ERICA MARIA MARTINS COUTINHO

**Avaliação de imunossenescência precoce em pacientes com
Imunodeficiência Comum Variável (ICV)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Dra. Myrthes Toledo Barros

SÃO PAULO

2019

ERICA MARIA MARTINS COUTINHO

**Avaliação de imunossenescência precoce em pacientes com
Imunodeficiência Comum Variável (ICV)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Dra. Myrthes Toledo Barros

SÃO PAULO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Coutinho, Erica Maria Martins
Avaliação de imunossenescência precoce em
pacientes com imunodeficiência comum variável (ICV)
/ Erica Maria Martins Coutinho. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Myrthes Anna Maragna Toledo Barros.

Descritores: 1.Imunodeficiência comum variável
2.Imunossenescência 3.Envelhecimento 4.Sistema
imunitário 5.Linfócitos 6.Telomerase 7.Polimorfismo
genético

USP/FM/DBD-457/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivos gerais	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Locais do estudo	26
3.2. Casuística.....	26
3.3. Critérios de inclusão e exclusão	27
3.3.1. Imunodeficiência comum variável	26
3.3.2. Idosos sem senilidade	27
3.3.3. Controles saudáveis	27
4.4. Coleta de amostras.....	27
4.4.1. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs)	28
4.4.2. Descongelamento das células criopreservadas	29
4.4.3. Imunofenotipagem de células TCD4+ e TCD8+.....	29
4.4.4. Estratégia de análise da imunofenotipagem	31
4.5. Determinação da atividade de telomerase	35
4.5.1. Separação celular (cell sorting) de linfócitos TCD8+	40
4.5.2. Atividade de telomerase	40
4.5.2.1 Preparo do extrato celular.....	40
4.5.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	41
4.5.2.3. Preparo dos tubos de PCR	43
4.5.2.4. Hibridização e ELISA	46
4.5.2.5. Preparo da hibridização e ELISA	46
4.6. Determinação de polimorfismos da Paraoxonase 1 (PON1).....	47
4.6.1. Obtenção das amostras	48
4.6.2. Obtenção de DNA genômico.....	48
4.6.3. Genotipagem para determinação de polimorfismos L55M no gene da PON1	49
4.7. Análise estatística dos Resultados	52
5. RESULTADOS	51
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES	51
8. ANEXO	51
9. REFERÊNCIAS	51
Apêndice	

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estratégia “Time”, “Singlets” e “Viabilidade”</i>	33
<i>Figura 2. Estratégia de análise células TCD8+ e TCD4+</i>	34
<i>Figura 3. Produtos formados após a digestão enzimática</i>	36
<i>Figura 4. Frequência de linfócitos TCD8+TCD28- em relação à população TCD8+ total.</i>	37
<i>Figura 5. Frequência de linfócitos TCD8+TCD28+ em relação à população CD8+ total</i>	38
<i>Figura 6. Frequência de linfócitos TCD4+TCD28- em relação à população CD4+ total</i>	39
<i>Figura 7. Frequência de linfócitos TCD4+TCD28+ em relação à população CD4+ total</i>	42
<i>Figura 8. Frequência de linfócitos TCD8+TCD28- em relação à população CD3+ total</i>	45
<i>Figura 9. Frequência de linfócitos TCD8+TCD28+ em relação à população CD3+ total</i>	47
<i>Figura 10. Frequência de linfócitos TCD4+TCD28- em relação à população CD3+ total</i>	49
<i>Figura 11. Frequência de linfócitos TCD4+TCD28+ em relação à população CD3+ total</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pannel de anticorpos monoclonais para avaliação de células T CD4+ e T CD8+ ..	14
Tabela 2. Características demográficas de pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis	15
Tabela 3. Frequência dos polimorfismos da PON-1 L55M em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis	17
Tabela 4. Manifestações clínicas investigadas em pacientes com ICV e idosos.....	19
Tabela 5. Manifestações clínicas em relação aos genótipos do polimorfismo PON1 L55M em pacientes com ICV.....	20
Tabela 6. Frequência de linfócitos TCD8+ TCD28- em relação à população TCD8+ total em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis	22
Tabela 7. Frequência de linfócitos TCD8+ TCD28+ em relação à população CD8+ total em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis	24
Tabela 8. Frequência de linfócitos TCD4+ TCD28- em relação à população CD4+ total em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis	26
Tabela 9. Frequência de linfócitos TCD4+ TCD28+ em relação à população CD4+ total em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis	27
Tabela 10. Frequência de linfócitos TCD8+ TCD28- em relação à população CD3+ total em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis	29
Tabela 11. Frequência de linfócitos TCD8+ TCD28+ em relação à população CD3+ total em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis	30
Tabela 12. Frequência de linfócitos TCD4+ TCD28- em relação à população CD3+ total em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis	32
Tabela 13. Frequência de linfócitos TCD4+ TCD28+ em relação à população CD3+ total em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis	34
Tabela 14. Atividade de telomerase em células T CD8+ de pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis	36

1. Introdução

1.1 Imunodeficiência Comum Variável (ICV)

A Imunodeficiência Comum Variável (ICV) é a imunodeficiência primária sintomática mais comum em adultos e tem como característica a redução dos níveis séricos de IgG (inferiores a 4,5 g/L em adultos ou dois desvios-padrão abaixo da média para a idade) com valores reduzidos ou indetectáveis de ao menos um dos isótipos IgA e/ou IgM, estando associada a outros critérios como: 1) início dos sintomas após dois anos de idade; 2) ausência de hemaglutininas e/ou resposta insatisfatória à vacinação; 3) exclusão de outras causas de hipogamaglobulinemias; nesse caso, sendo aconselhável que o diagnóstico não seja estabelecido antes dos quatro anos de idade (Bonilla et al., 2016).

A ICV afeta igualmente ambos os sexos e seu diagnóstico é estabelecido na maioria dos pacientes entre os 20 e 40 anos de idade, embora possa ser diagnosticada também na infância entre 8-10 anos, assim como qualquer outro grupo etário (Cunningham-Rundles, 1999; Cunningham-Rundles, 2010).

A prevalência da ICV é estimada de 1/50.000 a 1/125.000 em caucasianos, dependendo do país estudado (Bonilla et al., 2015; Picard et al., 2015). Ainda não temos dados disponíveis sobre a prevalência desta imunodeficiência no Brasil, mas tendo por base as casuísticas europeias e americanas que mostram uma prevalência entre 1:10.000 a 1:100.000 indivíduos, a estimativa é de deveríamos ter entre 2.100 e 21.000 pacientes com ICV. No registro LASID (Latin American Group for Immunodeficiencies), em setembro de 2019, existem 1552 pacientes portadores de imunodeficiências primárias em geral registrados no Brasil, dos quais aproximadamente 60% (931 pacientes) têm defeitos de anticorpos e apenas 306 pacientes com diagnóstico de ICV.

RESUMO

Coutinho EMM. *Avaliação de imunosenescência precoce em pacientes com imunodeficiência comum variável (ICV)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A Imunodeficiência Comum Variável (ICV) é a imunodeficiência primária sintomática mais comum em adultos e caracteriza-se pela presença de baixos níveis de IgG e IgA e/ou IgM. Os pacientes com ICV apresentam infecções recorrentes do trato respiratório e intestinal; alterações nas populações linfocitárias; alteração na produção de citocinas; capacidade de ativação e proliferação de linfócitos reduzida e baixa resposta vacinal. Além disso, podem ser acometidos por doenças autoimunes, autoinflamatórias e câncer. A imunosenescência é o processo de envelhecimento do sistema imunológico e tem como principais características as infecções constantes; alterações nas populações de linfócitos com proliferação de linfócitos CD28 negativos; *inflammaging*, resposta vacinal prejudicada e maior ocorrência de câncer e doenças autoimunes. Pelo fato das manifestações imunológicas e clínicas apresentadas durante a senescência traçarem um paralelo com o quadro clínico e laboratorial característico da ICV, nos fez questionar se os pacientes com essa imunodeficiência sofrem precocemente com o processo de imunossenescência. Para tanto, avaliamos em pacientes com imunodeficiência comum variável parâmetros imunológicos condizentes ao processo de imunossenescência em comparação a indivíduos idosos não senis e controles saudáveis. Ao todo participaram do estudo 33 indivíduos, sendo dezesseis (16) pacientes com ICV de ambos os sexos e idades variando de 18 a 49 anos, doze (12) idosos sem manifestação de senilidade sistêmica com idades variando de 65 a 90 anos e cinco (5) controles saudáveis de ambos os sexos e idades variando de 18 a 49 anos. Foram analisados polimorfismos no gene da enzima paraoxonase 1 (PON-1 L55M) através da obtenção do DNA genômico por método de salting out seguida da amplificação por PCR e digestão por enzimas de restrição, sendo possível a análise de RFLP. As populações linfocitárias TCD8+CD28-, TCD8+CD28+, TCD4+CD28- e TCD4+CD28+ foram analisadas através da imunofenotipagem por citometria de fluxo. A atividade de telomerase nos linfócitos TCD8+ foi realizada utilizando o método de TRAP seguido de reação de ELISA, para quantificação dos produtos da PCR. Em relação ao gênero, houve predominância do sexo feminino ($p=0,008$) no grupo de idosos (100%), no grupo de pacientes com ICV (56,3%) e no grupo de controles saudáveis (100%). A distribuição de brancos e não-brancos foi homogênea entre os grupos ($p=0,281$). A frequência dos genótipos de polimorfismos da PON-1 L55M foi similar ($p=0,392$) entre o grupo de pacientes com ICV (18,8%) 55MM; (43,8%) 55LM; (31,3%) 55LL e (6,3%) não detectado, e grupo de idosos (16,7%) 55MM, (25,0%) 55LM, (58,3%) 55LL. Não houve associação da frequência de polimorfismos da PON-1 L55M em pacientes com ICV às variáveis clínicas analisadas. A distribuição linfocitária TCD8+CD28- em relação ao número total de linfócitos TCD8+ foi caracterizada pela predominância de linfócitos TCD8+CD28- no grupo de ICV (mediana = 62,40) e no grupo de idosos (mediana = 68,95) ($p=0,756$). Em contrapartida, os valores de TCD8+CD28- dos controles saudáveis (mediana = 25,70) foram diminuídos em relação aos pacientes com ICV (mediana = 5,45) ($p=0,005$) e idosos (mediana = 3,70) ($p=0,03$). Os valores da população linfocitária TCD8+CD28+ foram similares ($p=0,756$) entre o grupo de pacientes com ICV (mediana = 37,35) e idosos (mediana = 31,00). Em contrapartida, os valores de TCD8+CD28+ dos controles saudáveis (mediana = 25,70) foram aumentados em relação aos pacientes com ICV (mediana = 37,35) ($p=0,005$) e idosos (mediana = 31,00) ($p=0,03$). A distribuição linfocitária TCD4+CD28- em relação ao número total de linfócitos TCD4+

foi similar entre o grupo de pacientes com ICV (mediana= 5,45) e idosos (mediana = 3,70) ($p=0,336$). Em contrapartida, os valores de TCD4+CD28- dos controles saudáveis (mediana 0,50) foram diminuídos em relação aos pacientes com ICV (mediana = 5,45) ($p=0,002$) e idosos (mediana = 3,70) ($p=0,024$). Os valores da população linfocitária TCD4+CD28+ foram similares entre os pacientes com ICV (mediana = 94) e idosos (mediana = 96) ($p=0,311$). A distribuição de TCD4+CD28+ nos controles saudáveis (mediana = 99) foi superior ao grupo de pacientes ICV (mediana = 94) ($p=0,002$) e ao grupo de idosos (mediana = 96) ($p=0,026$). Em relação à atividade de telomerase na população de linfócitos TCD8+ não existe diferença entre os grupos avaliados ($p = 0,545$). A predominância de linfócitos TCD8+CD28- nos pacientes com ICV, sendo similar ao grupo dos idosos, mostra que estes pacientes apresentam precocemente o processo de imunossenescência.

Descritores: Imunodeficiência comum variável; Imunossenescência; Envelhecimento; Sistema imunitário; Linfócitos; Telomerase; Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Coutinho, EMM. *Evaluation of early immunosenescence in patients with common variable immunodeficiency (CVID)* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Common Variable Immunodeficiency (CVID) is the primary immunodeficiency of antibodies symptomatic most common in adults. It is characterized by the presence of low levels of IgG and IgA and /or IgM. Patients have recurrent infections of the respiratory and intestinal tract; changes in lymphocyte populations; alteration in the production of cytokines; reduced ability to activation and proliferation of lymphocytes and low vaccine response. In addition, autoimmune, autoinflammatory diseases and cancer may affect them. Immunosenescence is the aging process of the immune system and its main features are constant infections; changes in lymphocyte populations with proliferation of lymphocyte CD28 negative; *inflammaging*, impaired vaccine response and increased occurrence of cancer and autoimmune diseases. Because the immunological and clinical manifestations presented during senescence draw a parallel with the clinical and laboratory characteristics of CVID, it made us question whether patients with this immunodeficiency have the early process of immunosenescence. Therefore, we evaluated in patients with common variable immunodeficiency consistent immunological parameters to immunosenescence process compared to non-senile elderly and healthy controls. A total of 33 individuals participated in the study, being sixteen (16) patients with CVID of both sexes and ages ranging from 18 to 49, twelve (12) elderly without systemic senile manifestation with ages ranging from 65 to 90 and five and five (5) healthy controls of both sexes and ages ranging from 18 to 49 years. Polymorphisms in the paraoxonase 1 gene (PON-1 L55M) were analyzed by genomic DNA extraction by salting out method followed by PCR amplification and restriction enzyme digestion, and RFLP analysis. The lymphocyte populations TCD8+CD28-, TCD8+CD28+, TCD4+CD28- and TCD4+CD28+ were analyzed by flow cytometry immunophenotyping. Telomerase activity in TCD8+ lymphocytes was performed using the TRAP method followed by ELISA reaction to quantify PCR products. In relation to gender, there was a predominance of females ($p = 0.008$) in the elderly group (100%), in patients with CVID (56.3%) and in the group of healthy controls (100%). The distribution of whites and nonwhites was homogeneous between the groups ($p = 0.281$). The frequency of PON-1 L55M polymorphism genotypes was similar ($p = 0.392$) among the group of patients with CVID (18.8%) 55MM; (43.8%) 55LM; (31.3%) 55LL and (6.3%) undetected, and elderly group (16.7%) 55MM, (25.0%) 55LM, (58.3%) 55LL. There was no association between frequency of PON-1 L55M polymorphisms in patients with CVID the clinical variables analyzed. The TCD8+CD28- lymphocyte distribution in relation to the total number of TCD8+ lymphocytes was characterized by the predominance of TCD8+CD28- lymphocytes in the CVID group (median = 62.40) and in the elderly group (median = 68.95) ($p = 0.756$). In contrast, TCD8+CD28- values from healthy controls (median = 25.70) were decreased compared to patients with CVID (median = 5.45) ($p = 0.005$) and elderly group (median = 3.70) ($p = 0.03$). The TCD8+CD28+ lymphocyte population values were similar ($p = 0.756$) between the group of patients with CVID (median = 37.35) and elderly group (median = 31.00). In contrast, TCD8+CD28+ values for healthy controls (median = 25.70) were increased compared to patients with CVID (median = 37.35) ($p = 0.005$) and elderly group (median = 31.00) ($p = 0.03$). The TCD4+CD28- lymphocyte distribution in relation to the total number of TCD4+ lymphocytes was similar between the group of patients with CVID (median = 5.45) and elderly group (median = 3.70) ($p = 0.336$). In contrast,

TCD4+ CD28- values from healthy controls (median 0.50) were decreased compared to patients with CVID (median = 5.45) ($p = 0.002$) and elderly group (median = 3.70) ($p = 0.024$). The TCD4+CD28+ lymphocyte population values were similar between the patients with CVID (median = 94) and elderly group (median = 96) ($p = 0.311$). The distribution of TCD4+CD28+ in healthy controls (median = 99) was higher than the group of CVID (median = 94) ($p = 0.002$) and the elderly group (median = 96) ($p = 0.026$). Regarding telomerase activity in the TCD8+ lymphocyte population there is no difference between the groups evaluated ($p = 0.545$). The predominance of TCD8+ CD28- lymphocytes in the patients with CVID, being similar to the group of the elderly, shows that these patients present early the process of immunosenescence.

Descriptors: Common variable immunodeficiency; Immunosenescence; Aging; Immune system; Lymphocytes; Telomerase; Polymorphism, genetic.

As manifestações clínicas da ICV são muito variadas, sendo considerada por muitos como uma síndrome cuja principal característica é a hipogamaglobulinemia (Cunningham-Rundles 2010). Os pacientes frequentemente cursam com infecções crônicas ou recorrentes do trato respiratório, bronquiectasias, esplenomegalia, doenças autoimunes, doenças inflamatórias gastrointestinais, malignidades, especialmente as de natureza linfoproliferativa, entre outros acometimentos (Chapel et al., 2008; Mathieu et al., 2016; Kokron et al., 2004).

Em geral, as causas da ICV são desconhecidas. Essa imunodeficiência apresenta um padrão de distribuição predominantemente esporádico, embora fatores hereditários estejam presentes em aproximadamente 15% dos pacientes, decorrentes de mutações autossômicas dominantes ou recessivas em um ou mais genes que afetam tanto a imunidade humoral quanto a celular. Algumas formas monogênicas já foram descritas, no entanto, acredita-se que a herança poligênica seja a principal envolvida na patologia (Notarangelo *et al.*, 2009; Orange *et al.*, 2011).

O sistema imunológico de pacientes com ICV tem sido investigado em diversos estudos que descrevem anormalidades funcionais e fenotípicas predominantemente da imunidade adaptativa. No entanto, a multiplicidade destes defeitos, a sua distribuição desigual dentro de diferentes coortes e a falta de uma verdadeira análise abrangente e combinada de todos os elementos, tem impossibilitado um mapeamento conciso de todos os mecanismos que conduzem à imunopatogênese da ICV (Salzer et al., 2012).

Em relação à imunidade inata, há relatos de pacientes apresentando profundas alterações nos diferentes subtipos de células dendríticas do sangue, que afetam desde a diferenciação, maturação e função destas células, ocorrendo redução da expressão de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e HLA-DR, fundamentais para o desenvolvimento

da resposta imune adaptativa. Além disso, defeitos na sinalização da via TLR-9 em células dendríticas e linfócitos B também já foram descritos (Abbas et al., 2018).

Alguns indivíduos apresentam uma população de monócitos cronicamente ativados que produzem elevados níveis de interleucina-12 (IL-12), polarizando a resposta imune para um perfil Th1 e inibindo assim a produção de citocinas do perfil Th2 que são essenciais para a diferenciação terminal de linfócitos B e troca de classes de imunoglobulinas (Bayry, et al., 2005).

Alterações nas vias de ativação do sistema complemento, como na via clássica e das lectinas também são observadas (Fevang, et al., 2005). Ainda, os pacientes podem apresentar números reduzidos de células NK e acredita-se que esta deficiência possa estar relacionada à incidência aumentada de tumores malignos descrita na ICV, uma vez que as células NK são capazes de reconhecer e eliminar células tumorais ou infectadas por vírus (Bayry, et al., 2005).

Em relação à produção de interleucinas, vários estudos mencionam diferenças entre os grupos analisados, sendo difícil uma determinação clara do perfil de citocinas na ICV (Varzaneh et al., 2014). Existem exceções, mas de maneira geral, há redução dos níveis de IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10 (Holm et al., 2003; Borte et al., 2009; Di Renzo et al., 2001) e aumento dos níveis de IL-6, IFN- γ e TNF- α consideradas pró-inflamatórias (Holm et al., 2003).

Pelo fato das manifestações clínicas da ICV serem muito variadas, a hipogamaglobulinemia tem sido considerada como ponto principal no diagnóstico considerado por diversos autores (Kainulainen et al., 2001; Cunningham-Rundles, 2010). Considerando-se que os pacientes com ICV apresentam hipogamaglobulinemia e, na maioria das vezes, número normal ou levemente reduzido de linfócitos B maduros no sangue

periférico com capacidade preservada da produção de anticorpos *in vitro*, foi aventada a hipótese de que defeitos em etapas tardias da maturação estejam impedindo que os linfócitos B se diferenciem em células produtoras de anticorpos (Cunningham-Rundles & Bodian, 1999). Cabe ressaltar que somente em cerca de 10% dos pacientes essa população linfocitária encontra-se drasticamente reduzida ou ausente (Wehr et al., 2008; Chapel et al., 2008).

Estudos *in vivo* mostram que cerca de 80 a 90% dos pacientes com ICV têm defeitos característicos como redução do número de linfócitos B de memória ($CD27^+ IgD^- IgM^-$), número aumentado de linfócitos $CD21^{low}$ anérgicos ao lado da diminuição da diferenciação para plasmócitos (Cunningham-Rundles & Bodian, 1999, com consequente depleção dessas células em órgãos linfoides como o tecido linfático associado ao intestino, nódulos linfáticos e medula óssea (Piqueras et al., 2003; Warnatz et al., 2002; Wehr et al., 2008; Herbst et al., 1994; Ochtrop et al., 2011; Taubenheim et al., 2005).

A expansão do número de células B $CD21^{low}$ é observada em outras doenças como lúpus eritematoso sistêmico (Wehr et al., 2004) e em pacientes com HIV com quadro virêmico. Uma vez que a redução do número de células B de memória não é vista apenas na ICV, não é correto considerá-la como critério diagnóstico. No entanto, essa população celular tem sido usada para classificar clinicamente e imunologicamente os pacientes em subgrupos mais homogêneos (Piqueras et al., 2003; Warnatz et al., 2002; Wehr et al., 2008).

Mais recentemente foram estabelecidas algumas classificações para tentar auxiliar nesta análise. A primeira delas, denominada classificação de Paris, consiste em três grupos diferentes de pacientes com ICV: o primeiro apresentando número normal de células B de memória, o segundo redução de células B de memória com comutação isotípica ($IgD^- CD27^+$) e número normal de células B de memória sem comutação isotípica ($IgD^+ CD27^+$) e

o terceiro grupo ausência de células B (Piqueras et al., 2003). Tendo como base as determinações observadas na classificação de Paris, Warnatz et al., 2002 desenvolveram uma segunda classificação chamada Freiburg, onde os pacientes são subdivididos em vários grupos: grupo Ia composto por indivíduos com células B de memória abaixo de 0,4% da população total de leucócitos circulantes com elevação de células B imaturas ($CD19^+CD21^{low/neg}$) e manifestações clínicas como esplenomegalia e citopenia autoimune; grupo Ib composto por indivíduos com número normal de células $CD19^+CD21^{low/neg}$; grupo II caracterizado pelo número normal de células B de memória comutadas (Warnatz et al., 2002).

Não apenas a imunidade humoral encontra-se afetada na ICV, sendo que cerca de 50 a 66% dos pacientes apresentam também alterações da imunidade celular (Cunningham-Rundles & Bodian, 1999), o que foi observado inclusive em nossa casuística no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia do Hospital das Clínicas da FMUSP (Kokron et al., 2004).

De modo geral, os pacientes desenvolvem diminuição relativa e absoluta de linfócitos T $CD4^+$ com número normal ou aumentado de linfócitos T $CD8^+$, com consequente inversão da relação $CD4^+/CD8^+$ (Kondratenko et al., 1997, Cunningham-Rundles & Bodian, 1999; Kokron et al., 2004).

As anormalidades funcionais de linfócitos T incluem, entre outras: defeitos de ativação, redução da resposta proliferativa a mitógenos e aumento de apoptose após ativação (Chapel et al., 2008, Cunningham-Rundles, 2010, Kokron et al., 2004); falha na geração de linfócitos T antígeno-específicos após vacinação e a neo-antígenos Cunningham-Rundles, 2010); aumento do número de linfócitos T supressores (Cunningham-Rundles et al., 2010)

e, em determinados grupos de pacientes, redução da expressão de CD40L nos linfócitos T ativados (Oliva et al., 1997) e baixos níveis de IL-2 mRNA (Farrington et al., 1994).

Em estudos avaliando hepatite C crônica e infecções pelo HIV, foi observado um cenário de exaustão de células T com alterações fenotípicas e funcionais, em decorrência do constante estímulo antigênico, com posterior redução gradativa de IL-2 e de TNF- α (Yi et al., 2010; Wherry & Kurachi, 2015). Acredita-se que ocorra exaustão de células T também na ICV, segundo estudo realizado por Fischer e colaboradores (2005), que observaram proliferação adequada de linfócitos em resposta a mitógenos embora reduzida aos antígenos toxoide tetânico e *Escherichia coli*, ao lado da redução dos níveis de IL-2 mRNA e IFN- γ mRNA, corroborando assim tal ideia.

É de conhecimento que células somáticas, como os linfócitos, apresentam uma intensa atividade replicativa antes de atingirem o seu crescimento e pararem de se dividir (Effros et al., 1994; Hayflick, 1965). Esta capacidade de replicação está diretamente relacionada a estruturas localizadas nas extremidades dos cromossomos denominadas telômeros que, à medida que ocorre a divisão celular, sofrem encurtamento e acarretam a diminuição da proliferação celular, caracterizando um estado de senescência (Harley et al., 2011).

A avaliação do comprimento dos telômeros em linfócitos T, além de verificar o seu estado replicativo, permite prever o potencial de exaustão imunológica nestas populações celulares (Effros et al., 1997; Weng et al., 1995). Diversos estudos envolvendo pacientes com doenças infecciosas e inflamatórias crônicas mostraram que há redução do comprimento dos telômeros em células T (Effros et al., 1997; Honda et al., 2001; Wagner et al., 1998; Wolthers et al., 1996; Wu et al., 1999). Testes *in vitro* mostraram maior redução do comprimento dos telômeros nas células T de memória do que nas células T *naive*, tendo

como parâmetros o aumento da idade e rodadas progressivas de divisão celular (Weng et al., 1995, Weng et al., 1997).

Em relação à ICV, até o presente momento existem apenas dois trabalhos discutindo o assunto, e cada um possui suas peculiaridades, não favorecendo a comparação dos resultados (Visentini, et al., 2011; Tucker, et al., 2004)

No trabalho realizado por Visentini et al. (2011), foram estudados dois grupos de pacientes, onde um grupo se enquadrava nas características clínicas estabelecidas no grupo Ia da classificação de Freiburg, apresentando o número de células B CD21^{low} acima de 20%, esplenomegalia e citopenias autoimunes e o outro grupo com pacientes não classificados no grupo Ia de Freiburg, apresentando o número de células B CD21^{low} abaixo de 20%. Além disso, foram analisadas as células T CD4+ e T CD8+ *naïve* e de memória. Os resultados mostraram uma redução significativa do comprimento dos telômeros tanto nas células B quanto nas células T do grupo Ia (B CD21^{low}) quando comparados ao grupo controle saudável pareado por idade e ao grupo não Ia. O encurtamento dos telômeros em relação aos linfócitos B mostrou-se independente do perfil fenotípico (B CD21^{low}). Os autores atribuem o encurtamento acelerado dos telômeros dos pacientes com ICV a continua exposição e estímulo imunológico por uma gama de micro-organismos que infectam cronicamente o trato respiratório e o intestino. Sendo possível que estímulos infecciosos mais intensos, em alguns pacientes, acelerem o encurtamento dos telômeros e o desenvolvimento do perfil clínico e imunológico característico do grupo Ia de Freiburg.

Já no trabalho realizado por Tucker, et al. (2004), foi avaliado o comprimento dos telômeros, a capacidade replicativa *in vitro* e a taxa de erosão dos telômeros nas populações de linfócitos T e B de pacientes com ICV e algumas outras deficiências primárias de anticorpos. Não encontraram diferenças significativas nos comprimentos de telômeros das

células B ou nas populações de células T CD4+, CD8+, CD45RA+ (*naive*) e CD45RO+ (memória) entre pacientes e controles pareados por idade. Em relação atividade replicativa através da cultura de células a longo prazo (6 meses) com estímulo mitogênico não houve diferenças entre pacientes e controles das subpopulações de células T, ou nas taxas de erosão dos telômeros com replicação celular nessas populações de células.

Normalmente, com o passar dos anos, ocorre involução tímica, mas em pacientes com ICV, além da diminuição da frequência de células *naive* (CD4+/CD8+ CD45RA+CCR7+) (Bateman et al., 2012; Isgro et al., 2005), há ainda redução de células T reguladoras e de células NKT invariantes (iNKT) (Cowan et al., 2015; Berzins et al., 2005). Utilizada como padrão para medir a atividade tímica e frequência de células recém - saídas do timo, a análise de TREC (círculos excisados pelo rearranjo dos genes do receptor de linfócitos T), um segmento gênico não duplicado durante a divisão celular formado a partir da recombinação VDJ, foi feita em células T CD4+ e T CD8+ de pacientes com ICV. Foi visto que o nível de TREC nestas células está reduzido até dez vezes mais em relação ao grupo controle (Guazzi et al., 2002; De Vera et al., 2004). Em outro trabalho, foi avaliado o nível de KREC (círculos excisados pela recombinação e deleção de kappa) nas células B destes pacientes e viram que também está reduzido (Serana et al., 2011).

Como decorrência da diminuição da produção de anticorpos, os pacientes com ICV apresentam maior susceptibilidade a infecções recorrentes ou crônicas do trato respiratório, causadas principalmente pelo *Haemophilus influenzae* ou *Streptococcus pneumoniae*, a infecções intestinais por *Giardia lamblia* e *Campylobacter jejuni*, que afetam cerca de 40% dos pacientes com um quadro de diarreia crônica (Cunningham-Rundles & Bodian, 1999). Além disso, as constantes infecções pulmonares podem levar a alterações estruturais como bronquiectasias, atelectasias e doença pulmonar obstrutiva crônica (Kainulainen et al., 2001;

Sneller, 2001; Cunningham-Rundles & Bodian, 1999; Abonia & Castells, 2002; Martinez et al. 2001).

Além das infecções recorrentes ou crônicas, outras manifestações clínicas são observadas na ICV, como é o caso das doenças autoimunes, que atingem aproximadamente 20 a 50% dos pacientes (Cunningham-Rundles & Bodian, 1999, Chapel et al., 2008; Mouillot et al., 2010; Agarwal et al., 2009; Agarwal & Cunningham-Rundles, 2019; Kokron et al., 2004). Entre as manifestações autoimunes descritas, as citopenias, em especial a púrpura trombocitopênica idiopática (PTI) e a anemia hemolítica, são as mais prevalentes (Chapel et al., 2008, Agarwal & Cunningham-Rundles, 2019; Kokron et al, 2004).

Adicionalmente, os pacientes podem ser acometidos por doenças intestinais com padrão celíaco ou de caráter autoimune/inflamatórias associadas à diarreia crônica ou a outros fatores como má-absorção, déficit de crescimento, enteropatia perdedora de proteínas (Washington et al., 1996) e alterações do metabolismo ósseo ((Baris et al., 2011); Barreto-Melo, 2017). Também são frequentes as doenças do conectivo, pele e tireoidite (Agarwal, 2019; Kokron et al., 2004; Sini, 2017).

Os mecanismos associados a essas condições ainda não estão esclarecidos e incluem o comprometimento de vias envolvendo citocinas e processos inflamatórios celulares, assim como também a perda da tolerância a autoantígenos através da deficiência de múltiplas moléculas e vias de sinalização comuns às imunodeficiências e perda da tolerância imunológica (Agarwal & Cunningham-Rundles, 2019).

Podem ocorrer também alterações no metabolismo ósseo conforme descrito inicialmente por Baris e colaboradores (2011) e, mais recentemente, também pelo nosso grupo (Barreto-Melo, 2017).

O surgimento de carcinomas e linfomas nestes pacientes é bem comum, sendo que a incidência de linfomas é 300 vezes maior do que na população geral e muitos estão relacionados à infecção prévia pelo EBV ou retrovírus. Normalmente desenvolvem linfomas do tipo não Hodgkin (LNH), embora alguns manifestem a forma de Hodgkin (LH) (Agarwal & Cunningham-Rundles, 2019)

Atualmente, o tratamento de pacientes com ICV consiste fundamentalmente na reposição intravenosa ou subcutânea de imunoglobulinas em dose de 400-600 mg/Kg de peso corporal, sendo administrada uma ou duas vezes no mês, visando manter os níveis sanguíneos de imunoglobulinas acima de 600 mg/dL (Orange et al., 2006).

Mesmo seguindo o tratamento de reposição de imunoglobulinas, a taxa de mortalidade destes pacientes é superior à da população normal (Cunningham-Rundles & Bodian, 1999). Pelo fato da maioria dos pacientes apresentarem infecções recorrentes e/ou crônicas, podendo também manifestar autoimunidade e doenças inflamatórias, foi sugerido que estas condições possam levar a um estímulo imunológico persistente e aumento do estresse oxidativo, o que poderia estar implicado na gravidade da doença e na associação com neoplasias (Aukrust et al., 1997; Sini et al., 2014).

A paraoxonase 1 (PON1) é uma enzima com função antiaterogênica e antioxidante. É sintetizada no fígado e excretada no sangue, atua na hidrólise dependente de cálcio de compostos organofosforados (paraoxonase), ésteres aromáticos (arilesterase) e ésteres cíclicos (lactonase), e está ligada à apolipoproteína A1 (Apo A1) e à lipoproteína de alta densidade (HDL) (Mackness et al., 1985; Jakubowski et al., 2000; Reddy et al., 2001; Primo-Parmo et al., 1996). Sua ação pode ser modulada negativamente por diversos fatores como produtos químicos ambientais, compostos farmacêuticos, dieta alimentar, tabagismo, idade e condições patológicas (Costa et al., 2005).

A análise de polimorfismos no gene da PON1 e a avaliação de sua atividade enzimática são muito estudadas em condições inflamatórias com aumento do estresse oxidativo como aquelas vistas na aterosclerose, na infecção pelo HIV e nas neoplasias (Hussein et al., 2011; De Roos et al., 2006).

Existem vários polimorfismos relatados no gene da PON1, no entanto os mais estudados são os das regiões codificadoras L55M e Q192R, estando o polimorfismo L55M relacionado às alterações na estabilidade da enzima arilesterase e o polimorfismo Q192R associado à formação de aloenzimas substrato-dependentes (Humbert et al., 1993; Primo-Parmo et al., 1996).

Considerando que tais polimorfismos podem estar associados a condições inflamatórias crônicas, durante trabalho realizado por nosso grupo que avaliou o polimorfismo L55M da PON1 em pacientes com ICV, foi observada menor atividade arilesterase da PON1 associada ao genótipo 55MM, o que está de acordo com dados da literatura (Hussein et al., 2011; de Roos et al., 2006) e aumento do número de infecções de vias aéreas superiores, pneumonias e maior incidência de neoplasias e óbitos nesses pacientes (Sini et al., 2014).

Curiosamente, muitas das manifestações clínicas e laboratoriais descritas em pacientes com ICV, independentemente do grupo etário analisado, são frequentemente vistas durante a senescência incluindo-se as alterações imunológicas que serão abordadas a seguir.

1.2 Senescência e Imunossenescência

O envelhecimento é um processo inevitável e irreversível, que promove a perda progressiva da capacidade funcional do organismo (Kovaiou & Grubeck-loebenstein, 2006).

O processo de envelhecimento em indivíduos acima de 65 anos é fisiológico e é chamado de senescência, enquanto que a presença de condições patológicas em indivíduos nesse grupo etário recebe o nome de senilidade (Papaléo et al., 2005).

A senescência celular foi observada pela primeira vez por Hayflick & Moorhead (1961), que determinaram, através do cultivo de fibroblastos em meio de cultura durante meses, que as células têm um número limitado de divisões e que após atingirem o limite - determinando assim a sua vida útil - são consideradas senescentes, sendo que este processo recebeu o nome de senescência replicativa (Hayflick & Moorhead, 1961).

A senescência replicativa está diretamente relacionada ao encurtamento dos telômeros, acarretando na instabilidade cromossômica (Hayflick & Moorhead, 1961; Harley et al., 1990). Além das alterações nos telômeros, outros fatores considerados estressores provocam a interrupção da divisão celular, porém de maneira mais rápida, denominada senescência prematura induzida pelo estresse.

Alguns desses estressores incluem oncogenes ativados (Bringold & Serrano, 2000; Ferbeyre et al., 2002; Palmero & Serrano, 2011), instabilidade genômica/danos no DNA (Gire et al., 2004; Kaneko et al., 2001; MacLaren et al., 2004), estresse oxidativo (Parrinello et al., 2003), condições sub-ótimas de cultura celular (Balin et al., 2002) e até mesmo interleucinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF α (Rodier et al., 2011; Coppe et al., 2008; Hubackova et al., 2012; Prattichizzo et al., 2016).

A imunossenescência nada mais é do que o envelhecimento do sistema imunológico. Durante este processo, constituintes do sistema imune, tais como as células-tronco hematopoiéticas, progenitores linfóides da medula óssea e do timo, estroma tímico, linfócitos maduros em órgãos linfóides secundários e elementos da resposta imune inata podem estar diminuídos, aumentados ou mesmo inalterados (Naylor et al., 2005; Goronzy et al., 2007; Messaoudi et al., 2004; Nikolich-Zugich et al., 2004; Hadrup et al., 2006; Torres et al., 2011).

Diversos estudos sugerindo alguns mecanismos que possam influenciar a imunossenescência já foram propostos, como por exemplo, alterações moleculares ligadas ao estresse oxidativo e a fatores hormonais (Cui et al., 2012).

Durante o envelhecimento ocorre o retardo da multiplicação celular e diminuição da reposição das células que morrem. As estruturas que permitem a integridade cromossômica durante a divisão celular são os telômeros, que estão localizados nas extremidades dos cromossomos e são compostos por longas séries de sequências curtas e repetidas em *tandem*, formadas por bases TTAGGG e por proteínas associadas (Zimmermann & Martens, 2005; Collins et al., 2000).

O encurtamento progressivo dos telômeros a cada divisão celular e a perda da informação genética são minimizados com a recuperação e adição de segmentos de DNA, sendo realizado pelo complexo enzimático ribonucleoprotéico denominado telomerase. Este complexo enzimático é uma DNA-polimerase RNA-dependente que sintetiza as repetições teloméricas de DNA e consiste de dois componentes essenciais: o componente funcional do RNA (nos seres humanos chamado hTERC), que serve como um molde para a síntese telomérica do DNA, e a proteína catalítica (hTERT) com atividade de transcriptase reversa (Cong et al., 2002).

Para muitos o mecanismo primário do envelhecimento é sem dúvida o encurtamento dos telômeros, sendo considerado um promissor marcador do envelhecimento celular (Kota et al., 2014).

Em muitas doenças neurodegenerativas a morte prematura de células é visível, estando muitas vezes, o encurtamento do telômero associado a tal condição (Kota et al., 2014). Estudos demonstraram que durante o envelhecimento, condições de estresse como doenças metabólicas ou inflamatórias, potencializam os danos gerados aos telômeros e também em suas proteínas associadas (Kota et al., 2014).

A redução da capacidade de divisão celular pode ser consequência da perda da atividade de telomerase . A atividade da telomerase pode ser observada principalmente em células com elevada capacidade proliferativa, como é visto em células germinativas jovens, células-tronco embrionárias e cancerígenas. No entanto, pode ser ativa em algumas células somáticas, como em células endoteliais, células endometriais em adultos e nos linfócitos T e B quando estimulados com antígenos ou mitógenos (Effros et al., 1994). Nos estímulos primários, ocorre uma intensa atividade dessa enzima, porém nos ciclos subsequentes de estimulação é vista a redução dessa atividade se tornando quase indetectável à medida que as células progridem para a senescência (Weng et al., 1995; Weng et al., 1997).

O envelhecimento tem sido caracterizado pelo “inflamm-aging”, que constitui um leve estado pró-inflamatório basal na ausência de doença. No entanto, pode influenciar no desencadeamento de doenças relacionadas ao envelhecimento que têm a inflamação como característica, como é o caso da doença de Alzheimer, diabetes tipo 2, neoplasias, aterosclerose, obesidade, osteoporose, osteoartrite, sarcopenia, depressão e síndrome de fragilidade do idoso (Ostan et al., 2008). Indicadores laboratoriais desse estado pró-inflamatório são os elevados níveis de interleucinas séricas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF- α , de proteínas de fase aguda (como proteína C-reativa) e de substância amilóide (Bauer et al., 1992).

O inflamm-aging é uma condição que se manifesta de maneira global entre os idosos, porém tem variações individuais, estando relacionadas com a morbidade e mortalidade desses indivíduos. Contrariamente, muitos centenários vivem bem, mesmo apresentando elevados níveis de marcadores inflamatórios característicos do inflamm-aging. Acredita-se que alterações genéticas nos genes da APOE, IL-6 e IL-10 podem estar associadas à fragilidade e com fatores pró ou anti-inflamatórios (Ostan et al., 2008; Mishto et al., 2003).

Há um grande interesse pela busca por marcadores biológicos associados à morbimortalidade no envelhecimento, como por exemplo a razão entre a quantidade das células T $CD4^+/CD8^+ < 1$, baixa proliferação de células T a mitógenos e expansão de células T senescentes ($CD28^-$) (Agius et al., 2009).

Para o reconhecimento do antígeno, além da apresentação via MHC, a participação de moléculas co-estimulatórias atuando como segundo sinal para ativação dos linfócitos T é fundamental (Abbas et al, 2018).

A molécula CD28 é um homodímero expresso na superfície de células T e promove o estímulo destas através da interação com os seus ligantes CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos e também atua em outras funções celulares importantes, como na estabilização do mRNA, controle do tráfego celular, formação de rafts lipídicos, e no metabolismo da glicose (Abbas et al. 2018). Além disso, a molécula CD28 vem sendo considerada como um biomarcador da imunossenescência, pois ao longo do envelhecimento sua expressão é reduzida na superfície dos linfócitos T (Effros, 1997).

Estudos mostram que a redução da atividade de telomerase pode estar relacionada à perda da expressão de CD28, já que linfócitos T $CD8^+ CD28^-$, além de terem baixa capacidade funcional, apresentam redução do comprimento dos telômeros (Weng et al., 1997).

Muitas das alterações imunológicas características do processo de envelhecimento podem ser observadas em indivíduos infectados pelo HIV que não estão em tratamento (Kalayjian et al., 2003; Van Baarle et al., 2005); Molina-Pinelo et al., 2009; Teixeira et al., 2001; Robbins et al., 2009; Neuhaus et al., 2010). Como resultado dessa senescência

prematura, os indivíduos infectados pelo HIV são mais acometidos por comorbidades relacionadas à idade do que a população geral (Deeks & Phillips, 2009; Effros et al., 2008).

Outra função imunológica investigada no processo de envelhecimento relaciona-se à imunidade humoral. As células B apresentam alterações tanto na quantidade, já que o número de células B circulantes na periferia do idoso encontra-se reduzido, quanto na qualidade, pois a afinidade dos anticorpos está reduzida quando comparada com a de jovens (Yang et al., 1996). Nos idosos há diminuição dos níveis de IgM e IgD na superfície celular, sugerindo uma mudança do compartimento de células B *naive* (CD27-) para o compartimento de células de memória (CD27+) (Caruso et al., 2009).

A diminuição da expressão de moléculas coestimulatórias na superfície das células B, como CD40 ou CD27, acarreta na ativação ineficaz de linfócitos T e prejuízo na troca de classe de imunoglobulinas (Aydar et al., 2002). Nos idosos, há diminuição dos níveis de IgM e IgD na superfície celular, sugerindo uma mudança do compartimento de células B *naive* (CD27-) para o compartimento de células de memória (CD27+) (Caruso et al., 2009).

O aumento da produção de autoanticorpos com o envelhecimento é muito relatado, tendo como exemplo, fator reumatoide, anticorpo anti-histona, anticorpo anti-DNA de cadeia dupla e anticorpo anti-cardiolipina. Acredita-se que por conta disso, os idosos tenham maior vulnerabilidade a doenças autoimunes (Ginaldi et al., 2001).

Pelo fato das características da imunossenescência, tais como, estado pró-inflamatório constante, aumento de infecções, resposta ineficaz a vacinas, alterações das populações linfocitárias, maior incidência de neoplasias e de doenças autoimunes e de alterações no metabolismo ósseo traçarem um paralelo com o quadro clínico e laboratorial observados na ICV, nossa hipótese é se os pacientes com esta imunodeficiência poderiam apresentar um envelhecimento precoce similar ao que ocorre durante a imunossenescência.

2. Objetivos

2.1. - Objetivos gerais

Avaliar se pacientes com imunodeficiência comum variável apresentam parâmetros imunológicos compatíveis com processo de imunossenescência em comparação a indivíduos idosos não senis e controles saudáveis.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a frequência de linfócitos TCD8+ CD28-, TCD8+ CD28+ e TCD4+ CD28-, TCD4+ CD28+ nos diferentes grupos.
2. Avaliar a atividade de telomerase na população de linfócitos TCD8+ nos diferentes grupos.
3. Avaliar a frequência dos genótipos do polimorfismo L55M da PON-1 em pacientes com imunodeficiência comum variável e idosos.
4. Associar a frequência do polimorfismo L55M da PON-1 às variáveis clínicas nos pacientes com imunodeficiência comum variável.

3. Materiais e métodos

3.1. Locais do estudo

O estudo envolveu pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) em acompanhamento no ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP, idosos do ambulatório de Idosos Sem Senilidade Sistêmica Sintomática do Serviço de Geriatria do HC-FMUSP e controles jovens saudáveis. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica (LIM 60) da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP, no Laboratório de Investigação Médica de Genética e Hematologia Molecular (LIM 31) e no Laboratório de Imunopatologia do Serviço de Hematologia do HCFMUSP.

O projeto foi submetido e aprovado pela CAPPesq (nº do parecer: 1.957.403) (Anexo 1). E o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi preenchido e assinado por cada participante da pesquisa (Anexo 2).

3.2. Casuística

Foram convidados a participar do estudo 16 pacientes com imunodeficiência comum variável de ambos os sexos e idades variando de 18 a 49 anos. Os pacientes foram pareados e distribuídos em três blocos de acordo com a faixa etária: 18 a 29 anos, 30 a 39 anos e 40 a 49 anos, sendo cada bloco composto por três mulheres e dois homens. Os critérios diagnósticos seguiram os parâmetros estabelecidos pelo Grupo Pan-americano de Imunodeficiências (PAGID).

O grupo de idosos foi composto por 12 mulheres sem manifestação de senilidade sistêmica com idades variando de 65 a 90 anos. As idosas foram distribuídas em três blocos de acordo com a faixa etária: 65 a 70 anos, 71 a 79 anos e 80 a 90 anos, sendo cada grupo composto por quatro mulheres.

O grupo de controles saudáveis foi composto por 05 indivíduos distribuídos em três blocos de acordo com a faixa etária: 18 a 29 anos (dois indivíduos), 30 a 39 anos (dois indivíduos) e 40 a 49 anos, com um indivíduo.

3.3. Critérios de inclusão e exclusão

3.3.1. Imunodeficiência comum variável

Foram selecionados os pacientes com diagnóstico estabelecido de ICV com idades entre 18 e 49 anos.

Foram excluídos os indivíduos tabagistas, gestantes, portadores de hipogamaglobulinemias secundárias, neoplasias atuais ou tratadas há menos de dois anos, em uso de corticoides, drogas imunossupressoras, modificadoras da resposta imunológica ou imunobiológicos, manifestando infecções agudas bacterianas ou virais no momento da coleta do sangue.

3.3.2 Idosos sem senilidade sistêmica

Foram incluídos idosos com idades entre 65 e 90 anos, assintomáticos ou com apenas alterações de caráter não sistêmico como osteopenia, osteoporose, glaucoma, catarata, rinite, hipertensão arterial leve controlada, artrose mono ou oligo-articular, incontinência urinária, dispepsia, esofagite, pólio benigno de cólon, alterações auditivas, dislipidemia hiperlipidêmica e gastrite não especificada.

Foram excluídos idosos com histórico de hipogamaglobulinemia com infecções de repetição, tabagistas e ex-tabagistas há menos de 20 anos, com manifestação de doenças autoimunes e/ou inflamatórias crônicas ou agudas com foco aparente, com histórico de neoplasias tratadas há menos de dois anos, hipertensão arterial moderada ou grave, doenças neurodegenerativas, diabetes mellitus e insuficiência renal.

3.3.3. Controles saudáveis

Foram selecionados indivíduos jovens saudáveis com idades entre 18 a 49 anos.

Foram excluídos os tabagistas e ex-tabagistas há menos de 20 anos, gestantes, com histórico de hipogamaglobulinemia, infecções de repetição ou agudas com foco aparente, doenças autoimunes e/ou inflamatórias crônicas, histórico de neoplasias, diabetes mellitus.

4.4. Coleta de amostras

Após a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido, as amostras foram processadas dentro das primeiras 24h após a coleta. Em relação aos pacientes com ICV, as coletas das amostras foram realizadas imediatamente antes da infusão mensal de imunoglobulina.

4.4.1. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs)

Foram coletados 35 mL de sangue periférico de cada indivíduo participante do estudo, em tubos ACD (Ácido Cítrico Citrato de Sódio e Dextrose - BD). Todas as amostras foram processadas para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) com Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, United Kingdom) (Baerlocher, 2002). Para tanto, as amostras foram diluídas em solução salina balanceada de HANKS (HBSS) na mesma proporção. Em 3 tubos cônicos de 50 mL, devidamente identificados, foi adicionado 15 mL de Ficoll-Paque e com estes inclinados a 45°C foi acrescentado cuidadosamente pelas paredes de cada um dos tubos cônicos 24 mL da amostra diluída em HANKS criando uma interface entre o Ficoll-Paque e a amostra de sangue diluída, sem homogeneização do tubo. Os tubos foram centrifugados a 2.300 rpm, à temperatura de 18 -20 °C por 30 minutos, sem utilização de freio ao final da centrifugação. Após a centrifugação, a camada de CMSP foi aspirada e transferida para um novo tubo cônico, devidamente identificado. Em seguida foi adicionado HANKS à camada de CMSPs, completando o volume de 50 mL e procedida à centrifugação a 1.700 rpm por 10 minutos. O

sobrenadante foi removido e as células novamente lavadas com HANKS e centrifugadas nas mesmas condições anteriores, removendo-se posteriormente o sobrenadante, tendo a homogeneização do pellet celular. Para eliminação das hemácias, foi acrescentado 3 mL da solução de lise (ACK) na amostra, por um período de 2 minutos. Para neutralizar a ação do ACK, foi acrescentado 10 mL de HANKS na amostra que posteriormente foi centrifugada a 1.700 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet celular formado foi cuidadosamente homogeneizado. Posteriormente foi acrescentada a amostra 10 mL da solução HANKS. A contagem foi realizada e a concentração celular definida em 1×10^7 células a cada 1 mL de meio de congelamento que é composto por 90% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO). Em seguida as células foram acondicionadas em criotubos e armazenadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e após 24 horas, transferidas para o tanque de nitrogênio líquido.

4.4.2. Descongelamento das células criopreservadas

As células foram descongeladas de forma rápida através da agitação dos criotubos em banho-maria a 37°C e, em seguida foi feita a transferência das células para tubos contendo 9 mL de meio R10 (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado) e posterior centrifugação a 1.800 rpm por 10 minutos a 20°C . O sobrenadante foi removido e o botão celular homogeneizado e ressuspenso em 5 mL de meio R10. A contagem celular foi realizada no contador automatizado (*Countess Automated Cell Counter da Invitrogen*) utilizando-se 10 μL de suspensão celular + 10 μL de Trypan Blue 0,4%. Após a contagem, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em R10 na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL.

4.4.3. Imunofenotipagem de células TCD4+ e TCD8+

As células já ajustadas na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL foram incubadas com os anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD28 e com o corante de viabilidade celular *Live/Dead* (Invitrogen) seguindo as titulações padronizadas no LIM-60 (Tabela 1) por 15 minutos, na geladeira ao abrigo da luz. Após isso, as amostras foram lavadas com 2 mL de tampão MACS Buffer e centrifugadas a 1.800 rpm por 5 minutos a 20°C. O sobrenadante foi removido e o botão celular homogeneizado e ressuspensionado em 2 mL de MACS Buffer. As amostras ficaram sob refrigeração a 4°C até o momento da aquisição no citômetro de fluxo BD FACS Aria II. As análises foram realizadas no software FlowJo 9.9.4®.

Tabela 1 - Pannel de anticorpos monoclonais para avaliação de células T CD4+ e T CD8+

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Titulação
CD3	SK7	PerCP	10 µL
CD8	MEM-31	PE	10 µL
CD4	MEM-241	FITC	20 µl
CD28	CD28.2	APC	10 µl
Live/Dead	-	PE Texas Red	0,4 µl

4.4.4. Estratégia de análise da imunofenotipagem

A voltagem do equipamento foi ajustada utilizando-se o reagente *Comp-beads* anti-IgG Mouse (BD, Bioscience) marcadas individualmente para cada fluorescência. Após o ajuste de voltagem no citômetro de fluxo, as amostras foram adquiridas e seus dados gravados para posterior análise no software FlowJo 9.9.4 (Tree Star®). Após a compensação

das amostras, inicialmente delimitamos a área denominada por *Time*, que permite retirar as oscilações do laser que possam ter ocorrido durante a aquisição. Nessa estratégia, coloca-se no eixo da ordenada o parâmetro PE, sendo esse o detector mais sensível, e no eixo da abscissa a opção *Time* para então delimitar a região mais contínua (Figura 1-A).

Em seguida, utilizou-se o parâmetro de “*Singlets*”, que permite separar apenas as células que passaram uma a uma em frente ao laser num fluxo contínuo, eliminando as células que passaram juntas, evitando dados errôneos. Optamos por fazer duas vezes o parâmetro de “*Singlets*”, visando filtrar ainda mais a análise. Para isso, no primeiro “*Singlets*”, foi delimitado no eixo da ordenada o parâmetro *Foward Scatter-Height* (FSC-H) e na abscissa, *Foward Scatter-Area* (FSC-A) (Figura 1-B) e no segundo “*Singlets*”, *SideScatter- Height* (SSC-H) na ordenada e *Side Scatter-Area* (SSC-A) na abscissa, sendo determinada a região em diagonal mais condensada com os eventos, (Figura 1-C). Em seguida, outro grupo foi delimitado considerando a viabilidade celular, através da utilização do *Live/Dead* (Invitrogen), no qual as células viáveis são delimitadas na região negativa (Figura 1-D).

Figura 1. Estratégia “Time”, “Singlets” e “Viabilidade”

Para a identificação das células de interesse o grupo de linfócitos foi separado por tamanho e granularidade (FSC-A x SSC-A) (Figura 2-A). Em seguida, o *gate* de linfócitos T

CD3⁺ foi selecionado (SSC-A X CD3) (Figura 2-B). A partir do *gate* de células CD3⁺, foram selecionadas as células T CD8⁺ e T CD4⁺ (CD8 x CD4) (Figura 2-C). O passo seguinte foi avaliar a expressão de CD28 nas populações de células T CD8⁺ (SSC-A x CD28) (Figura 2-D) e T CD4⁺ (SSC-A x CD28) (Figura 2-E).

Figura 2. Estratégia de análise células TCD8⁺ e TCD4⁺

4.5. Determinação da atividade de telomerase

4.5.1. Separação celular (cell sorting) de linfócitos TCD8⁺

Para avaliar a atividade de telomerase nas células T CD8⁺ presentes em amostras de CMSPs de pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis foi necessária a separação dessa população celular pelo método de cell sorting no citômetro de fluxo FACSaria II (BD Bioscience), capaz de analisar e isolar até 4 subpopulações celulares de cada amostra. Foram marcadas 5 x 10⁶ CMSPs, utilizando o painel de anticorpos monoclonais (anti-CD3, anti-CD4,

anti-CD8, anti-CD28 e *Live/Dead*), e após incubação e marcação, as células foram adquiridas e durante o processo de aquisição a população de células T CD8⁺ foi selecionada.

O mecanismo de cell sorting consiste na formação de gotículas que contêm as células de interesse. A estabilização e formação das gotículas ocorrem através da distância constante entre a interrupção e a interseção do laser do aparelho, e através de uma vibração de acionamento da gota, é liberado um jato líquido através de um transdutor piezoelétrico chamado “nozzle”. Após saírem do nozzle, as células passam pelo ponto de interseção do laser onde são analisadas e classificadas de acordo com os requisitos predefinidos. No entanto, nesta etapa as células estão muito próximas umas das outras impedindo a formação de gotículas individuais. Em seguida, as células chegam ao ponto de interrupção, onde são compactadas em gotículas únicas. As gotículas encontram-se sob um campo elétrico estático formado entre duas placas de metal (placas de deflexão). As gotículas carregadas eletricamente são desviadas da corrente principal vertical para tubos de coleta previamente identificados. Após o processo, é verificado o grau de pureza da população celular separada que deve estar acima de 95%.

Em relação à separação dos linfócitos T CD8⁺ a obtenção celular após o processo foi de 2×10^5 . Em seguida essas células foram transferidas para eppendorfs, sendo centrifugadas em altíssima rotação para formação de pellets celulares. Os sobrenadantes foram retirados de forma cuidadosa e os pellets armazenados a -80 °C.

Todas as etapas do processo foram rigorosamente cumpridas na separação da população TCD8⁺.

4.5.2. Atividade da telomerase

A avaliação da atividade da telomerase foi feita através do método TRAP *do inglês* - Telomere Repeat Amplification Protocol - (Kim et al., 1994) seguido da reação ELISA *do inglês* – Enzyme-linked immunoabsorbent assay, para quantificação dos produtos da PCR *do inglês* - Polymerase Chain Reaction.

4.5.2.1. Preparo do extrato celular

O processo de preparo do extrato celular e da PCR foi realizado em condições assépticas, em ambiente de capela de fluxo laminar, com tubos de PCR estéreis, DNase, RNasefree, ponteiros estéreis DNase, RNasefree centrífuga refrigerada conforme orientações do fabricante do kit TeloTAGGGTelomerase PCR ELISA PLUS (Roche, Catálogo 12 013 789 001).

O pellet celular foi ressuspenso em 200 µL de reagente de lise pré-resfriado em gelo. A amostra foi incubada por 30 minutos em gelo. O lisado celular foi centrifugado a 16.000 giros por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e cerca de 175 µL e transferido para um tubo novo.

4.5.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Cada amostra processada teve um controle negativo, a partir do tratamento de uma alíquota dessa amostra a 85°C, por 10 minutos. Foi realizado também um controle negativo com a utilização do reagente de lise, no lugar da amostra. O kit possuía amostras com

concentrações conhecidas de telômeros, denominadas control template low e control template high, contendo, respectivamente, 0,001 e 0,1 amol/uL. Como controle positivo da PCR, em cada tubo processado, além da amplificação dos telômeros, foi amplificado também um “padrão interno”, constituído de uma sequência de 216 pares de base. O kit forneceu uma “mistura de reação” contendo a Taq DNA polimerase, os primers biotinilados para os telômeros e para o “padrão interno” e os nucleotídeos utilizados pela Taq DNA polimerase.

4.5.2.3. Preparo dos tubos de PCR

Nos tubos das amostras, foi adicionado 1 µL do extrato celular. No tubo dos controles negativos foi adicionado 1 µL do extrato celular correspondente inativado pelo calor. Para cada amostra testada e os controles, foram adicionados 25µL de “mistura de reação” e 5 µL do “padrão interno” em um tubo apropriado para PCR. Para o control template low foi adicionado 1 µL de cada em um tubo separado. Todos os tubos foram completados com água bidestilada livre de RNase e DNase para volume final de 50 µL. Os tubos foram transferidos para o termociclador onde a reação seguiu: 1 ciclo de 25°C por 30 minutos (Elongamento), 1 ciclo de 94°C por 5 minutos (Inativação da telomerase), 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (Denaturação), 30 ciclos de 50°C por 30 segundos (Anelamento), 30 ciclos de 72°C por 90 segundos (Polimerização), seguidos de 1 ciclo final de 72°C por 10 minutos.

4.5.2.4. Hibridização e ELISA

Cada tubo contendo os produtos de PCR das amostras foi processado durante a realização do ELISA em dois poços separados, um deles contendo tampão de hibridização

para telômeros e o outro poço contendo tampão de hibridização para o “padrão interno”. Os controles negativos foram hibridizados com tampão de hibridização para telômeros.

4.5.2.5. Preparo da hibridização e ELISA

Para cada amostra foram pipetados 10 µL de reagente de desnaturação em dois tubos separados. Em cada tubo foi adicionado 2,5 µL do produto de amplificação com posterior incubação a 15 a 25 °C, por 10 minutos. Foi adicionado 100 µL do tampão de hibridização para telômeros em um dos tubos e 100 µL do tampão de hibridização para o “padrão interno” no outro tubo. Os tubos foram homogeneizados no vórtex. Os controles negativos foram tratados apenas com tampão de hibridização para telômeros. Foram transferidos 100 µL de cada mistura para cada poço correspondente na microplaca. Os poços foram recobertos com a folha adesiva e a placa incubada em um agitador a 37°C a 300 rpm por duas horas. As soluções de hibridização foram removidas completamente. Foram realizadas três lavagens com 250 µL de tampão de lavagem por no mínimo 30 segundos cada, removendo assim o tampão. Foi adicionado aos poços 100 µL de solução de anticorpo policlonal antidigoxigenina (Anti-DIG) conjugado com peroxidase, sendo a placa posteriormente recoberta com a folha adesiva e incubada no agitador a 300 rpm, por 30 minutos, a 15 a 25°C. A solução foi removida completamente e cinco lavagens foram realizadas cada com 250 µL de tampão de lavagem, removendo completamente o tampão ao final. Foi adicionado aos poços 100 µL de solução de tetrametilbenzidina (TMB), substrato para produção de cor, pré-aquecida a 15 a 25°C. A placa foi incubada a 300 rpm, por 20 minutos, a 15 a 25°C. Sem remover o substrato em reação, foi adicionado 100 µL do reagente de parada (stop), para interromper a formação de cor, com mudança da cor de azul para o amarelo. Um leitor de placa de ELISA foi utilizado para medir a absorbância das

amostras a 450 nm (com um comprimento de onda de referência de 690 nm) em até 30 minutos após o acréscimo do stop reagent.

A média das leituras de absorvância dos controles negativos foi subtraída e as amostras foram consideradas positivas para a telomerase se a diferença na absorvância (ΔA) atingiu o dobro da atividade de fundo (atividade de fundo é o valor do controle negativo ou da amostra tratada termicamente).

4.6. Determinação do polimorfismo L55M da PON-1

4.6.1. Obtenção das amostras

Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubo com anticoagulante EDTA. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos a 8°C, para obtenção do “buffycoat”. A camada contendo os leucócitos e plaquetas foi retirada e fracionada em duas alíquotas de 500 µL em tubo de 1,5 mL e congelada a -20°C para posterior purificação e obtenção do DNA genômico.

4.6.2. Obtenção de DNA genômico

O DNA genômico foi obtido por método de salting out conforme descrito por Miller et al., 1998. Neste método, ocorre a remoção de proteínas celulares pela desidratação e precipitação com solução saturada de NaCl.

Nas alíquotas previamente separadas foi acrescentado 750µL de tampão de lise de sacarose (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, sacarose 34 mM, MgCl₂ 10mM, triton X-100 1%). A amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 segundos. O sobrenadante foi removido através da sucção por vácuo, restando no fundo do tubo apenas o pellet. Foi adicionado então 1 mL de tampão de lise e realizada uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos, com novo descarte de sobrenadante. Esse processo se repetiu por mais uma vez. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 500 µL de solução RCLB ao pellet e posterior centrifugação, por 3 minutos, a 3.000 rpm. Ao final do processo, o sobrenadante foi removido por sistema a vácuo. Em seguida, foi adicionado ao pellet 500 µL de solução TEN (Tris-HCl 10mM, pH8,2, EDTA 2mM e NaCl 400mM), 5 µL de SDS 10% e 3 µL de Proteinase K. A solução foi homogeneizada brevemente por inversão até que o pellet se desprendesse do fundo do tubo. As amostras foram incubadas por uma hora a 56°C, em placa térmica. Após o período de incubação, foi adicionado 150 µL de NaCl (5M). Após agitação vigorosa, a amostra foi centrifugada a 5.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol. A amostra foi então homogeneizada por inversão. Sequencialmente, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4°C para a formação de um pellet de DNA. O sobrenadante foi desprezado por inversão e foi acrescentado 1 mL de etanol 70%. Após nova centrifugação a 5.000 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado. Esse processo foi repetido por mais três vezes. Ao final da quarta repetição, o tubo contendo o pellet de DNA foi seco em SpeedVac, durante 20 minutos. Ao final do processo de secagem do DNA, o mesmo foi reidratado com 100 µL de solução TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM). A quantificação do DNA obtido foi realizada por espectrofotometria utilizando-se o equipamento NanoDrop (NanoDrop, EUA).

4.6.3. Genotipagem para determinação do polimorfismo L55M da PON-1

Foram amplificados fragmentos específicos para cada região pesquisada, posteriormente foram digeridos por enzimas de restrição. A estratégia permite diferenciar os possíveis genótipos para o polimorfismo estudado (análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição - RFLP).

As análises foram realizadas conforme descritas por Motti et al. (2001). Para a digestão dos produtos da PCR-multiplex, foi utilizada a enzima de restrição Hinf-I, que deu origem aos fragmentos capazes de caracterizar o polimorfismo da PON1-L55M.

O processo de PCR seguiu as seguintes relações: em uma reação de 25 µL de volume utilizou-se Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8,3, MgCl₂ 7 mM, 600 mM de cada nucleotídeo trifosfato, 0,16 mM de primer *forward* e *reverse* de PON1-55, 1 µg de DNA genômico e 1U de Taq-polimerase. No termociclador a reação seguirá da seguinte maneira: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto (denaturação), 61°C por 45 segundos (anelamento) e 72°C por 45 segundos (extensão), seguidos de 1 ciclo final de 72°C por 5 minutos.

As sequências de primers utilizadas:

PON1-55F (5'→3'): GAG TGA TGT ATA GCC CCA GTT TC

PON1-55R (5'→3'): AGT CCA TTA GGC AGT ATC TCCg

O produto amplificado possui 144pb. Teve então início a digestão, seguindo uma reação de 2 horas de duração, a 37°C constantes, com 2U de enzima Hinf-I, preparadas em tampão contendo Tris-HCl 10mM, pH 8,0, NaCl 60mM, MgCl₂ 10mM e β-Mercaptoetanol

1mM. Ao final da digestão, o produto final se apresentou da seguinte forma: havendo digestão pela enzima do fragmento contendo 144pb, foi determinado como alelo PON1-55M (Figura 3-A). Se a amostra apresentou o alelo PON1-55L, o resultado foi de uma banda de 122pb (Figura 3-B), resultante da digestão do DNA pela enzima de restrição. As amostras amplificadas e posteriormente digeridas foram colocadas em gel de agarose a 3% com o corante fluorescente GelRed, para corrida eletroforetica e visualizadas no ImageQuant™ LAS 4000. Para tanto, as amostras foram diluídas 1:5 em tampão contendo 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e glicerol 30%. Foram aplicados 20µL do produto final da reação PCR-RFLP diluído em 4µL do tampão anteriormente descrito, além de 5µL de 50pb que foi utilizado como marcador de peso molecular (PM) (Figura 3). A eletroforese foi realizada em sistema Mini-PROTEAN® II da BioRad, utilizando-se espaçadores de 0,5mm de espessura.

Figura 3. Fragmentos MM, LM e LL do polimorfismo PON1 – L55M formados após a digestão enzimática

4.7. Análise dos Resultados

As análises referentes à frequência das populações linfocitárias, distribuição dos genótipos do polimorfismo L55M da PON-1 e sua associação com as diversas variáveis

clínicas foram feitas utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes. Foram considerados significantes os valores de p abaixo de 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Dados demográficos

O grupo de pacientes com imunodeficiência comum variável (ICV) foi composto por 16 indivíduos, sendo 9 (56,3%) do sexo feminino e 7 (43,8%) do sexo masculino, com média de idade de $32,81 \pm 8,93$ anos. Os dados referentes à idade de início dos sintomas, ao tempo de doença, à idade do diagnóstico e ao retardo diagnóstico encontram-se na Tabela 2. O segundo grupo analisado foi composto por 12 mulheres idosas (Idosos) com média de idade de $75,41 \pm 8,94$ anos, sendo 10 de cor branca. Como grupo controle foram avaliados 5 indivíduos jovens saudáveis, sendo 4 mulheres (80,00%) e apenas um homem (20%) com média de idade de $30,40 \pm 7,23$ anos.

Tabela 2 - Características demográficas de pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis

Dados Gerais	ICV (n=16)	Idosos (n=12)	Controles saudáveis (n=5)
Femininos	9 (56,3%)	12 (100%)	4 (80,00%)
Masculinos	7 (43,8%)	0	1 (20,00%)
Branco	9 (56,3%)	10 (83,3%)	3 (60,0%)
Não-branco	7 (43,8%)	2 (16,7%)	2 (40,00%)
Idade*	$32,81 \pm 8,93$	$75,41 \pm 8,94$	$30,40 \pm 7,23$
Início dos sintomas*	$12 \pm 10,34$	-	-
Tempo de doença*	$22,06 \pm 8,92$	-	-
Idade do diagnóstico*	$21,94 \pm 9,92$	-	-
Retardo diagnóstico*	$10 \pm 7,20$	-	-

*Média $\pm$ DP (anos)

Houve predominância do sexo feminino em relação ao masculino ($p=0,008$) no grupo de idosos $n= 12$ (100%) e no grupo de controles saudáveis $n= 4$ (80%). No grupo de pacientes com ICV a distribuição dos gêneros foi igual.

Quanto à cor da pele, 9 (56,3%) dos pacientes com ICV autodeclararam-se brancos e 7 (43,8%) como não-brancos. Entre os idosos, 10 (83,3%) autodeclararam-se brancos e 2 (16,7%) como não-brancos. Em relação aos controles saudáveis, 3 (60,0%) autodeclararam-se brancos e 2 (40,0%) como não-brancos. A distribuição de brancos e não-brancos foi homogênea entre os grupos ($p=0,281$).

5.2. Descrição dos genótipos do polimorfismo PON1-L55M

As frequências genotípicas do polimorfismo PON1-L55M nos grupos de pacientes e idosos estão demonstradas na Tabela 3. Em um dos pacientes com ICV não foi possível identificar o genótipo para o polimorfismo, provavelmente devido a mutações alélicas que não foram contempladas neste estudo.

Tabela 3 – Distribuição genotípica do polimorfismo PON-1 L55M em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Genótipo	ICV (n=16)	Idosos (n=12)	Controles saudáveis (n=5)
55MM	3 (18,8%)	2 (16,7%)	-
55LM	7 (43,8%)	3 (25,0%)	-
55LL	5 (31,3%)	7 (58,3%)	-
Não detectado	1 (6,3%)	0 (0%)	-

5.3. Características clínicas. A investigação clínica dos pacientes e idosos foi realizada de acordo com a rotina do serviço para pacientes com ICV. As manifestações investigadas encontram-se demonstradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Manifestações clínicas investigadas em pacientes com ICV e idosos

a. Infecções	b. Aspectos clínicos e laboratoriais	c. Comorbidades
<ul style="list-style-type: none"> • Meningite • Trato Urinário • Oportunistas • Sepses • Vias Aéreas <ul style="list-style-type: none"> - Pulmonares - Sinusites - Otites 	<ul style="list-style-type: none"> • Linfonodomegalia • Linfoproliferação • Gastrointestinais: <ul style="list-style-type: none"> - Gastrite e Esofagite - Diarreia infecciosa • Esplenomegalia • Hepatomegalia • Hipertensão portal 	<ul style="list-style-type: none"> • Atopia <ul style="list-style-type: none"> - Asma - Rinite - Dermatite atópica • Autoimunidade

5.4. Comparação entre parâmetros clínicos e laboratoriais e genótipos do polimorfismo PON1 L55M.

Na Tabela 5 estão listadas as manifestações clínicas que foram detectadas mais frequentemente nos pacientes com ICV, distribuídas de acordo com os genótipos 55MM, 55LM e 55LL. Como pode ser observado, não houve diferença entre os genótipos do polimorfismo PON1 L55M e frequência de infecções de vias aéreas (pneumonias, sinusites, otites e tonsilites), diarreia infecciosa, infecções oportunistas, hepatoesplenomegalia, gastrite, atopia (asma, rinoconjuntivite, dermatite atópica), doenças autoimunes (doença celíaca, doenças inflamatórias intestinais, citopenias, vitiligo, tireoidite) e osteopenia ou osteoporose.

Tabela 5 - Manifestações clínicas em relação aos genótipos do polimorfismo PON1 L55M em pacientes com ICV

		Sim		Não	
*Infecções de vias aéreas	55MM	3 (100,00%)	p>0,05	0 (0%)	p>0,05
	55LM	7 (100,00%)		0 (0%)	
	55LL	4 (80,00%)		1 (20,00%)	
* Diarreia	55MM	2 (66,7%)	p>0,05	1 (33,3%)	

infecçiosa	55LM	5 (71,4%)		2 (28,6%)	p>0,05
	55LL	4 (80,00%)		1 (20,00%)	
*Infecções oportunistas	55MM	2 (66,7%)	p>0,05	1 (33,3%)	p>0,05
	55LM	4 (57,1%)		3 (42,9%)	
	55LL	2 (40,00%)		3 (60,00%)	
* Hepatoesplenomegalia	55MM	1 (33,3%)	p>0,05	2 (66,7%)	p>0,05
	55LM	5 (71,4%)		2 (28,6%)	
	55LL	0 (0%)		5 (100,00%)	
*Gastrite	55MM	2 (66,7%)	p>0,05	1 (33,3%)	p>0,05
	55LM	5 (71,4%)		2 (28,6%)	
	55LL	5 (100,00%)		0 (0%)	
*Atopia	55MM	3 (100,00%)	p>0,05	0 (0%)	p>0,05
	55LM	6 (85,7%)		1 (14,3%)	
	55LL	2 (40,00%)		3 (60%)	
*Autoimunidade	55MM	0 (0%)	p>0,05	3 (100,00%)	p>0,05
	55LM	2 (28,6%)		5 (71,4%)	
	55LL	2 (40,00%)		3 (60,00%)	
Osteopenia ou Osteoporose	55MM	2 (100%)	p>0,05	0 (0%)	p>0,05
	55LM	4 (100,00%)		0 (0%)	
	55LL	0 (0%)		1 (100,00%)	

5.5. Distribuição da população linfocitária TCD8⁺CD28⁻ em relação ao número total de linfócitos TCD8⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Na Tabela 6 estão apresentados os dados referentes à frequência de linfócitos TCD8⁺CD28⁻ em relação ao número total de linfócitos TCD8⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis. O número total de linfócitos TCD8⁺ engloba linfócitos TCD8⁺CD28⁺ e TCD8⁺CD28⁻. O cálculo estatístico refere-se aos valores das medianas.

Tabela 6- Frequência de linfócitos TCD8⁺ TCD28⁻ em relação à população total de TCD8⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

TCD8⁺ TCD28⁻	ICV (n=16)	Idosos (n=12)	Controles saudáveis (n=5)
Média ± Erro padrão	62,59 ± 5,27	66,23 ± 3,71	27,86 ± 4,29
95% IC para média	(51,35 – 73,82)	(58,05 – 74,41)	(15,92 – 39,79)
Mediana	62,40	68,95	25,70
Desvio Padrão	21,08	12,87	9,61
Mínimo	19,70	38,90	20,20
Máximo	91,20	82,60	43,90

Conforme pode ser observado (Figura 4), a população linfocitária TCD8⁺CD28⁻ foi igualmente predominante (p=0,756) no grupo ICV (mediana = 62,40) e no grupo de idosos (mediana = 68,95). Em contrapartida, os valores da população TCD8⁺CD28⁻ no grupo controle constituíram a minoria (mediana = 25,70), estando significativamente abaixo dos valores referentes aos pacientes com ICV (mediana = 62,40) (p=0,005) e idosos (mediana = 68,95) (p=0,03).

Figura 4. Frequência de linfócitos TCD8⁺ TCD28⁻ em relação à população total de TCD8⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Controles x ICV ($p=0,005$), Controles x Idosos ($p=0,03$), ICV x Idosos ($p=0,756$)

5.6. Distribuição da população linfocitária TCD8⁺CD28⁺ em relação ao número total de linfócitos TCD8⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Na Tabela 7 estão apresentados os dados referentes à frequência de linfócitos TCD8⁺CD28⁺ em relação ao número total linfócitos TCD8⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis. O número total de linfócitos TCD8⁺ engloba linfócitos TCD8⁺CD28⁺ e TCD8⁺CD28⁻. O cálculo estatístico refere-se aos valores das medianas.

Tabela 7- Frequência de linfócitos TCD8⁺ TCD28⁺ em relação à população total de CD8⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

TCD8 ⁺ TCD28 ⁺	ICV (n=15)	Idosos (n=9)	Controles saudáveis (n=5)
Média ± Erro padrão	37, 15± 5,25	33,60 ± 3,70	71,96 ± 0,30
95% IC para média	(25,95 – 48,36)	(25,45 – 41,75)	(60,11 – 83,80)
Mediana	37,35	31,00	74,20
Desvio Padrão	21,03	12,82	9,53
Mínimo	8,70	17,40	56,00
Máximo	79,80	60,80	79,50

Conforme pode ser observado (Figura 5), a população linfocitária TCD8⁺CD28⁺ foi igualmente ($p=0,756$) no grupo ICV (mediana = 37,35) e no grupo de idosos (mediana = 31,00). Em contrapartida, os valores de TCD8⁺CD28⁺ no grupo controle constituíram a maioria (mediana = 74,20), estando significativamente acima dos valores referentes aos pacientes com ICV (mediana = 37,35) ($p=0,005$) e idosos (mediana = 31,00) ($p=0,03$).

Figura 5. Frequência de linfócitos TCD8⁺ TCD28⁺ em relação à população total de CD8⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Controles x ICV ($p=0,005$), Controles x Idosos ($p=0,03$), ICV x Idosos ($p=0,756$)

5. 7. Distribuição da população linfocitária TCD8⁺CD28⁻ em relação ao número total de linfócitos TCD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Na Tabela 8 estão apresentados os dados referentes à frequência de linfócitos TCD8⁺CD28⁻ em relação ao número total linfócitos TCD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis. Os linfócitos TCD3⁺ englobam linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺. O cálculo estatístico refere-se aos valores das medianas.

Tabela 8- Frequência de linfócitos TCD8+ TCD28- em relação à população total de CD3+ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

TCD3+ TCD8+ TCD28-	ICV (n=15)	Idosos (n=9)	Controles saudáveis (n=5)
Média ± Erro padrão	15,73 ± 3,65	5,67 ± 0,857	2,32 ± 0,761
95% IC para média	(7,94 – 23,52)	(3,78 – 7,55)	(0,21– 4,43)
Mediana	7,60	5,35	1,70
Desvio Padrão	14,61	2,96	1,70
Mínimo	1	1	1
Máximo	52	12	5

Conforme pode ser observado (Figura 6), a população linfocitária TCD8+CD28- foi igualmente predominante ($p=0,089$) no grupo ICV (mediana = 7,60) e no grupo de idosos (mediana = 5,35). Os valores da população TCD8+CD28- no grupo controle constituíram a minoria (mediana = 1,70) estando abaixo dos valores referentes aos pacientes com ICV (mediana = 7,60) ($p=0,002$) e igual em relação ao grupo de idosos (mediana = 5,35) ($p=0,068$).

Figura 6. Distribuição da população linfocitária TCD8⁺CD28⁻ em relação ao número total de linfócitos TCD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Controles x ICV ($p= 0,002$), Controles x Idosos ($p=0,068$), ICV x Idosos ($p=0,089$)

5. 8. Distribuição da população linfocitária TCD8⁺CD28⁺ em relação ao número total de linfócitos TCD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Na Tabela 9 estão apresentados os dados referentes à frequência de linfócitos TCD8⁺CD28⁺ em relação ao número total linfócitos TCD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis. Os linfócitos TCD3⁺ englobam linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺. O cálculo estatístico refere-se aos valores das medianas.

Tabela 9- Frequência de linfócitos TCD8⁺ TCD28⁺ em relação à população total de CD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

TCD3 ⁺ TCD8 ⁺ TCD28 ⁺	ICV (n=15)	Idosos (n=9)	Controles saudáveis (n=5)
Média ± Erro padrão	5,82 ± 0,643	3,12 ± 0,705	5,46 ± 0,677
95% IC para média	(4,45 – 7,19)	(1,56 – 4,67)	(3,58 – 7,34)
Mediana	4,85	3,00	5,00
Desvio Padrão	2,57	2,44	1,51
Mínimo	2	1	4
Máximo	10	8	7

Figura 7. Frequência de linfócitos TCD8⁺ TCD28⁺ em relação à população total de CD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Controles x ICV (p=0,901), Controles x Idosos (p=0,037), ICV x Idosos (p=0,002)

Conforme pode ser observado (Figura 7), a população linfocitária TCD8⁺CD28⁺ foi igualmente predominante (p=0,901) no grupo ICV (mediana = 4,85) e no grupo de controles saudáveis (mediana = 5,00). Os valores da população TCD8⁺CD28⁺ no grupo de idosos constituíram a minoria (mediana = 3,00) estando significativamente abaixo dos valores referentes aos pacientes com ICV (mediana = 4,85) (p=0,002) e controles saudáveis (mediana = 5,00) (p=0,037).

5. 9. Distribuição da população linfocitária TCD4⁺CD28⁻ em relação ao número total de linfócitos TCD4⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Na Tabela 10 estão apresentados os dados referentes à frequência de linfócitos TCD4⁺CD28⁻ em relação ao número total linfócitos TCD4⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis. O número total de linfócitos TCD4⁺ engloba linfócitos TCD4⁺CD28⁺ e TCD4⁺CD28⁻. O cálculo estatístico refere-se aos valores das medianas.

Tabela 10- Frequência de linfócitos TCD4⁺ TCD28⁻ em relação à população total de CD4⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

TCD4⁺ TCD28⁻	ICV (n=15)	Idosos (n=9)	Controles saudáveis (n=5)
Média ± Erro padrão	10,59± 3,13	5,65 ± 1,37	0,86 ± 0,318
95% IC para média	(3,91 – 17,27)	(2,62 – 8,68)	(-0,02 – 1,74)
Mediana	5,45	3,70	0,50
Desvio Padrão	12,53	4,77	0,71
Mínimo	0,40	0,40	0,30
Máximo	49,20	14,90	1,90

Conforme pode ser observado (Figura 8), a população linfocitária TCD4⁺CD28⁻ foi igualmente predominante (p=0,336) no grupo ICV (mediana = 5,45) e no grupo de idosos (mediana = 3,70). Em contrapartida, os valores da população TCD4⁺CD28⁻ no grupo

controle constituíram a minoria (mediana = 0,50) estando significativamente abaixo dos valores referentes aos pacientes com ICV (mediana = 5,45) ($p=0,005$) e idosos (mediana = 3,70) ($p=0,024$).

Figura 8. Frequência de linfócitos TCD4⁺ TCD28⁻ em relação à população total de CD4⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Controles x ICV ($p=0,005$), Controles x Idosos ($p=0,024$), ICV x Idosos ($p=0,336$)

5. 10. Distribuição da população linfocitária TCD4⁺CD28⁺ em relação ao número total de linfócitos TCD4⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Na Tabela 11 estão apresentados os dados referentes à frequência de linfócitos TCD4⁺CD28⁺ em relação ao número total linfócitos TCD4⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis. O número total de linfócitos TCD4⁺ engloba linfócitos TCD4⁺CD28⁺ e TCD4⁺CD28⁻. O cálculo estatístico refere-se aos valores das medianas.

Conforme pode ser observado (Figura 9), a população linfocitária TCD4⁺CD28⁺ foi igualmente predominante ($p=0,311$) no grupo ICV (mediana = 94) e no grupo de idosos (mediana = 96). Em contrapartida, os valores da população TCD4⁺CD28⁺ no grupo controle

constituíram a maioria (mediana = 99) estando significativamente acima em relação aos

TCD4+ TCD28+	ICV (n=16)	Idosos (n=12)	Controles saudáveis (n=5)
Média ± Erro padrão	89,28± 3,13	94,25 ± 1,38	99,00 ± 0,30
95% IC para média	(82,59 – 95,97)	(91,21 – 97,30)	(98,26 – 99,93)
Mediana	94	96	99
Desvio Padrão	12,55	4,79	0,67
Mínimo	50,60	84,90	98,10
Máximo	99,50	99,60	99,60

pacientes com ICV (mediana = 94) ($p=0,002$) e idosos (mediana = 96) ($p=0,026$).

Tabela 11- Frequência de linfócitos TCD4+ TCD28+ em relação à população total de CD4+ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Figura 9. Frequência de linfócitos TCD4+ TCD28+ em relação à população total de CD4+ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Controles x ICV ($p=0,002$), Controles x Idosos ($p=0,026$) e ICV x Idosos ($p=0,311$)

5. 11. Distribuição da população linfocitária TCD4⁺CD28⁻ em relação ao número total de linfócitos TCD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Na Tabela 12 estão apresentados os dados referentes à frequência de linfócitos TCD4⁺CD28⁻ em relação ao número total linfócitos TCD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e

controles saudáveis. Os linfócitos TCD3⁺ englobam linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺. O cálculo estatístico refere-se aos valores das medianas.

Tabela 12- Frequência de linfócitos TCD4⁺ TCD28⁻ em relação à população total de CD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis

TCD3 ⁺ TCD4 ⁺ TCD28 ⁻	ICV (n=15)	Idosos (n=9)	Controles saudáveis (n=5)
Média ± Erro padrão	6,81 ± 1,99	4,56 ± 1,07	0,76 ± 0,273
95% IC para média	(2,56 – 11,05)	(2,19 – 6,93)	(0,00– 1,52)
Mediana	3,15	3,05	0,50
Desvio Padrão	7,97	3,72	0,611
Mínimo	0	0	0
Máximo	29	11	2

Conforme pode ser observado (Figura 10), a população linfocitária TCD4⁺CD28⁻ foi igualmente predominante ($p=0,731$) no grupo ICV (mediana = 3,15) e no grupo de idosos (mediana = 3,05). Os valores da população TCD4⁺CD28⁻ no grupo controle constituíram a minoria (mediana = 0,50) estando significativamente abaixo em relação aos pacientes com ICV (mediana = 3,15) ($p=0,005$) e idosos (mediana = 3,05) ($p=0,013$).

Figura 10. Frequência de linfócitos TCD4⁺ TCD28⁻ em relação à população total de CD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

ICV x Idosos ($p=0,731$), Controles x ICV ($p=0,005$) e Controles x Idosos ($p=0,014$)

5. 12. Distribuição da população linfocitária TCD4⁺CD28⁺ em relação ao número total de linfócitos TCD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Na Tabela 13 estão apresentados os dados referentes à frequência de linfócitos TCD4⁺CD28⁺ em relação ao número total linfócitos TCD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis. Os linfócitos TCD3⁺ englobam linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺. O cálculo estatístico refere-se aos valores das medianas.

Tabela 23- Frequência de linfócitos TCD4⁺ TCD28⁺ em relação à população total de CD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis

TCD3 ⁺ TCD4 ⁺ TCD28 ⁺	ICV (n=15)	Idosos (n=9)	Controles saudáveis (n=5)
Média ± Erro padrão	60,07 ± 4,62	76,99 ± 2,57	84,38 ± 1,93
95% IC para média	(50,22 – 69,92)	(71,33 – 82,65)	(79,02– 89,74)
Mediana	61,70	77,50	82,60
Desvio Padrão	18,47	8,91	4,31
Mínimo	24	60	80
Máximo	86	93	90

Figura 11. Frequência de linfócitos TCD4⁺ TCD28⁺ em relação à população total de CD3⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Controles x ICV (p=0,003), Controles x Idosos (p=0,208) e ICV x Idosos (p=0,022)

Conforme pode ser observado (Figura 11), a população linfocitária TCD4⁺CD28⁺ foi igualmente predominante (p=0,208) no grupo de idosos (mediana = 77,50) e no grupo de controles saudáveis (mediana = 82,60). Os valores da população TCD4⁺CD28⁺ no grupo de pacientes com ICV constituíram a minoria (mediana = 61,70) estando significativamente abaixo em relação aos idosos (mediana = 77,50) (p=0,022) e controles saudáveis (mediana = 82,60) (p=0,003).

5. 13. Avaliação da atividade de telomerase nos linfócitos TCD8⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis.

Na Tabela 14 estão apresentados os dados referentes a análise da atividade de telomerase nos linfócitos TCD8⁺ em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis. O cálculo estatístico refere-se aos valores das medianas.

Conforme pode ser observado, a atividade de telomerase nos linfócitos TCD8⁺ dos pacientes com ICV (mediana = 1,79) e dos idosos (mediana = 2,43) foi igual ao grupo de controles saudáveis (mediana = 2,05) não havendo diferença estatística (p = 0,545).

Tabela 14 - Atividade de telomerase em células T CD8⁺ de pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis

	ICV (n=15)	Idosos (n=9)	Controles (n=5)
Média ± Erro padrão	7,34±3,20	6,21± 2,43	22,34± 19,69
95% IC para média	(0,47 – 14,22)	(0,59 – 11,83)	(-32,33 – 77,01)
Mediana	1,79	2,43	2,05
Desvio Padrão	12,41	7,31	44,03
Mínimo	0,00	1,70	0,46
Máximo	36,94	21,88	100,94

6. DISCUSSÃO

Neste estudo os pacientes com imunodeficiência comum variável (ICV) e indivíduos idosos foram genotipados para o polimorfismo L55M da PON1 e avaliados quanto à frequência de linfócitos CD8⁺ ou CD4⁺ positivos ou negativos para o biomarcador de imunossenescência CD28 e quanto à atividade da telomerase na população de linfócitos TCD8⁺.

Quanto à distribuição de gêneros, no grupo de idosos apenas mulheres foram selecionadas de acordo com os critérios diagnósticos de idoso saudável sem senilidade, uma vez que os homens convidados se recusaram a participar do estudo devido à necessidade de coleta de sangue para realização de exames laboratoriais extra-rotina. Também no grupo de controles saudáveis houve predomínio de mulheres pelos mesmos motivos acima referidos. Entre os pacientes com ICV, o número de homens e mulheres foi igual, estando de acordo com o conhecimento de que essa imunodeficiência não apresenta diferença na distribuição quanto aos gêneros (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999).

A maioria dos idosos e dos controles saudáveis se identificou como branca, enquanto nos pacientes com ICV a porcentagem de brancos e não brancos foi similar. Este dado não segue o padrão das publicações relacionadas ao tema, que aponta a ICV como uma doença que atinge predominantemente populações caucasianas (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999; Cunningham-Rundles, 2010). Contudo, este ainda é um dado que carece de investigação mais aprofundada em nosso país, em virtude da ampla miscigenação presente na população brasileira e do fato da identificação da cor da pele ser estabelecida através de autodeclaração.

As infecções bacterianas recorrentes ou crônicas incidem na maioria dos pacientes com ICV, embora também sejam frequentes as infecções virais e oportunistas, as doenças autoimunes/inflamatórias e as neoplasias (Cunningham-Rundles & Bodian, 1999, Kokron et al., 2004). Devido a essa ampla heterogeneidade clínica, o reconhecimento e o diagnóstico da ICV pode tornar-se difícil, resultando em um retardo do diagnóstico de aproximadamente 6 a 10 anos (Cunningham-Rundles, 2010).

No presente estudo, o período médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico de ICV foi de 10 anos, similar à média superior daquela relatada na literatura atual (Cunningham-Rundles, 2010). Por outro lado, foi mais baixa do que a média de 13,38 anos observada durante um estudo prévio da mesma coorte de ICV onde não houve limitação de idade e envolvendo um número muito maior de pacientes (Sini, 2014).

Nesse trabalho, os autores explicam o retardo diagnóstico elevado como decorrência do longo tempo de doença dos pacientes avaliados, que foi de aproximadamente 26 anos e que possivelmente, por esse motivo, em muitos deles a doença tenha tido início em uma época em que havia maior desconhecimento da ICV por médicos generalistas, o que está de acordo com o observado também por outros pesquisadores (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999). Corroborando com essa hipótese, deve-se considerar que a média de idade dos pacientes com ICV no estudo de Sini et al. foi de 42,7 anos (Sini, 2014).

Outro fator a ser considerado é que selecionamos pacientes mais jovens, entre 18 e 49 anos, o que resultou em uma média de idade de aproximadamente 32 anos e também um menor tempo de doença (22 anos). Consequentemente, é provável que o melhor conhecimento da ICV nos últimos anos por médicos não especialistas tenha influenciado na diminuição do tempo de retardo diagnóstico aqui observada.

Em nosso estudo, a média de idade do diagnóstico foi de aproximadamente 22 anos e a média de início dos sintomas de 12 anos, o que está de acordo com a maioria dos casos de ICV, nos quais o diagnóstico é estabelecido entre a terceira e a quarta décadas de vida, sendo apenas 20% dos casos diagnosticados antes dos 20 anos de idade (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999, Cunningham-Rundles, 2010).

Diversos trabalhos apontam para a importância das enzimas da família das paraoxonases PON1, PON2 e PON3 no metabolismo oxidativo (Camps *et al.*, 2009). A PON1 é a enzima da família das paraoxonases mais estudada e foi a primeira a ser identificada através de sua capacidade de hidrolisar organofosforados xenobióticos no soro de indivíduos expostos a estes compostos químicos. O principal local de sua síntese é o fígado encontrando-se no soro comumente associada ao HDL (Camps *et al.*, 2009). Esta enzima possui atividade paraoxonase, arilesterase e lactonase. Em condições fisiológicas, a PON1 está correlacionada à proteção contra doenças cardiovasculares (Camps *et al.*, 2009).

Além do papel biológico da PON1 na prevenção da aterosclerose, que já está bem estabelecido, esta família de enzimas também possui importante atuação sobre o *stress* oxidativo (Camps *et al.*, 2009). Infecções agudas, por exemplo, provocam a redução de quase 90% da expressão hepática do mRNA de PON1 e inflamações persistentes também provocam alterações estruturais nas moléculas de HDL, principal carreadora da enzima (Reddy *et al.*, 2001)

O aumento do *stress* oxidativo pode provocar a redução da atividade de PON1 e, conseqüentemente, atuar na patogênese de doenças atreladas a essa condição, como doenças inflamatórias, imunossenescência, AIDS, neoplasias, infecções (Camps *et al.*, 2009) e imunodeficiência comum variável, conforme demonstrado previamente por Aukrust *et al.* (1997) e, mais recentemente, por Sini *et al.* em nossa coorte de pacientes com essa imunodeficiência (Sini *et al.*, 2014).

Em estudos utilizando diferentes grupos etários de indivíduos saudáveis analisando a atividade enzimática da PON1, foi visto que há redução da atividade paraoxonase da PON1 no soro em indivíduos mais velhos, porém sem alteração na concentração e atividade arilesterase (Seres et al., 2004). Por outro lado, Marchegiani e colaboradores (2006) analisaram qual genótipo influenciaria no envelhecimento “bem-sucedido”. Para isso foram determinados três grupos com faixas etárias de 22–65, 66–89 e ≥ 90 . Os resultados mostraram que a atividade da paraoxonase está diminuída com a idade, estando mais acentuada nos nonagenários e centenários. Em relação aos polimorfismos Q192R e L55M, foi visto também que os portadores R+ e M- apresentaram maior atividade da paraoxonase ao longo de toda a faixa etária, dando indício que o alelo R garante a função desta enzima, enquanto que o alelo M confere menor atividade. Foi visto também que os portadores M+ possuem níveis mais baixos de atividade arilesterase (Marchegiani et al., 2006). Estes dados corroboram com aqueles obtidos pelo nosso grupo, onde os pacientes com ICV com o genótipo 55MM apresentaram menor atividade arilesterase e manifestações clínicas mais graves da doença (Sini, et al. 2014).

No presente estudo, as frequências genótípicas do polimorfismo L55M da PON-1 não diferiram entre os pacientes com ICV e idosos e foram semelhantes às aquelas anteriormente descritas em indivíduos doadores de sangue em São Paulo (Sini et al., 2014). Não foi possível identificar o genótipo em um dos pacientes com ICV provavelmente devido à presença de mutações alélicas que não foram contempladas neste estudo.

Quando a distribuição dos genótipos MM, LM e LL foram comparados entre os pacientes com ICV, não observamos diferenças quanto à idade, início dos sintomas, idade do diagnóstico, tempo de doença e retardo diagnóstico. Do mesmo modo, não houve diferença quanto à distribuição genotípica e os diversos parâmetros clínicos que foram mais frequentes no grupo dos pacientes analisados.

Neste estudo observamos que a maioria dos indivíduos com ICV apresentava histórico de infecções recorrentes, principalmente de vias aéreas superiores, o que está de acordo com os dados da literatura (Resnick *et al.*, 2012). Além do mais, não foram encontradas associações entre a presença de infecções e os genótipos do polimorfismo L55M da PON1, o que também está de acordo com dados do relato anterior (Sini *et al.*, 2014)

Também não foram observadas associações entre alterações das populações linfocitárias CD4⁺ e CD8⁺ e aumento de infecções oportunistas com os genótipos da PON em pacientes com ICV. Esses dados diferem daqueles relatados por Aukrust e colaboradores que reportaram em pacientes com ICV aumento da peroxidação lipídica relacionado a alterações do metabolismo da glutatona e da cisteína em linfócitos TCD4⁺. Estes autores sugerem que o estímulo antigênico contínuo possa desempenhar um papel patogênico na doença, assim como desencadear determinadas condições como infecções oportunistas ou neoplasias (Aukrust *et al.*, 1997).

É amplamente conhecido que durante o envelhecimento a susceptibilidade e a frequência de infecções normalmente se tornam mais acentuadas, além de serem agravadas pela ineficácia da resposta vacinal, ao lado da maior incidência de câncer e doenças autoimunes, o que resulta em maior morbidade e mortalidade (Ewers *et al.*, 2008; Ademokun *et al.*, 2010). Curiosamente, muitas das outras manifestações clínicas e laboratoriais descritas em pacientes com ICV, independentemente do grupo etário analisado, são frequentemente vistas durante a senescência como o aumento de infecções, autoimunidade e neoplasias (Cunningham-Rundles, 2010)

A predisposição à autoimunidade na ICV tem sido associada a vários mecanismos, incluindo heranças monogênicas, infecções recorrentes ou de difícil tratamento, que podem gerar eliminação defeituosa de antígenos não-próprios, inflamação crônica, deposição de imunocomplexos em órgãos, produção de anticorpos antiteciduals por mimetismo molecular, secreção alterada de citocinas, desequilíbrio entre as subpopulações celulares, ativação crônica dos linfócitos e até mesmo falha nos mecanismos de tolerância central e/ou periférica (Saifi & Wysocki, 2015; Lopes & Rizzo, 2008).

Em 2004, no Ambulatório Hospital das Clínicas da FMUSP, a prevalência de doenças autoimunes em pacientes com ICV foi de 24,1% (Kokron et al., 2004). Posteriormente, no ano de 2008, em uma coorte maior de 161 pacientes, a prevalência foi de 39%, sendo mais frequentes a púrpura trombocitopênica idiopática, anemia hemolítica autoimune, padrão celíaco, pangastrite atrófica, retocolite ulcerativa e vitiligo. A presença de autoanticorpos é um importante critério para o diagnóstico de autoimunidade, contudo, é um fator que pode estar ausente ou diminuído nestes pacientes, dificultando o seu diagnóstico (Lopes & Rizzo, 2008).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), aproximadamente 75% das neoplasias ocorrem em indivíduos acima dos 60 anos, sendo mais comuns as leucemias, os linfomas e mieloma múltiplo, dentre outros. Nos últimos 25 anos, o número de casos de linfomas duplicou, em especial nas pessoas acima de 60 anos (Brasil, 2010).

A prevalência de carcinomas e linfomas em pacientes com ICV está aumentada sendo que a incidência de carcinomas é 50 vezes maior do que na população geral, enquanto que a de linfomas é 300 vezes maior, muitos deles relacionados à infecção prévia pelo EBV ou retrovírus. Normalmente, os pacientes desenvolvem linfomas do tipo não Hodgkin (LNH), embora alguns manifestem a forma de Hodgkin (LH) (Who Scientific Group, 1997).

Em nossa coorte de pacientes com ICV em acompanhamento no Hospital das Clínicas, existe maior prevalência de câncer gástrico, ao contrário do que é relatado na literatura.

Um dos critérios de exclusão por nós adotado para participação em nosso protocolo foi a ausência de neoplasias há mais de 2 anos. As coletas das amostras para estudo foram realizadas em 2017 e, para surpresa, três dos pacientes com ICV participantes do estudo desenvolveram câncer gástrico entre 2018 e 2019. Estes pacientes estão sendo analisados para verificação se houve também mudança de padrões imunológicos.

Foi visto em uma coorte de pacientes com ICV que a presença de infiltrados linfocíticos policlonais e de granulomas em pulmão, linfonodos e baço estava associada a um risco aumentado de 5 vezes para o desenvolvimento de neoplasias linfóides durante evolução de longo prazo (Chapel et al., 2008).

Outra alteração também observada na ICV que clinicamente pode simular um linfoma é a hiperplasia nodular linfóide (HNL) em sítios extranodais como pulmão e trato gastrointestinal (Da Silva et al., 2011). Nestas lesões podem ser detectadas pequenas populações de linfócitos B monoclonais, o que dificulta o diagnóstico diferencial com neoplasia. É importante salientar que já foram descritos pacientes com HNL e proliferação monoclonal que não evoluíram para malignidade mesmo após longo período de observação (Da Silva et al., 2011). Do mesmo modo, já foram detectados rearranjos oligoclonais da cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH) e do receptor de células T (TCR) sem relação com natureza maligna da lesão histológica presente (Gompels et al., 2003).

É possível que nestes pacientes haja um elo entre o desenvolvimento de linfoproliferação policlonal secundária a infecções crônicas e a posterior evolução para malignidades de natureza linfóide. Entre os exemplos da relação entre linfomas MALT e algumas infecções são citadas: *Helicobacter pylori* e lesões gástricas; *Campylobacter jejuni*

e comprometimento de intestino delgado; *Borrelia burgdorferi* e linfoma cutâneo; vírus da hepatite C e linfoma hepático e esplênico (Da Silva et al., 2011).

Por outro lado, não se pode descartar a participação de linfócitos T no desencadeamento de LNH, uma vez que aproximadamente 50% dos pacientes com ICV apresentam também alterações da imunidade celular, o que confere a esta doença um caráter de deficiência combinada humoral e celular (Kokron et al., 2004).

Os idosos menos acometidos pelo processo de imunossenescência podem apresentar maior sobrevida. Por outro lado, algumas características demonstradas na imunossenescência como a redução da diversidade do receptor de células T (TCR), a redução da proliferação de células T, o aumento da população de células CD8+ citotóxicas, a redução de CD4+ *naïve* na periferia e redução da população de células B estão associadas ao aumento da gravidade e mortalidade desses indivíduos (Franceschi et al., 1995; Ferguson et al., 1995, Yang et al., 2008).

Durante o envelhecimento normal os linfócitos T de memória tornam-se mais numerosos em relação aos linfócitos T *naïve*. Isso parece ocorrer devido à involução do timo (Peres et al., 2003), mas de maneira mais acentuada em decorrência da exposição crônica a agentes infecciosos ao longo da vida, levando consequentemente à proliferação de células de memória, em declínio das células *naïve* (Effros & Pawelec, 1997).

Como exemplo, pode-se citar a infecção causada pelo citomegalovírus (CMV), que vem sendo bastante avaliada no contexto da imunossenescência, pois pode atuar como adjuvante para esse processo (Ostan et al., 2008, Sylwester et al., 2005). Devido à infecção, ocorre ativação de muitos clones de linfócitos T citotóxicos efetores e de memória. Não se sabe a causa exata, mas o CMV promove a expansão de muitos linfócitos capazes de reconhecer seus diferentes constituintes antigênicos, ou seja, muitos clones de linfócitos

para reconhecer apenas um agente viral. Essa situação é agravada pelo fato do CMV não ser eliminado pelo organismo, promovendo uma estimulação crônica de linfócitos e diminuição do número de linfócitos T virgens. Idosos soropositivos para o citomegalovírus apresentam ainda maior morbidade e mortalidade para outros tipos de infecções (Brunner et al., 2011).

A escassez de linfócitos T *naïve* promove resposta ineficaz a novas infecções como a pneumonia, tuberculose, infecções do trato urinário, da pele e de tecidos moles (Brunner et al., 2011). Por outro lado, o excesso de linfócitos T de memória está implicado na maior produção de interleucinas, contribuindo para o estado pró-inflamatório (Hakim & Gress, 2007).

Há um grande interesse pela busca por marcadores biológicos associados à morbimortalidade no envelhecimento. Alterações significativas no sistema imunológico promovem um perfil de risco determinante na discriminação entre o envelhecimento saudável e o patológico. A partir de estudos longitudinais com a população sueca acima de 80 anos de idade, foram estabelecidos alguns parâmetros como: razão da quantidade das células T $CD4+/CD8+ < 1$, baixa proliferação de células T a mitógenos e expansão de células T senescentes (CD28-) (Agius et al., 2009). Os idosos que se enquadraram neste perfil apresentaram elevada mortalidade ao longo do estudo, independentemente do estado de saúde. Além disso, quando associado a danos cognitivos, os idosos morreram duas vezes mais cedo que os idosos apenas com aquele perfil de risco (Ferguson et al., 1995).

Muitas das alterações imunológicas características do processo de envelhecimento podem ser observadas em indivíduos infectados pelo HIV que não estão em tratamento, como a inversão da relação $CD4+/CD8+$, baixa taxa de células T *naïve*, repertório reduzido de linfócitos T, baixa resposta vacinal e expansão de linfócitos T efetores CD28- (Kalayjian et al., 2003; Van Baarle et al., 2005).

Além disso, como consequência da senescência prematura, os indivíduos infectados pelo HIV são mais acometidos por comorbidades relacionadas à idade do que a população geral, destacando-se os distúrbios neurocognitivos, cânceres não relacionados à AIDS, sarcopenia e fragilidade (Deeks & Phillips, 2009; Effros et al., 2008). Atualmente, esses indivíduos são considerados idosos aos 50 anos de idade, diferentemente da população geral que atinge a velhice em torno dos 65 anos (Guaraldi et al., 2011).

Neste contexto, cabe traçar um paralelo entre as manifestações clínicas observadas em diversos pacientes com ICV, indivíduos infectados pelo HIV e idosos. Entre as principais citam-se as infecções bacterianas, baixa resposta vacinal, infecções oportunistas e aumento da prevalência de neoplasias. Embora a sarcopenia e a fragilidade sejam bem conhecidas em pacientes infectados pelo HIV não tratados e idosos, são poucos os trabalhos referentes a esse tema na ICV (Baris et al., 2011; Barreto-Melo, 2017).

Neste estudo observamos que aproximadamente metade dos pacientes (46,6%) apresentava osteopenia ou osteoporose. Inicialmente, Baris e colaboradores (2011) descreveram alterações no metabolismo ósseo com elevada incidência de osteoporose e fraturas não apenas em pacientes de grupos etários mais elevados como também em adolescentes com ICV. Os autores então propuseram que essas alterações pudessem ser decorrentes das constantes infecções e inflamações, além das alterações gastrointestinais que promovem perda nutricional (Baris et al., 2011).

Mais recentemente, nosso grupo também observou em mais da metade dos adultos com ICV abaixo dos 49 anos de idade, diminuição da densidade mineral óssea, especialmente naqueles com menores valores de linfócitos T CD4⁺, embora sem relação com diarreia crônica ou desnutrição (Barreto-Melo, 2017).

A molécula CD28 vem sendo considerada como um biomarcador da imunossenescência, pois ao longo do envelhecimento sua expressão é reduzida na superfície dos linfócitos T (Effros, 1997). Ao nascimento, a maior parte das células T periféricas expressa CD28; com idades entre 20 e 40 anos, a frequência cai para 86%; entre 70 e 90 anos, está reduzida para 70% e em idosos centenários, a expressão é cerca de 60% (Effros, 2005).

Como consequência, a redução da expressão de CD28 resulta em células com menor diversidade do receptor de células T (TCR), com a capacidade prejudicada de proliferação após estímulo antigênico, menor citotoxicidade e menor habilidade em secretar IL-2 e assim regular a ativação. Além disso, há maior suscetibilidade para a morte induzida por ativação, pior resposta vacinal e comprometimento da resposta imune contra patógenos. O fenótipo (CD8⁺ CD28⁻) vem sendo determinado como fator de risco, sendo associado à maior morbidade e mortalidade de idosos (Agarwal et al., 2007).

Com o objetivo de avaliar se pacientes com ICV poderiam apresentar expansão da população de linfócitos TCD28⁻, analisamos a frequência dessa população celular em pacientes com ICV em comparação aos indivíduos idosos e controles normais.

Inicialmente, comparamos a frequência de células CD8⁺CD28⁺ ou CD8⁺CD28⁻ em relação à população CD8⁺ total ou à população de linfócitos TCD3⁺. Nos dois tipos de análise, observamos frequência mais elevada de células CD8⁺CD28⁻ em relação às células CD8⁺CD28⁺ em pacientes com ICV e idosos, o que é compatível com a presença de expansão de células CD28⁻. Por outro lado, como era esperado, nos controles jovens saudáveis houve amplo predomínio de células CD8⁺CD28⁺. Interessantemente, foi observado que a expansão de linfócitos CD8⁺CD28⁻ foi similar entre idosos e pacientes com ICV, o que sugere a presença de uma possível imunossenescência precoce nessa imunodeficiência.

As células T CD8⁺ são originadas de progenitores linfóides comuns que migram da medula óssea para o timo, onde passam por uma série de fases distintas de maturação (Abbas et al, 2018). O compartimento de células CD8⁺ naíve é composto por células T policlonais que expressam CD28, CCR7 e CD62L, as duas últimas permitindo que as células se recirculem entre o sangue e os órgãos linfóides secundários. A ativação inicial das células T CD8⁺ envolve o reconhecimento pelo receptor de células T (TCR) dos peptídeos apresentados no contexto de MHC classe I por células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) como as células dendríticas (DCs). As DCs também expressam os marcadores de superfície CD70 e CD80 / CD86 para ligação a receptores CD27 e CD28 expressos em células TCD8⁺, fornecendo um sinal secundário crítico para a ativação celular (Abbas et al, 2018).

Além disso, as células T CD4⁺ auxiliares (Th), quando ativadas pelas DCs, expressam MHC de classe II e moléculas coestimuladoras compostas por sinapses (CD54 e CD80) e interagem com linfócitos TCD8⁺ que expressam CD40. Adicionalmente, as células CD4 também secretam citocinas, como a IL-2, que promovem a diferenciação de células T CD8⁺ naíve em linfócitos T efetores e em células TCD8⁺ de memória. (Abbas et al, 2018).

As células TCD8⁺ ativadas liberam IFN-gama e TNF-alfa para destruir as células alvo e estimular a resposta antitumoral mediada por macrófagos (Abbas et al, 2018).

Em vários tumores sólidos, a infiltração tecidual de linfócitos CD8⁺ pode ser usada como fator prognóstico, conforme já demonstrado no câncer de mama, carcinoma colorretal, escamoso oral, carcinoma pancreático e ovariano (Hu et al., 2019)

Após ativação, as células TCD8⁺ destroem células-alvo específicas como células cancerígenas ou células hospedeiras infectadas por vírus através de vias que incluem a

exocitose granular, ligante Fas e apoptose mediada por TRAIL, levando ao controle de tumores ou depuração de vírus (Huff et al., 2019)

Subsequentemente, ocorre inativação fisiológica de células T, bem como a geração de células TCD8⁺ de memória (Martinez-Lostão et. al., 2015). Deste modo, se houver inativação ou a conversão patológica de células T CD8⁺ em células TCD8⁺ senescentes, pode ocorrer progressão do tumor ou da replicação viral (Wu et al., 2012)

A senescência celular foi identificada em áreas de homeostase fisiológica, como cicatrização de feridas (De Maria et al., 2014) e linfócitos NK naturais da placenta (Rajagopalan & Long, 2012). No entanto, a senescência celular também contribui para a perda de função associada ao envelhecimento e doenças relacionadas à idade, bem como às infecções virais crônicas, doenças neurodegenerativas e neoplasias (Howcroft et al., 2013)

Duas categorias de senescência celular foram descritas em literatura: a primeira é a senescência replicativa associada ao envelhecimento, dependente de telômeros, e a segunda é senescência prematura induzida por estresse, também conhecida como senescência independente de telômeros (Munoz-Espin & Serrano, 2014).

A senescência induzida por oncogenes é um dos mecanismos bem descritos para senescência prematura (Munoz-Espin & Serrano, 2014). Independentemente do mecanismo de iniciação, as células que sofrem senescência sobrevivem exibindo uma variedade de características fenotípicas e moleculares, incluindo alterações morfológicas, bloqueio de divisão, alteração da sensibilidade contra apoptose, disfunção metabólica e uma atividade secretora denominada fenótipo secretório associado à senescência (SASP) (Childs et al., 2017).

Em termos de fenótipo e função, as células $CD8^+CD28^-$ representam uma população distinta da população geral de células $TCD8^+ CD28^+$ e desempenham um papel crucial na depuração de câncer e células infectadas intracelularmente (Strioga et al., 2011).

Estudos in vitro demonstraram que células $TCD28^+$ purificadas perdiam progressivamente $CD28$ durante cada estimulação bem-sucedida, sendo que as células $T CD8^+$ perdem seu marcador $CD28$ mais rapidamente do que células $TCD4^+$ (Chen et al., 2018)

Isto está de acordo com o que observamos neste estudo, quando comparamos a frequência de células $CD4^+CD28^+$ ou $CD4^+CD28^-$ em relação à população $TCD4^+$ total e à população de linfócitos $TCD3^+$. Nos dois tipos de análise observamos frequência mais elevada de células $CD4^+CD28^+$ nos três grupos de estudo avaliados. Interessantemente, as porcentagens de linfócitos $TCD4^+CD28^-$ estavam igualmente mais elevadas em pacientes com ICV e em idosos do que nos controles saudáveis. Esses achados estão de acordo com o conhecimento de que pacientes com ICV e idosos apresentam distúrbios da regulação imune que levam a maior frequência de infecções, doenças autoimunes e neoplasias.

Do mesmo modo, quando a análise comparativa foi realizada em relação aos linfócitos $TCD3^+$, também observamos predomínio de células $CD4^+CD28^+$. No entanto, os pacientes com ICV apresentaram menor frequência de linfócitos $CD28^+$ do que idosos e controles saudáveis, enquanto a frequência de linfócitos $CD28^-$ foi similar em pacientes com ICV e idosos e mais elevada em relação aos controles normais.

As células $T CD8^+ CD28^-$ são altamente oligoclonais e constituem linfócitos efetores terminalmente diferenciados que perderam sua capacidade de sofrer divisão celular (Chen et al., 2018). Elas são funcionalmente heterogêneas e suas características variam de acordo com o contexto em que são encontradas (Chen et al., 2018). Elas também expressam uma variedade de outros receptores relacionados a NKcell, incluindo KIR, NKG2D, CD56,

CD57, CD94 e Fc-receptor IIIa e apresentam características que atravessam a fronteira entre a imunidade inata e a adaptativa (Chen et al., 2018).

De modo geral, os pacientes desenvolvem diminuição relativa e absoluta de linfócitos TCD4+ com número normal ou aumentado de linfócitos TCD8+, com consequente inversão da relação CD4+/CD8+ (Kondratenko et al., 1997, Cunningham-Rundles & Bodian, 1999; Kokron et al., 2004).

Enquanto a causa da possível exaustão de células T em ICV ainda não está totalmente esclarecida, algumas características imunofenotípicas encontradas em infecções virais crônicas foram observadas em células T CD8+ de alguns pacientes com ICV, nos quais estavam altamente ativadas e expressando marcadores de ativação crônica como CD38, HLA-DR, marcadores de memória como CD45RO e de apoptose como CD95 (Boileau et al., 2011; Lanio et al., 2009; Viallard et al., 2006; Vlková et al., 2006). Embora a expansão de células T de memória seja vista com o avanço da idade, este processo está amplamente aumentado na ICV (Vlková et al., 2006).

Expressão aumentada de CD57, também conhecida como HNK-1 (Human Natural Killer-1), é um aspecto comum associado a células T senescentes circulantes e células T senescentes CD8+CD28-CD57+ aumentadas podem ser encontradas em condições patológicas múltiplas, incluindo infecção pelo HIV, mieloma múltiplo, câncer de pulmão e doenças crônicas, condições de inflamação, como diabetes e obesidade, onde as células CD8+CD28- podem causar danos significativos ao tecido circundante normal maneira não específica para o antígeno (Onyema et al., 2015).

A taxa diferencial de perda de CD28 está associada à rápida inativação da telomerase e as células TCD8+ atingem a senescência replicativa mais rapidamente do que células T

CD4⁺, estágio durante o qual as células T não conseguem mais entrar em mitose, mas ainda permanecem viáveis (Oin et al., 2016).

Assim, as células CD8⁺CD28⁻ são definidas como células T senescentes. Menos de 50% do compartimento da célula T CD8⁺ de indivíduos idosos ou infectados cronicamente é de CD28⁺, enquanto até 80% das células T CD4⁺ mantêm sua expressão CD28⁺ mesmos nos centenários (Oin et al., 2016).

Nossos resultados demonstraram que as células TCD8⁺CD28⁺ estavam igualmente diminuídas em 37,15% dos pacientes com ICV e em 33,60% dos idosos em relação aos controles saudáveis (71,96%). Por outro lado, o compartimento TCD4⁺CD28⁺ estava igualmente elevado no grupo ICV (89,28%) e de idosos (94,25%) embora diminuídos em relação aos controles sadios (99%).

Estes dados são totalmente concordantes com aqueles relatados por Weng et al. e muito sugestivos da presença de imunossenescência do compartimento de linfócitos TCD8⁺CD28⁺ em nossos pacientes com ICV, ao lado de compartimento CD4⁺CD28⁺ preservado (Weng et al., 2009).

Curiosamente, uma grande proporção de células T CD8⁺CD28⁻ de idosos também apresenta níveis mais baixos de expressão de CD8 (Mou et al., 2014). Apesar do significado desta observação ser desconhecido, a regulação negativa da expressão das moléculas CD8 e CD4 é característica das células T ativadas, sugerindo que essas células TCD8^{low}CD28⁻ representem linfócitos senescentes que são ativados cronicamente a partir de antígenos persistentes comuns (no cenário do envelhecimento) ou infecção ou inflamação persistente (no cenário do câncer) (Mou et al., 2014).

Acredita-se que o envelhecimento seja controlado por diversas funções de defesa ou de resposta antiestresse e que estressores como agentes físicos (calor, radiação gama), químicos (radicais livres), biológicos (vírus, bactérias) e psicológicos (depressão, estresse) podem contribuir para o processo de envelhecimento. O organismo possui mecanismos antienvelhecimentos que incluem enzimas de reparo de DNA, antioxidantes, proteínas de choque térmico e ação do sistema imune. Vale ressaltar, que tais artifícios se diferem entre as espécies e indivíduos, podendo ser notado pelas diferenças na expectativa de vida (Kirkwood & Austad, 2000).

Estudos mostram que a redução da atividade de telomerase pode estar relacionada à perda da expressão de CD28, já que linfócitos T CD8⁺ CD28⁻, além de terem baixa capacidade funcional, apresentam redução do comprimento dos telômeros (Weng et al., 1997).

Neste estudo procedemos à quantificação da atividade da telomerase em linfócitos TCD8⁺ do sangue periférico em pacientes com ICV, idosos e controles saudáveis. Conforme pode ser observado, a atividade de telomerase nos linfócitos TCD8⁺ dos pacientes com ICV (mediana = 1,79) e dos idosos (mediana = 2,43) foi similar ao grupo de controles saudáveis (mediana = 2,05) não havendo diferença estatística ($p = 0,545$) entre os grupos.

Estes resultados não confirmam aqueles por nós esperados, ou seja, a atividade da telomerase estaria diminuída em pacientes com ICV que apresentam infecções frequentes, o que poderia estar contribuindo para uma imunossenescência precoce nessa imunodeficiência. Também deve ser ressaltado que a análise individual de pacientes com ICV demonstrou atividade de telomerase abaixo do valor de detecção do KIT (representada por 0) em quatro deles, sem que houvesse manifestações clínicas relevantes comuns entre eles até o momento. Por outro lado, não podemos descartar a possibilidade de que outros

fatores não relacionados à atividade da telomerase estejam envolvidos na imunossenescência precoce em pacientes com ICV, como por exemplo agentes químicos e físicos.

6. CONCLUSÃO

A frequência de genótipos do polimorfismo L55M da PON-1 foi homogênea em relação ao grupo de pacientes com ICV, grupo de idosos e controles saudáveis. Em relação à atividade de telomerase, não houve diferença estatística entre os grupos. A predominância de linfócitos TCD8⁺ CD28⁻ nos pacientes com imunodeficiência comum variável, se assemelhando ao grupo de idosos, sugere que esses pacientes passem pelo processo de imunossenescência precocemente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S. *Imunologia Celular e Molecular*. 9ª Ed., Saunders (Elsevier), 2012.
2. ABONIA J.P. & CASTELLS M.C. 2002. Common variable immunodeficiency. *Allergy Asthma Proc* 23: 53–57.
3. Ademokun A., Wu Y.C, Dunn-Walters D. The Ageing B Cell Population: Composition And Function. *Biogerontol* 2010;11:125-37
4. AGARWAL S. & CUNNINGHAM-RUNDLES C. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2009 Sep;9(5):347-52.
5. AGIUS E., LACY K.E., VUKMANOVIC-STEJIC M., JAGGER A.L., PAPAGEORGIOU A.P., HALL S., ET AL. Decreased Tnf-Alpha Synthesis By Macrophages Restricts Cutaneous Immunosurveillance By Memory Cd4+ TCells During Aging. *J Exp Med*. 2009;206:1929-40.
6. AUKRUST P., BERGE R.K., MÜLLER F., UELAND P.M., SVARDAL A.M., FRØLAND S.S. Elevated plasma levels of reduced homocysteine in common variable immunodeficiency--a marker of enhanced oxidative stress. *Eur J Clin Invest* 1997; 27(9):723-30.
7. BALIN AK, PRATT L, AND ALLEN RG. Effects of ambient oxygen concentration on the growth and antioxidant defenses of human cell cultures established from fetal and postnatal skin. *Free Radic Biol Med* 32: 257–267, 2002.
8. BARIS S, OZEN A, ERCAN H, KARAKOC-AYDINER E, CAGAN H, OZDEMIR C, BARLAN M, BAHCECILER NN, BARLAN IB. Osteoporosis: an ignored complication of CVID. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011 Nov;22(7):676-83.
9. BARRETO-MELO. Estado nutricional, massa óssea, aptidão cardiorrespiratória, força muscular e populações linfocitárias de pacientes com imunodeficiência comum variável. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, 2017.
10. BATEMAN E.A, AYERS L., SADLER R., et al. T cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency disorders: associations with clinical phenotypes in comparison with other groups with recurrent infections. *Clin Exp Immunol* 2012;170:202–11.
11. BAYRY, J., *et al.* Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. *Trends Mol Med*, v.11, n.8, Aug, p.370-6. 2005.

12. BERZINS S.P., COCHRANE A.D., PELLICCI D.G., et al. Limited correlation between human thymus and blood NKT cell content revealed by an ontogeny study of paired tissue samples. *Eur J Immunol* 2005;35:1399–407.
13. BOILEAU J., MOUILLOT G., GÉRARD L., et al. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: correlation with lymphocyte phenotype in the French DEFI study. *J Autoimmun* 2011;36:25–32.
14. BONILLA FA, BARLAN I, CHAPEL H, COSTA-CARVALHO BT, et al. ICON: Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J allergy Clin Immunol Pract*. 2015
15. BONILLA, F. A. et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract*, v. 4, n. 1, p. 38-59, 2016 Jan-Feb 2016.
16. BORTE S, PAN-HAMMARSTROM Q, LIU C, SACK U, BORTEM, WAGNER U, et al. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood*. 2009;114(19):4089–98.
17. BRINGOLD F AND SERRANO M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 35: 317–329, 2000.
18. CHAPEL H, LUCAS M, LEE M, BJORKANDER J, WEBSTER D, GRIMBACHER B, FIESCHI C, THON V, ABEDI MR, HAMMARSTROM L. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. 2008 Jul 15;112(2):277-86.
19. CHEN, X.; LIU, Q.; XIANG, A.P. CD8+CD28- T cells: Not only age-related cells but a subset of regulatory T cells. *Cell. Mol. Immunol*. 2018, 15, 734–736.
20. CHILDS, B.G.; GLUSCEVIC, M.; BAKER, D.J.; et al. Senescent cells: An emerging target for diseases of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2017, 16, 718–735.
21. COLLINS K. Mammalian telomeres and telomerase. *Current Opinion in Cell Biology* 2000;12:378-83.
22. CONG Y.S., WRIGHT W.E., SHAY J.W. Human telomerase and its regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002; 66:407-25.
23. COPPE, J. P. et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology* 6, 2853–2868, doi: 10.1371/journal.pbio.0060301 (2008).
24. COWAN JE, JENKINSON WE, ANDERSON G. Thymus medulla fosters generation of natural Treg cells, invariant gammadelta T cells, and invariant NKT cells: what we learn from intrathymic migration. *Eur J Immunol* 2015;45:652–60.

25. CUI H., KONG Y., ZHANG H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct.* 2012;2012:646354.
26. CUNNINGHAM-RUNDLES C. & BODIAN C., Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients, *Clin Immunol.* 1999; 92: 34–48.
27. CUNNINGHAM-RUNDLES C. How I Treat Common Variable Immune Deficiency. *Blood.* 2010 Jul 8;116 (1):7-15
28. DA SILVA SP, RESNICK E, LUCAS M, LORTAN J, PATEL S, CUNNINGHAM-RUNDLES C, GATTER K, LIU Q, JAFFE ES, CHAPEL H. Lymphoid proliferations of indeterminate malignant potential arising in adults with common variable immunodeficiency disorders: unusual case studies and immunohistological review in the light of possible causative events. *J Clin Immunol.* 2011 Oct;31(5):784-91. doi: 10.1007/s10875-011-9565-z. Epub 2011 .
29. DE ROOS A.J., GOLD L.S., WANG S., et al.. Metabolic Gene Variants and Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1647-1653.
30. DE VERA M.J., AL-HARTHI L., GEWURZ A.T. Assessing thymopoiesis in patients with common variable immunodeficiency as measured by T-cell receptor excision circles. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93:478–84.
31. DEEKS SG, PHILLIPS AN. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. *BMJ* 2009; 338:a3172
32. DEMARIA, M.; OHTANI, N.; YOUSSEF, S.A. et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* 2014, 31, 722–733.
33. DI Renzo M., Serrano D., Zhou Z., George I., Becker K., Cunningham- Rundles C. Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas/fasligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS. *Clin Exp Immunol.* 2001; 125 (1):117–22.
34. EFFROS R.B., BOUCHER N., PORTER V., ZHU X., SPAULDING C., WALFORD R.L., KRONENBERG M., COHEN D. AND SCHACHTER F. 1994. Decline in CD28T cells in centenarians and in long term T cell cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence. *Exp. Gerontol.* 29: 601 - 609.
35. EFFROS R.B., DAGARAG M., SPAULDING C., et al. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol. Rev.* 2005; 205:147–57.

36. EFFROS RB, FLETCHER CV, GEBO K, et al. Aging and infectious diseases: workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions. *Clin Infect Dis*, 2008; 47:542–53.
37. EFFROS, R. B., and PAWELEC, G. Replicative senescence of T lymphocytes: Does the Hayflick limit lead to immune exhaustion? *Immunol. Today* 18, 450–454, 1997. Ewers I, Rizzo Lv, Kalil Filho J. *Imunologia E Envelhecimento*. Einstein 2008;6(Supl 1):S13-20. 47.
38. FARRINGTON M., GROSMARE L.S., NONOYAMA S. et al. CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(3):1099–103.
39. FERBEYRE G, DE STANCHINA E, LIN AW, Querido E, McCurrach ME, Hannon GJ, and Lowe SW. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 22: 3497–3508, 2002.
40. FERGUSON F.G., WIKBY A., MAXSON P., OLSSON J., JOHANSSON B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1995; 50(6):B378–B382.
41. FEVANG, B., *et al.* Common variable immunodeficiency and the complement system; low mannose-binding lectin levels are associated with bronchiectasis. *Clin Exp Immunol*, v.142, n.3, Dec, p.576-84. 2005.
42. FISCHER K1, VOELKL S, HEYMANN J, PRZYBYLSKI GK et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2828-35.
43. FRANCESCHI, C. et al. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunology Today*, v. 16, n. 1, p. 12-16, 1995.
44. GIRE V, ROUX P, WYNFORD-THOMAS D, BRONDELLO JM, AND DULIC V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J* 23: 2554–2563, 2004. Epub Jun 10, 2004.
45. GOMPELS MM, HODGES E, LOCK RJ et al. Lymphoproliferative disease in antibody deficiency: a multi-centre study. *Clin Exp Immunol* 2003; 134:314–20.
46. GORONZY JJ, LEE WW, JWEYAND CM. Aging and T-cell diversity. Exp Gerontol. 2007 May;42(5):400-6. Epub 2007 Jan 10.
47. GUARALDI G, ORLANDO G, ZONA S, et al. Premature age-related co-morbidities among HIV-infected persons compared to the general population. *Clin Infect Dis* 2011.

48. GUAZZI V, AIUTI F, MEZZAROMA I, et al. Assessment of thymic output in common variable immunodeficiency patients by evaluation of T cell receptor excision circles. *Clin Exp Immunol* 2002;129:346–53.
49. HADRUP SR, STRINDHALL J, KØLLGAARD T, et al. Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly. J Immunol. 2006 Feb 15;176(4):2645-53.
50. HARLEY CB, FUTCHER AB, and GREIDER CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458–460, 1990.
51. HARLEY CB, LIU W, BLASCO M, VERA E, ANDREWS WH, BRIGGS LA, RAFFAELE JM. A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program. *Rejuvenation Res*. 2011 Feb;14(1):45-56.
52. HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961 Dec;25:585-621.
53. HAYFLICK L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res*. 37: 614 ± 636.
54. HERBST EW, ARMBRUSTER M, RUMP JA, BUSCHER HP, PETER HH: Intestinal B cell defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 1994, 95:215-221.
55. HOLM AM, AUKRUST P, AANDAHL EM, MULLER F, TASKEN K, FROLAND SS. Impaired secretion of IL-10 by T cells from patients with common variable immunodeficiency–involvement of protein kinase A type I. *J Immunol*. 2003;170(11):5772–7.
56. HONDA M, MENGESHA E, ALBANO S, NICHOLS WS et al. 2001. Telomere shortening and decreased replicative potential, contrasted by continued proliferation of telomerase-positive CD8CD28(lo) T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol*. 99: 211 ± 221.
57. HOWCROFT,T.K.; CAMPISI,J.; LOUIS,G.B. et al.The role of inflammation in age-related disease. *Aging* 2013, 5, 84–93.
58. HUBACKOVA, S., KREJCIKOVA, K., BARTEK, J. AND HODNY, Z. IL1- and TGFbeta-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine ‘bystander senescence’. *Aging* 4, 932–951 (2012).

59. HUFF WX, KWON JH, HENRIQUEZ M, et al. The Evolving Role of CD8+CD28– Immunosenescent T Cells in Cancer Immunology. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 2810;
60. HUMBERT R, ADLER DA, DISTECHE CM, et al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3:73-6.
61. HUSSEIN YM, GHARIB AF, ETEWA RL, ELSAWY WH. Association of L55M and Q192R polymorphisms in paraoxonase 1 (PON1) gene with breast cancer risk and their clinical significance. *Mol Cell Biochem.* 2011 May; 351(1-2):117-23.
62. ISGRO A, MARZIALI M, MEZZAROMA I, et al. Bone marrow clonogenic capability, cytokine production, and thymic output in patients with common variable immunodeficiency. *J Immunol* 2005;174:5074–81.
63. JAKUBOWSKI H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein Nhomocysteinylation. *J Biol Chem* 2000;275:3957-62.
64. KAINULAINEN, L., et al. Diagnostic findings in 95 Finnish patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*, v.21, p.145–149. 2001.
65. KANEKO T, TAHARA S, TAGUCHI T, AND KONDO H. Accumulation of oxidative DNA damage, 8-oxo-2'-deoxyguanosine, and change of repair systems during in vitro cellular aging of cultured human skin fibroblasts. *Mutat Res* 487: 19–30, 2001
66. KIRKWOOD TBL, AUSTAD SN. Review article. Why do we age? *Nature.* 2000;408:233-8.
67. KOKRON, C. M., et al. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. *An Acad Bras Cienc*, v.76, n.4, Dec, p.707-26. 2004.
68. KONDRATENKO, I; AMLOT, PL; WEBSTER, AD; FARRANT, J. Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. *Clin Exp Immunol* 1997; 108:9-13.
69. KOTA LN, BHARATH S, MOILY NS et al. , Reduced Telomere Length in Neurodegenerative Disorders May Suggest Shared Biology. Published Online:26 Dec 2014 <https://doi.org/10.1176/appi.neuropsych.13100240>
70. KOTA LN, BHARATH S, PURUSHOTTAM M, MOILY NS, SIVAKUMAR PT, VARGHESE M, et al. Reduced telomere length in neurodegenerative disorders may suggest shared biology. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2015;27:e92–96.
71. KOVAIOU RD, GRUBECK-LOEBENSTEIN B. Age-associated changes within CD4+ T cells. *Immunol Lett*, 2006 Sep 15;107(1):8-14. Epub 2006 Aug 14.

72. LANIO N, SARMIENTO E, GALLEG0 A, et al. Immunophenotypic profile of T cells in common variable immunodeficiency: is there an association with different clinical findings? *Allergol Immunopathol (Madr)* 2009;37:14–20.
73. Lopes-Da-Silva S, Rizzo Lv. Autoimmunity In Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2008.
74. MACKNESS MI, HALLAM SD, PEARD T, WARNER S, WALKER CH. The separation of sheep and human serum “A”-esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation. *Comp Biochem Physiol*. 1985; 82:675-7.
75. MACLAREN A, BLACK EJ, CLARK W, AND GILLESPIE DA. c-Jun-deficient cells undergo premature senescence as a result of spontaneous DNA damage accumulation. *Mol Cell Biol* 24: 9006–9018, 2004.
76. MARCHEGIANI F; MARRA M; SPAZZAFUMO L; JAMES RW; BOEMI M; OLIVIERI F; CARDELLI M; CAVALLONE L; BONFIGLI AR; FRANCESCHI C. Paraoxonase Activity and Genotype Predispose to Successful Aging. *The Journals of Gerontology*, v. 61, p. 541–546, 2006.
77. MARTINEZ GARCIA MA, DE ROJAS MD, NAUFFAL MANZUR MD et al.. 2001. Respiratory disorders in common variable immunodeficiency. *Respir Med* 95: 191–195.
78. MARTINEZ-LOSTAO, L.; ANEL, A.; PARDO, J. How do cytotoxic lymphocytes kill cancer cells? *Clin. Cancer Res*. 2015, 21, 5047–5056
79. MATHIEU U, HUAIBIN M, KO S et al.. Gastrointestinal Disorders Associated with Common Variable Immune Deficiency (CVID) and Chronic Granulomatous Disease (CGD). *Curr Gastroenterol Rep* . 2016 April ; 18(4): 17
80. MESSAOUDI I, LEMAOULT J, GUEVARA-PATINO JA, METZNER BM, NIKOLICH-ZUGICH J. Age-related CD8 T cell clonal expansions constrict CD8 T cell repertoire and have the potential to impair immune defense. *J Exp Med*. 2004 Nov 15;200(10):1347-58.
81. MILLER A.S., DYKES D.D., POLESKY H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*. 1998;16:1215.
82. MISHTO M, SANTORO A, BELLAVISTA E, BONAFE M, MONTI D, FRANCESCHI C. Immunoproteasomes and immunosenescence. *Ageing Res Rev*. 2003;2(4):419-32.
83. MOHEBBI A, AZIZI G

84. MOLINA-PINELO S, VALLEJO A, DIAZ L, et al. Premature immunosenescence in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low-level CD4 T cell repopulation. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 64:579–588.
85. MOTTI C, DESSÌ M, GNASSO A, IRACE C, INDIGENO P, ANGELUCCI CB, BERNARDINI S, FUCCI G, FEDERICI G, CORTESE C. A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis.* 2001 Sep;158(1):35-40.
86. MOU, D.; ESPINOSA, J.; LO, D.J.; KIRK, A.D. CD28 negative T cells: Is their loss our gain? *Am. J. Transpl.* 2014, 14, 2460–2466
87. MOUILLOT G, CARMAGNAT M, GÉRARD L, et al. Study Group. B-cell and T-cell phenotypes in COVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *J Clin Immunol.* 2010 Sep;30(5):746-55.
88. MUNOZ-ESPIN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014, 15, 482–496.
89. NAYLOR K, LI G, VALLEJO AN, LEE WW, et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol.* 2005 Jun 1;174(11):7446-52.
90. NEUHAUS J, JACOBS DR, BAKER JV JR, et al. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J. Infect. Dis.* 2010; 201:1788–1795.
91. NIKOLICH-ZUGICH J, SLIFKA MK, MESSAOUDI I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol.* 2004 Feb;4(2):123-32.
92. NOTARANGELO, L. D. et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol*, v. 124, n. 6, p. 1161-78, Dec 2009.
93. OCHTROP ML, GOLDBACKER S, MAY AM, et al. T and B lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency. *Blood* 2011, 118:309-318.
94. ONYEMA, O.O.; DECOSTER, L.; NJEMINI, R.; et al. Shifts in subsets of CD8+T-cells: as evidence of immunosenescence in patients with cancers affecting the lungs: An observational case-control study. *BMC Cancer* 2015, 15, 1016
95. ORANGE JS, HOSSNY EM, WEILER CR et al. Use of intravenous immunoglobulin in human disease: a review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117 (4 suppl):S525–S553.

96. ORANGE, J. S. et al. Genome-wide association identifies diverse causes of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, v. 127, n. 6, p. 1360-7.e6, Jun 2011
97. OOSTAN R, BUCCI L, CAPRI M, ET AL (2008) Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. *Neuroimmunomodulation* 15:224–240
98. OOSTAN, R. et al. Immunosenescence and Immunogenetics of Human Longevity. *Neuroimmunomodulation*, v. 15, n. 4-6, p. 224-240, 2008.
99. OUYANG Q, WAGNER WM, VOEHRINGER D, WIKBY A, KLATT T, WALTER S, MULLER CA, PIRCHER H, PAWELEC G. Age-associated accumulation of CMV-specific CD8⁺ T cells expressing the inhibitory killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). *Exp Gerontol* 38:911–920, 2003.
100. PALMERO I AND SERRANO M. Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol* 333: 247–256, 2001.
101. PAPALÉO NETTO, MATHEUS; CARVALHO FILHO, EURICO THOMAZ & SALLES, RENATA F. N. Fisiologia do envelhecimento. In: CARVALHO FILHO, Eurico Thomaz & PAPALÉO NETTO, Matheus. (eds.). *Geriatrics: fundamentos, clínica e terapêutica*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 43-62.
102. PARRINELLO S, SAMPER E, KRTOLICA A, GOLDSTEIN J, MELOV S, AND CAMPISI J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5: 741–747, 2003.
103. PICARD C, AL-HERZ W, BOUSFIHA A et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol*. 2015
104. PIQUERAS B, LAVENU-BOMBLED C, GALICIER L et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol* 2003, 23:385-400.
105. PRATTICIZZO, F. et al. Anti-TNF-alpha treatment modulates SASP and SASP-related microRNAs in endothelial cells and in circulating angiogenic cells. *Oncotarget* 7, 11945–11958, doi: 10.18632/oncotarget.7858 (2016).
106. PRIMO-PARMO SL, SORENSON RC, TEIBER J, LA DU BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996;33 :498-507.

107. QIN,L.; JING,X.; QIU,Z. et al. Aging of immune system: Immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy adults. *Aging* 2016, 8, 848–859
108. RAJAGOPALAN, S.; LONG, E.O. Cellular senescence induced by CD158D reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 20596–20601
109. REDDY ST, WADLEIGH DJ, GRIJALVA V, et al. Human paraoxonase - 3 is a HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase - 1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol* 2001; 21:542-7.
110. RODIER, F. & CAMPISI, J. Four faces of cellular senescence. *The Journal of cell biology* 192, 547–556, doi: 10.1083/jcb.201009094 (2011).
111. SAIFI M, WYSOCKI CA. Autoimmune Disease in Primary Immunodeficiency: At the Crossroads of Anti-Infective Immunity and Self-Tolerance. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2015 Nov;35(4):731-52.
112. SALZER U, WARNATZ K, PETER HH. Common variable immunodeficiency: an update. *Arthritis Res Ther.* 2012 Sep 24;14(5):223.
113. SERANA F, AIRÒ P, CHIARINI M, et al. Thymic and bone marrow output in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2011;31:540–9.
114. SERES I; PARAGH G; DESCHENE E; FULOP T JR; KHALIL A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol.* 2004 Jan;39(1):59-66.
115. SINI, BC.; BYDLOWSKI, SP.; LEVY C.; KOKRON, CM.; MASELLI, LMF.; COHON, A.; OLIVEIRA, AKB.; KALIL, J.; BARROS, MAMT. Would the PON1-55MM polymorphism be associated to higher disease severity in patients with Common Variable Immunodeficiency? *Braz J Allergy Immunol.* 2014;2(1):35-43.
116. SNELLER, M. C. Common variable immunodeficiency. *Am J Med Sci*, v.321, n.1, Jan, p.42-8. 2001.
117. STRIOGA, M.; PASUKONIENE, V.; CHARACIEJUS, D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology* 2011, 134, 17–32.
118. SYLWESTER AW, BRIDGET L. MITCHELL, JOHN B. EDGAR, CARA TAORMINA, CHRISTIAN PELTE, FRANZISKA RUCHTI, PAUL R. SLEATH, KENNETH H. GRABSTEIN, NANCY A. HOSKEN, FLORIAN KERN, JAY A. NELSON, AND LOUIS J. PICKER. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med.* 2005 Sep 5; 202(5): 673–685.

119. TAUBENHEIM N, VON HORNUNG M, DURANDY A et al. Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients. *J Immunol* 2005, 175:5498-5503.
120. TEIXEIRA L, VALDEZ H, MCCUNE JM, et al. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. *AIDS*. 2001; 15:1749–1756.
121. TORRES KCL, PEREIRA PA, LIMA GSF, SOUZA BR, MIRANDA DM, BAUER ME, SILVA MAR. Imunossenescência. *Geriatrics & Gerontologia*. 2011;5(3):163-9.
122. TUCKER VC, RYE AD, HARRISON J, KING L, DUDDRIDGE M, BROWNING MJ. Lymphocyte subpopulations from patients with primary antibody deficiency do not show increased telomere erosion. *Immunobiology*. 2004;208(5):455-62.
123. VAN BAARLE D, TSEGAYE A, MIEDEMA F, AKBAR A. Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: rapid ageing during chronic stimulation of the immune system. *Immunol. Lett*. 2005; 97:19–29.
124. VARZANEH FN, KELLER B, UNGER S, AGHAMOHAMMADI A, WARNATZ K, REZAEI N. Cytokines in common variable immunodeficiency as signs of immune dysregulation and potential therapeutic targets - a review of the current knowledge. *J Clin Immunol*. 2014 Jul;34(5):524-43.
125. VIALARD JF, BLANCO P, ANDRÉ M, et al. CD8+HLA-DR+ T lymphocytes are increased in common variable immunodeficiency patients with impaired memory B-cell differentiation. *Clin Immunol* 2006;119:51–8.
126. VISENTINI M, CAGLIUSO M, CONTI V, et al. Telomere-dependent replicative senescence of B and T cells from patients with type 1a common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol*. 2011 Mar;41(3):854-62.
127. VLKOVÁ M, THON V, SÁRFYOVÁ M, et al. Age dependency and mutual relations in T and B lymphocyte abnormalities in common variable immunodeficiency patients. *Clin Exp Immunol* 2006;143:373–9.
128. WAGNER UG, KOETZ K, WEYAND CM AND GORONZY JJ. 1998. Perturbation of the T cell repertoire in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14447 - 14452.
129. WARNATZ K, et al. (2002) Expansion of CD19(hi)CD21(lo/neg) B cells in common variable immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune cytopenia. *Immunobiology* 206:502–513.

130. WEHR C, KIVIOJA T, SCHMITT C, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008, 111:77-85.
131. WENG NP, LEVINE BL, JUNE CH AND HODES RJ. 1995. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11091 - 11094.
132. WENG NP, PALMER LD, LEVINE BL, LANE HC, JUNE CH AND HODES RJ. 1997. Tales of tails: regulation of telomere length and telomerase activity during lymphocyte development, differentiation, activation and aging. *Immunol. Rev.* 160: 43 - 54.
133. WHERRY EJ, KURACHI M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015;15:486–99.
134. WHO SCIENTIFIC GROUP. Primary immunodeficiency diseases: report of a WHO scientific group. *Clin Exp Immunol* 1997; 99:1-124.
135. WOLTERS KC, BEA G, WISMAN A, OTTO SA, DE RODA HUSMAN AM, SCHAFT N, DE WOLF F, GOUDSMIT J, COUTINHO RA, VAN DER ZEE AG, MEYAARD L AND MIEDEMA F. 1996. T cell telomere length in HIV-1 infection: no evidence for increased CD4T cell turnover. *Science* 274: 1543 ± 1547.
136. WU K, VOLKE A, LUND M, BANG K AND THESTRUP-PEDERSEN K. 1999. Telomerase activity is spontaneously increased in lymphocytes from patients with atopic dermatitis and correlates with cellular proliferation. *J. Dermatol. Sci.* 22: 24 ± 30.
137. WU, R.C.; HWU, P.; RADVANYI, L.G. New insights on the role of CD8(+)CD57(+) T-cells in cancer. *Oncoimmunology* 2012, 1, 954–956
138. WU, Y.Y. et al. Limitations on the quantitative determination of telomerase activity by the electrophoretic and ELISA based TRAP assays. *Clin Chim Acta*, v.293, n.1-2: p.199-212, 2000.
139. XU W; LARBI. Markers of T Cell Senescence in Humans. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 10;18(8).
140. YANG YH, AN J, WENG NP. Telomerase is involved in IL-7-mediated differential survival of naive and memory CD4(+) T cells. *Journal of Immunology.* 2008; 180(6):3775–81.
141. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology* 2010;129:474–81.
142. YU, J. E., *et al.* Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, v.124, n.2, Aug, p.349-56, 356 e1-3. 2009.

143. ZIMMERMANN S, MARTENS UM. Telomere dynamics in hematopoietic stem cells. Current Molecular Medicine. 2005;5:179-85.