

---

ARTIGO ORIGINAL

---

## Comparação da secreção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) entre pacientes com nefropatia da IgA e deficiência de IgA.\*

### *Comparison of the cytokine secretion (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) among patients with IgA nephropathy and IgA deficiency*

JM Benitez<sup>1</sup>, RT Barros<sup>2</sup>, CVG Cevallos<sup>3</sup>, LV Rizzo<sup>4</sup>, C Kokron<sup>5</sup>, V Woronik<sup>6</sup>, J Kalil<sup>7</sup>, MT Barros<sup>8</sup>

#### Resumo

**Objetivo:** A nefropatia primária da IgA (NIgA) e a deficiência de IgA (DIgA) constituem as formas mais comuns de glomerulonefrite e de deficiência primária de anticorpos, respectivamente, despertando interesse especial o fato de ambas envolverem distúrbios contrastantes da produção da IgA. O objetivo deste trabalho foi comparar os níveis de citocinas possivelmente implicadas na produção da IgA (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) em pacientes com NIgA ou DIgA.

**Casística e Métodos:** Foram estudados 18 pacientes com NIgA (hematúria microscópica e proteinúria persistente ou intermitente e biópsia renal percutânea com depósito de IgA em mesângio glomerular detectado por imunofluorescência), sendo nove do gênero masculino e nove do feminino, com média de idade de 33,2 anos; 17 pacientes com DIgA (níveis séricos de IgA menores do que 7 mg/dL e níveis normais ou elevados de IgG e IgM), sendo 13 do gênero masculino e quatro do feminino, com média de idade de 25,5 anos; dez voluntários sadios (dois do gênero masculino e oito do feminino com média de idade de 30,7 anos). As citocinas foram quantificadas por método imunoenzimático em sobrenadante de cultura de PMBC após 48 horas de estímulo com fitohemaglutinina.

**Resultados:** Foram observados: 1) níveis elevados de IL-5 e de IL-10 e baixos de IL-6 em pacientes com NIgA em relação aos pacientes com DIgA e controles sadios; 2) níveis semelhantes de IL-4 em ambos grupos de pacientes e mais elevados na NIgA em comparação aos controles sadios; 3) níveis similares de todas as citocinas testadas em pacientes com DIgA e controles sadios.

#### Abstract

**Objectives:** Immunoglobulin A nephropathy (IgAN) and selective IgA deficiency (IgAD) represent the most common forms of glomerulonephritis and primary immunodeficiency, respectively. It is of special interest that both are associated with disturbances in IgA synthesis. Our objective was to quantify and compare levels of IgA production-related cytokines (IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10) in patients with IgAN or IgAD.

**Patients and Methods:** A total of 35 patients, in two groups, were studied. One patient group consisted of 9 males and 9 females (mean age, 33.2), all with IgAN (microscopic hematuria with persistent or intermittent proteinuria, and glomerulonephritis as defined by the presence of glomerular IgA deposits). The other patient group comprised 13 males and 4 females (mean age 25.5), all with IgAD (serum IgA levels lower than 7 mg/dL, with normal or elevated levels of IgG and IgM). A control group of 10 healthy volunteers (2 males and 8 females) was also studied. Using ELISA, we measured cytokines in the supernatant from peripheral blood mononuclear cells after 48 hours of stimulation with phytohemagglutinin.

**Results:** We observed that: 1) IL-5 and IL-10 levels were higher and IL-6 levels were lower in patients with IgAN than in patients with IgAD; 2) levels of IL-4 were comparable between IgAN and IgAD patients but were higher in patients with IgAN than in the controls.

---

\* Trabalho agraciado com o prêmio Osvaldo Seabra no XXX Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia em 2003.

**Conclusões:** Os níveis elevados de IL-5 encontrados na NIgA reforçam a importância desta citocina na síntese de IgA, cujos níveis séricos estão aumentados em aproximadamente 50% dos casos; os níveis elevados de IL-4 e IL-5 encontrados nestes pacientes sugerem que estas duas citocinas possam estar envolvidas na glicosilação da IgA e seu conseqüente depósito em mesângio renal; os níveis elevados de IL-10 e baixos de IL-6 observados em pacientes com NIgA reforçam a hipótese de que a IL-10 esteja implicada na síntese da IgA em humanos e sugerem que esta citocina possa desempenhar um papel regulador sobre a produção de IL-6.

*Rev. bras. alerg. imunopatol. 2004; 27(3):82-93* nefropatia da IgA, deficiência de IgA, citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)

1 - Mestre em Ciências- Área de Alergia e Imunopatologia – FMUSP, Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia – Departamento de Clínica Médica – FMUSP; 2 - Doutor em Medicina, Disciplina de Nefrologia – Departamento de Clínica Médica – FMUSP; 3 - Doutora em Ciências - Área de Alergia e Imunopatologia – FMUSP, Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia – Departamento de Clínica Médica – FMUSP; 4 - Professor Livre-Docente, Departamento de Imunologia ICB-USP; 5 – Doutora em Pediatria – UNIFESP, Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia - Departamento de Clínica Médica – FMUSP; 6 - Doutora em Medicina, Disciplina de Nefrologia - Departamento de Clínica Médica – FMUSP; 7 - Professor Titular, Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia – FMUSP; 8 - Doutora em Microbiologia e Imunologia – UNIFESP, Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia - FMUSP

## Introdução

A doença de Berger ou nefropatia mesangial primária da IgA (NIgA) é uma das formas de glomerulonefrite mesangial, podendo ser distinguida das demais pela imunofluorescência do tecido renal. Evidencia-se nesta situação, a presença de depósitos granulares dominantes da imunoglobulina A no mesângio, com distribuição global e difusa<sup>6,17</sup>.

Atualmente, a nefropatia da IgA constitui a glomerulopatia primária mais comum em escala mundial, mas as variações na sua distribuição geográfica são muito grandes<sup>16</sup>. No Brasil, o Registro Paulista de Biópsias Renais mostra que a nefropatia da IgA corresponde a 17% das glomerulonefrites primárias<sup>37</sup>.

Em geral, há poucos sinais clínicos característicos, como a hematúria e a proteinúria, que podem ser persistentes ou intermitentes<sup>6,17</sup>. Podem ocorrer episódios de hematúria macroscópica ao lado de dor lombar, muitas vezes coincidentes com in-

**Conclusions:** The fact that levels of IL-5 were elevated in patients with IgAN reinforces the important role played by this cytokine in IgA synthesis, serum levels of which were elevated in approximately 50% of these patients. In addition, the finding that IL-4 and IL-5 levels were elevated in these patients suggests that these two cytokines may be involved in IgA glycosylation and consequent deposition in renal mesangial cells. Moreover, the fact that these IgAN patients had elevated levels of IL-10 and low levels of IL-6 supports the hypothesis that IL-10 is involved in IgA synthesis in humans and indicates that it may play a regulatory role in IL-6 production.

*Rev. bras. alerg. imunopatol. 2004; 27(3):82-93* IgA nephropathy, IgA deficiency, cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)

fecções do trato respiratório superior, sendo mais freqüentes acima dos 40 anos de idade<sup>16</sup>.

A causa da nefropatia da IgA permanece desconhecida, não havendo demonstração consistente de que agentes ambientais infecciosos estejam envolvidos na indução da resposta do isótipo A<sup>22</sup>.

Os mecanismos patogênicos básicos possivelmente implicados na nefropatia da IgA têm sido abordados sob três aspectos: 1) aumento da produção de IgA na medula óssea<sup>8, 10, 16, 19</sup>; 2) vida média aumentada por retardo no clareamento plasmático da IgA e conseqüente deposição mesangial<sup>3, 39, 40, 45</sup>; 3) distúrbios na troca de isótipos das imunoglobulinas ("switch") com defeito na produção da imunoglobulina A<sup>4, 10, 25</sup> e subclasses de IgG<sup>34</sup>.

Na NIgA observa-se aumento dos níveis séricos desta imunoglobulina de duas a três vezes em relação ao nível normal, em aproximadamente 50% dos casos, despertando interesse o fato de que os depósitos glomerulares parecem conter exclusivamente a subclasse IgA1<sup>16</sup>. As células B do sangue periférico de pacientes apresentam secreção espontânea anormal desta imunoglobulina<sup>19</sup> ou produção aumentada após estímulo com mitógenos<sup>18</sup>. Linfócitos B normais em co-culturas com linfócitos T histocompatíveis de pacientes com nefropatia mesangial produzem altos níveis de IgA (apud 10). Como a síntese de IgA é fortemente dependente de células T, é possível que estas anormalidades influenciem a ativação de linfócitos B produtores de IgA.

Em pacientes com nefropatia da IgA, estudos com injeção *in vivo* de complexos imunes contendo IgA, indicam a existência de eliminação

(“clearance”) retardada desta imunoglobulina<sup>45</sup>. Esses resultados sugerem a existência de função anormal dos receptores celulares para IgA<sup>39,40</sup> ou possível associação com anomalias estruturais desta imunoglobulina<sup>3, 39</sup> que levaria ao retardo do seu clareamento sérico.

Despertam interesse especial as citocinas envolvidas na troca de isótipos das imunoglobulinas, tendo em vista o arranjo genômico seqüencial para  $\alpha 1$ ,  $\gamma 2$  e  $\gamma 4$  no cromossoma 14 humano (5' -  $\mu$  -  $\delta$  -  $\gamma 3$  -  $\gamma 1$  -  $\alpha 1$  -  $\gamma 2$  -  $\gamma 4$  -  $\epsilon$  -  $\alpha 2$  - 3')<sup>1</sup>. Em pacientes com nefropatia da IgA, foi demonstrado que o TGF-  $\beta 1$ , em associação com IL-10, foi capaz de induzir a troca de isótipo para a produção de IgA<sup>4,25</sup>. Experimentalmente, a estimulação de células B de murinos *in vitro* com IL-4 e IL-5 determinou um defeito na glicosilação da IgA, semelhante àquele de pacientes com NIGa<sup>10</sup>.

Contraopondo-se à nefropatia da IgA, onde ocorre aumento da produção desta imunoglobulina, a deficiência de IgA (DIgA) caracteriza-se pela produção diminuída deste mesmo isótipo, com valores séricos menores do que 7 mg/dl, ao lado de níveis normais de IgG e IgM<sup>12</sup>. Constitui a mais comum das imunodeficiências primárias de anticorpos, com uma prevalência de 1:600 a 1:800 na população geral<sup>12</sup>. A deficiência da IgA predispõe a várias doenças, tais como atopias, infecções recorrentes, doenças do trato gastrointestinal, doenças auto-imunes e neoplasias, sendo que esta suscetibilidade para manifestações clínicas tão diversas ainda não foi totalmente esclarecida<sup>21,27</sup>.

Têm sido descritos alguns mecanismos fisiopatológicos prováveis na deficiência de IgA que conduzem ao bloqueio da diferenciação de células B maduras com IgA de superfície para células plasmáticas secretoras de anticorpos, tais como: 1) Deficiências intrínsecas do linfócito B, com retardo na sua diferenciação e comprometimento das células secretoras para IgA1 e IgA2 ou para IgG2 e IgG4<sup>12</sup>; 2) Alteração na função de células T com diminuição da atividade T auxiliadora ou aumento da atividade T supressora<sup>44</sup>; 3) Alteração na função e/ou produção de citocinas. Neste contexto, Müller *et al*<sup>42</sup> encontraram valores séricos significativamente mais baixos de TGF-  $\beta$  em pacientes com DIgA quando comparados a controles sadios. De France *et al*<sup>15</sup> observaram que a produção de IgA por linfócitos de pacientes com DIgA pode ser eficientemente regulada *in vitro*

pela adição de IL-10 em culturas de células B ativadas com anticorpos anti-CD40. Também em alguns pacientes com deficiência de IgA associada à deficiência de IgG2, a resposta deficiente para a síntese destas imunoglobulinas parece ser decorrente da diminuição da produção de IL-6<sup>4</sup>.

Tendo em vista a importância das citocinas na síntese das imunoglobulinas, o objetivo deste trabalho foi comparar os níveis de citocinas possivelmente implicadas na síntese da IgA (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) em pacientes com nefropatia da IgA ou com deficiência de IgA.

### Casuística

Após aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Instituição, foram estudados 35 indivíduos adultos, divididos em dois grupos.

**Grupo NIGa:** constituído por 18 pacientes (nove homens e nove mulheres), com idades entre 18 e 67 anos (média 33,2 e mediana de 25,5anos) e diagnóstico previamente estabelecido de nefropatia da IgA. Os critérios diagnósticos adotados foram: hematúria microscópica e proteinúria persistente ou intermitente e biópsia renal percutânea, com depósito de IgA em mesângio glomerular detectado por imunofluorescência<sup>6</sup> (Tabela 1).

**Grupo DIgA:** constituído por 17 pacientes com DIgA (13 homens e 4 mulheres), com idades entre 10 e 56 anos (média 25,5 e mediana de 23,0 anos), definida pela presença de níveis séricos de IgA menores do que 7mg/dL e níveis normais ou elevados de IgG e IgM<sup>12</sup>. (Tabela 1).

**Grupo Controle Sadio (CS):** constituído por 10 voluntários com níveis normais de imunoglobulinas séricas (2 homens e 8 mulheres), com idades entre 22 e 36 anos (média 30,7 e mediana de 30,5 anos). Critérios de inclusão: ausência de quaisquer sintomas e parâmetros laboratoriais normais, sem uso freqüente de medicações.

**Características clínicas e laboratoriais.** dos pacientes com nefropatia da IgA e deficiência de IgA, estão relacionadas na Tabela 1.

**Quantificação das citocinas.** Células mononucleares foram obtidas, após separação por gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia<sup>®</sup>), de uma amostra de 25 mL de sangue periférico heparinizado. A quantificação das citocinas foi realizada no sobrenadante de cultura de 48 horas de células estimuladas com fitohemaglutinina (PHA), segundo a técnica de Waithe<sup>50</sup>, sendo considerados normais os índices de proliferação

maiores ou iguais a 10. Os sobrenadantes foram estocados a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o uso. As dosagens de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 foram realizadas por método imunoenzimático disponível comercialmente (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis), de acordo com as especificações do fabricante. As

amostras de sangue foram colhidas em períodos durante os quais os pacientes com NIgA ou DIgA estavam clinicamente estáveis. Os limites de detecção para as várias citocinas são: IL-4: 10 pg/mL; IL-5: 3,0 pg/mL; IL-6: 0,7 pg/mL; IL-10: 50 pg/mL.

**Tabela 1** - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com nefropatia de NIgA e deficiência de DIgA

Características	NIgA	DIgA
Número de pacientes	18	17
Média de idade (variação)	33,2 (18-67)	25,5 (10 -57)
Mediana de idade (anos)	25,50	23,0
Masculino / feminino	9/9	13/4
Hematúria microscópica	15 (83,33%)	0
Hematúria macroscópica	8 (44,44%)	0
Proteinúria > 1 g/dL	4 (22,22%)	0
Creatinina (entre 1,2 e 2,5 mg/dL)	9 (50%)	0
Infecções de repetição	0	11 (64,70%)
Atopia	6 (33,33%)	11 (64,70%)
Auto-imunidade	0	4 (23,52%)
IgA sérica > 350 mg/dL	5 (29,41%)	0
IgA sérica < 7 mg/dL	0	17(100,0%)'
IgE sérica > 100 UI/mL	1 (14,28%)	12 (70,58%)
Biópsia renal	18 (100,00%)	Não realizada
Proliferação mesangial	15 (83,33%)	
Expansão segmentar da matriz	8 (44,44%)	

Níveis normais de imunoglobulinas em adultos - IgA: 153-359 mg/dL; IgE: até 100 UI/mL.

**Análise estatística.** Para comparação dos grupos foram utilizados testes de diferença de proporção, Kruskal-Wallis (H). Os testes não paramétricos de Mann-Whitney foram utilizados para a correlação entre dois grupos. O nível de significância adotado foi de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ). Níveis des-

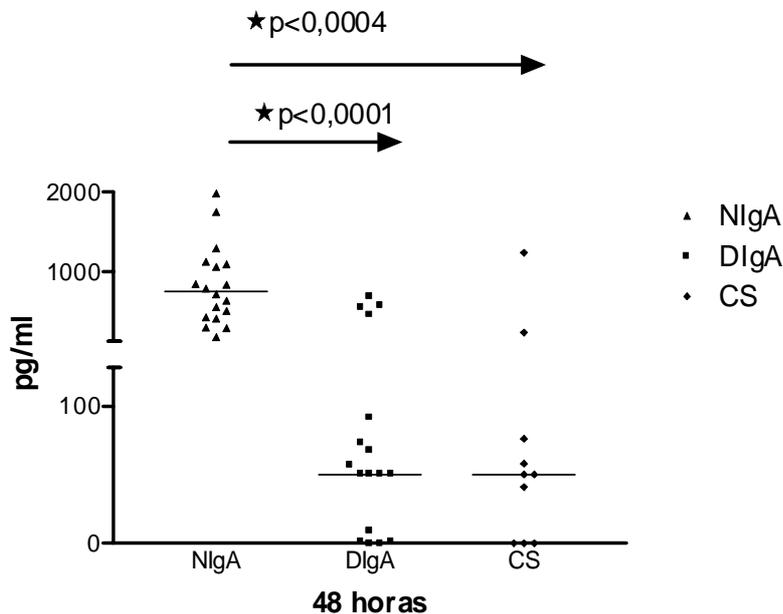
critivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significativos.

**Resultados**

**Níveis de IL-10.** Os níveis de IL-10 foram mais elevados nos sobrenadantes de cultura dos pacientes com nefropatia da IgA (mediana de

753,3 e percentil 25-75% de 471,4 -1080,0) em comparação aos indivíduos com deficiência de IgA (mediana de 50,0 e percentil 25-75% de 90,0 – 73,0) ( $p < 0,0001$ ) e controles sadios (mediana de 50,0 e percentil 25-75% de 20,5 – 67,0)

( $p = 0,0004$ ) (Figura 1). Em todos os pacientes com NIgA foram detectados níveis de IL-10 acima de 150 pg/mL, ao contrário do observado no grupo com DIgA (4/17 = 23,52%) e controles sadios (2/10 = 20%) (Figura 1).



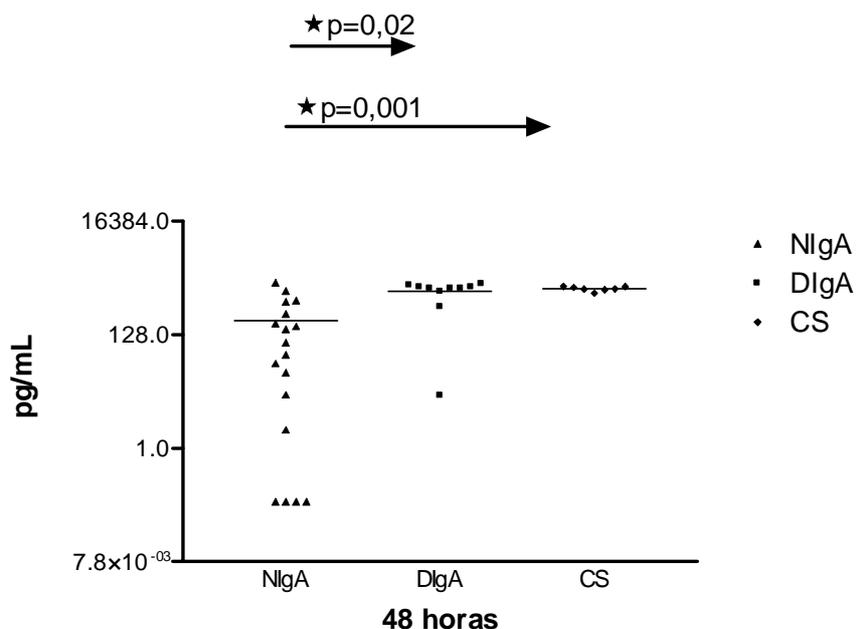
**Figura 1** – Concentrações de IL-10 no sobrenadante de cultura de 48 horas de células mononucleares do sangue periférico, após estímulo com PHA, em pacientes com Nefropatia de IgA (NIgA; n =18), Deficiência de IgA (DIgA; n = 17) e controles sadios (CS; n = 10)

**Níveis de IL-6.** Os níveis de IL-6 (mediana de 71,8 e percentil 25-75% de 5,9 – 254,2) foram mais baixos em pacientes com NIgA em comparação àqueles encontrados entre pacientes com DIgA (mediana de 923,5 e percentil 25-75% de 854,0 – 966,0) ( $p = 0,02$ ) ou controles sadios (mediana de 896,0 e percentil 25-75% de 872,0 – 973,0) ( $p < 0,01$ ) (Figura 2). Também foi observado que apenas um dos pacientes com NIgA (1/18 = 5,56%) apresentou nível de IL-6 acima da mediana encontrada para o grupo de deficiência de IgA e que em 6 entre 18 (33,33%) pacientes, os níveis de IL-6 foram indetectáveis (4/18 = 2,22%) ou estavam abaixo de 10 pg/mL (2/18 = 11,11%) (Figura 2).

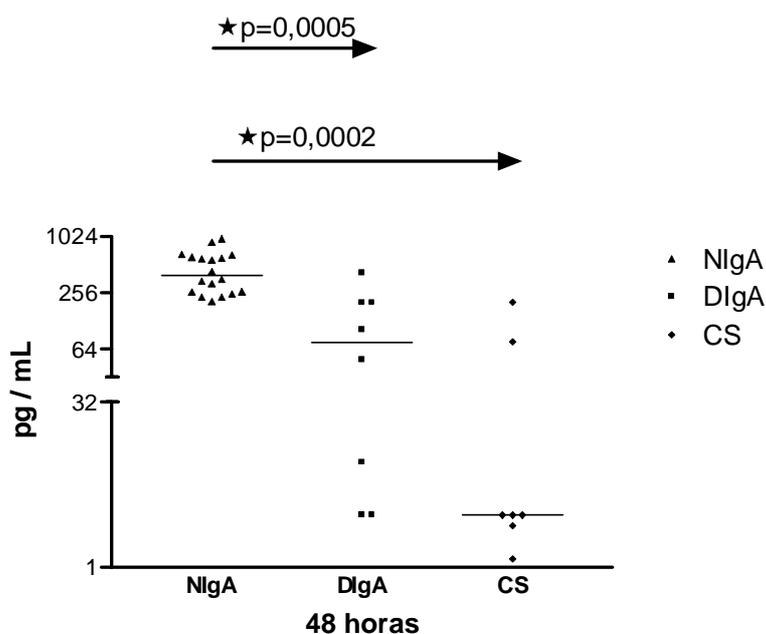
**Níveis de IL-5.** Durante análise comparativa entre os vários grupos de estudo, foram observados níveis de IL-5 mais elevados em pacientes com NIgA (mediana de 393,5 e percentil 25-75% de 261,5 – 606,5) do que em pacientes com DIgA (mediana de 75,5 e percentil 25-75% de 6,0 – 199,5) ( $p = 0,0005$ ) ou controles sadios (mediana de 3,0 e percentil 25-75% de 2,7 – 39,5) ( $p <$

0,0002). Por outro lado, os níveis de IL-5 não diferiram entre pacientes com deficiência de IgA e indivíduos sadios ( $p = 0,1206$ ) (Figura 3). Níveis variáveis de IL-5 foram encontrados nos grupos de DIgA ou controles sadios, estando em níveis baixos (menores do que 10 pg/mL) em 32,5% e 56,28% dos indivíduos, respectivamente. Por outro lado, no grupo de NIgA, os níveis de IL-5 estavam elevados em todos os pacientes (Figura 3).

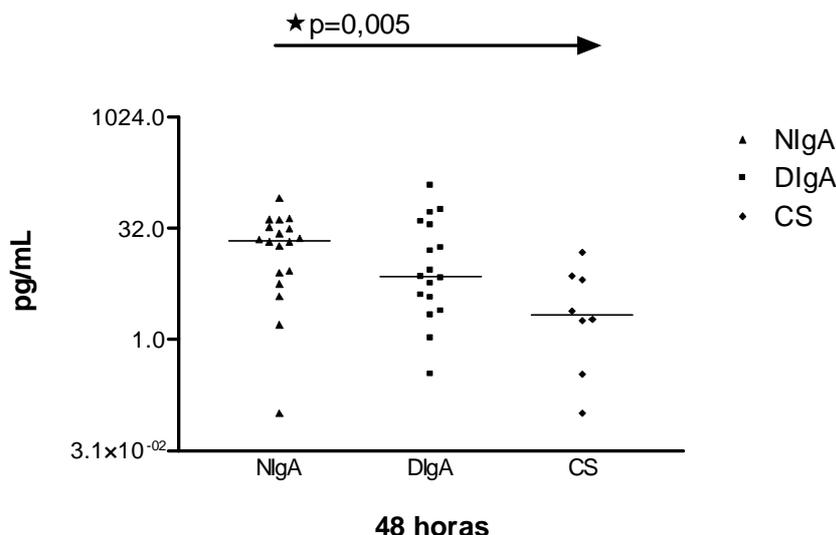
**Níveis de IL-4.** Os níveis de IL-4 foram similares nos sobrenadantes de cultura dos pacientes com nefropatia da IgA (mediana de 21,8 e percentil 25-75% de 8,2 – 32,5) ou deficiência de IgA (mediana de 7,1 e percentil 25-75% de 3,7 – 17,4) ( $p = 0,29$ ). No entanto, durante análise em separado de pacientes com NIgA e o grupo controle sadio (mediana de 2,2 e percentil 25-75% de 1,1 – 6,8), foram observados níveis médios de IL-4 mais altos nos pacientes nefropatas ( $p = 0,005$ ). Em relação ao grupo de pacientes com DIgA, foi observada forte tendência para a mesma diferença, embora sem significado estatístico ( $p = 0,054$ ) (Figura 4).



**Figura 2** – Concentrações de IL-6 no sobrenadante de cultura de 48 horas de células mononucleares do sangue periférico, após estímulo com PHA, em pacientes com Nefropatia de IgA (NIgA; n= 18), Deficiência de IgA (DIgA; n= 10) e controles sadios (CS; n = 7)



**Figura 3** – Concentrações de IL-5 no sobrenadante de cultura de 48 horas de células mononucleares do sangue periférico, após estímulo com PHA, em pacientes com Nefropatia de IgA (NIgA; n = 18), Deficiência de IgA (DIgA; n = 8) e controles sadios (CS; n = 7).



**Figura 4** – Concentrações de IL-4 (pg/mL) em sobrenadante de cultura de 48 horas de células mononucleares do sangue periférico, após estímulo com PHA, em pacientes com Nefropatia de IgA (NIgA; n=18), Deficiência de IgA (DIgA; n=17) e controles sadios (CS; n= 8)

**Teste de linfoproliferação.** A resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico, analisada pela contagem de cpm e índice de estimulação frente ao mitógeno PHA, foi similar entre os vários grupos estudados ( $p = 0,13$ ). Durante a análise comparativa entre os grupos de pacientes, foi observada tendência a menor resposta linfoproliferativa entre pacientes com NIgA do que em pacientes com DIgA, embora sem significância estatística ( $p = 0,058$ ).

## Discussão

A nefropatia da IgA constitui a forma mais comum de glomerulonefrite em alguns países do mundo<sup>14,16, 20</sup>, enquanto a deficiência de IgA constitui a forma mais comum entre as imunodeficiências primárias de anticorpos<sup>12</sup>. No entanto, a etiologia e patogênese destas doenças permanecem desconhecidas, despertando interesse especial o fato de ambas envolverem distúrbios contrastantes da produção da imunoglobulina A.

Embora a predominância de citocinas de perfil Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) ou Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13) tenha sido estabelecida em algumas formas de glomerulonefrite, não há evidências definitivas de que isto ocorra em pacientes com NIgA. Alguns investigadores têm demonstrado predominância de citocinas de perfil Th1<sup>33</sup>, Th2<sup>18, 51</sup> ou de ambas populações<sup>46</sup>.

Nesta investigação, quantificamos os níveis das citocinas IL-4 e IL-5, com o objetivo de caracterizar o perfil Th2. Em relação à IL-4, não houve diferença entre os dois grupos de pacientes, embora os níveis observados na NIgA tenham sido mais elevados do que aqueles obtidos para os controles sadios.

Estes dados estão de acordo com outros relatos na literatura<sup>11, 18, 26, 30, 47, 51</sup>. Assim, produção aumentada de IL-4 (que promove a troca de isótipo de imunoglobulinas) foi observada em pacientes com NIgA e seus parentes próximos<sup>47</sup>. Também a expressão de IL-4 em PBMC, em células Th ou em ambas pode estar aumentada em pacientes com NIgA, quando determinada por expressão de mRNA<sup>18, 30</sup> ou por Elisa<sup>51</sup>. Considerando os dados observados no presente estudo e em relatos anteriores, é possível que a IL-4 esteja envolvida tanto *in vitro* como *in vivo* na produção aumentada da IgA em pacientes com NIgA<sup>11</sup>. Por outro lado, Lai *et al*<sup>33</sup> demonstraram que a expressão de IL-4 em pacientes com NIgA estava normal durante avaliação realizada por método imunoenzimático.

Nesta investigação, os níveis de IL-5 estavam aumentados em pacientes com NIgA em comparação aos grupos de DIgA e controles sadios, estando de acordo com outros autores<sup>28,33</sup>.

A IL-5, produzida principalmente por linfócitos Th2 e mastócitos ativados; atua não apenas sobre eosinófilos, mas também sobre células B, aumentando a secreção da imunoglobulina A<sup>1</sup>. Examinando mecanismos de ativação da célula B pela IL-5, Harriman<sup>29</sup> observou aumento da secreção de IgA apenas por linfócitos B com IgA<sup>+</sup> de superfície, sugerindo que a IL-5 seja capaz de induzir diferenciação terminal de células B IgA<sup>+</sup> para células secretoras de imunoglobulina A. Durante estudos em pacientes com deficiência de IgA, Lio *et al.* (1998)<sup>36</sup> observaram que a IL-5 exógena foi capaz de reconstituir a síntese de IgA *in vitro*.

Neste estudo, níveis variáveis de IL-5 foram encontrados nos grupos de DIgA ou controles normais, estando em níveis baixos (menores do que 10 pg/mL) em 32,5% e 56,28% dos indivíduos, respectivamente. Por outro lado, os níveis de IL-5 estavam elevados em todos os pacientes com NIgA. A análise conjunta dos dados, que evidenciou níveis mais elevados de IL-5 nos pacientes com nefropatia do que em pacientes com DIgA, reforça a hipótese de que a IL-5 seja uma das citocinas promotoras da diferenciação de linfócitos B para células produtoras de IgA<sup>29,38,43</sup>.

A recorrência de depósitos de IgA no mesângio de rins obtidos de doadores são transplantados para pacientes com NIgA sugere que uma das causas desta nefropatia seja o aumento dos níveis circulantes de IgA<sup>122</sup> ou alterações estruturais da molécula de IgA<sup>40</sup>. Nos últimos anos, alguns pesquisadores demonstraram que na NIgA ocorre defeito da glicosilação da molécula de IgA<sup>39</sup>, posteriormente atribuída à deficiência da enzima beta-1-3-galactosiltransferase<sup>3</sup>. Mais recentemente, outros pesquisadores observaram defeito na glicosilação também da IgA<sup>1</sup> extraída do tecido renal de pacientes com NIgA<sup>2</sup>.

Durante um elegante experimento *in vitro*, Chintalacharuvu & Emancipator<sup>10</sup> estimularam células B murinas com IL-4 e IL-5, e observaram alteração da glicosilação terminal da IgA<sup>1</sup> secretada. A partir destes resultados, foi proposto que a produção aumentada de IL-4 e IL-5 pelos linfócitos do sangue periférico de pacientes com NIgA poderia influir na glicosilação da IgA e sua conseqüente deposição no glomérulo renal, à semelhança do que foi encontrado no presente estudo.

Lim *et al.*<sup>35</sup> propuseram que o predomínio Th1/Th2 e o nível das citocinas pró-inflamatórias possam determinar o processo patogênico e a gravi-

dade das manifestações clínicas da NIgA. Assim, as citocinas de perfil Th1 foram associadas à lesão glomerular, as de perfil Th2 a lesões túbulo-intersticiais e a IL-8 a lesões vasculares. Esses dados não estão de acordo com aqueles encontrados nesta casuística, na qual níveis elevados de IL-5 foram detectados em 83% dos pacientes com proliferação mesangial.

Durante esta investigação, foram observados níveis de IL-10 mais elevados em pacientes com NIgA do que no grupo com DIgA e controles normais. Estes dados referentes aos níveis de IL-10 em pacientes com NIgA confirmam aqueles obtidos por Fijter *et al.*<sup>24</sup>, que encontraram níveis elevados desta citocina no sobrenadante de cultura de preparações de sangue total ativadas por LPS ou PHA.

Em relação aos pacientes com DIgA, os níveis de IL-10 estavam mais baixos do que os encontrados em pacientes com NIgA, embora similares ao dos controles normais. Estes resultados confirmam aqueles relatados por Guerra<sup>28</sup>, que encontrou níveis similares de IL-10 em pacientes com DIgA, ICV e controles normais.

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica, que é produzida em murinos por células Th2 e, em humanos, não somente por células Th0, Th1 e Th2, mas também por células TCD8<sup>+</sup><sup>52</sup>. Evidências atuais são indicativas de que a IL-10 afeta diretamente a produção e proliferação de células B produtoras de IgA, podendo estar implicada na troca do isótipo durante a produção desta imunoglobulina<sup>9</sup>. Esta hipótese está de acordo com os dados obtidos neste estudo, que demonstraram níveis mais elevados de IL-10 na nefropatia da IgA do que em pacientes com DIgA.

A produção de níveis elevados de IL-10 em pacientes com NIgA é compatível com o aumento da resposta humoral, podendo desempenhar um papel na desregulação da resposta de IgA frequentemente observada<sup>16,41</sup>. Nesta casuística, níveis elevados de IgA foram observados em apenas 5/18 pacientes com nefropatia, não guardando relação com os níveis de IL-10.

A detecção da IL-10 não garante que esta citocina esteja biologicamente ativa, podendo-se propor a hipótese, ainda não comprovada, de que em pacientes com deficiência de IgA possam existir antagonistas da IL-10, como por exemplo, receptores solúveis<sup>52</sup>. Por outro lado, a presença de citocinas antagonistas da IL-10, como IFN- $\gamma$ , IL-2

ou IL-4, levando a um possível desequilíbrio da produção de IgA, foi descartada<sup>13</sup>.

Neste estudo, níveis detectáveis de IL-10 acima de 150 pg/ mL foram encontrados em todos os indivíduos com NIgA, ao contrário do observado no grupo com DIgA (23,52%) e controles normais (20 %).

Tem sido atribuído à IL-10 um potente efeito supressor da síntese de citocinas por linfócitos Th1, possivelmente pelo bloqueio da produção de IFN- $\gamma$  e/ou por antagonismo de seus efeitos de ativação sobre monócitos<sup>48</sup>. Este papel inibitório de monócitos é importante, uma vez que a IL-10 produzida endogenamente tem atividades auto-reguladoras sobre monocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6) e produção e expressão de MHC classe II pelos monócitos<sup>1</sup>. Neste contexto, Fiorentino *et al*<sup>23</sup> observaram que em comparação ao TNF- $\alpha$  e à IL-6, a IL-10 é produzida mais tardiamente pelos monócitos.

Nesta casuística, os níveis de IL-6 foram mais baixos em pacientes com NIgA em comparação àqueles encontrados entre pacientes com DIgA ou controles saudáveis. Também foi observado que apenas um dos pacientes com NIgA (5,56%) apresentou nível de IL-6 acima do valor médio encontrado para o grupo de deficiência de IgA, sendo que em 33,33% deles, os níveis de IL-6 foram indetectáveis (22,22%) ou estavam abaixo de 10 pg/mL (11,11%).

Os dados referentes aos níveis baixos de IL-6 não confirmam aqueles descritos por Fijter *et al*<sup>24</sup>, que encontraram níveis normais desta citocina em pacientes com NIgA. Os resultados da produção de IL-6 em pacientes com deficiência de IgA e controles normais estão de acordo com os dados obtidos por Kowalezyk *et al*<sup>32</sup>. No entanto, diferem dos relatados por Müller *et al*<sup>42</sup>, que encontraram níveis séricos baixos de IL-6 próximos ao limiar de detecção em 4/17 pacientes com deficiência de IgA, enquanto que os níveis de IL-6 foram indetectáveis em todos os indivíduos controles normais.

A IL-6 é uma das citocinas envolvidas na regulação do crescimento de células B, atuando como um ativador policlonal de células humanas em cultura, conjuntamente com a IL-2<sup>1</sup>. Essa interleucina constitui um co-fator após a troca de isótipo no linfócito B, uma vez que induz secreção de IgA em células B que expressam IgA de superfície (BIgA<sup>+</sup>) *in vitro*<sup>5</sup>, não afetando as células B IgA<sup>-</sup><sup>7,31,49</sup>.

Os resultados deste estudo referentes à IL-6 são contraditórios, uma vez que, tendo em vista o papel desta citocina na produção de IgA, o esperado seria a presença de níveis altos de IL-6 em pacientes com NIgA e baixos naqueles com DIgA. Nesta casuística, os dados obtidos não permitem comprovar a hipótese de que os níveis baixos de IL-6 em pacientes com NIgA possam ser atribuídos ao efeito supressor da IL-10<sup>48</sup>.

Em resumo, a análise comparativa dos níveis de citocinas dosadas no sobrenadante de cultura de PBMC revelou: a) em pacientes com NIgA, os níveis de IL-5 e IL-10 estavam elevados e os níveis de IL-6 estavam baixos em comparação aos pacientes com DIgA e controles saudáveis; os níveis de IL-4 foram similares em comparação ao grupo de DIgA, embora mais elevados do que nos controles saudáveis; b) em pacientes com DIgA, os níveis de todas as citocinas testadas foram similares àqueles encontrados para o grupo de controles saudáveis.

Pela análise comparativa entre os dados obtidos neste estudo e aqueles citados na literatura, pode-se dizer que: os níveis elevados de IL-5 encontrados na NIgA reforçam a importância desta citocina na síntese de IgA, cujos níveis séricos estão aumentados em aproximadamente 50% dos casos; os níveis elevados de IL-4 e IL-5 encontrados nestes pacientes sugerem que estas duas citocinas possam estar envolvidas na glicosilação da IgA e seu conseqüente depósito em mesângio renal; os níveis elevados de IL-10 e baixos de IL-6 observados em pacientes com NIgA reforçam a hipótese de que a IL-10 esteja implicada na síntese da IgA em humanos e sugerem que esta citocina possa desempenhar um papel regulador sobre a produção de IL-6.

#### Referências bibliográficas

1. Abbas A, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology 5<sup>nd</sup> ed. Philadelphia. WB Saunders, 2003.
2. Allen AC, Bailey EM, Brenchley PE, Buck KS, Barratt J, Feehally J. Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients. *Kidney Int* 2001; 60: 969-73.
3. Allen AC, Feehally J. IgA1 glycosylation and pathogenesis of IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 551-6.

4. Aukrust P, Müller F, Froland SS. Elevated serum levels of interleukin-4 and interleukin-6 in patients with Common Variable Immunodeficiency (CVI) are associated with chronic immune activation and low numbers of CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 70:217-24.
5. Baskin B, Pettersson E, Srekola CI. Studies of the molecular basic of IgA production subclass regulation and class-switch recombination in IgA nephropathy patients. *Clin Exp Immunol* 1996; 106: 509-17.
6. Beaglay KW, Eldridge JH, Lee F, Kiyano H, Everson MP, Koopman WJ, *et al.* Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin-6 induce high rate IgA secretion in IgA committed B cells. *J Exp Med* 1989; 169:2133-48.
7. Berger J. IgA mesangial nephropathy 1968-1983. *Contrib Nephrol* 1984; 40:4-6.
8. Brandtzaeg P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS* 1995; 105:1-19.
9. Brière F, Bridon JM, Chevet D, Sovillet G, Bienvenu F, Guret C, *et al.* Interleukin-10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *J Clin Invest* 1994; 94:97-104.
10. Cagnoli L, Beltrandi E, Pasquali S, Biagi R, Casadei-Maldini M, Rossi L, *et al.* - B and T cell abnormalities in patients with primary IgA nephropathy. *Kidney Int* 1985, 28:646-51.
11. Cerrutti A, Zan H, Schaffe A, Bergsagel L, Harindranath N, Max E, *et al.* CD40 ligand and appropriate cytokine induce switching to IgG, IgA and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>, Bcell line. *J Immunol* 1998; 160:2145-57.
12. Chintalacharuvu SR, Emancipator SN. The glycosylation of IgA produced by murine B cells is altered by Th2 cytokines. *J Immunol* 1997; 159:2327-33.
13. Chintalacharuvu SR. T cell cytokines determine the severity of experimental IgA nephropathy by regulating IgA-glycosylation. *Clin Exp Immunol* 2001; 126:326-33.
14. Conley ME, Notarangelo MD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. *Clin Immunol* 1999; 93:190-7.
15. Chomarat P, Risoan M-C, Banchereau J, Miossec P. Interferon- $\gamma$  inhibits interleukin-10 production by monocytes. *J Exp Med* 1993; 177:523-7.
16. D'Amico G. Idiopathic IgA mesangial nephropathy. *Nephron* 1985; 41:1-13.
17. Defrance T, Van Bervliet B, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin-10 and Transforming Growth Factor  $\beta$  cooperate to induce anti-CD40 activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 1992; 175: 671-82.
18. Deviere J, Content J, Deny CH, Vandebussche P, Moine AL, Schandane L, *et al.* Immunoglobulin A and Interleukin 6 form a positive secretory feedback loop: A study of normal subjects and alcoholic cirrotics. *Gastroenterolog* . 1992; 103: 1296-1301.
19. Donadio JV, Grande JP. IgA Nephropathy. *N Engl J Med* 2002; 347: 738-46.
20. Donadio JV, Grande JP. Immunoglobulin A nephropathy: a clinical perspective. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:1324-32.
21. Droz D. Natural history of primary glomerulonephritis with mesangial deposits of IgA. *Contrib Nephrol* 1976; 2:150-7.
22. Ebihara I, Hirayama K, Yamamoto S, Muro K, Yamagata K, Koyama A. Th2 predominance at the single-cell level in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 16:1783- 89.
23. Emancipator SN. Immunoregulatory factors in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Kidney Int* 1990; 38:1216-29.
24. Emancipator SN, Lamm ME. IgA nephropathy: pathogenesis of the most common form of glomerulonephritis. *Lab Invest* 1989; 60:168-183.
25. Español T, Catala M, Hernandez M, Caragol J, Bertram JM. Development of a common variable immunodeficiency in IgA deficiency patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80:333-5.
26. Feehally J, Allen AC. Pathogenesis of IgA nephropathy. *Ann Med Interne (Paris)*. 1999; 150:91-98.
27. Fiorentino DF, Zlotink A, Mosmann TR, Howard MH, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147:3815- 22.
28. Fijter JW, Daha MR, Schroeijers L, Van ES A, Van Kooten C. Increased IL-10 production by stimulated whole blood cultures in primary IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol* 1998; 111:429-34.
29. Friman V, Hanson LA, Bridon JM, Tarkowski A, Banchereau J, Brière F. IL-10 driven immunoglobulin production by B lymphocytes from IgA-deficient individuals correlates to infection proneness. *Clin Exp Immunol* 1996; 104:432-38.
30. Gesualdo L, Ranieri E, Emancipator SN. Defective mucosal immunoregulation as factor in the pathogenesis of IgA nephropathy (NIgA). In: H Sakai, O Sakai, Y Nomoto, eds. *Pathogenesis of IgA nephropathy*. Tokyo. Harcourt Brace Javonich, Japan. 1990; p. 111-126.
31. Grecco O. Manifestações clínicas de atopia na deficiência de IgA - São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Dissertação de Mestrado), 1996, p. 125

32. Guerra CVC. Níveis de IL-5, IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  em pacientes com deficiência de imunoglobulina A – São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Tese de Doutorado), 2002, p. 127
33. Harriman GR, Kunitom DY, Elliott JF, Paetkau V, Strobe W. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J Immunol* 1988; 140:3033-39.
34. Ichinose H, Miyazaki M, Koji T, Furusu A, Ozono Y, Harada T, *et al.* Detection of cytokine mRNA-expressing cells in peripheral blood of patients with IgA nephropathy using non-radioactive *in situ* hybridization. *Clin Exp Immunol* 1996; 103: 125-32.
35. Kilgore LL, Patterson BW, Parenti DM, Fischer WR. Immune complex hyperlipidemia induced by an apolipoprotein-reactive immunoglobulin A paraprotein from a patient with multiple myeloma: characterization of this immunoglobulin. *J Clin Invest* 1985; 76:225-32.
36. Kim PH, Kagnoff MF. Transforming growth factor- $\beta$ 1: a co-stimulator for IgA production. *J Immunol*, 1990; 144:3411-16.
37. Kowalczyk D, Bozenna M, Zembala M. Cytokine production in transient hipogammaglobulinemia and isolated IgA deficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 100: 556-62.
38. Lai KN, Leung JC, Lui SF. Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol*, 1991; 85:240-5.
39. Layward L, Finnemore AM, Allen AC, Harper SJ, Feehally J. Systemic and mucosal IgA responses to systemic antigen challenge in IgA nephropathy. *Clin Immunol Immunopathol*, 1993; 69(3):306-13; 1993.
40. Lim CS, Zheng S, Kim YS, Ahn C. TH1/TH2 predominance and proinflammatory cytokines determine the clinical pathological severity of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:269-75.
41. Lio D, D'Anna, Leone F, Curro MF, Candore G, Caruso C. Hypothesis: interleukin-5 impairment can be a key point in the pathogenesis of MHC-linked selective IgA deficiency. *Autoimmunity* 1998; 27:185-8.
42. Malafronte P, Barros RT, Woronik V, *et al.* Brazilian Glomerulonephritis Registry: Analysis of a regional multicentre study in State of Sao Paulo. *J Am Soc Nephrol* 2001; 115 A (abstract).
43. McGhee J, Mestecky J, Elson CH, Kiyono H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol* 1989; 9: 175-97.
44. Mestecky J, Tomana M, Crowley-Nowick P, Moldoveanu Z, Julian BA, Jackson S. Defective galactosylation and clearance of IgA1 molecules as a possible etiopathogenic factor in IgA nephropathy. *Contrib Nephrol* 1993; 104:172-82.
45. Monteiro RC. Mecanismos imunológicos da nefropatia da IgA. Papel dos receptores celulares. In: Cruz J, Barros RT eds. *Atualidades em Nefrologia* 4. Sarvier, São Paulo. 1996; 104-110.
46. Moore KW, O' Garra A., De Waal Malefijt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Ann Rev Immunol* 1993; 11:165-90.
47. Müller F, Aukrust P, Nilssen DE, Froland SJ. Reduced serum level of transforming growth factor –  $\beta$  in patients with IgA deficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 76:203-8.
48. Murray PD, McKenzie DT, Swain SL, Kagnoff MF. Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J Immunol* 1987; 139: 2669-74.
49. Plebani A, Monafò V, Ugazio AG, Burgio GR. Clinical heterogeneity and reversibility of selective immunoglobulin A deficiency in 80 children. *Lancet* 1986; 2: 828-31.
50. Rai A, Nast C, Adler S. Henoch-Schönlein purpura nephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2637-44.
51. Roccatello D, Picciotto G, Torchio M, Ropolo R, Franceschini R, Coppo R, *et al.* Removal system of immunoglobulin A and immunoglobulin containing complexes in IgA nephropathy and cirrhosis patients – the role of asialoglycoprotein receptors. *Lab Invest* 1993; 69:714-23.
52. Scivittaro V, Gesualdo L, Ranieri E, Marfella C, Schwen AS, Emancipator E. Profiles of immunoregulatory cytokine production *in vitro* in patients with IgA nephropathy and their kindred. *Clin Exp Immunol* 1994; 96:311-16.
53. Scivittaro V, Ranieri E, Di Cillo M, Aventaggiato L, Emancipator S, Schena F. *In vitro* immunoglobulin production in relatives of patients with IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 1994; 42:1-8.
54. Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992; 148: 1143-48.
55. Van Vasselaer P, Smith CI. Transforming growth factor beta directs IgA switching in human B cells. *J Immunol* 1992; 148:2062-7.
56. Yano N, Enodoh M, Takemura F, *et al.* Involvement of interleukin-4 and soluble CD23 in hyper-synthesis of immunoglobulins A and E in patients with IgA nephropathy. *Nephron* 1996; 72:44-51.
57. Yssel H, De Waal Malefijt R, Roncarolo MG, Abrams JS, Lashesmaa R, Spits H, *et al.* Interleukin 10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol* 1992; 149:2378- 84

58. Malafronte P, Barros RT, Woronik V, *et al.* Brazilian Glomerulonephritis Registry: Analysis of a regional multicentre study in State of Sao Paulo. J Am Soc Nephrol 2001; 115 A (abstract).

**Endereço para correspondência**

Myrthes Toledo Barros  
Rua Caiubi, 372, apto 111  
05010-000 – São Paulo - SP  
Tel. 0XX-11-3676.0485  
myrtb@uol.com.br