expressing CD35 were also normal or increased in XLA patients. This finding has not been reported previously. The integrity of CD35 expression may be important in avoiding the incidence of immune-complex diseases in XLA patients, as the transcription of CD35 has been reported to be related inversely to circulating immune complexes in patients with systemic lupus erythematosus [29]. In contrast to XLA, the CVI patients showed a lower receptor density for CD16⁺ and CD32⁺ monocytes in relation to controls (Fig. 2). However, an increase in the expression of CD14⁺CD16⁺ monocytes from CVI patients was reported, a phenomenon that could be related to immunoglobulin therapy in these individuals. The expression of CD64, CD32 and CD16 is linked to their state of activation [17]. Nevertheless, CD16 cell surface expression levels diminish after stimulation because of receptor internalization and shedding of the soluble receptor from the cell surface [17]. The patients in our study were under monthly immunoglobulin therapy but the blood samples were collected immediately before the intravenous immunoglobulin infusion. Although we did not measure IgG levels, we can suppose that they must have been very low, potentially interfering with monocyte activation.

The antigen-presenting function of DCs has been reported to be normal in CVI [30,31], although a deep alteration in the distribution of myeloid DC subsets in the peripheral blood of CVI patients was found [32]. Myeloid dendritic cells from these patients displayed severely perturbed differentiation and maturation with decreased expression of the co-stimulatory molecules CD80, CD86 and HLA-DR. Impaired IL-12 production with T helper 1 (Th1)-biased cytokine environment, unfavourable to antibody production, was also noticed [14,33,34]. The processes are complex with positive and negative feedback between cells, including the regulation of surface-signalling molecules [35] and the production of cytokines. Evidence of dysregulation in the monocyte/T cell interactions involving IL-12 and IFN-γ in CVI has been described [33].

Although the percentages of CD11b⁺ monocytes (CR3) were quite different between XLA, CVI and the control group, we considered this to have no physiological significance because the values were very similar, all close to 100%.

The results reported above, showing a general pattern of normality of Fc and CRs, agree with the clinical observation that XLA and CVI patients have good outcomes under intravenous immunoglobulin (IVIg) replacement. The reported actions of IVIg mediated by the variable regions F(ab')₂, actions of Fc on a range of Fc receptors (FcR) and actions mediated by complement binding within the Fc fragment are possible because the patients are expressing FcR and CR.

In conclusion, the current work offers an important insight into monocyte subsets by providing evidence that

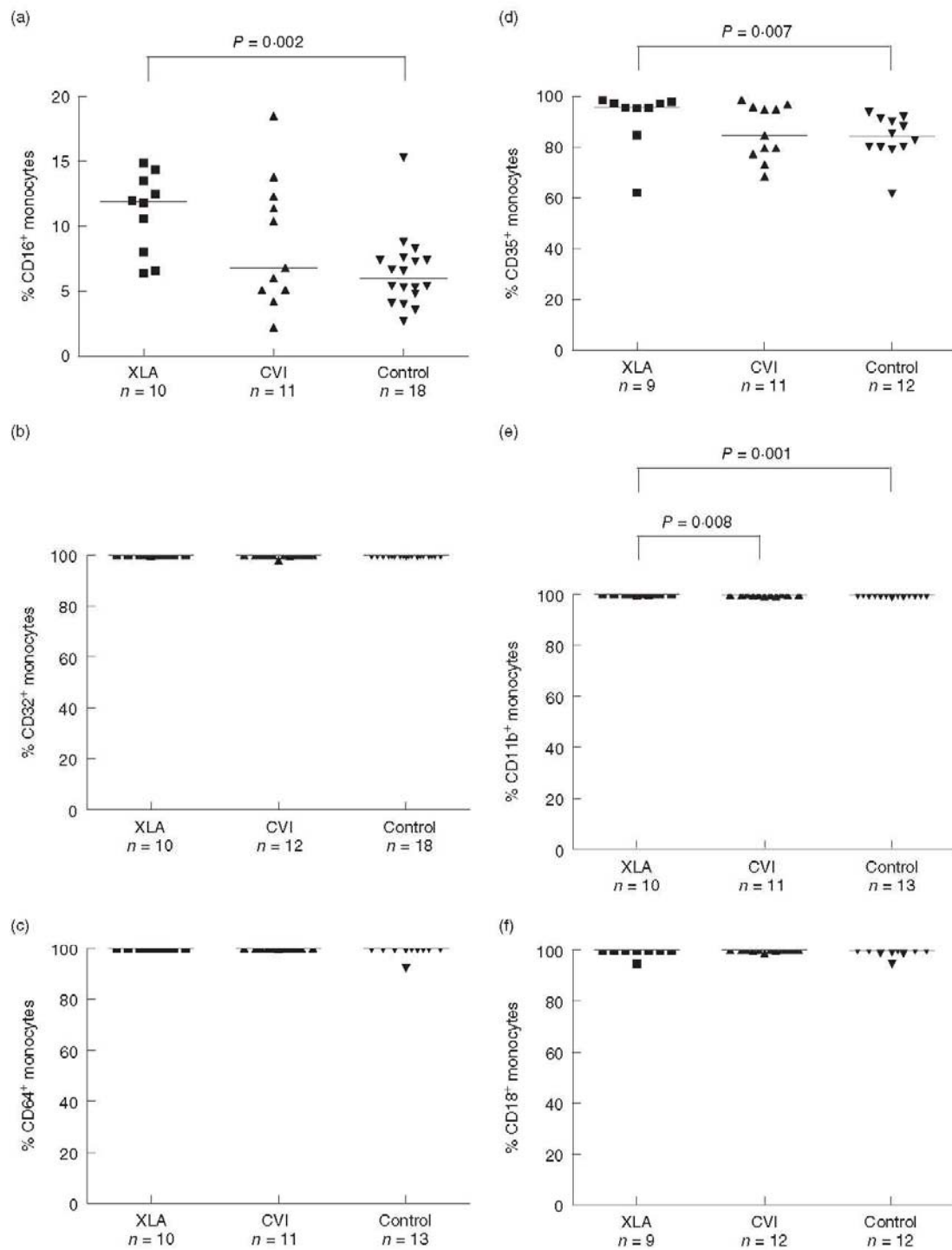


Fig. 1. Comparison of Fc γ (a–c) and complement (d–f) receptor expression, measured by percentages of positive monocytes, among patients with X-linked agammaglobulinaemia, common variable immunodeficiency and normal controls.

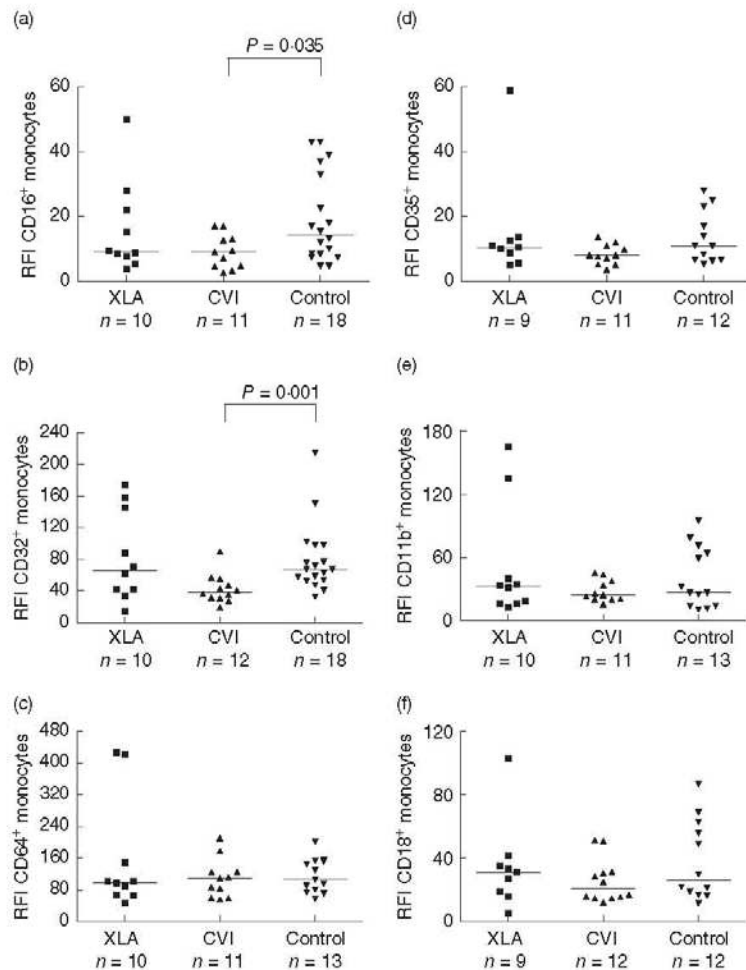


Fig. 2. Comparison of Fc γ (a–c) and complement (d–f) receptor expression, measured by relative fluorescence intensity, among patients with X-linked agammaglobulinaemia, common variable immunodeficiency and normal controls.

XLA patients, who have Btk reduction, show normal or increased percentages of monocytes expressing Fc γ and complement receptors. These findings provide support for the inference that inefficient chemotaxis and phagocytosis, reported previously in XLA patients, could be due to defects in cytoplasmic transduction mechanisms. CVI patients, who have a normal Btk expression, showed reduced CD16 and CD32 membrane expression, although the percentage of positive monocytes for these receptors was not reduced.

Acknowledgements

We are grateful to all participating patients and also to Mrs Noemia Orie and Simone Corte for their technical assistance. This work was supported by 'Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo' (FAPESP) and 'Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior' (CAPES), Brazil.

References

- 1 Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ *et al.* Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993; 72:279–90.
- 2 Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P *et al.* The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993; 361:226–33.
- 3 Putatani T, Miyawaki T, Tsukada S *et al.* Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood* 1998; 91:595–602.
- 4 Smith CI, Baskin B, Humire-Greiff P *et al.* Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, Btk, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol* 1994; 152:557–65.
- 5 Genevieve HC, Hinshelwood S, Gaspar HB *et al.* Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage. *Eur J Immunol* 1994; 24:3100–5.

- 6 Quek LS, Bolen J, Watson SP. A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Curr Biol* 1998; **8**:1137–40.
- 7 Futatani T, Watanabe C, Baba Y, Tsukada S, Ochs HD. Bruton's tyrosine kinase is present in normal platelets and its absence identifies patients with X-linked agammaglobulinemia and carrier females. *Br J Haematol* 2001; **114**:141–9.
- 8 Cunningham-Rundles C. Hematologic complications of primary immune deficiencies. *Blood Rev* 2002; **16**:61–4.
- 9 Kanegane H, Taneichi H, Nomura K, Futatani T, Miyawaki T. Severe neutropenia in Japanese patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Immunol* 2005; **25**:490–5.
- 10 Brunner C, Müller B, Wirth T. Bruton's tyrosine kinase is involved in innate and adaptive immunity. *Histol Histopathol* 2005; **20**:945–55.
- 11 Mangla A, Khare A, Vineeth V *et al.* Pleiotropic consequences of Bruton tyrosine kinase deficiency in myeloid lineages lead to poor inflammatory responses. *Blood* 2004; **104**:1191–7.
- 12 Hammarström L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 2000; **120**:225–31.
- 13 Chapel H, Geba R, Rosen F, IUIS PID (Primary Immunodeficiency) Classification Committee. Primary immunodeficiency diseases: an update. *Clin Exp Immunol* 2003; **132**:9–15.
- 14 Bayry J, Hermine O, Webster DA, Levy Y, Kaveri SV. Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. *Trends Mol Med* 2005; **11**:370–6.
- 15 Amoras AL, Kanegane H, Miyawaki T, Vilela MM. Defective Fc γ CR1- and CR3-mediated monocyte phagocytosis and chemotaxis in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia patients. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2003; **13**:181–8.
- 16 Aderan A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**:593–623.
- 17 Heijnen IAFM, van de Winkel JGJ. Human IgG Fc receptors. *Int Rev Immunol* 1997; **16**:29–55.
- 18 Lindvall JM, Blomberg KE, Valiaho J *et al.* Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol Rev* 2005; **203**:200–15.
- 19 WHO Scientific Group. Primary immunodeficiency diseases. *Clin Exp Immunol* 1999; **118** (Suppl. 1):1–28.
- 20 Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 2006; **211**:609–18.
- 21 Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 2001; **69**:11–20.
- 22 Gordon S, Taylor P. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:953–64.
- 23 Gagliardi MC, Finocchi A, Orlandi P *et al.* Bruton's tyrosine kinase defect in dendritic cells from X-linked agammaglobulinemia patients does not influence their differentiation, maturation and antigen-presenting cell function. *Clin Exp Immunol* 2003; **133**:115–22.
- 24 Hackam DJ, Rotstein OD, Schreiber A, Zhang WJ, Grinstein S. Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fc gamma receptors in macrophages. *J Exp Med* 1997; **186**:955–66.
- 25 Suzuki T, Kono H, Hirose N, Okada M, Yamamoto K, Honda Z. Differential involvement of Src family kinase in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J Immunol* 2000; **165**:473–82.
- 26 Nore BF, Vargas L, Mohamed AJ *et al.* Redistribution of Bruton's tyrosine kinase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho-family GTPases. *Eur J Immunol* 2000; **30**:145–54.
- 27 Inabe K, Ishiai M, Scharenberg AM, Freshney N, Downward J, Kurosaki T. Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. *J Exp Med* 2002; **195**:189–200.
- 28 Fluckiger AC, Li ZM, Kato RM *et al.* Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation. *EMBO J* 1998; **17**:1973–85.
- 29 Verma J, Arora V, Marwaha V, Kumar A, Das N. Association of leukocyte CR1 gene transcription with the disease severity and renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2005; **14**:273–9.
- 30 Thon V, Eggenbauer H, Wolf HM *et al.* Antigen presentation by common variable immunodeficiency (CVID) B cells and monocytes is unimpaired. *Clin Exp Immunol* 1997; **108**:1–8.
- 31 Fischer MB, Hauber I, Wolf HM, Vogel E, Mannhalter JW, Eibl MM. Impaired TCR signal transduction, but normal antigen presentation, in a patient with common variable immunodeficiency. *Br J Haematol* 1994; **88**:520–6.
- 32 Viallard JF, Camou F, Andre M *et al.* Altered dendritic cell distribution in patients with common variable immunodeficiency. *Arthritis Res Ther* 2005; **7**:1052–5.
- 33 Cambronero R, Sewell WA, North ME, Webster AD, Farrant J. Up-regulation of IL-12 in monocytes: a fundamental defect in common variable immunodeficiency. *J Immunol* 2000; **164**:488–94.
- 34 Braig DU, Schäffer AA, Glocker E *et al.* Linkage of autosomal dominant common variable immunodeficiency to chromosome 5p and evidence for locus heterogeneity. *Hum Genet* 2003; **112**:369–78.
- 35 Gollob JA, Li J, Kawasaki H *et al.* Molecular interaction between CD58 and CD2 counter-receptors mediates the ability of monocytes to augment T cell activation by IL-12. *J Immunol* 1996; **157**:1886–93.

Defective Fc-, CR1- and CR3-Mediated Monocyte Phagocytosis and Chemotaxis in Common Variable Immunodeficiency and X-linked Agammaglobulinemia Patients

A.L. Braga Amoras¹, H. Kanegane², T. Miyawaki², and M.M. dos Santos Vilela¹

¹Department of Pediatrics and Center for Investigation in Pediatrics-CIPED, School of Medical Sciences, State University of Campinas, Unicamp, Brazil, ²Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, Japan

Summary. Blood monocyte phagocytic functions were evaluated by chemotaxis, phagocytosis, and superoxide anion production in nine patients with common variable immunodeficiency (CVI), eight patients with X-linked agammaglobulinemia (XLA), and in 17 normal subjects. Further laboratory diagnosis included the determination of the Bruton's tyrosine kinase (Btk) protein expression in monocytes using flow cytometry. The analysis of monocyte phagocytic function demonstrated that CR3-, CR1-, and Fc-mediated phagocytosis ($p = 0.0001$) were significantly decreased in CVI and XLA patients, and chemotaxis of monocytes ($p = 0.0082$) was reduced in XLA patients. Superoxide anion production, however, did not differ between the CVI, XLA, and the control groups. The cytoplasmic expression of Btk protein in monocytes was normal in CVI patients and decreased or not detected in XLA patients. It is proposed that impaired chemotaxis and phagocytosis by monocytes may be a characteristic of the innate immune system in CVI and XLA patients, providing a new direction for the physiopathology of these immunodeficiencies.

Keywords: X-linked agammaglobulinemia, Bruton's tyrosine kinase, hypogammaglobulinemia, common variable immunodeficiency, flow cytometry, phagocytosis, chemotaxis, monocytes, NADPH oxidase, innate immunity

Introduction

Common variable immunodeficiency (CVI) is an incompletely defined syndrome characterized by a marked reduction in serum levels of both IgG (usually < 3.0 g/l) and IgA (< 0.05 g/l). IgM is also reduced (< 0.3 g/l) in about half of the patients. This condition is clinically more complex than X-linked agammaglobulinemia (XLA), with patients being prone to chronic inflammatory and autoimmune complications [1].

XLA is a B-cell deficiency caused by mutations in the Bruton's tyrosine kinase (Btk) gene. Btk protein is essen-

tial for B-cell survival, cell cycle progression, and proliferation in response to B-cell antigen receptor (BCR) stimulation [2].

A wide spectrum of immunological abnormalities have been related to the low immunoglobulin levels observed in CVI patients, such as intrinsic B-lymphocyte defects, defective helper T-cell function, excessive suppressor T-cell activity, defects in the function of dendritic cells, or abnormal antigen processing and presentation by macrophages [3–7]. Susceptibility genes for CVI within the MHC class II and III loci have been reported [8], but the fundamental cause of this disorder remains unknown.

The mononuclear phagocytic system is critical for natural immunity but also becomes adapted to play a central role in specific acquired immunity.

Monocytes express IgG Fc receptors (FcγRI (CD64) and FcγRII (CD32)), which mediate cell attachment and stimulate several signal transduction events [9, 10]. These receptors are important for the clearance of immune complexes and for internalization of IgG-coated cells or microorganisms.

CR3 (complement receptor 3, CD11b/CD18), a β2-integrin, activates leukocytes via signaling complexes and actin reorganization, mediates phagocytosis, and promotes leukocyte transmigration [11] and, therefore, has a key role in innate antimicrobial defenses.

CR1 (complement receptor 1, CD35), the C3b receptor on human erythrocytes, neutrophils, B-lymphocytes, and monocytes surface membranes [12] is also a receptor for mannan-binding lectin (MBL), a member of the collectin family, with opsonic function [13]. CR1 permits expression of the biological activity of the complement system and influences complement activation, promoting the uptake of C3b-bearing or C4b-bearing immune complexes in the plasma or on the surface of adjacent cells [14].

Although the function and integrity of the T- and B-lymphocyte systems have been extensively investigated, there have been few reports regarding the role of phagocytes in CVI and XLA.

This study aimed to further investigate the role of the innate immune system in CVI and XLA by evaluating, in peripheral blood, the chemotactic monocytic activities, monocyte phagocytosis of particles opsonized by IgG, C3b, and C3bi and superoxide anion production by monocytes and granulocytes.

Materials and Methods

Subjects

Nine patients with CVI, eight with XLA, ranging from 4 to 38 years of age (Table 1), were studied. The reference

population for the functional studies consisted of 17 healthy laboratory and health care workers. The diagnosis of CVI was based on established criteria, including reduction serum of IgG, IgA, and/or IgM by two or more standard deviations from the normal mean [1, 15], and the diagnosis of XLA was based on the decreased expression of Btk proteins in monocytes, markedly reduced levels of all major classes of immunoglobulins, and circulating B-cell numbers (< 1%) [16–18].

At the time of the study, 14 patients were receiving replacement therapy with intravenous immunoglobulin and three patients had never received immunoglobulin replacement therapy. The blood samples were collected at least 3 weeks after the administration of intravenous immunoglobulin.

All patients gave prior informed consent and the study had the approval of the local ethics committee.

Cell Preparation and Isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation.

Contaminating erythrocytes were hypotonically lysed. The leukocyte count was automatically determined (Coulter Counter model T 890, Hialeah, FL, USA) and adjusted to 2×10^7 cells ml^{-1} for the measurement of O_2^- in Hank's balanced salt solution. The final PBMC concentration was adjusted to 2×10^6 cells ml^{-1} for the measurement of chemotaxis and phagocytosis. Cell viability, as assessed by Trypan blue exclusion test, was greater than 96%.

Flow Cytometric Analysis of Cellular Btk Expression in Monocytes

Heparinized venous blood from patients was centrifuged onto Ficoll-Hypaque, and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from the interface. PBMC

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of common variable immunodeficiency patients

Patient/ Gender		Age at diagnosis	Serum Ig level (mg/dL)*			Peripheral B-cells (%)
			IgM	IgG	IgA	
P2	Male	11y	57.3	803	307	31.34
P3	Male	13y	1.8	100	0.0	11.93
P6	Male	27y	2	85	0.0	18.0
P9	Female	8y	483	0.8	0.0	12.55
P10	Female	3y	87	450	23.9	21.34
P14	Male	2y	46	569	24.5	24.57
P15	Male	12y	116	406	112	17.55
P16	Female	4y	29	433	10	15.21
P17	Male	19y	13.6	18.5	7.2	13.55

*Serum levels of immunoglobulins at age of diagnosis are shown

were washed three times in PBS pH 7.4, and analyzed by flow cytometry for Btk expression. PBMC were first stained with PE-labelled anti-CD14 (IgG2a; Dako, Japan) MoAb for 20 min on ice to discriminate monocytes from other cells. The cells were fixed (4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature), and permeabilized (0.1% Triton X-100 in Tris-buffered saline pH 7.4, with 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) for 5 min). These cells were reacted with 2 µg/ml of anti-BTK (48-2H) or control IgG1 (Dako, Japan) MoAb for 20 min on ice, washed, and further incubated with a 1:2000 dilution of FITC-conjugated goat anti-mouse IgG1 antibody (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) for 20 min on ice. The stained cells were analyzed by two-color flow cytometry (EPICS XL-MCL; Coulter Corp., Hialeah, FL, USA) [19].

Chemotactic Assays

Chemotaxis was evaluated using a modified Boyden method [20]. Five hundred µl of a 2×10^6 cells ml⁻¹ suspension was placed in the upper compartment of the Boyden chamber and 200 µl of the chemotactic factor was placed in the lower compartment. The two compartments were separated by a cellulose-ester filter membrane (Millipore) with an 8 mm pore size suitable for the migration of mononuclear cells. Spontaneous chemotaxis was determined using Hanks buffered salt solution (HBSS) in the lower chamber. Stimulated chemotaxis was performed using chemotactic factors obtained either from patient serum or pooled sera from healthy donors, incubated with 50 µg ml⁻¹ LPS (*E. coli* strain 026:B6 lipopolysaccharide, Sigma Chemical Co., USA) for 30 min at 37°C. The chemotaxis chamber was incubated for 2 h and the filters were then fixed, dried, made transparent, and placed on glass slides. The chemotactic assay results are expressed as the average of 20 measurements of the distance between the cell layer closest to the upper compartment and the field occupied by at least one cell using a microscope objective (40 ×) and its micrometer.

Phagocytosis Assays

Fc-, CR1-, and CR3-mediated phagocytosis was assayed using a modification of the method of Van Furth, Van Zwet, and Leigh [21].

Mononuclear leukocytes at a concentration of 1×10^6 cells/ml in HBSS were incubated in Leighton tubes containing a coverslip in a humid atmosphere with 5% CO₂ for 30 min at 37°C. The tubes were then washed by vigorous shaking in HBSS at room temperature and the cells adhering to the coverslip were incubated for a further 30 min with sheep erythrocytes (E) previously incubated with anti-E rabbit hemolysin (Instituto Butantã, São Paulo, Brazil) or zymosan particles (Z). EA were used for the

evaluation of receptors to the Fc portion of IgG, and zymosan for the evaluation of C3 receptors. In the latter experiments, zymosan particles were used without any previous incubation (Z-M) or after incubation with a pool of normal sera (Z-N) or with patient serum (Z-P). Coverslips were washed, fixed, and stained with hematoxylin-eosin for EA or Leishman for zymosan and mounted in Entellam. Four hundred monocytes were counted on each slide, and the cells that had phagocytized particles were identified morphologically with the aid of an immersion objective (100 ×). The "phagocytic index" is defined as the percentage of cells that phagocytized at least one particle and the "phagocytic capacity" as the number of particles ingested per 100 cells.

Measurement of Superoxide Anion

The production of O₂⁻ by neutrophils and mononuclear cells was assayed using a modified method of Cohen & Chovanec [22]. A suspension of neutrophils or mononuclear cells (2×10^6 ml⁻¹) was incubated with phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA, 30nm) in the presence of cytochrome c (81 µM) for 60 min at 37°C. The spontaneous superoxide anion release was determined using HBSS instead of PMA. Half of the tubes contained superoxide dismutase (SOD, 90 µM ml⁻¹) at the beginning of the experiment, as a control for the nonspecific reduction of cytochrome c. The reaction was stopped by placing the tubes in ice. Following the reaction, SOD (90 µM ml⁻¹) was added to tubes not already containing it. After centrifugation (2200 g for 15 min at 4°C), the absorbance of the supernatant was measured at 550 nm and the O₂⁻ production was calculated using an extinction coefficient of 21100 M⁻¹ cm⁻¹. All experiments were performed in duplicate. The results were expressed in O₂⁻ nmols/10⁶ cells/60'.

Statistical Analysis

Statistical analysis of results was made using the Mann-Whitney (not paired) and Kruskal-Wallis. The results are expressed as medians. Significance was defined as $p < 0.05$ [23].

Results

Flow Cytometric Analysis of BTK Expression in Monocytes

We first examined monocyte BTK expression in patients through use of a flow cytometric assay. Among 17 hypogammaglobulinemia patients, we found that eight patients exhibited a lack of circulating mature B-cells (< 1%). BTK expression in monocytes revealed that BTK deficiency (4.4 to 70.2%) was present in seven patients with

Table 2. Clinical and laboratory characteristics of X-linked agammaglobulinemia patients

Patient	Gender	Age at diagnosis	Serum Ig level (mg/dl)*			Peripheral B cells (%)	Btk (%)**	
			IgM	IgG	IgA		Patient	Mother
P1	Male	7y	14.4	33.0	0.0	0.3	9.0	53.8
P4	Male	6y	15	109	7	0.0	25.6	51.1
P5	Male	14y	15	203	53.9	0.04	70.2	58.5
P7	Male	7y	10	240	0.6	0.0	26.3	49
P8	Male	8y	3.4	54	0.0	0.19	13.3	39.8
P11	Male	6y	60	0.0	40	0.96	4.4	Nd
P12	Male	2y	2	22	2	0.0	97	97
P13	Male	10y	0.0	150	20	0.0	9.0	22.4

* Serum levels of immunoglobulins at age of diagnosis are shown. ** Indicate a proportion of BTK—positive cells in monocytes. Nd: deceased

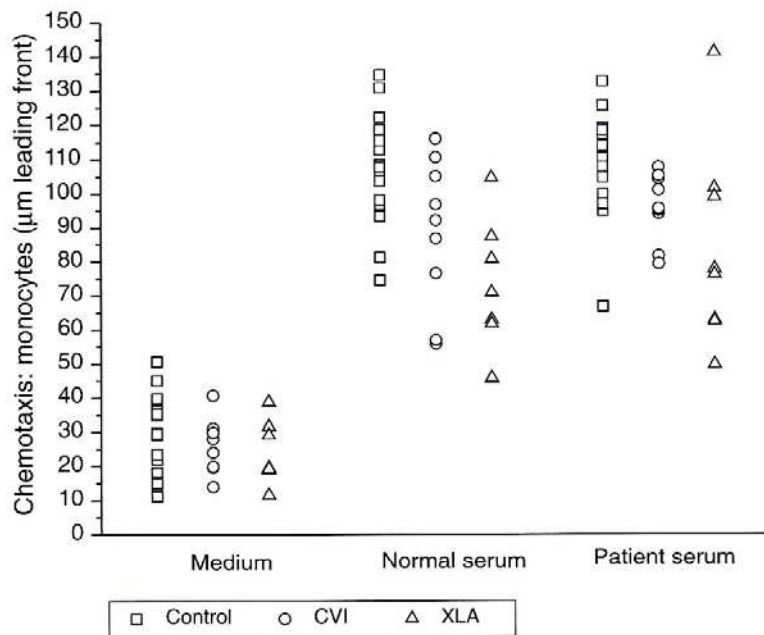


Figure 1. Scatter plot illustration of monocyte chemotaxis *in vitro* from common variable immunodeficiency (CVI) patients, X-linked agammaglobulinemia (XLA) patients, and controls

presumed XLA (Table 2). Importantly, the mosaic pattern of BTK expression in monocytes was obtainable in all of their mothers except P12, indicating that they were obligate XLA carriers. In contrast, P12 and mother had normal BTK expression, implying a non-XLA immunodeficiency. Few cases with XLA show BTK expression comparable to normals [18, 19].

Chemotactic Assays

The chemotactic assay was measured by μm leading front. The results demonstrated that the spontaneous mi-

gration of monocytes in CVI patients was 28.08, 19.46 in XLA patients, and 29.57 in the control group, without statistical differences among the three groups ($p = 0.5723$).

When LPS-induced chemotaxis of monocytes was measured in the presence of normal serum ($p = 0.0018$), the migration in CVI patients was 92.18, 66.97 in XLA patients, and 107.75 in the control group. Migration was 95.55 in the CVI patients, 77.01 in XLA patients, and 110.85 in the control group, when the patients' serum was used ($p = 0.0082$), demonstrating a significant decrease in the chemotaxis of monocytes in the XLA patients, in comparison to the normal group

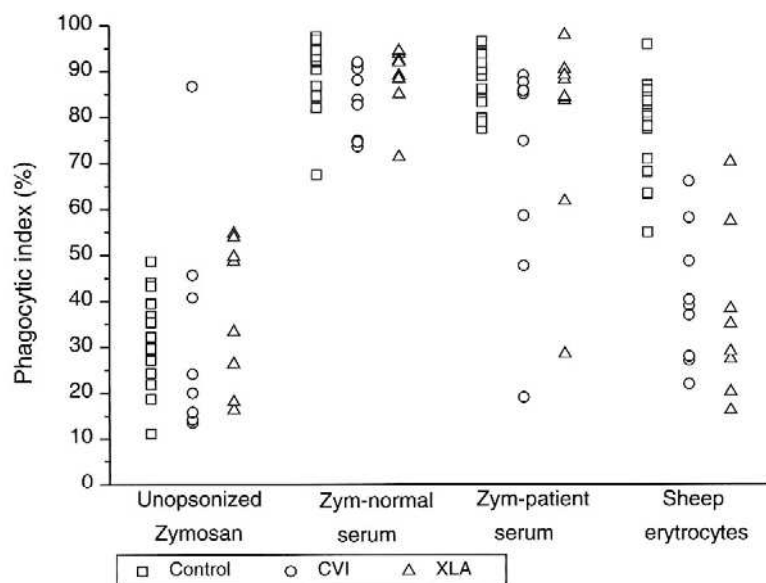


Figure 2. Scatter plot illustration of zymosan phagocytic index of monocytes from common variable immunodeficiency (CVI) patients, X-linked agammaglobulinemia (XLA) patients, and controls

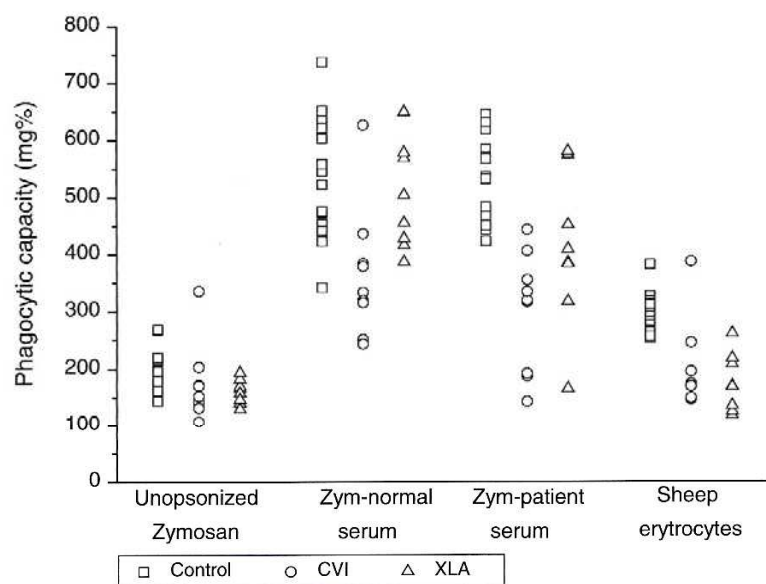


Figure 3. Scatter plot illustration of Zymosan particle phagocytic capacity of monocytes from common variable immunodeficiency (CVI) patients, X-linked agammaglobulinemia (XLA) patients, and controls

Phagocytosis

The monocyte phagocytic index for nonopsonized zymosan was 22.05 in CVI patients, 40.96 in XLA, and 31.0 in the control group, and no difference was demonstrated among the three groups ($p = 0.4104$).

The phagocytic index for opsonized zymosan with patient's serum was 84.97 in the CVI group, 86.08 in XLA, and 90.29 in the control group ($p = 0.0325$), while pooled serum from normal donors was 83.82 in the CVI patients,

90.37 in XLA, and 92.16 in the control group ($p = 0.0759$). The phagocytic index for EA was 38.82 in the CVI patients, 31.83 in XLA, and 79.96 in the control group ($p < 0.0001$), demonstrating a significant difference among the three groups (Figure 2).

The monocyte phagocytic capacity for nonopsonized zymosan was 170.67 in CVI patients, 162.0 in XLA, and 196.0 in the control group, demonstrating a difference ($p = 0.0283$) between the XLA and control groups.

The phagocytic capacity for opsonized zymosan with

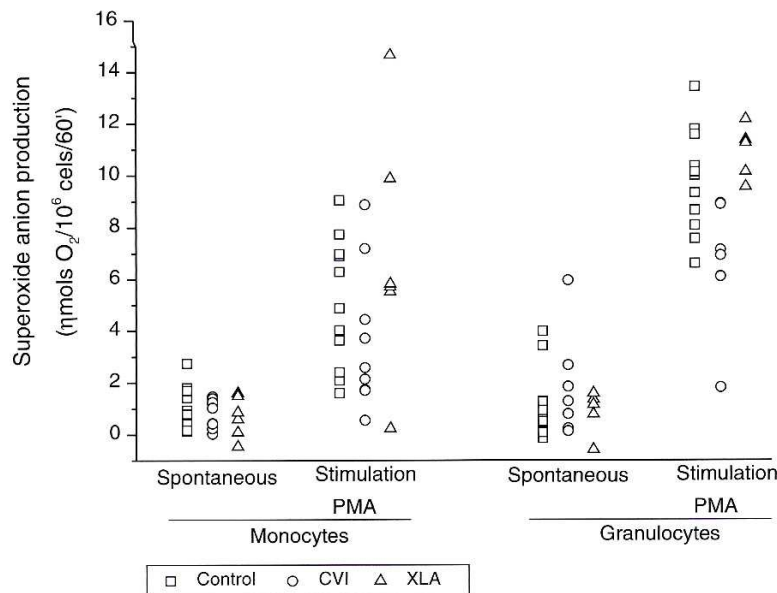


Figure 4. Scatter plot illustration of superoxide anion released by monocytes and granulocytes from common variable immunodeficiency (CVI) patients, X-linked agammaglobulinemia (XLA) patients, and controls

the patient's serum was 320.0 in the CVI group, 397.93 in XLA, and 533.0 in the control group, demonstrating a significant difference ($p = 0.0001$) among the three groups. With pooled serum from normal donors, the capacity was 334.0 in the CVI patients, 480.09 in XLA, and 523.0 in the control group, demonstrating differences between the CVI group and the control and XLA groups ($p = 0.0042$). The monocyte phagocytic capacity for EA was 169.83 in the CVI patients, 168.82 in XLA, and 299.0 in the control group, demonstrating a significant difference ($p < 0.0001$) among the three groups (Figure 3).

Measurement of Superoxide Anion

The superoxide anion assay was measured by $\text{O}_2^-/\text{10}^6/60'$. The spontaneous superoxide anion production by monocytes in the CVI patients was 1.04 (0.04 ~ 5.97), 0.73 (-0.46 ~ 1.61) in XLA compared to 0.94 (0.16 ~ 2.75) in the control group ($p = 0.3963$); following PMA-stimulation this production was 2.59 (0.56 ~ 8.89) in the CVI patients, 5.77 (0.24 ~ 14.67) in XLA, and 4.88 (1.61 ~ 9.06) in the control group ($p = 0.3391$). The spontaneous superoxide anion production by granulocytes in the CVI patients was 1.05 (0.14 ~ 5.97), 1.15 (-0.59 ~ 1.58) in XLA, and 0.83 (-0.14 ~ 3.99) in the control group ($p = 0.5952$), and after PMA-stimulation the production was 6.93 (1.82 ~ 8.95) in the CVI patients, 11.27 (9.57 ~ 12.18) in XLA, and 10.02 (6.62 ~ 13.45) in the control group, demonstrating a significant difference ($p = 0.0031$) between CVI patients and control group (Figure 4).

Discussion

This study demonstrated that important functions of the monocytes such as chemotactic activity and phagocytosis were severely impaired in CVI and XLA patients. The impaired phagocytosis could be attributed to different levels of expression of Fc γ receptor, complement receptor, and mannose-binding lectin (MBL) receptor, which are involved in clearance of immune complexes and in the internalization of IgG-coated cells or microorganisms.

Spontaneous migration of monocytes in CVI and XLA patients was normal. However, LPS-induced chemotaxis of the XLA patients' monocytes was markedly reduced and did not recover after control serum administration, suggesting defective chemotaxis caused by a probable intrinsic cell or membrane receptor defect for monocyte complement.

The XLA patients' monocytes were not capable of mounting a normal phagocytic capacity for nonopsonized zymosan, not even after opsonization of zymosan particles with normal human serum and patients' serum. The monocyte phagocytic index for opsonized zymosan with normal human serum and patients' serum was also decreased in the CVI and XLA patients when compared with the control group.

The persistence in the decrease of the phagocytic function, even after sera from normal individuals was added to provide adequate conditions for zymosan opsonization, suggests the presence of a quantitative or functional deficiency of the CR1, CR3 receptors, and collectins, which are necessary for the phagocytosis of opsonized zymosan.

The demonstration of a decreased phagocytic capacity of XLA monocytes for nonopsonized zymosan compared

to the control monocytes suggests the possibility of reduced expression or a functional blockage of the mannose-fucose receptors and CR3 in this group of patients.

In this experiment, the monocytes had evolved phagocytic receptors, such as CR1 and CR3 receptors, which promote phagocytosis of zymosan opsonized by C3b and C3bi, and the MBL receptor, which promotes phagocytosis of nonopsonized zymosan.

MBL belongs to the collectin family and acts as a ligand for the MBL receptor, which binds carbohydrates with terminal mannose and fucose found in zymosan, promoting phagocytosis. MBL can also interact with C1s and C1r to activate the classic complement pathway [24].

In our study, the monocyte phagocytic index and the capacity to phagocytose sheep erythrocytes (EA) were also severely decreased in the CVI and XLA patients when compared with the control group.

The Fc γ receptor promotes phagocytosis of sheep erythrocytes (EA) opsonized by IgG (rabbit IgG anti-sheep red blood cells). The mechanism whereby the interaction of opsonized particles with Fc γ receptors triggers the engulfment of opsonized particles remains incompletely understood, although activation of tyrosine kinases has been recognized as an early step [25].

In order to investigate whether this decreased phagocytosis in CVI and XLA individuals could be attributed to a different level of expression of Fc γ receptor or complement receptors, the surface expression of these receptors will have to be determined.

The analysis of spontaneous and PMA-stimulated activity of the NADPH oxidase system of monocytes did not demonstrate a significant difference in patients when compared to healthy controls. However, the analysis of PMA-stimulated activity in the NADPH oxidase system of granulocytes demonstrates a difference between the patients and the control group.

The deficit of mononuclear phagocytic function observed in CVI patients may be associated with defects of the humoral and cellular immune response, caused by failure of tissue macrophages to process and present antigens. The blockage in the early step of B-cell maturation caused by a defective Btk gene, as observed in the XLA, may also be responsible for causing a reduction in Fc receptor gene expression in these patients.

In conclusion, the results suggest that impaired chemotaxis and phagocytosis of monocytes may be a characteristic of CVI and XLA patients, providing a new direction for the physiopathology of these particular immunodeficiencies.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant 98/13420-6 and Japan International Cooperation Agency (JICA). The authors thank E.C. Cambiucci for technical assistance.

References

1. Cunningham-Rundles, C., Bodian, C., Common variable immunodeficiency: Clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999, 92(1):34–48.
2. Petro, J.B., Rahman, S.M., Ballard, D.W., Khan, W.N. Bruton's tyrosine kinase is required for activation of IkB kinase and nuclear factor κ B in response to B-cell receptor engagement. *J Exp Med* 2000, 191(10):1745–1754.
3. Gaspar, H.B., Conley, M.E. Early B-cell defects. *Clin Exp Immunol* 2000, 119:383–389.
4. Eibl, M.M., Mannhalter, J.W., Zielinski, C.C., Ahmad, R. Defective macrophage-T-cell interaction in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 1982, 22:316–322.
5. Eibl, M.M., Mannhalter, J.W., Zlabinger, G., Mayr, W.R., Tilz, G.P., Ahmad, R., Zielinski, C.C. Defective macrophage function in a patient with common variable immunodeficiency. *N Engl J Med* 1982, 307:803–806.
6. Farrant, J., Bryant, A.E., Lever, A.M.L., Edwards, A.J., Knight, S.C., Webster, A.D.B. Defective low-density cells of dendritic morphology from the blood of patients with common variable hypogammaglobulinemia: Low immunoglobulin production on stimulation of normal B-cells. *Clin Exp Immunol* 1985, 61:189–194.
7. 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.
8. Schaffer, F.M., Palermos, J., Zhu, Z.B., Barger, B.O., Cooper, M.D. Individuals with IgA deficiency and common variable immunodeficiency share polymorphisms of major histocompatibility complex class III genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:8015–8019.
9. Schreiber, A.D., Rossman, M.D., Levinson, A.I. The immunobiology of human Fc γ receptors on hematopoietic cells and tissue macrophages. *Clin Immunol Immunopathol* 1992, 62:566–572.
10. Crowley, M.T., Costello, P.S., Fitzer-Attas, C.J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V.L., De Franco, A.L. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages. *J Exp Med* 1997, 186(7):1027–1039.
11. Ehlers, M.R. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* 2000, 2(3):289–294.
12. Fearon, D.T., Austen, K.F. The alternative pathway of complement: A system for host resistance to microbial infection. *N Engl J Med* 1980, 303:259–263.
13. Ghiran, I., Barbashov, S.F., Klickstein, L.B., Tas, S.W., Jensenius, J.C., Nicholson-Weller, A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J Exp Med* 2000, 192(12):1797–1808.
14. Ross, G.D., Medof, M.E. Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3. *Adv Immunol* 1985, 37:217–267.
15. Conley, M.E., Notarangelo, L.D., Etzioni, A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. *Clin Immunol* 1999, 93(3):190–197.
16. Sideras, P., Smith, C.I. Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. *Adv Immunol* 1995, 59: 135–223.
17. Ochs, H.D., Smith, C.L. X-linked agammaglobulinemia. *A J Invest Allergol Clin Immunol* 2003; Vol. 13(3): 181–188

- clinical and molecular analysis. *Medicine* 1996, 75:287–299.
18. Kanegane, H., Futatani, T., Wang, Y., Nomura, K., Shinozaki, K., Matsukura, H., Kubota, T., Tsukada, S., Miyawaki, T. Clinical and mutational characteristics of X-linked agammaglobulinemia and its carrier identified by flow cytometric assessment combined with genetic analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 108(6):1012–1020.
 19. Futatani, T., Miyawaki, T., Tsukada, S., Hashimoto, S., Kunikata, T., Arai, S., Kurimoto, M., Niida, Y., Matsuoka, H., Sakiyama, Y., Iwata, T., Tsuchiya, S., Tatsuzawa, O., Yoshizaki, K., Kishimoto, T. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood* 1998, 91:595–602.
 20. Boyden, S.V., Jr. The chemotactic effect of mixture of antibody and antigen in polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1962, 115:453–466.
 21. Van Furth, R., Van Zwet, T.L., Leijh, P.C.J. *In vitro* determinations of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In D.M. Weir (Ed.), *Handbook of experimental immunology* (3rd ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1978, 32.1–32.19.
 22. Cohen, H.J., Chovanic, M.E. Superoxide release measured continuously at 37°C by following SOD-inhibitable reduction of ferricytochrome C at 550 nm. *J Clin Invest* 1978, 61:1081–1085.
 23. Conover, W.J. In *Practical nonparametric statistics*. New York: Wiley 1971, 206–216.
 24. Turner, M.W. Mannose-binding lectin: The pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996, 17(11):532–540.
 25. Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Schreiber, A., Zhang, W.J., Grinstein, S. Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fcγ receptors in macrophages. *J Exp Med* 1997, 186(6):955–966.

Maria Marluce dos Santos Vilela, PhD

Pediatrics Department and Center for Investigation in Pediatrics
CIPED, School of Medical Sciences
State University of Campinas—UNICAMP
P.O. Box 6111, 13083–970
Campinas, SP
Brazil
Tel. +55 19 3788-8959
Fax +55 19 3788-8980
E-mail marluce@head.fcm.unicamp.br