

**ELEVADOS NÍVEIS DE CÉLULAS NKT NA DOENÇA GRANULOMATOSA
CRÔNICA ASSOCIADA À HIPOTIREOIDISMO AUTOIMUNE:
UM RELATO DE CASO**

*HIGH LEVELS OF NKT CELLS IN CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE ASSOCIATED
WITH AUTOIMMUNE HYPOTHYROIDISM: A CASE REPORT*

Francisco Sales de Albuquerque Filho¹; Marina Cadena da Matta², Paula Teixeira Lyra Marques³; Ana Carla Augusto Moura Falcão⁴; Jailson de Barros Correia MD PhD⁵; João Bosco de Oliveira Filho⁶ MD, PhD; Leuridan Cavalcante Torres PhD⁷.

¹ Aluno do curso de graduação de Medicina da Faculdade Pernambucana de Saúde e bolsista do Programa de Iniciação Científica-PIBIC IMIP/CNPq

² Biomédica, Doutoranda em Saúde Materno Infantil pelo Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

³ Médica Alergologista Pediátrica, Doutoranda em Saúde Materno Infantil pelo Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

⁴ Médica Alergologista Pediátrica, Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

⁵ Médico Clínico Geral, Doutor em Patologia pela Universidade de São Paulo (USP)

⁶ Médico Pediatra, Docente da Pós-graduação *stricto sensu* do IMIP

⁷ Doutora em Imunologia pela Universidade de São Paulo (USP), Docente da Pós-graduação *stricto sensu* do IMIP

***Autor correspondente:**

Leuridan Cavalcante Torres, PhD

Instituto de Medicina Integra Prof. Fernando Figueira (IMIP),

Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

Rua dos Coelhos, 300. Boa Vista

CEP 50070-550

Telefone: 81 98659 6766

E-mail: leuridan.torres@gmail.com

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a resposta imune celular de uma paciente com o diagnóstico de doença granulomatosa crônica (DGC) e hipotireoidismo autoimune. **MÉTODOS:** Foi realizada a análise de uma paciente que aos 14 anos apresentava suspeita de DGC e diagnóstico de hipotireoidismo autoimune pela clínica e detecção sérica de autoanticorpos tireoidianos anti-TPO e anti-Tireoglobulina. E aos 16 anos, foi confirmado o diagnóstico de DGC pelo teste da dihidrorodamina (DHR 123). O estudo foi realizado no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) e Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP no período de agosto de 2014 a julho de 2015. Para análise da resposta imune celular, foi realizada a imunofenotipagem das células T, B, NK, NKT e iNKT por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD27, anti-CD16, anti-CD56, anti-iTCR. Os valores obtidos da paciente foram comparados a um controle saudável e aos valores de referência para a população Brasileira. **RESULTADOS:** A paciente apresentou valores absolutos normais de leucócitos totais ($5.700 \text{ células/mm}^3$), neutrófilos ($2.747 \text{ células/mm}^3$), linfócitos ($2.502 \text{ células/mm}^3$) e plaquetas ($220.000/\mu\text{L}$). Valores relativos e absolutos normais de linfócitos T totais ($1873 \text{ células/mm}^3$, percentil 50-90), TCD8+ (416 células/mm^3 , percentil 10-50), TCD4+ ($1166 \text{ células/mm}^3$, percentil 50-90) e relação CD4+/CD8+ normal (2,8). Valores absolutos diminuídos de células NK (86 células/mm^3 , percentil $< p10$). Valores relativos e absolutos normais de linfócitos B totais (465 células/mm^3 , percentil 10-50). Valores percentuais diminuídos de células B de memória (8,58%) quando comparados ao controle saudável (44,39%). Elevado percentual de células NKT totais (7,61%) e subpopulações de células iNKT (1%) quando comparado ao controle saudável (2,58% e 0,4%, respectivamente). **CONCLUSÃO:** Conclui-se que existe uma associação entre IPDs e doenças autoimunes. O estudo sugere que exista envolvimento das células NKT na fisiopatologia do hipotireoidismo autoimune. Os resultados desse estudo são inéditos na literatura, e contribuirá para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune celular nas doenças autoimunes.

Palavras-chaves: Doença granulomatosa crônica, células NKT, hipotireoidismo autoimune.

ABSTRACT

OBJECTIVE: Evaluation of the cellular immune response in a patient diagnosed with chronic granulomatous disease (CGD) and autoimmune hypothyroidism. **METHODS:** Analysis of a 14 years old patient with suspected CGD and diagnosis of autoimmune hypothyroidism by clinical signs and the serum detection of autoantibodies anti-thyroid peroxidase and anti-thyroglobulin. At the age of 16, the diagnosis of CGD was confirmed by the dihydrorhodamine (DHR 123). The study was performed at the Prof. Fernando Figueira Integral Medicine Institute (IMIP) and at IMIP's Translational Research Laboratory from August 2014 to July 2015. In order to analyze the cellular immune response, immunophenotyping by flow cytometry of the T, B, NK, NKT e iNKT cells were performed, by applying the monoclonal antibodies anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD27, anti-CD16, anti-CD56, anti-iTCR. The patient's acquired cell levels were compared to a healthy control and to reference values for the Brazilian population. **RESULTS:** The patient showed normal levels of total leucocytes ($5,700 \text{ cells/mm}^3$), neutrophils ($2,747 \text{ cells/mm}^3$), lymphocytes ($2,502 \text{ cells/mm}^3$) and platelets ($220,000/\mu\text{L}$). Relative and absolute levels of total T lymphocytes ($1,873 \text{ cells/mm}^3$, 50th-90th percentile), TCD8⁺ (416 cells/mm^3 , 10th-50th percentile), TCD4⁺ ($1,166 \text{ cells/mm}^3$, 50th-90th percentile) were normal. The CD4⁺/CD8⁺ ratio was normal (2.8). It was observed reduced absolute levels of NK cells (80 cells/mm^3 , 10th percentile). Normal relative and absolute levels of total B lymphocytes (465 cells/mm^3 , 10th-50th percentile). Relative levels of memory B cells were reduced (8.58%), when compared with healthy control (44.39%). Elevated percentage levels of total NKT cells (7.61%) and subset of iNKT cells (1%) when compared with a healthy control (2.58% and 0.4%, respectively). **CONCLUSION:** In summary, it was observed an association between primary immunodeficiencies and autoimmune diseases. The study suggests that there is an involvement of NKT cells in the pathophysiology of the autoimmune hypothyroidism. The results of this work are unpublished in the literature, and will contribute to a better comprehension of the underlying mechanisms of the cellular immune response to autoimmune diseases.

Keywords: Chronic granulomatous disease, NKT cells, autoimmune hypothyroidism.

1. INTRODUÇÃO

As Imunodeficiências Primárias (IDP) são geralmente raras, porém como grupo sua frequência é de aproximadamente 1:1.200 na população em geral, estimando que exista nos Estados Unidos 250.000 afetados para uma população de 310 milhões. (1,2). As IDPs possuem mais de 180 diferentes tipos, e manifestam-se geralmente nos primeiros anos de vida, acompanhadas de complicações, e com elevada mortalidade (3). Além disso, existe um grupo de IDPs bem caracterizadas como monogênicas, em que os afetados sistematicamente apresentam manifestações de autoimunidade e em alguns casos, já nos primeiros meses de vida (4). Este grupo de doenças fala a favor de que existam alguns genes, que quando sofrem determinadas mutações, podem, por si, levar a manifestações autoimunes graves, aparentemente em muitos casos sem a necessidade de grande influência de fatores ambientais. A frequência das doenças autoimunes (DAI) nos países ocidentais alcança hoje entre 5 e 7% da população geral e encontra-se em ascensão. Admite-se que a interação de fatores genéticos e ambientais constitua a base da patogenia das DAIs. Nas duas primeiras décadas da vida, as DAIs mais comumente identificadas são as tireoidopatias, o diabetes mellitus tipo 1, a artrite idiopática juvenil (AIJ), a doença celíaca, a púrpura trombocitopênica imune, o lupus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) e a hepatite autoimune (HAI).

1.1 Doença granulomatosa crônica e Hipotieroidismo autoimune

Dentre as IDPs, destaca-se a Doença Granulomatosa Crônica (DGC) que faz parte do grupo de doenças de defeitos de fagócitos. Em 2013, estudo realizado em centro de referência no Brasil mostrou que dos 1008 pacientes com IDPs, aproximadamente 3,9% apresentavam DGC (3). A DGC é caracterizada pela deficiência da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo

fosfato (NADPH) oxidase presente nos fagócitos. A NADPH participa da formação de espécies reativas de oxigênio (*ROS – reactive oxygen species*). Este processo é nomeado de *burst oxidativo* e possui um papel importante na eliminação de microorganismos (2,5,6).

As doenças tireoidianas autoimunes (DTAI) como a Doença de Graves e a Tireoidite de Hashimoto (TH), resultam de uma desregulação do sistema imune que leva a uma resposta imune celular e humoral contra autoantígenos presentes na tireóide (7). A TH é caracterizada pela produção de autoanticorpos antitireoglobulina (anti-Tg) e anti-tireoperoxidase (anti-TPO), e infiltração de linfócitos no parênquima da tireoide, causando à destruição progressiva da glândula, e, conseqüentemente, ao hipotireoidismo (8). As DTAI são consideradas os distúrbios autoimunes mais frequentes, as quais possuem etiologia multifatorial como a hereditariedade e fatores ambientais, sendo também associadas a outras doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide, sendo a *diabetes mellitus* tipo I (DMTI) a mais associada (7,9,10).

1.2 Células Natural Killer T (NKT)

Na resposta imune celular, diversas populações têm sido associadas às doenças autoimunes, incluindo as células *Natural Killer T* (NKT). As NKT reconhecem glicolipídeos no contexto de moléculas CD1d expressas por células nucleadas, entre elas, estão as células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, linfócitos B e macrófagos. As moléculas CD1d são responsáveis pela apresentação de antígenos glicolipídicos para as células NKT que expressam receptores de células NK (CD56 e NK1.1) e receptores do complexo de reconhecimento antigênico de células T (CD3 e TCR) (11,12). Além disso, existem as subpopulações de células *invariant NKT* que apresentam receptores de antígeno de células T

(*invariant TCR Va14Ja18 - iTCR*) e o marcador CD3 (6). As células iNKT estão envolvidas com o aumento ou supressão da resposta imune por meio da rápida produção de citocinas próinflamatórias e antiinflamatórias. As células iNKT ativadas promovem uma produção importante de citocinas (Interferon (IFN)- γ , Interleucina (IL)-4 e IL-17) e de proteínas citotóxicas (granzima B e perforina) (13). As citocinas estimulam diferentes respostas imunes de acordo com os padrões secretados, o que pode apresentar a uma cascata de eventos que resultará na ativação de várias outras células incluindo *Natural killers* (NK), neutrófilos e macrófagos (13). Por esta razão, existem vários estudos na literatura que relatam em modelo experimental e seres humanos a associação das iNKT com doenças autoimunes e câncer (11,14–16).

Diante disto, considerando que as IDPs podem estar associadas à autoimunidade, o objetivo deste trabalho foi investigar a resposta imune celular em uma paciente com DGC e hipotireoidismo autoimune.

2. MÉTODOS

2.1 Avaliação clínica

A paciente aos 14 anos apresentava suspeita de DGC e diagnóstico de hipotireoidismo autoimune com detecção sérica de autoanticorpos tireoidianos anti-TPO (11,1UI/ μ L) e anti-Tireoglobulina (10,2UI/ μ L).

Aos 16, anos, foi confirmado o diagnóstico de DGC pelo teste da dihidrorodamina (DHR) 123 com índice de oxidação de neutrófilos ION = 10 (Valor de referencia ION > 80). Ao exame físico, apresentava peso de 53,4kg (> 48^o percentil), estatura de 1,56 m (> 15^o percentil), afebril e anictérica, com um episódio de púrpura trombocitopênica idiopática (PTI), colelitíase, infecções de repetição (pneumonia e varicela disseminada), abscesso hepático, e esplenomegalia. Os exames laboratoriais mostraram concentrações séricas normais de IgG (1793 mg/dL, percentil 50-90), IgA (383 mg/dL, percentil 50-90) e IgM (168 mg/dL, percentil 50-90) de acordo com a faixa etária. Baixas concentrações séricas de tiroxina - T4 livre (0,97 ng/dL), elevadas de hormônio tireoestimulante - TSH (17,06 mUI/L) e normais de tri-iodotironina (T3 - 168 ng/dL). Não houve detecção de autoanticorpos p-ANCA, FAN e anti-músculo liso, com exceção c-ANCA com títulos 1/40. Concentrações normais de transaminases hepáticas (TGO e TGP), fosfatase alcalina e gama-GT. Proteína C reativa e velocidade de hemossedimentação foram normais.

2.2 Imunofenotipagem T, B, NK, NKT e iNKT

A imunofenotipagem de linfócitos T totais (CD3⁺), linfócitos TCD4⁺ (CD3⁺/CD4⁺), linfócitos TCD8⁺ (CD3⁺/CD8⁺), linfócitos B (CD19⁺), linfócitos B de memória (CD19⁺/CD27⁺/IgD⁻), células NK (CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺), células NKT (CD3⁺/CD56⁺) e células

iNKT (CD56+/CD3⁺/iTCR⁺) foi realizada por citometria de fluxo em sangue periférico. Os anticorpos monoclonais BD Pharmingen utilizados foram anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD27, anti-CD16, anti-CD56, anti-iTCR.

3. RESULTADOS

3.1 Investigação imunológica

Ela apresentou valores absolutos normais de leucócitos totais (5.700 células/mm³), neutrófilos (2.747 células/mm³), linfócitos (2.502 células/mm³) e plaquetas (220.000/μL). Valores relativos e absolutos normais de linfócitos T totais (1873 células/mm³, percentil 50-90), TCD8⁺ (416 células/mm³, percentil 10-50), TCD4⁺ (1166 células/mm³, percentil 50-90) e relação CD4⁺/CD8⁺ normal (2,8). Valores absolutos diminuídos de células NK (86 células/mm³, percentil < p10) quando comparados aos valores de referência para a população Brasileira (17). Valores relativos e absolutos normais de linfócitos B totais (465 células/mm³, percentil 10-50). Valores percentuais diminuídos de células B de memória (8,58%) quando comparados ao controle saudável (44,39%). Elevado percentual de células NKT totais (7,61%) e subpopulações de células iNKT (0,7%) quando comparado ao controle saudável (2,58% e 0,2%, respectivamente) (**Figura 1 e Figura 2**).

4. DISCUSSÃO

A paciente tem como doença de base, a DGC, que foi a causa de diversas infecções graves de repetição durante a infância, porém neste período não havia relato clínico de alterações autoimune. Isso sugere que as repetidas infecções por patógenos, principalmente por bactérias extracelulares, possam promover a ativação de células envolvidas em doença autoimune. As

células NKT participam da resposta imune contra patógenos extracelulares, incluindo bactérias e fungos, os quais são os principais patógenos associados à DGC (5,18). A DGC é caracterizada pela deficiência da produção de espécies reativas de oxigênio, substância com ação microbicida produzida principalmente por neutrófilos e macrófagos, os quais são componentes celulares da imunidade inata, sendo a primeira linha de defesa do organismo (19). A falta destes mecanismos de resposta contra patógenos bacterianos na DGC pode levar a ativação de outras populações celulares que também fazem parte da imunidade inata, como as células NKT.

Estudos relatam que repetidas infecções aumentam a expressão da molécula CD1d nas células apresentadoras de antígenos e com isso, uma ativação exacerbada de células NKT, com elevada produção de citocinas inflamatórias, que de forma persistente, pode levar a uma resposta imune inadequada (20). A ativação e proliferação de clones celulares autorreativos, os quais participam de mecanismos de resposta autoimunes, podem causar doenças como a tireoidite autoimune (TA) (18). Alguns autores demonstraram em modelo animal que a TA está relacionada com uma elevada ativação das células NKT (21,22). Estes autores sugerem que a apresentação da tireoglobulina no contexto de moléculas CD1d na glândula tireoidiana leva a uma resposta de células NKT contra a tireoide, causando a sua lesão tecidual (22).

Na avaliação da imunidade celular foram observados percentuais diminuídos de células B de memória, sendo esses achados previamente descritos em pacientes com DGC (23). Além disso, a redução desta população tem sido associada a outros tipos de imunodeficiências primárias e doenças autoimunes (24). Também se verificou que a paciente apresentou redução no número absoluto de células NK. Alguns autores relataram que existe uma associação entre a deficiência de células NK e doenças autoimunes (25).

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que existe uma associação entre IPDs e doenças autoimunes. O estudo sugere que exista envolvimento das células NKT na fisiopatologia do hipotireoidismo autoimune. Os resultados desse estudo são inéditos na literatura, e contribuirá para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune celular nas doenças autoimunes.

REFERÊNCIA

1. Bonilla F a, Geha RS. 12. Primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 Suppl):S571–81.
2. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 SUPPL. 2):182–94.
3. Carneiro-Sampaio M, Moraes-Vasconcelos D, Kokron CM, Jacob CM a, Toledo-Barros M, Dorna MB, et al. Primary immunodeficiency diseases in different age groups: A report on 1,008 cases from a single Brazilian reference center. *J Clin Immunol*. 2013;33(4):716–24.
4. Carneiro-Sampaio M, Coutinho A. Tolerance and Autoimmunity: Lessons at the Bedside of Primary Immunodeficiencies. *Adv Immunol*. 2007;95(07):51–82.
5. Holland SM. Chronic Granulomatous Disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. Elsevier Inc; 2013;27(1):89–99.
6. Abbas, Abul K. Lichtman, Andrew H. H., Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 2014.
7. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A, Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev*. Elsevier B.V.; 2015;14(2):174–80.
8. Kumar V, Abbas AK, Aster J. *Robbins Basic Pathology*. 9th ed. Saunders; 2013. 928 p.
9. Szyper-Kravitz M, Marai I, Shoenfeld Y. Coexistence of thyroid autoimmunity with other autoimmune diseases: friend or foe? Additional aspects on the mosaic of autoimmunity. *Autoimmunity*. 2005;38(3):247–55.
10. Patrizio Caturegli, Hiroaki Kimura RR and NRR. Autoimmune thyroid diseases. *Horumon To Rinsho*. 2007;19:44–8.
11. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest*. 2004;114(10):1379–88.
12. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2013;13(2):101–17.
13. Pichavant M, Rémy G, Bekaert S, Le Rouzic O, Kervoaze G, Vilain E, et al. Oxidative stress-mediated iNKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal Immunol*. Society for Mucosal Immunology; 2014 May;7(3):568–78.

14. Brigl M, Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:817–90.
15. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:877–900.
16. Van Kaer L, Joyce S. Innate immunity: NKT cells in the spotlight. *Curr Biol.* 2005;15(11):10–3.
17. Moraes-Pinto MI, others. Valores de referência de linfócitos/mm³ em população brasileira saudável. *Gr Prim Immunodefíc Disord.* 2006;3:1–4.
18. Gapin L. iNKT cell autoreactivity: what is “self” and how is it recognized? *Nat Rev Immunol.* 2010;10(4):272–7.
19. Kang EM, Marciano BE, Deravin S, Zarembek K a., Holland SM, Malech HL. Chronic granulomatous disease: Overview and hematopoietic stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol.* Elsevier Ltd; 2011;127(6):1319–26.
20. Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(6):405–17.
21. Burek CL, Sharma RB, Rose NR. NKT cell regulation of autoimmune thyroiditis. *Autoimmunity.* 2003;36(6-7):405–8.
22. Sharma RB, Fan X, Caturegli P, Rose NR, Burek CL. Invariant NKT Cell Lines Derived from the NOD·H2 Mouse Enhance Autoimmune Thyroiditis. *J Thyroid Res.* 2011;2011:895923.
23. Cotugno N, Finocchi A, Cagigi A, Di Matteo G, Chiriaco M, Di Cesare S, et al. Defective B-cell proliferation and maintenance of long-term memory in patients with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol.* Elsevier Ltd; 2015 Mar;135(3):753–61.e2.
24. Rivas JDJ, Brocardo GA, Kokron C, Rizzo LV, Kalil J, Barros MT. Caracterização imunofenotípica de linfócitos B de memória na deficiência de IgA e imunodeficiência comum variável. 2010;33(1):23–31.
25. Schleinitz N, Vély F, Harlé JR, Vivier E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology.* 2010;131(4):451–8.

FIGURAS

Figura 1- Valores relativos de células NKT ($CD3^+/CD56^+$), iNKT ($CD3^+/iTCR^+$), NK ($CD56^+/CD16$). (A) Paciente e (B) Controle saudável.

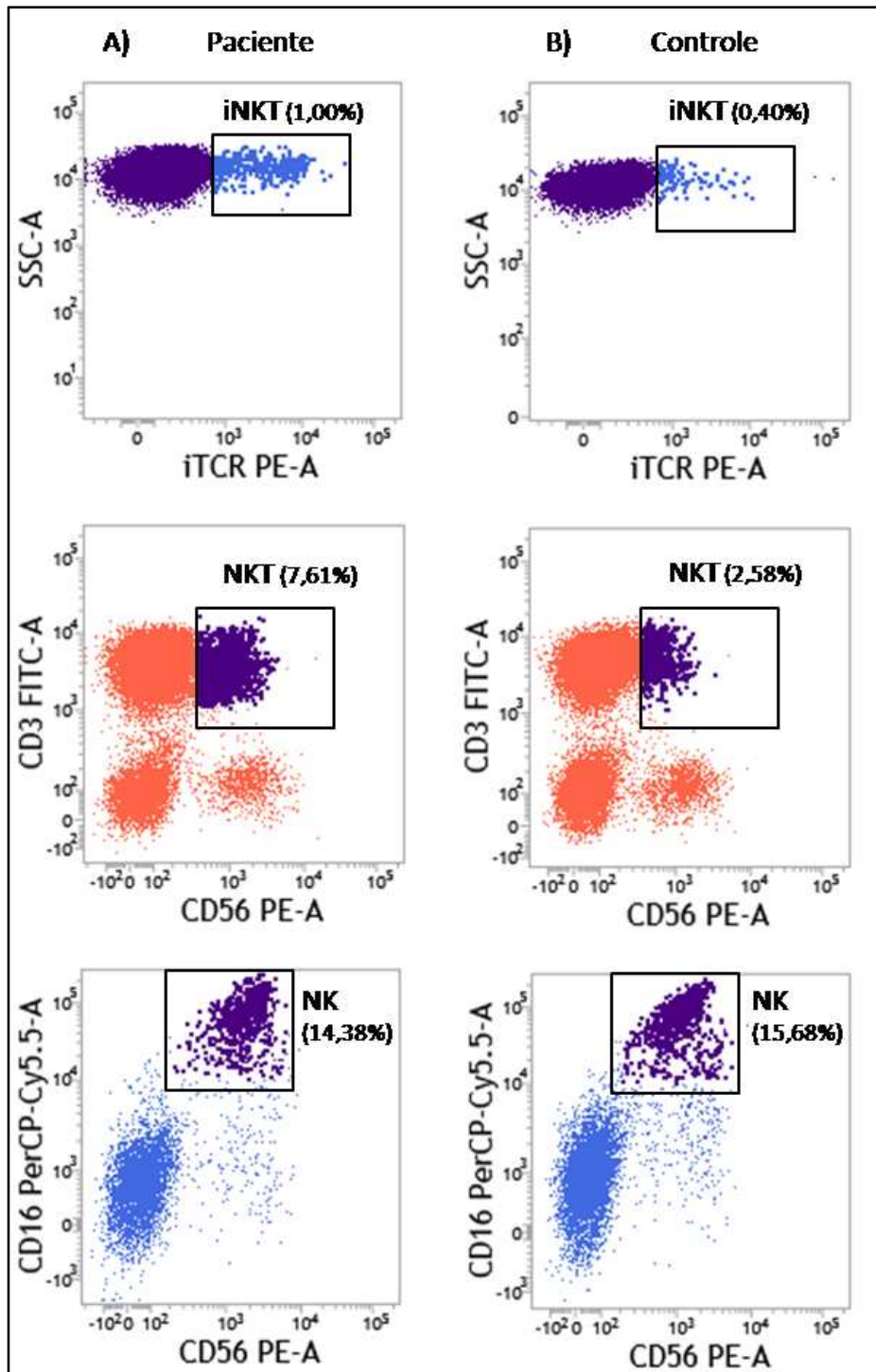


Figura 2- Valores relativos de células linfócitos B Totais (CD19⁺) e células B de Memória (CD19⁺/CD27⁺). (A) Paciente e (B) Controle saudável.

