Bruno Carnevale Sini

**Relação entre os polimorfismos da paraoxonase 1 e do
citocromo P450 em pacientes com imunodeficiência comum
variável em uso de medicamentos ou exposição a poluentes
ambientais**

São Paulo

2017

Bruno Carnevale Sini

**Relação entre os polimorfismos da paraoxonase 1 e do
citocromo P450 em pacientes com imunodeficiência comum
variável em uso de medicamentos ou exposição a poluentes
ambientais**

Tese de doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Prof. Dra. Myrthes Anna
Maragna Toledo Barros

São Paulo

2017

Dedicatória

*See first, think later, then test.
But always see first. Otherwise,
You will only see what you were expecting.
Most scientist forget that*

Douglas Adams

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais. Sei que para vocês esse doutorado, que hoje sai do plano das ideias e torna-se realidade, é um motivo de alegria tão grande quanto é para mim. Sei também que nem sempre o destino gosta de cumprir com tudo o que é planejado, mas como se diz, “o lugar para onde se vai muitas vezes é mais importante do que o lugar de onde se partiu”. Gostaria de agradecer também ao meu irmão, Caio. Ver você hoje atingindo seus objetivos e se tornando cada vez mais maduro é uma razão de orgulho para mim.

Gostaria de agradecer especialmente à Larissa. Se o sucesso é o destino ao final de uma longa estrada, ela foi caminho, guia, combustível e parceira desta viagem. Meu vocabulário não é nem de perto extenso o suficiente para encontrar todas as maneiras necessárias para agradecer tudo aquilo que você fez por mim. Só posso dizer que mesmo a rocha mais sólida só deixa de ser uma rocha quando passa pelas mãos de um artífice habilidoso. Só então ela se torna a fundação de um castelo.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Myrthes Toledo Barros. Já são mais de sete anos trabalhando juntos, estudando juntos e aprendendo juntos. Muito do que hoje eu sei, só sei porque aprendi com a senhora. Obrigado por ter me dado a possibilidade de alcançar os objetivos que sempre busquei.

Deixo também meus agradecimentos ao Prof. Sérgio Bydlowski; quando eu decidi que tornaria realidade o sonho de ser cientista, foi o seu laboratório que me abriu as portas, que me ajudou a dar meus primeiros passos. Agradeço também aos colegas do LIM-31 por toda a ajuda ao longo de todos esses anos, onde eu aprendi a ser um pesquisador. Obrigado pelos ensinamentos, lições e pelo tempo que passamos juntos.

Gostaria de agradecer também ao Prof. Jorge Kalil por ter possibilitado continuar na busca dos meus objetivos. Foi nas reuniões com o senhor que aprendi a importância de uma boa pergunta para um trabalho científico e por todas as discussões que me ensinaram o real significado de fazer ciência.

Agradeço muito aos meus colegas e amigos que, direta ou indiretamente, ajudaram muito neste trabalho. Aos meus colegas de pós-graduação, com quem toda semana, no 8º andar, passamos horas e horas discutindo a importância da Coca-Cola na felicidade de um pesquisador. Aos meus amigos Wesley e Ana, com quem dividi muitos happy-hours, experimentos, pizzas e muitas das coisas boas que aconteceram ao longo de todos esse anos de pós graduação.

Gostaria de agradecer também ao Leandro que, mesmo tendo se tornado pai no dia seguinte ao qual decidimos como abordar meu dados, continuou disposto a me ajudar com toda a estatística desse trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer especialmente aos pacientes com quem trabalhei ao longo desses anos. Sem a participação deles esse trabalho não seria possível.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sini, Bruno Carnevale

Relação entre os polimorfismos da paraoxonase 1 e do citocromo P450 em pacientes com imunodeficiência comum variável em uso de medicamentos ou exposição a poluentes ambientais / Bruno Carnevale Sini. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Myrthes Anna Maragna Toledo Barros.

Descritores: 1.Paraoxonase 2.Imunodeficiência comum variável 3.Sistema enzimático do citocromo P-450 4.Infecção 5.Estresse oxidativo 6.Neoplasias 7.Morbidade 8.Mortalidade

USP/FM/DBD-386/2017

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

Sumário

1.Introdução.....	1
1.1 Imunodeficiência comum variável.....	2
1.2 Stress oxidativo	7
1.3 Paraoxonases	8
1.3.1 Paraoxonase 1	9
1.3.2 Polimorfismos de PON1 e atividade enzimática	10
1.4. Citocromo P450.....	11
1.4.1 CYP2E1.....	12
1.5 Stress oxidativo e neoplasias	13
1.6 Imunodeficiências secundárias	15
2.Objetivos.....	19
2. 1 Objetivos gerais.....	20
2.2 Objetivos específicos	20
3.Metodologia.....	21
3.1 Locais do estudo.....	22
3.2 Casuística	22
3.2.1 Pacientes	22
3.2.2 Indivíduos controle saudáveis	23
3.3 Obtenção das amostras de soro/ plasma.....	23
3.4 Obtenção de DNA genômico a partir de células de sangue periférico	24
3.5 Genotipagem para os polimorfismos de PON1 e CYP450.....	25
3.5.1 Determinação do polimorfismo L55M no gene da PON1	26
3.5.2 Genotipagem do polimorfismo CYP450:	27
3.6 Determinação da atividade arilesterase de PON1	27
3.7 Análise do perfil clínico/laboratorial dos pacientes com ICV	28
3.8 Exposição ambiental e uso de medicamentos.....	29

3.9 Análise estatística	29
4.Resultados.....	30
4.1 Dados demográficos	31
4.2 Níveis de colesterol e populações linfocitárias CD4+ e CD8+ em pacientes de nos grupos ICV e HS e controles saudáveis	32
4.3 Descrição individual dos polimorfismos da PON1-L55M e CYP2E1	33
4.4 Atividade arilesterase.....	34
4.5 Relação entre parâmetros clínicos e laboratoriais	36
4.6 Sobrevida.....	44
4.7 Fatores preditivos	46
5.Discussão	48
6.Conclusões	67
7.Referências.....	70
8.Anexos	80

Lista de abreviaturas

ICV: Imunodeficiência Comum Variável

ICOS: Gene co-estimulador induzível

BAFF: Receptor do fator ativador de célula B

TNFRSF: Superfamília dos receptores de TNF

NK: Células natural killer

NKT: Células T natural killer

DII: Doença inflamatória intestinal

LNH: linfomas não-Hodgkin

SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

HNL: Hiperplasia nodular linfóide

ROS: Espécies reativas do oxigênio

PON / PONs: paraoxonase / paraoxonases

CYP450: Citocromo P450

CYP: Citocromo

mRNA: RNA mensageiro

GSTP-1: glutathione S-transferase p1

IL: Interleucina

PCR-RFLP: Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism, em inglês

IVAS: Infecção de vias aérea superiores

HS: Hipogamaglobulinemia secundária

ITU: Infecção do Trato Urinário

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Lista de figuras

Figura 1: Incidência de comorbidades associadas em pacientes com ICV e HS	55
Figura 2: Incidência de linfonodomegalia em relação aos genótipos de PON1 em pacientes com ICV	58
Figura 3: Incidência de hepatomegalia em relação aos genótipos de PON1 em pacientes com ICV	58
Figura 4: Curva de sobrevida em relação ao Δt dos pacientes com ICV em relação aos alelos L e M do polimorfismo PON1-L55M	61
Figura 5: Curva de sobrevida em relação ao tempo de doença dos pacientes com ICV em relação aos alelos L e M do polimorfismos PON1-L55M	62

Lista de tabelas

Tabela 1: Características demográficas de pacientes com ICV e controles saudáveis.....	31
Tabela 2: Características laboratoriais de pacientes nos grupos ICV e HS	33
Tabela 3: Frequência dos polimorfismos da PON-1 L55M e da CYP450 – 2E1 nos grupos ICV, HS e controles saudáveis	34
Tabela 4: Atividade Arilesterase nos grupos ICV, HS e controles saudáveis	35
Tabela 5: Relação da Arilesterase com o Perfil lipídico.....	35
Tabela 6: Variáveis clínicas investigadas	36
Tabela 7: Presença de Infecções em relação aos genótipos do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS.....	37
Tabela 8: Presença de alterações gastrointestinais, linfonodomegalia e linfoproliferações benignas em relação aos genótipos do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS	38
Tabela 9: Presença de alterações gastrointestinais, linfonodomegalia e linfoproliferações benignas em relação aos alelos dos genótipos da PON1 L55M nos grupos ICV e HS	39
Tabela 10: Presença de parâmetros de gravidade em relação aos genótipos do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS	40
Tabela 11: Presença de Infecções em relação ao alelo 55L do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS.....	41
Tabela 12: Presença de alterações gastrointestinais, linfonodomegalia e linfoproliferações benignas em relação aos alelos do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS	42
Tabela 13: Presença de parâmetros de gravidade em relação aos alelos do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS	43
Tabela 14: Presença de parâmetros de gravidade em relação aos alelos do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS	44
Tabela 15: Sobrevida em relação à Idade atual dos pacientes ICV.....	45
Tabela 16: Sobrevida relação ao retardo diagnóstico (Δt) nos pacientes ICV	45
Tabela 17: Sobrevida em relação ao tempo de doença nos pacientes ICV	46
Tabela 18: Odds ratio (OR) para complicações associadas à gravidade da ICV	47
Tabela 19: Odds ratio (OR) associado aos fatores predisponentes para óbito nos pacientes ICV	47

Resumo

Sini BC. *Relação entre os polimorfismos da paraoxonase 1 e do citocromo P450 em pacientes com imunodeficiência comum variável em uso de medicamentos ou exposição a poluentes ambientais*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO. A Imunodeficiência comum variável (ICV) é uma doença heterogênea caracterizada pela redução dos níveis de IgG, IgA e/ou IgM e da função de anticorpo. As manifestações clínicas incluem a presença de infecções recorrentes ou crônicas, doenças inflamatórias/autoimunes e incidência aumentada de malignidades como linfomas e carcinomas, caracterizando-se, conseqüentemente, por um estado de ativação imune persistente e alterações do metabolismo oxidativo. Tanto a paraoxonase 1(PON1) quanto o polimorfismo do citocromo p450 (CYP) 2E1 têm importante participação nos processos oxidativos, controlando a extensão dos danos causados por alterações na concentração de oxidantes. Acredita-se que, tal qual ocorre na população normal, tanto a PON1 quanto a CYP2E1 tenham importante papel na gravidade e na sobrevida dos pacientes com ICV. **OBJETIVO:** estudar os polimorfismos de PON1 e CYP2E1, bem como a atividade arilesterase da PON1, e sua relação com o perfil lipídico, características clínicas, morbidade e mortalidade em pacientes com ICV. **MÉTODOS/RESULTADOS:** Foram avaliadas as frequências alélicas dos polimorfismos de PON1 e CYP2E1, o perfil lipídico e a atividade arilesterase da PON1 em 101 pacientes com ICV e 16 pacientes com hipogamaglobulinemia secundária (HS) e 130 controles saudáveis. Nos dois grupos de pacientes foi analisada a presença de parâmetros clínicos e laboratoriais, morbidade e gravidade da doença. Houve diferença na frequência dos genótipos de PON1-L55M entre pacientes primários e secundários, sendo o alelo 55L e o genótipo 55LM mais frequente no grupo HS. A atividade arilesterase de PON1 mostrou-se menor nos pacientes com ICV em relação ao grupo controle, com pacientes do genótipo 55MM apresentando os menores valores de atividade. Pacientes com o genótipo 55MM apresentaram doença mais grave quando comparados aos demais grupos genotípicos, sendo essa diferença causada não por uma característica deletéria deste genótipo, mas pelo papel protetor desempenhado pelo alelo 55L; pacientes

portadores desse alelo apresentaram menor prevalência de manifestações graves como neoplasias, hepatomegalia, sepse e óbitos, bem como maior sobrevida daqueles que apresentavam ao menos uma cópia deste alelo. **CONCLUSÃO:** Este constitui o primeiro relato demonstrando maior frequência do genótipo 55LM e do alelo 55L em pacientes com hipogamaglobulinemia secundária e de menor atividade arilesterase em pacientes com ICV portadores do genótipo 55MM. Nossos resultados são sugestivos de que a presença do alelo 55L possa desempenhar papel protetor na ICV. Além disso, foi constatado que a presença de linfonomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, sepse e hipertensão portal possam ser fatores preditivos tanto de um quadro de doença mais grave quanto de maior mortalidade.

Descritores: paraoxonase; imunodeficiência comum variável; sistema enzimático do citocromo P-450; infecção; estresse oxidativo; neoplasias; morbidade; mortalidade

Abstract

Sini BC. *Relation between paraoxonase 1 and cytochrome P450 gene polymorphisms and patients with common variable immunodeficiency and in use of medication or exposed to enviromental pollutants* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Introduction: Common Variable Immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous disease characterized by reduced levels of IgG, IgA and / or IgM and antibody function. Clinical manifestations include the presence of recurrent or chronic infections, inflammatory/autoimmune diseases, and increased incidence of malignancies such as lymphomas and carcinomas, which is characterized by a state of persistent immune activation and alterations in oxidative metabolism. Both paraoxonase 1 (PON1) and cytochrome p450 (CYP) 2E1 polymorphism have an important role in oxidative processes, controlling the extent of damage caused by changes in oxidant concentration. It is believed that, as in the normal population, both PON1 and CYP2E1 play an important role in the severity and survival of patients with CVID. **Objectives:** to study the polymorphisms of PON1 and CYP2E1, as well as the arilesterase activity of PON1, and its relation with the lipid profile, clinical characteristics, morbidity and mortality in patients with CVID. **Methods/Results:** The allelic frequencies of the PON1 and CYP2E1 polymorphisms, the lipid profile and the arilesterase activity of PON1 in 101 patients with CVID and 16 patients with secondary hypogammaglobulinemia (HS) and 130 healthy controls were evaluated. The presence of clinical and laboratory parameters, morbidity and severity of the disease were analyzed in both groups of patients. There was a difference in the frequency of PON1-L55M genotypes between primary and secondary patients, being the 55L allele and the 55LM genotype more frequent in the HS group. The arilesterase activity of PON1 was lower in patients with CVID than in the control group, with patients of the 55MM genotype showing the lowest values. Patients with the 55MM genotype presented a more severe disease when compared to the other genotype groups, this difference is being caused not by a deleterious characteristic of this genotype, but by the protective role played by the 55L allele; patients with this allele had a lower prevalence of severe manifestations such as

malignancies, hepatomegaly, sepsis and deaths, as well as a longer survival of those who had at least one copy of this allele. CONCLUSION: This is the first report showing a higher frequency of the 55LM genotype and the 55L allele in patients with secondary hypogammaglobulinemia and of lower arilesterase activity in patients with CVID with 55MM genotype. Our results suggest that the presence of the 55L allele may play a protective role in CVID. In addition, it was found that the presence of lymph node enlargement, hepatomegaly, splenomegaly, sepsis and portal hypertension may be predictive factors of both a more severe disease and a higher mortality rate.

Descriptors: paroxonase; common variable immunodeficiency; cytochrome P-450 enzyme system; infection; oxidative stress; neoplasms; morbidity; mortality

1.Introdução

1.1 Imunodeficiência comum variável

A imunodeficiência comum variável (ICV) é a imunodeficiência primária sintomática mais comum em adultos. Sua prevalência tem sido estimada em torno de 1:10.000 e 1:100.000 na população geral (a depender do país estudado), afetando igualmente ambos os sexos (Bonilla *et al.*, 2016). A idade de apresentação da ICV varia, embora o início dos sintomas seja mais comum na segunda e na terceira décadas de vida com um pico na infância em torno dos 8-10 anos (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999, Resnick *et al.*, 2012, Salzer *et al.*, 2012)

Caracteristicamente, é uma doença que apresenta acentuada hipogamaglobulinemia, com redução drástica dos níveis séricos de IgG, inferiores a 4,5g/L em adultos ou 2,5% abaixo da média para a idade) e valores reduzidos ou indetectáveis de IgA, podendo apresentar ou não redução concomitante de IgM. Além disso, os indivíduos acometidos também devem preencher outros critérios diagnósticos, como início dos sintomas após dois anos de idade, ausência de isohemaglutininas e/ou resposta insatisfatória à vacinação, após terem sido excluídas outras possíveis imunodeficiências primárias ou hipogamaglobulinemias secundárias. É aconselhável também que o diagnóstico não seja realizado antes dos quatro anos de idade (Bonilla *et al.*, 2016, Chapel e Cunningham-Rundles, 2009).

De maneira geral, as causas da ICV não são conhecidas. Cerca de 90% dos casos não possuem causas genéticas definidas. Das análises feitas até o momento, diversos genes apresentam mutações que poderiam levar ao fenótipo da doença, sendo que todas estavam presentes em moléculas relacionadas a elementos da biologia celular da célula B: gene co-estimulador induzível (ICOS), receptor do fator ativador de célula B (BAFF), receptor TACI, CD19, CD20, CD21 e CD81 (Al-Herz *et al.*, 2014, Yong *et al.*, 2008)

O sistema imune adaptativo é o mais acometido na ICV. Apesar do prejuízo na produção de anticorpos, a maioria dos pacientes apresenta níveis normais de linfócitos B periféricos o que sugere a presença de defeitos nas fases finais do desenvolvimento celular. Outros pacientes,

contudo, apresentam células B com fenótipo de células imaturas, com volume aumentado, uso restrito de famílias de gene VH e perda da capacidade de mutação dos genes da região variável da cadeia pesada de imunoglobulinas (Braun *et al.*, 1992, Farrant *et al.*, 1989)

Outras alterações do sistema imune também podem estar presentes, como disfunção de monócitos/macrófagos e linfócitos T. O prejuízo à função dos linfócitos T acomete aproximadamente metade dos pacientes com ICV, caracterizando-se pela inversão da relação CD4/CD8, tanto por diminuição de TCD4+ como por aumento de TCD8+ (Kokron *et al.*, 2004, Yazdani *et al.*, 2014), além de testes de hipersensibilidade cutânea negativos (PPD, tricoftina, candidina) (Kokron *et al.*, 2004). Também estão descritos níveis reduzidos de linfócitos T CD4+ e aumentados de CD8+ efetores de memória (Bateman *et al.*, 2012). Além disso, pacientes com ICV podem apresentar menor quantidade de células natural killer (NK) (Aspalter *et al.*, 2000) e células T natural killer (NKT), o que parece estar associado à menor tolerância imunológica e maior suscetibilidade ao câncer (Carvalho *et al.*, 2010, Gao *et al.*, 2014).

Clinicamente, os pacientes com ICV apresentam grande heterogeneidade de manifestações, sendo mais comuns as infecções crônicas ou recorrentes, tanto do trato respiratório quanto do gastrointestinal, podendo apresentar também doenças autoimunes/inflamatórias, doença granulomatosa, citopenias e neoplasias (Resnick *et al.*, 2012, Chapel *et al.*, 2008). Essa amplitude de apresentações faz da ICV uma doença de difícil diagnóstico, com casos em que o intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico da doença chega a ultrapassar 15 anos (Chapel *et al.*, 2008).

Tendo por base a ampla gama de aspectos clínicos vistos na ICV, alguns pesquisadores têm proposto dividir os pacientes fenotipicamente em subgrupos de acordo com suas principais características. A classificação mais conhecida é a de Chapel e Cunningham-Rundles (Chapel e Cunningham-Rundles, 2009), que propõem que os pacientes sejam divididos de acordo com 5

fenótipos: apenas infecções de repetição ou crônicas sem outras doenças associadas; presença de doenças autoimunes; linfoproliferação benigna; enteropatia e linfoma.

Posteriormente, Jolles e colaboradores propuseram os seguintes subgrupos: apenas infecções de repetição ou crônicas sem outras doenças associadas; presença de citopenias como trombocitopenias, anemia hemolítica e neutropenias; doenças linfoproliferativas e enteropatias não explicadas (Jolles, 2013).

Em 2015, Abbott & Gelfand consideraram os seguintes fenótipos: presença de doenças hepáticas; doenças intestinais; doenças pulmonares; citopenias e doenças linfoproliferativas/malignidades (Abbott e Gelfand, 2015).

Mais recentemente, Bonilla et al., propõem enquadrar os pacientes com ICV em dois fenótipos distintos: aqueles que apresentam apenas infecções e aqueles que, além das infecções, podem desenvolver outras comorbidades (Bonilla *et al.*, 2016). Segundo Resnick et al. (Resnick *et al.*, 2012), o risco de morte é 11 vezes maior quando há uma ou mais complicações não infecciosas, comparado à presença de complicações apenas infecciosas, sendo linfoma, má absorção, doenças hepáticas, gastrointestinais e pulmonares crônicas com prejuízo da função pulmonar as condições mais associadas à mortalidade.

Entre as infecções que acometem os pacientes com ICV, as do trato sino-respiratório são as mais comuns, com episódios de pneumonia, sinusite, otite e/ou bronquite em pelo menos uma ocasião. Devido à natureza recorrente que essas infecções podem adquirir, sua reincidência pode levar ao surgimento de doença pulmonar crônica e bronquiectasias, levando à progressiva perda da função pulmonar que, mesmo após o tratamento, pode se agravar (Resnick *et al.*, 2012, Cunningham-Rundles, 2010, King, 2011).

Doenças do trato gastrointestinal também apresentam repercussões clínicas relevantes. Devido à ausência de IgA, atuante na proteção das mucosas, é comum que ocorram infecções

gastrointestinais principalmente por *Giardia lamblia*, desencadeando episódios de diarreia transitória ou persistente ou por *Helicobacter pylori*, frequentemente associado a episódios de gastrite (Resnick *et al.*, 2012, Baldovino *et al.*, 2013).

Pacientes que apresentem diarreia decorrente da presença de doença inflamatória intestinal (DII) devem ser considerados potencialmente graves, pois apresentam perda de peso acentuada, esteatorreia e má absorção. Neste caso, os achados histológicos obtidos a partir de biópsias do trato gastrointestinal incluem apoptose das células da cripta intestinal, hiperplasia nodular linfóide, folículos linfóides hiperplásicos, ausência de plasmócitos, infiltração linfocitária intraepitelial (Abbott e Gelfand, 2015) e achatamento das vilosidades do intestino delgado semelhante à doença celíaca, mas não responsiva à retirada do glúten (Cunningham-Rundles, 2012). Associado à DII os pacientes com ICV podem apresentar uma ou mais dos seguintes: gastrite e colite linfocíticas, enterocolite colagenosa, doença granulomatosa, doença do enxerto contra hospedeiro (Daniels *et al.*, 2007), carcinomas e adenocarcinomas cujo tratamento pode levar à ressecção parcial ou total do estômago e consequente redução da capacidade digestiva e absorviva (Jolles, 2013, De Petris *et al.*, 2014).

Em pacientes com ICV, o carcinoma gástrico e os linfomas são as manifestações neoplásicas mais comuns. A prevalência de câncer gástrico na ICV é cerca de 50 vezes maior em relação à população geral, sendo sua etiologia provavelmente decorrente de gastrite atrófica multifocal, secundária à infecção por *H. pylori* ou anemia perniciosa (Dhalla *et al.*, 2011)

O elevado risco para o desenvolvimento de câncer gástrico, em pacientes com ICV já havia sido observado ainda em meados da década de 1980, quando um estudo prospectivo com 220 pacientes, em seguimento por 11 anos, demonstrou risco aumentado de cerca de 47 vezes (Kinlen *et al.*, 1985). Contudo, apesar do aumento significativo, os adenocarcinomas gástricos associados à ICV ainda permanecem sendo uma ocorrência rara (Dhalla *et al.*, 2011). Recentemente, (De Petris *et al.*, 2014) encontrou, em avaliação de 5793 casos, apenas 6 que

correspondiam a neoplasias associadas à imunodeficiência, sendo dois destes em pacientes menores de 40 anos. Em 5 destes indivíduos foi observado a presença de adenocarcinomas concomitantemente com pangastrite atrófica difusa (De Petris *et al.*, 2014)

Em relação aos linfomas, a prevalência é em torno de 300 vezes maior em homens a 500 vezes maior em mulheres, em comparação à população geral. Desses, independente do sexo, os mais frequentes são os linfomas não-Hodgkin (LNH), embora também possam ser detectados linfomas de linhagens T e também NK (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999).

Em uma coorte de 224 pacientes europeus em acompanhamento durante longo período, apenas 5 deles desenvolveram LNH, representando um aumento estimado de risco de doença em cerca de 18 vezes. Contudo, se comparado a outros pacientes imunocomprometidos, este aumento de risco é relativamente pequeno, tendo em perspectiva pacientes portadores de aids (aumento do risco em 78 vezes) e receptores de transplante de órgãos sob terapia imunossupressora (aumento de 80 vezes no risco). Nestes pacientes, as infecções por vírus oncogênicos parecem desempenhar importante papel no desenvolvimento de linfomas, estes apresentando susceptibilidade aumentada relacionada com deficiências do sistema imune adaptativo, particularmente aquelas envolvendo as células T (Cunningham-Rundles, 2009, Grulich *et al.*, 2007). No diagnóstico diferencial com linfomas, as patologias que devem ser consideradas são: a hiperplasia nodular linfóide (HNL) em sítios extranodais e o padrão celíaco (doença celíaca-like) ambas consideradas benignas (da Silva *et al.*, 2011, Notarangelo *et al.*, 2006).

Devido ao padrão de infecções recorrentes ou crônicas, bem como doenças autoimunes/inflamatórias, foi sugerido que essas condições possam se traduzir como estímulo imunológico persistente, com aumento do *stress* oxidativo e do quadro inflamatório, evidenciando assim a importância do estudo de mecanismos anti-inflamatórios e do metabolismo redox na doença.

1.2 Stress oxidativo

O conceito de *stress* oxidativo foi introduzido na Medicina em 1985. Consiste, de maneira simplificada, em um desequilíbrio entre a formação de agentes pró-oxidantes como ROS (espécies reativas do oxigênio), e o consumo de antioxidantes. Nas últimas duas décadas esse tópico tem despertado o interesse de inúmeros pesquisadores, principalmente pela percepção de sua ampla capacidade de influenciar quase todos os processos fisiológicos do organismo (Rahal *et al.*, 2014).

Todas as células do corpo humano mantém homeostasia entre as espécies oxidantes e antioxidantes (Poli *et al.*, 2004). Em condições metabólicas normais, a formação de ROS e de outros radicais livres é importante para o funcionamento do organismo, como a produção de ATP, processos anabólicos e catabólicos (Rahal *et al.*, 2014). Quando um desequilíbrio ocorre, o *stress* oxidativo pode promover lesões celulares ou teciduais, com possíveis alterações no DNA, nas proteínas e na peroxidação lipídica. Pode também provocar alterações na sinalização do citocromo c, na liberação de insulina e de citocinas e na sinalização via AP-1 e NF-kB (Tak e Firestein, 2001).

Quanto à influência do *stress* oxidativo no sistema imune, essa relação já está bem estabelecida. O próprio sistema imune usa doses de radicais livres no combate a patógenos. Tanto as células fagocíticas quanto os linfócitos T e B carregam consigo a enzima NADPH oxidase, responsável pela produção de ROS após desafio imunológico (Babior, 1999). Nesse contexto, já se observou aumento acentuado da produção de radicais livres em culturas de monócitos infectadas com vírus da dengue (Valero *et al.*, 2013).

Foi observado também que os radicais livres podem interferir com a frequência e gravidade de infecções bacterianas e virais, provocando alterações tanto na resposta inata quanto na adaptativa, desregulando a secreção de IFN- γ , expressão de CD14, produção de proteínas de fase aguda e indução de TNF- α (Hodgson *et al.*, 2012).

Outro fator importante é que o *stress* oxidativo produzido, devido a condições inflamatórias não resolvidas ou até mesmo persistentes, pode se tornar uma das principais causas de alterações na resposta imunológica. O caos criado por essas mudanças pode desencadear a perda da integridade estrutural tanto celular quanto tecidual e levar a condições crônicas ou neoplásicas (Khatami, 2011). Adicionalmente, o acúmulo dessas modificações aumenta ainda mais o *stress* oxidativo e sustenta a ativação contínua do sistema imune ou mesmo respostas inflamatórias sem causas definidas (Schneider *et al.*, 2011). Consequentemente, fatores produzidos nessas condições, como o TNF, proteases e quinases, participam ativamente no crescimento e proliferação tumoral. Um exemplo disso é o rápido aumento dos casos de câncer de tireóide, cuja causa mais provável parece ser o aumento da exposição da população a irradiações, provocando o aumento da produção de radicais livres (Pellegriti *et al.*, 2013).

Tendo em vista a ampla gama de modificações que o *stress* oxidativo pode provocar no sistema imune e na resposta imunológica, e que pacientes com ICV apresentam como base um quadro pró-inflamatório acentuado, como infecções recorrentes ou crônicas, doenças autoimunes/inflamatórias e neoplasias, o estudo dos mecanismos que possam influenciar tanto a produção de radicais livres, como combater suas consequências, adquire importante papel científico. Neste contexto, uma das importantes vias de pesquisa tem sido o estudo das paraoxonases (PONs) nesta doença.

1.3 Paraoxonases

As PONs provêm de uma família multigene de enzimas – a qual inclui PON1, PON2 e PON3 – localizadas no braço longo do cromossomo 7 em humanos (entre q21.3 e q22.1) (Primo-Parmo *et al.*, 1996). Parecem pertencer a uma família de enzimas ancestrais, cujo aparecimento se deu muito cedo na escala evolutiva em uma diversa gama de organismos, desde invertebrados até mamíferos (Furlong, 2008)

Os genes que codificam as enzimas PON apresentam grande homologia estrutural (Campo *et al.*, 2004, Draganov *et al.*, 2000), sendo que em humanos as enzimas apresentam aproximadamente 60% de identidade entre aminoácidos e em torno de 79% entre nucleotídeos (Campo *et al.*, 2004).

Entre as três enzimas PONs, a PON 1 foi a primeira a ser descrita e é também a mais bem estudada. Sua descoberta se deu pela capacidade que tem de hidrolisar xenobióticos organofosforados no soro humano. Quanto às PON2 e PON3, identificadas mais recentemente, suas funções principais ainda permanecem apenas especulativas (Mackness e Mackness, 2004).

1.3.1 Paraoxonase 1

Em 1946, Abraham Mazur sugeriu a existência de uma enzima em tecido animal com a capacidade de hidrolisar compostos organofosforados. A PON1, cujo nome é derivado de paraoxon, um metabólito do pesticida Parathion (Sorenson *et al.*, 1995), foi descoberta no início dos anos 1950, quando Aldridge classificou as esterases em dois grupos, A e B, baseado em suas interações com tais compostos (Aldridge, 1953, Mackness *et al.*, 1991).

Em humanos, a enzima PON1 possui massa molecular de 43 a 45 kDa (Mackness *et al.*, 1998); trata-se de uma glicoproteína com atividade esterase, aparentemente sintetizada e secretada pelo fígado, completamente dependente de cálcio para sua ação hidrolítica e irreversivelmente inibida pelo EDTA (Campo *et al.*, 2004, Aviram *et al.*, 2005, Aviram e Rosenblat, 2005, Durrington *et al.*, 2001, Gonzalvo *et al.*, 1997).

A PON1 está presente no soro associada à apoA-1, que é integrante das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Na última década, através de estudos evolutivos, análises funcionais e estruturais, foi estabelecido que a função primitiva da enzima seria a de uma lipolactonase (Aharoni *et al.*, 2005, Khersonsky e Tawfik, 2005) que, com o decorrer do tempo, teve sua especificidade expandida para outros substratos. Adicionalmente, a enzima também é capaz de

proteger contra modificações oxidativas tanto as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), quanto as de alta densidade (Aviram, 1999, Aviram *et al.*, 1998). A PON1 despertou mais interesse científico quando, em 1991, Mackness e colaboradores demonstraram sua capacidade de prevenir o acúmulo de lipoperóxidos nas moléculas de LDL, correlacionando-a assim a um papel biológico de proteção contra doenças cardiovasculares (Mackness *et al.*, 1991).

1.3.2 Polimorfismos de PON1 e atividade enzimática

Em relação à PON1, mais de 160 polimorfismos já foram descritos em seu gene (Costa *et al.*, 2005). A base molecular dos polimorfismos na atividade da enzima consiste em uma mutação com codificação de um aminoácido diferente do normal (mutação *missense*), fazendo com que sua atividade seja determinada geneticamente: uma substituição de aminoácido na posição 192, havendo a troca de uma glutamina (Q) por uma arginina (R) (G/A: Gln/Arg), origina duas aloenzimas cujas atividades relativas são substrato-dependentes (Costa *et al.*, 2005). Assim, substratos como paroxon e fenitroxon, organofosforados amplamente empregados como inseticidas, são hidrolisados mais rapidamente pela aloenzima R, enquanto outros substratos, como diazoxon e gases nervosos como soman e sarin, são mais rapidamente hidrolisados pela aloenzima Q. Ainda existem, além destes, substratos como o fenilacetato, que são hidrolisados igualmente por ambas.

Das duas isoformas do polimorfismo Q192R, a PON1-Q parece promover melhor proteção da LDL contra o acúmulo de peróxidos lipídicos *in vitro* (Mackness *et al.*, 2003). Por outro lado, o alelo R parece constituir fator de risco independente para doença coronariana, ao qual atribui-se menor capacidade antioxidativa (Draganov *et al.*, 2000).

Quanto à sua distribuição, o alelo PON1-192R parece ser mais frequente na África Central, em alguns aborígenes ou em regiões mais isoladas, enquanto o alelo Q parece ser mais frequente em regiões temperadas da Europa e também da América do Norte (Draganov *et al.*,

2000, Scacchi *et al.*, 2003). Um único estudo realizado na população brasileira, contudo, revelou distribuições distintas para a PON1 (Allebrandt *et al.*, 2002).

Outro polimorfismo da PON1 que também tem despertado grande interesse é o polimorfismo exônico localizado na posição 55 (L55M). Neste ocorre a troca de um aminoácido leucina (L) por metionina (M) (T/A: Leu/Met) capaz de afetar a atividade de enzima de maneira independente do polimorfismo PON1-Q192R (Mackness *et al.*, 2003, MacKness *et al.*, 2000), estando o alelo PON1-55M associado a menores concentrações séricas da enzima e também à baixa eficiência da PON1 plasmática (Costa *et al.*, 2005).

Embora tenham importante participação no metabolismo, as paraoxonases não são as únicas enzimas capazes de atuar tanto no *stress* oxidativo quanto na filtragem de agentes tóxicos. Diversos outros conjuntos de enzimas também podem desempenhar esse papel; dentre elas, as enzimas da superfamília do citocromo P450 aparecem em destaque, tanto pela sua atividade contra agentes externos quanto pela sua capacidade de influenciar e ser influenciada pelo sistema imunológico.

1.4. Citocromo P450

Nos organismos vertebrados existe uma ampla variedade de citocromos P450 (CYP450), todos críticos na produção e metabolismo de hormônios esteróides e na supressão da resposta imunológica por hormônios glicocorticóides, que constituem o primeiro elo identificado entre o CYP450 e a imunidade. Durante períodos de infecção aguda, tanto a expressão quanto a atividade de CYP estão alteradas, culminando na diminuição da capacidade do fígado e de outros órgãos de metabolizar drogas, produtos químicos e também alguns compostos endógenos (Daly, 2015).

Tal como ocorre com as paraoxonases, existem diversas subfamílias de CYP450, cada uma especializada no metabolismo de um determinado tipo de substrato. A subfamília 1A, por exemplo, está relacionada ao metabolismo da aflatoxina B1, enquanto a subfamília 2C apresenta

relação com o metabolismo de certas drogas neuroativas, como a fenitoína, a varfarina e o ácido aracdônico. A subfamília 2E, por outro lado, parece estar relacionada ao metabolismo de procarcinogênicos, sendo a enzima CYP450-2E1 considerada a principal ativadora dessas substâncias. Ainda sobre essa enzima, acredita-se que ela possa induzir letargia em células imunológicas e, do mesmo modo que as PONs, a grande maioria das enzimas dessas subfamílias apresentam-se altamente polimórficas (Daly, 2015).

1.4.1 CYP2E1

Atualmente há muitas evidências de que a CYP2E1 seja responsável pela ativação metabólica de uma ampla gama de compostos carcinogênicos, entre os quais encontram-se as nitrosaminas, por exemplo. A hipótese mais aceita é de que essa enzima tenha participação nos processos de oxidação de compostos como o etanol, o benzeno, o xileno e o tolueno podendo, assim, dar início ao processo de carcinogênese (He e Feng, 2015, Jimenez-Garza *et al.*, 2015). Dentre as CYPs hepáticas, a CYP2E1 representa uma das isoformas mais comuns, presente também em níveis significativos em tecidos extra-hepáticos (Jimenez-Garza *et al.*, 2015).

Embora alguns produtos químicos, assim como determinados estados fisiológicos, possam induzir a atividade de CYP2E1, um número considerável de variações interindividuais já foram descritas sugerindo que essa variabilidade possa ser determinada por polimorfismos da enzima (Xu *et al.*, 2014).

De maneira semelhante às PONs, o gene da CYP2E1 é altamente polimórfico. Entre os polimorfismos encontrados, acredita-se que os polimorfismos -1293G/C (Pst I) e o -1053C/T (Rsa I) estejam relacionados à maior capacidade carcinogênica da enzima, principalmente em relação aos carcinógenos de baixo peso molecular, como o CCl₄, benzeno, estireno, 1, 2-dicloropropano, tricloroetileno, dentre outros (He e Feng, 2015). Diversas meta-análises recentes e estudos caso/controle indicaram a participação desses polimorfismos no aumento do risco para o

desenvolvimento de neoplasias gástricas, colorretais, esofágicas e pulmonares (Chong *et al.*, 2016).

Estudos recentes também associado a CYP2E1 a alterações na função do sistema imunológico. Durante um estudo visando explorar a relação entre a exposição a poluentes e a atividade de CYP, foram observados fenômenos epigenéticos associados ao aumento da expressão de mRNA de CYP2E1 em linfócitos periféricos. Nesse contexto, os autores conseguiram detectar a presença de metilações nos promotores do gene da enzima, bem como nos promotores de glutathione S-transferase p1 (GSTP-1) e interleucina 6 (IL-6). Desta forma, foi proposto que a exposição a tais poluentes, principalmente o tolueno, poderia apresentar correlação direta com o metabolismo do indivíduo, em que concentrações mais altas de tolueno poderiam culminar na não-responsividade de leucócitos perante as infecções (muito provavelmente pela redução da IL-6) e ao aumento de ROS, em decorrência da redução de GSTP-1. Neste mesmo trabalho também foi identificado que o aumento da produção de TNF- α poderia aumentar o risco para o desenvolvimento de um quadro pró-inflamatório crônico (Jimenez-Garza *et al.*, 2015).

Seguindo essa mesma linha, outro estudo recente conseguiu observar que, em camundongos, diante da redução de IL-6 e aumento da expressão de CYP2E1, houve aumento do *stress* oxidativo, bem como aumento da colonização bacteriana e redução da função efetora dos leucócitos (Elingarami *et al.*, 2015).

1.5 Stress oxidativo e neoplasias

Em 1994, Aukrust e colaboradores observaram o aumento de marcadores de *stress* oxidativo, como o malonaldeído plasmático, correlacionando-o com contagens reduzidas de linfócitos CD4+, presença de esplenomegalia e também de HNL em intestino em pacientes com ICV (Aukrust *et al.*, 1994). Posteriormente, o mesmo grupo relatou também o aumento de

glutathiona e de cisteína, bem como aumento dos níveis plasmáticos de homocisteína (Aukrust *et al.*, 1997).

Estudos prévios realizados em nosso grupo com pacientes com ICV foram sugestivos de que os polimorfismos das enzimas PON possam ter relação com a presença de neoplasias, especialmente de LNH (Sini, 2013).

Outros trabalhos também sugerem que os polimorfismos encontrados nesta família de enzimas possam estar relacionados a diversos fatores de risco para diversas neoplasias, principalmente câncer de mama, de pulmão, câncer retal, leucemia e linfomas não-Hodgkin na população geral (De Roos *et al.*, 2006, Hussein *et al.*, 2011, Kerridge *et al.*, 2002). Conforme observado por De Roos (De Roos *et al.*, 2006), a presença do genótipo 55MM pareceu estar correlacionada à presença de fatores de risco para o desenvolvimento de linfomas .

Ainda, conforme dados prévios realizados por nosso grupo, a presença de apenas uma cópia do alelo PON1-55L já parece ser capaz de desempenhar papel protetor em indivíduos com ICV. Neste estudo, indivíduos que portavam esse alelo apresentaram não apenas incidência menor de neoplasias em geral, como também quadros mais brandos de ICV, com menor incidência de infecções de vias aéreas e também de pneumonias, tornando assim evidente a importância do estudo da família de enzimas PON nas imunodeficiências que cursam com estímulos imunológicos persistentes (Sini, 2013).

Os estudos acima citados parecem apontar possíveis relações entre os polimorfismos das paraoxonases e a presença de fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias na população geral (De Roos *et al.*, 2006, Hussein *et al.*, 2011, Kerridge *et al.*, 2002) e em pacientes com imunodeficiência comum variável (Sini, 2013). De maneira semelhante, polimorfismos genéticos no CYP450 parecem atuar tanto no metabolismo de agentes externos como na ativação de pró-carcinogênicos, já sendo relacionado ao desenvolvimento de neoplasias em

indivíduos anteriormente imunocompetentes e também às suas microrrelações com o sistema imune (Jimenez-Garza *et al.*, 2015).

É curioso destacar também que, entre pacientes com ICV, em acompanhamento no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do HC-FMUSP, um número significativo de indivíduos relata casos de exposição a algum agente tóxico ambiental previamente ao início da doença. Esses indivíduos têm história pregressa ou atual de contato com agentes tóxicos ambientais e já está bem estabelecido que a intoxicação por chumbo possui associação com o desencadeamento de leucemia em crianças nascidas de mães que fizeram uso de tinturas de cabelo durante a gestação (de Aguiar Goncalves *et al.*, 2012).

Desta maneira, tem sido sugerido que uma possível associação entre os fatores acima citados e alguns dos polimorfismos mais comuns tanto das PONs quanto do CYP possam afetar o metabolismo de alguns compostos aos quais estes indivíduos tiveram exposição. Tais alterações, portanto, poderiam ser suficientes para comprometer o funcionamento geral do organismo e gerar, como consequência, imunodeficiências secundárias tanto ao uso de medicamentos quanto à exposição ambiental. Adicionalmente, poderiam também estar associadas a complicações em quadros já instalados de ICV, com piora do prognóstico da doença e aumento no risco já elevado de desenvolvimento de neoplasias. Por fim, cabe ainda ressaltar que, mesmo após extensa revisão da literatura, não foi possível encontrar estudos prévios relacionando tais fatores com o quadro clínico de pacientes com ICV.

1.6 Imunodeficiências secundárias

O diagnóstico da ICV primária é estabelecido em pacientes com hipogamaglobulinemia nos quais outras causas de hipogamaglobulinemias primárias bem definidas foram excluídas como agamaglobulinemia, síndrome da hiperIgM e doença linfoproliferativa ligada ao X. Também devem ser excluídas outras condições secundárias associadas a hipogamaglobulinemias, tais como neoplasias (timoma, leucemia linfocítica crônica, linfomas e

mieloma múltiplo); uso de medicamentos, sendo os mais comuns os imunossuppressores, rituximab, os anticonvulsivantes, anti-depressivos e modificadores da resposta imunológica; infecções por vírus como Epstein-Barr, HIV, Citomegalovírus, Rubella virus e Parvovírus B19; enteropatias perdedoras de proteínas, como a linfangiectasia intestinal e doença celíaca; síndrome nefrótica; queimaduras extensas; doenças sistêmicas associadas à supressão da medula óssea (Al-Herz *et al.*, 2014).

Diversos relatos, no entanto, apresentam casos de pacientes cujos diagnósticos seriam compatíveis com ICV primária mas que, diferente desta, apresentam possível correlação com o uso prolongado de medicamentos como glicocorticóides, sulfassalazina ou drogas anticonvulsivantes, principalmente carbamazepina ou fenitoína. Algumas dessas drogas, por sua vez, podem estimular o sistema imunológico enquanto outras podem, possivelmente, provocar sua inibição (Beghi e Shorvon, 2011, Eom *et al.*, 2013, Ozaras *et al.*, 2012, Pereira e Sanchez, 2002)

Nessa linha os corticosteroides representam, entre os inibidores da resposta imunológica, as drogas que provocam mais comumente reduções nos níveis séricos de imunoglobulinas. Os possíveis mecanismos fisiológicos implicados são sua capacidade de atuar sobre diversas vias de sinalização, provocando o desligamento de genes pró-inflamatórios, principalmente pela inibição da histona-acetiltransferase, e o recrutamento da histona-deacetilase 2, reforçando a ligação entre as histonas e a molécula de DNA e impedindo a transcrição (Oakley e Cidlowski, 2013).

Carbamazepina e fenitoína, por sua vez, são medicamentos utilizados principalmente no tratamento de doenças neurológicas e que também parecem ser capazes de influenciar o sistema imunológico. Contudo, diferentemente dos corticosteroides, o mecanismo através do qual estas drogas provocam a inibição da resposta imune ainda não está suficientemente esclarecido (Beghi e Shorvon, 2011, Eom *et al.*, 2013, Pereira e Sanchez, 2002). Em um estudo

com crianças recém diagnosticadas com epilepsia, que apresentavam níveis normais ou até mesmo elevados de imunoglobulinas, o tratamento com carbamazepina provocou redução dos níveis de imunoglobulinas. Neste mesmo trabalho especula-se se essa droga seria capaz de interferir tanto na maturação das células B quanto atuar sobre células T reguladoras (Beghi e Shorvon, 2011, Eom *et al.*, 2013, Ozaras *et al.*, 2012, Pereira e Sanchez, 2002).

Existem também estudos que sugerem que esses medicamentos possam inibir a síntese de proteínas em linfócitos, reduzindo a razão CD4/CD8, assim como os níveis de IgA e/ou IgG e/ou IgM. Resultados *in vitro* sugerem que essas drogas possam provocar redução dos níveis séricos de IL-2 (perfil Th1) e de IL-4 (perfil Th2) e aumento de TGF- β e de IL-10 (Treg). Tais evidências devem ser, contudo, analisadas com cautela, já que alguns indivíduos tratados com carbamazepina apresentaram aumento de IL-2 e pacientes tratados com fenitoína apresentaram aumento de IL-1 (Beghi e Shorvon, 2011, Ozaras *et al.*, 2012).

Vale ressaltar também que outras drogas, além das anteriormente citadas, podem levar ao desenvolvimento de imunodeficiências secundárias. A sulfassalazina, por exemplo, é um medicamento utilizado no tratamento de doenças inflamatórias intestinais cujos efeitos inibitórios já são conhecidos (Eom *et al.*, 2013, Ozaras *et al.*, 2012).

Outra importante fonte de fatores capazes de interferir com o sistema imunológico são os poluentes ambientais, principalmente solventes, pesticidas agrícolas ou metais pesados. Trabalhos recentes foram capazes de determinar que a exposição de indivíduos saudáveis a certos solventes, principalmente xileno e tolueno, pode induzir alterações celulares que resultam em queda da função efetora de células imunológicas (Jimenez-Garza *et al.*, 2015).

Desta forma, é possível que indivíduos expostos a tais substâncias acabem por desenvolver alguma alteração do metabolismo oxidativo. Essas alterações, por serem causadas por exposição contínua, podem se acumular indefinidamente enquanto durar

a exposição, provocando um progressivo aumento do stress oxidativo e afetando de maneira gradativa a resposta imunológica. Consequentemente, como esses fatores podem induzir, direta ou indiretamente, uma anergia do sistema imune, é possível que, com o acúmulo dessas modificações, esses indivíduos possam desenvolver sintomas muito semelhantes aos dos pacientes com ICV. Torna-se então importante estudar nesses pacientes, à semelhança de pacientes com imunodeficiências primárias, os mecanismos responsáveis pelo controle do stress oxidativo, como a PON1 e o CYP450.

2.Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Realizar em pacientes com imunodeficiência comum variável ou provável hipogamaglobulinemia secundária, a genotipagem dos polimorfismos L55M da PON1 e CYP2E1*5 do citocromo P450 e quantificar a atividade arilesterase da PON1

2.2 Objetivos específicos

Analisar as relações entre os polimorfismos dessas enzimas e as características clínicas de pacientes com imunodeficiência comum variável e hipogamaglobulinemia secundária

Estudar a relação entre as paraoxonases, seus polimorfismos e atividade arilesterase com o perfil lipídico dos pacientes com imunodeficiência comum variável e hipogamaglobulinemia secundária

Avaliar o uso de medicamentos em pacientes com hipogamaglobulinemia secundária ou a exposição a fatores ambientais em pacientes imunodeficiência comum variável ou hipogamaglobulinemia doença secundária.

3.Metodologia

3 Metodologia

3.1 Locais do estudo

Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O estudo da atividade arilesterase e a genotipagem da PON1 e do CYP450 foram realizados no Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM 31) do HC- FMUSP.

Os exames de rotina foram realizados no Laboratório Central de Análises do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2 Casuística

3.2.1 Pacientes

Foi avaliada retrospectivamente uma coorte de 117 pacientes com diagnóstico de imunodeficiência comum variável primária ou provavelmente secundária ao uso de medicamentos, incluindo corticosteroides, fenitoína, carbamazepina, valproato e sulfassalazina.

3.2.1.1 Critérios Diagnósticos

O diagnóstico de ICV foi estabelecido na presença de níveis séricos baixos de IgG e IgA e/ou IgM e comprometimento da função de anticorpo, de acordo com os critérios definidos por Conley e colaboradores (Conley *et al.*, 1999).

3.2.1.2 Critérios de inclusão

Pacientes de ambos os sexos, acima dos 18 anos de idade, que preenchiam o diagnóstico de ICV primária ou imunodeficiência secundária ao uso de medicamentos ou exposição ambiental a agentes tóxicos e que aceitaram participar da pesquisa.

3.2.1.3 Exames laboratoriais de rotina

A triagem inicial incluiu: hemograma, dosagem de imunoglobulinas no soro, sorologias para agentes infecciosos, eletroforese de proteínas, componentes C3 e C4 do sistema complemento. Posteriormente foram realizados: colesterol total, frações e triglicérides, urina tipo I e protoparasitológico de fezes; exames de imagem; avaliação da função pulmonar; avaliação de autoimunidade (pesquisa de anticorpos anti-nucleares, anti-tireoglobulina, anti-tireoperoxidase, anti-mitocondria, anti-célula parietal gástrica, anti-LKM, ANCA (anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos), fator reumatóide, anticorpo anti-endomísio e anti-transglutaminase, teste de Coombs); biópsias (linfonodos, estômago, intestino). Exames adicionais foram realizados de acordo com os quadros clínicos que cada paciente apresentou durante sua avaliação e posterior evolução.

3.2.2 Indivíduos controle saudáveis

A frequência dos polimorfismos da PON1 e do CYP450 foi estudada em 130 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, doadores de sangue na Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo e funcionários saudáveis voluntários do HC-FMUSP.

3.3 Obtenção das amostras de soro/ plasma

Após aplicação e aceitação do termo de consentimento livre e esclarecido, foram obtidos 5 ml de sangue com anticoagulante EDTA e 8 ml de sangue em tubo seco dos pacientes e indivíduos controles incluídos no estudo. Os pacientes foram orientados a comparecer em jejum de 12 horas quando da coleta das amostras de sangue. Os controles saudáveis, por sua vez, estavam em estado pós-prandial devido à necessidade de alimentação para a doação de sangue.

Imediatamente após a coleta, as amostras foram mantidas a 0°C (banho de gelo) por no máximo 60 minutos, sendo então centrifugadas (3.000 rpm por 5 minutos a 8°C), visando-se realizar alíquotas de soro e plasma (armazenados a -80°C até o uso) – para análises de atividade enzimática e perfil lipídico – e obter-se a purificação do DNA genômico.

3.4 Obtenção de DNA genômico a partir de células de sangue periférico

O DNA genômico foi obtido por método de *salting out* conforme descrito por Miller (Miller *et al.*, 1988). Neste método, há remoção de proteínas celulares pela desidratação e precipitação com solução saturada de NaCl.

Utilizando-se uma pipeta de transferência, 500µL da camada de leucócitos foram colocados em tubo de 1,5 mL. Acrescentou-se 750µL de tampão de lise de sacarose (Tris-HCl 10mM, pH 7,5, sacarose 34mM, MgCl₂ 10mM, Triton X-100 1%). Deu-se então seguimento à centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos. Utilizando-se sucção por vácuo, o sobrenadante foi removido, restando no fundo do tubo apenas o *pellet*. Foi adicionado então 1mL de tampão de lise e realizada uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos, com novo descarte do sobrenadante. Esse processo repetiu-se novamente.

Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 500µL de solução RCLB ao *pellet* e procedeu-se à centrifugação, por 3 minutos, a 3.000 rpm. Ao final do processo, o sobrenadante foi removido por sistema à vácuo.

Posteriormente, adicionou-se ao *pellet* 500µL de solução TEN (Tris-HCl 10mM, pH8,2, EDTA 2mM e NaCl 400mM), 5µL de SDS 10% e 3µL de Proteinase K. A solução foi

homogeneizada brevemente por inversão até que o *pellet* se desprendesse do fundo do tubo. Procedeu-se então à incubação por uma hora a 56°C, em banho-maria.

Após o período de incubação, foram adicionados 150µL 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 1,5mL contendo 600µL de Isopropanol. A amostra então foi 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 adicionado 1mL 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 100µL de solução TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0, EDTA 1mM).

A quantificação do DNA obtido foi realizada por espectrofotometria utilizando-se o equipamento NanoDrop (NanoDrop, EUA).

3.5 Genotipagem para os polimorfismos de PON1 e CYP450

Foram amplificados fragmentos específicos para cada região pesquisada, posteriormente 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*).

3.5.1 Determinação do polimorfismo L55M no gene da PON1

As análises foram realizadas conforme descritas por Motti (Motti *et al.*, 2001).

Para a digestão dos produtos da PCR-RFLP, foi utilizada a enzima de restrição Hinf-I, originando assim fragmentos capazes de caracterizar os polimorfismos PON1-L55M

O processo de PCR seguiu as seguintes relações: em uma reação de 25µL de volume utilizando Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, pH 8,3, MgCl₂ 7mM, 600mM de cada nucleotídeo trifosfato, 0,16mM de primers *forward* e *reverse* de PON1-192 e PON1-55 e 0,3mM de primers *forward* e *reverse* PON2-311, 1µg de DNA genômico e 1U de Taq-polimerase. A reação deu-se 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 utilizados foram:

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

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

Os produtos amplificados apresentaram 144pb. Realizou-se então a digestão de tais produtos, seguindo uma reação com 2 horas de duração, à 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, os produtos finais se apresentavam da seguinte forma: se o fragmento contendo 144pb não sofreu digestão pela enzima, este foi determinado como sendo o alelo PON1-55M. Se a amostra possuía o alelo PON1-55L, o resultado apresentado era o de uma banda de 122pb, resultante da digestão do DNA pela enzima de restrição.

3.5.2 Genotipagem do polimorfismo CYP450:

Subfamília 2E1: foi realizada através de PCR-RFLP, numa reação de 25µL. A reação continha 1,0µg de cada primer; 0,2mM de DNTPs; 2,5mM de MgCl₂ e 1,5 de Taq-polimerase. A reação consistiu de uma fase inicial de 95°C por minutos. Seguiu-se para uma fase de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 57°C e 2 min a 72°C, finalizando o processo com uma etapa de 10 min a 72°C. O produto final seguiu para digestão com 10 unidades da enzima *Rsa I* a 37°C por 4 horas. Após esse processo as amostras foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose a 2,5% para a presença dos alelos c1 ou c2, sendo que a presença de c1 resultou em bandas de 352 e 200pb, enquanto c2 foi resistente a digestão ((Tan *et al.*, 2000)).

3.6 Determinação da atividade arilesterase de PON1

A atividade arilesterase da PON1 foi realizada conforme descrita por Lorentz e colaboradores (Lorentz *et al.*, 1979). Para tanto, as alíquotas de soro foram diluídas 1:3 em tampão Tris-CaCl₂ contendo (4,45mM Tris e 0,47mM CaCl₂). Em seguida, foram preparados 100mL de tampão de reação de Tris-CaCl₂ contendo 13µL de fenilacetato (Phenyl Acetate, 99%; Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA). Após a preparação do tampão de reação, 5µL das alíquotas diluídas 1:3 foram então adicionados a 3.000µL de tampão de reação contendo fenilacetato, para iniciar a análise. Esta foi mensurada cineticamente durante 5 minutos, com intervalos de leitura de 30 segundos e realizada a 270nm, utilizando-se um espectrofotômetro DU®-70 Spectrophotometer Beckman, à temperatura de 25°C.

Cálculo da atividade arilesterase

Atividade arilesterase = Fator x Δ Abs/min x diluição

Fator = $V_{tr} \text{ (ml)} / \epsilon 270 \times V_a \text{ (ml)} \times E \text{ (cm)}$

V_{tr} = volume total da reação (3ml)

V_a = volume da amostra (0,005ml)

E = caminho óptico (1cm)

$\epsilon 270$ do fenol = Coeficiente de absorção molar (1,310)

3.7 Análise do perfil clínico/laboratorial dos pacientes com ICV

Perfil clínico. Foram analisados os seguintes parâmetros: 1) idade de início dos sintomas, idade ao diagnóstico da ICV, intervalo de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico da doença e tempo total de doença; 2) história de pelo menos um episódio de sepse como apresentação da doença ou durante sua evolução, excluindo-se a fase terminal dos pacientes que foram a óbito; 3) história de infecções de repetição e/ou crônica de vias aéreas superiores (IVAS), pneumonia e diarreia; 4) presença de linfonodomegalia mediastinal e/ou abdominal, esplenomegalia, hepatomegalia, hipertensão portal, bronquiectasias e doença pulmonar obstrutiva crônica; 5) alterações histológicas do trato gastrointestinal compatíveis doença celíaca (padrão celíaco), hiperplasia nodular linfoide (HNL), metaplasia intestinal e/ou gástrica; 6) diagnóstico prévio de malignidades; 7) história familiar de imunodeficiências primárias e/ou neoplasias de linhagem hematológica. Os diagnósticos das diversas doenças associadas à ICV encontradas nesta casuística foram estabelecidos obedecendo a critérios clínicos e laboratoriais recomendados pelas sociedades internacionais das especialidades envolvidas.

3.8 Exposição ambiental e uso de medicamentos

Para os pacientes com possível diagnóstico de hipogamaglobulinemia secundária, a investigação dos medicamentos utilizados foi feita através de análise dos prontuários. A exposição ambiental foi avaliada no âmbito profissional, levando-se em conta a profissão dos indivíduos. Foram considerados expostos aqueles pacientes que, durante entrevista, afirmaram terem tido contato com solventes químicos, tintas e tinturas, defensivos agrícolas ou metais pesados.

3.9 Análise estatística

Foi realizado uma análise descritiva dos dados através do cálculo das medidas de resumo (Média, desvio-padrão, mediana e quartis) e por meio de gráficos do tipo box-plots para as variáveis contínuas. As variáveis categóricas foram expressas em termos de porcentagens e gráficos de barras.

A comparação dos grupos foi realizada por meio do teste ANOVA ou teste-t para as variáveis que seguem distribuição normal (teste de Anderson-Darling) e para as variáveis que não seguem normalidade, foi utilizado do teste de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney para as variáveis homogêneas (teste de Bartlett) e para as variáveis heterogêneas, teste de Levene ou Brunner-Manzel. As comparações múltiplas foram feitas pelos testes paramétricos e não paramétricos de Tukey.

A regressão de Cox foi realizada para estimar o Risco Relativo. O teste de Log-Rank foi utilizado para medir a significância da distância entre os grupos. A regressão logística foi utilizada para estimar o OR (Odds Ratio) em relação a óbitos e gravidade. Para estabelecer um ponto de corte na variável ARIL, foi utilizada a técnica de Lausen, que estima um ponto de corte maximizando a estatística de Log-Rank.

4.Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos

O grupo de pacientes com ICV foi composto por 101 indivíduos, sendo 54 (53,47%) do sexo feminino e 47 (46,53%) do sexo masculino, com média de idade de $42,78 \pm 14,15$ anos. O segundo grupo analisado foi composto por 16 pacientes com hipogamaglobulinemia secundária (HS) sendo 8 (50%) masculinos e 8 (50%) femininos e média de idade de $49,0 \pm 14,03$ anos. Como grupo controle foram avaliados 130 indivíduos saudáveis doadores de sangue, sendo 80 do gênero masculino (61,54%) e 50 do feminino (38,46%) com média de idade de $41,22 \pm 10,89$ anos.

Tabela 1: Características demográficas de pacientes com ICV e controles saudáveis

Dados Gerais	Pacientes ICV (n=101)	Pacientes HS (n=16)	Controles (n=130)
Femininos	53,47% (54)	50,00% (8)	38,46% (50)
Masculinos	46,53% (47)	50,00% (8)	61,54% (80)
Cor da pele			
Branco	72,28% (73)	68,75% (11)	-
Pardo	20,80% (21)	31,25% (5)	-
Negro	04,96% (5)	00,00	-
Oriental	01,98% (2)	00,00	-
Idade Atual	42,78±14,15	49,00±14,03	41,22 ± 10,89
Idade de início dos sintomas	16,82±11,75	29,07±16,47	-
Tempo de Doença	25,96±14,49	23,56±19,97	-
Idade de Diagnóstico	30,20±13,95	39,86±18,53	-
Retardo Diagnóstico	13,38±12,82	10,07±12,78	-

Quanto à cor da pele, 72,28% dos pacientes com ICV autodeclararam-se como brancos, 20,80% como pardos e apenas 04,96% e 01,98% como negros ou orientais, respectivamente. Quanto ao grupo de indivíduos com HS, 11 referiram-se como brancos e 5 deles como sendo de pele parda.

Em relação ao quadro clínico, observou-se que a idade de início dos sintomas variou desde 1 até 52 anos, com média de 16,82 anos nos pacientes com ICV e entre 1 e 58 anos nos pacientes com hipogamaglobulinemia secundária, com média de 29,07 anos. A média de idade de diagnóstico foi de 30,20 anos para os pacientes com ICV e 39,86 anos para os pacientes com HS. Quanto ao tempo de doença, a média para o grupo ICV foi de 25,96 anos enquanto que para o grupo HS foi de 23,56 anos (tabela 1).

4.2 Níveis de colesterol e populações linfocitárias CD4+ e CD8+ em pacientes de nos grupos ICV e HS e controles saudáveis

Os valores totais de HDL, LDL e Colesterol, bem como as contagens de células CD4 e CD8 encontram-se descritos na tabela 2. Segundo esses dados, foi possível observar que, embora apresentando perfil lipídico alterado, tanto os pacientes com ICV quanto aqueles com hipogamaglobulinemia secundária não foram caracterizados como portadores de dislipidemia em relação aos valores de referência (Parra *et al.*, 2010).

Tabela 2: Características laboratoriais de pacientes nos grupos ICV e HS

	HDL	LDL	Colesterol	CD4	CD8
Grupo ICV (n=101)					
Média ± Desvio	43,6±17,51	98±31,28	161,27±44,45	596,65±302,56	738,57±460,88
Mínimo	11	42	36	139	110
Mediana	40,5	95,5	158	561	653
Máximo	127	217	296	1472	3345
Grupo HS (n=16)					
Média ± Desvio	52,12±43	121,25±37,98	192,44±37,89	761,44±372,56	822,38±479,67
Mínimo	24	74	142	245	227
Mediana	47,5	117,5	189	692	730
Máximo	86	218	258	1700	2252

4.3 Descrição individual dos polimorfismos da PON1-L55M e CYP2E1

As frequências alélicas dos polimorfismos PON1-55L, PON1-55M, CYP2E1-C1 e CYP2E1-C2 dos grupos de pacientes e controles saudáveis estão demonstradas na tabela 3. Em nove pacientes não foi possível identificar o genótipo para os dois polimorfismos da PON1, provavelmente devido a mutações alélicas que não foram contempladas neste estudo.

Foi observado aumento da frequência do alelo PON1-55L ($p<0,001$) e do genótipo 55LM ($p=0,001$) no grupo de pacientes HS em relação ao grupo ICV (Tabela 3). A frequência alélica no grupo de pacientes ICV não diferiu daquela observada no grupo controle. No grupo de pacientes secundários, não foi encontrado nenhum paciente com o genótipo 55MM. Quanto ao polimorfismo CYP2E1*5 do citocromo, não foram observadas quaisquer diferenças estatísticas na frequência alélica ou genotípica entre os diversos grupos estudados.

Tabela 3: Frequência dos polimorfismos da PON-1 L55M e da CYP450 – 2E1 nos grupos ICV, HS e controles saudáveis

Polimorfismo	Pacientes ICV	Pacientes HS	Controles
PON1 – L55M			
55MM	33,66% (34)	0,00% (0)	16,15% (21)
55LM	25,74% (26)*	50,00% (8)*	38,46% (50)
55LL	32,67% (33)	43,75% (7)	45,38% (59)
Não detectado	7,92% (8)	06,25% (1)	-
Alelos			
55L	49,46% (92)**	73,33 (22)**	64,62% (168)
55M	50,54% (94)	26,67% (8)	35,38% (92)
CYP450 – 2E1			
C1-C1	90,10% (91)	93,75% (15)	86,92% (113)
C1-C2	09,90% (10)	06,25% (1)	13,08 (17)
C2-C2	-	-	-
Não detectado	-	-	-
Alelos			
2E1-C1	95,05% (192)	96,87% (31)	93,46% (243)
2E1-C2	04,95% (10)	03,13% (1)	06,54% (17)

* Maior frequência de pacientes do genótipo 55LM em pacientes com HS em relação aos pacientes ICV

** Maior frequência do alelo 55L em pacientes com HS em relação aos pacientes ICV

4.4 Atividade arilesterase

A determinação da atividade arilesterase de PON1, nos 117 pacientes estudados, apresentou os seguintes resultados: média de $80,90 \pm 21,75$ U/L, com valor máximo de 137,07 U/L e valor mínimo de 30,08U/L para os pacientes com ICV e $85,79 \pm 23,39$ U/L para os pacientes com HS. A determinação da atividade arilesterase de PON1, nos 130 indivíduos controles, apresentou média de $91,41 \pm 22,81$ U/L, com valor máximo de 160,50 U/L e mínimo de 13 U/L.

Relação entre atividade arilesterase e os polimorfismos da PON-1. Foi possível observar que houve diferença entre a atividade arilesterase do grupo de pacientes ICV em

relação aos indivíduos controle ($p < 0,001$). Os pacientes ICV do grupo 55LL também apresentaram atividade enzimática reduzida em comparação aos controles de mesmo genótipo ($p = 0,006$). Em relação ao grupo de pacientes secundários, não houve diferenças significativas entre os valores observados e os demais grupos estudados.

Tabela 4: Atividade Arilesterase nos grupos ICV, HS e controles saudáveis

Polimorfismo	Pacientes ICV (n=100)	Pacientes HS (n=16)	Controles (n=130)
PON1 – L55M			
Total	80,90+21,75*	85,79+23,39	91,41 ± 22,81*
55MM	71,02+24,29	-	86,96 + 21,76
55LM	86,08+18,36	79,09+18,34	84,9 + 18,569
55LL	85,49+17,19**	96,00+27,23	100,64 + 23,1**

* Diferença entre a atividade arilesterase de PON1 entre ICV e controles $p < 0,001$
 **Diferença entre a atividade arilesterase de PON1 entre ICV e controles do genótipo 55LL $p = 0,006$

Relação entre atividade arilesterase da PON1 e o perfil lipídico. Não houve correlação estatística entre os valores de HDL, LDL e colesterol total e os níveis de atividade arilesterase de PON1, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5: Relação da Arilesterase com o Perfil lipídico

Fator	Intervalo de confiança (95%)		p<0,05
HDL	-0,13866	0,25284	0,56
LDL	-0,03104	0,351331	0,098
COLESTEROL TOTAL	-0,07423	0,312795	0,22

4.5 Relação entre parâmetros clínicos e laboratoriais

Características clínicas. A investigação clínica dos pacientes foi realizada de acordo com a rotina clínica do serviço. As manifestações investigadas encontram-se demonstradas na tabela 6.

Tabela 6: Variáveis clínicas investigadas

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 	<ul style="list-style-type: none"> • Linfonomegalia • Linfoproliferação • Gastrointestinais: <ul style="list-style-type: none"> - Gastrite e Esofagite - Diarréia - <i>H.pylori</i> - Doenças Inflamatórias intestinais 	<ul style="list-style-type: none"> • Asma • Rinite • DPOC • Bronquiectasias • Neoplasias • Esplenomegalia • Hepatomegalia • Hipertensão portal

Comparação entre parâmetros clínicos e laboratoriais e genótipos do polimorfismo PON1 L55M. Conforme demonstrado nas tabelas abaixo, não houve associações entre as diferentes infecções (Tabela 7) e manifestações gastrointestinais (Tabela 8) apresentadas e os genótipos de PON nos pacientes com ICV. Todavia, foi observada associação entre os genótipos de PON1 – L55M e menor incidência de linfonomegalia ($p=0,021$) nos pacientes com genótipo 55LM e maior incidência de malignidade ($p=0,018$) e hepatomegalia ($p=0,027$) nos pacientes com o genótipo 55MM, conforme demonstrado na Tabela 9.

Não foram observadas, nos pacientes com hipogamaglobulinemia secundária, diferenças significativas entre a presença de infecções, linfonomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia ou outras comorbidades em relação aos diferentes genótipos de PON1 ou de CYP2E1*5.

Tabela 7: Presença de Infecções em relação aos genótipos do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS

		Pacientes ICV *	P (<0,05)	Pacientes HS *	P (<0,05)
Vias Aéreas	55MM	100%	0,965	-	1
	55LM	96,15%		75%	
	55LL	96,96%		71,42%	
Pneumonia	55MM	97,05%	0,338	-	0,619
	55LM	88,46%		65,5%	
	55LL	87,87%		42,85%	
Sinusites	55MM	79,41%	1	-	1
	55LM	80,76%		65,5%	
	55LL	78,78%		57,14%	
Oportunistas	55MM	50%	0,505	-	0,2
	55LM	34,61%		0%	
	55LL	42,42%		28,57%	
Sepse	55MM	20,58%	0,617	-	0,077
	55LM	11,53%		50%	
	55LL	12,12%		0%	
ITUs	55MM	23,52%	0,161	-	1
	55LM	7,69%		12,5%	
	55LL	9,09%		14,28%	
Meningite	55MM	5,88%	0,766	-	1
	55LM	3,84%		25%	
	55LL	9,09%		14,28%	

* Valores de n dos grupos estudados: ICV - MM: 34, ICV - LM:26 e ICV - LL: 33; HS - MM: 0, HS - LM: 8, HS - LL: 7. $p < 0,05$

Tabela 8: Presença de alterações gastrointestinais, linfonodomegalia e linfoproliferações benignas em relação aos genótipos do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS

		Pacientes ICV	P (<0,05)	Pacientes HS	P (<0,05)
Gastrointestinais	55MM	70,58%	0,746	0	1
	55LM	96,15%		75%	
	55LL	84,84%		85,71%	
Intestinal	55MM	82,35%	0,746	0	1
	55LM	73,07%		62,5%	
	55LL	84,84%		57,14%	
Diarréia	55MM	76,47%	0,168	0	1
	55LM	88,46%		50%	
	55LL	66,66%		57,14%	
Esofagite	55MM	50,00%	0,501	0	0,132
	55LM	61,53%		25%	
	55LL	63,63%		71,42%	
Gastrite	55MM	82,35%	1	0	0,315
	55LM	84,61%		37,5%	
	55LL	84,84%		71,42%	
<i>H. pylori</i>	55MM	17,64%	0,671	0	1
	55LM	26,92%		12,5%	
	55LL	24,24%		14,28%	
Linfonodomegalia	55MM	41,17%**	0,021	0	0,132
	55LM	15,38%**		12,5%	
	55LL	48,48%**		71,42%	
Linfoproliferação	55MM	35,29%	0,748	0	0,119
	55LM	46,15%		12,5%	
	55LL	42,42%		57,14%	

* Valores de n dos grupos estudados: ICV - MM: 34, ICV - LM:26 e ICV - LL: 33; HS - MM: 0, HS - LM: 8, HS - LL: 7. p<0,05

** Valores de p significativos

Tabela 9: Presença de alterações gastrointestinais, linfonomegalia e linfoproliferações benignas em relação aos alelos dos genótipos da PON1 L55M nos grupos ICV e HS

		Pacientes ICV*	P (<0,05)	Pacientes HS*	P (<0,05)
Asma	55MM	35,29%		0	
	55LM	38,46%	1	25%	1
	55LL	36,36%		14,28%	
Rinite	55MM	58,82%		0	
	55LM	69,23%	0,498	62,5%	1
	55LL	54,54%		71,42%	
Autoimunidade	55MM	47,05%		0	
	55LM	11,53%	0,173	62,5%	0,569
	55LL	27,27%		71,42%	
Malignidades	55MM	38,23% **		0	
	55LM	11,53% **	0,018	0%	1
	55LL	12,12% **		0%	
Bronquiectasias	55MM	52,94%		0	
	55LM	50,00%	0,431	25%	0,608
	55LL	66,66%		42,85%	
DPOC	55MM	2,94%		0	
	55LM	3,84%	0,529	12,5%	0,282
	55LL	9,09%		42,85%	
Esplenomegalia	55MM	52,94%		0	
	55LM	38,46%	0,494	25%	0,467
	55LL	51,51%		0%	
Hepatomegalia	55MM	44,11% **		0	
	55LM	11,53% **	0,027	0%	1
	55LL	33,33% **		0%	
Hipertensão Portal	55MM	23,52%		0	
	55LM	11,53%	0,397	0%	-
	55LL	21,21%		0%	

* Valores de n dos grupos estudados: ICV - MM: 34, ICV - LM:26 e ICV - LL: 33; HS - MM: 0, HS - LM:8, HS - LL: 7. $p < 0,05$

** Valores de p significativos

De maneira semelhante, observou-se também associação entre o genótipo e o quadro clínico apresentado pelos pacientes no grupo ICV, sendo essa associação caracterizada pelo alto número de pacientes considerados graves ($p=0,029$) e presença de malignidades ($p=0,005$) com o genótipo 55MM. Por fim, foi possível observar maior incidência de óbitos neste mesmo grupo genotípico ($p=0,038$). Em relação à gravidade do grupo HS, foram observados apenas dois casos de óbitos (sendo um dos casos em uma paciente portadora do genótipo MM) e de sepse (tabela 10).

Tabela 10: Presença de parâmetros de gravidade em relação aos genótipos do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS

		Pacientes ICV	P (<0,05)	Pacientes HS	P (<0,05)
Gravidade	55MM	73,52% **	0,029	-	0,569
	55LM	42,30% **		62,5%	
	55LL	48,48% **		71,42%	
Óbitos	55MM	29,41% **	0,038	-	0,467
	55LM	0% **		25%	
	55LL	15,15% **		0%	
Malignidade	55MM	38,23% **	0,005	-	0,608
	55LM	11,53% **		0%	
	55LL	12,12% **		0%	
Sepse	55MM	38,23%	0,617	-	0,077
	55LM	7,69%		25%	
	55LL	21,21%		0%	

* Valores de n dos grupos estudados: ICV - MM: 34, ICV - LM:26 e ICV - LL: 33; HS - MM: 0, HS - LM: 8, HS - LL: 7. $p < 0,05$

** Valores de p significativos

Comparação entre parâmetros clínicos e laboratoriais e alelos do polimorfismo

PON1-L55M. Foram também realizadas as análises das relações entre os alelos da PON1-L55M e as diversas manifestações clínicas dos pacientes. Conforme demonstrado nas tabelas a seguir, foi possível observar a correlação entre o alelo 55L e menor incidência de malignidades nos pacientes ICV. De maneira semelhante, nos pacientes que

apresentavam ao menos uma cópia deste alelo, o número de pacientes graves foi menor entre aqueles que possuíam genótipo 55LL ou 55LM, assim como o número de pacientes que foram a óbito durante o estudo.

Conforme demonstrado na tabela 11, não foram observadas relações entre a presença do alelo 55L e a incidência de infecções de vias aéreas, pneumonias, sinusites, infecções oportunistas, sepse, infecções do trato urinário (ITUs) ou meningite e os alelos do polimorfismo L55M da PON1.

Tabela 11: Presença de Infecções em relação ao alelo 55L do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS

		Pacientes ICV*		P (<0,05)	Pacientes HS*		P (<0,05) **
		Presente	Ausente		Presente	Ausente	
Vias Aéreas	55L	96,61%	3,39%	0,531	73,33%	26,67%	-
	55M	100%	0,00%		-	-	
Pneumonia	55L	88,14%	11,86%	0,25	53,33%	46,67%	-
	55M	97,06%	02,94%		-	-	
Sinusites	55L	79,41%	20,59%	1	60,00%	40,00%	-
	55M	79,66%	20,34%		-	-	
Oportunistas	55L	38,98%	61,02%	0,385	13,33%	86,67%	-
	55M	50,00%	50,00%		-	-	
Sepse	55L	11,86%	88,14%	0,367	26,67%	73,33%	-
	55M	20,59%	79,41%		-	-	
ITUs	55L	8,47%	91,53%	0,062	13,37%	86,67%	-
	55M	23,53%	76,47%		-	-	
Meningite	55L	6,78%	93,22%	1	21,43%	78,57%	-
	55M	5,88%	94,12%		-	-	

* Valores de n dos grupos estudados: ICV - M: 34, ICV - L: 59; HS - MM: 0, HS - LM: 8, HS - LL: 7. $p < 0,05$

** Em relação aos valores de p no grupo HS, por não terem sido encontrados pacientes 55MM, não foi possível calcular esse valor.

Na tabela 12 encontram-se demonstradas as incidências de manifestações gastrointestinais nos pacientes estudados. Não foi possível observar relação entre a presença do alelo PON1 – 55L e a incidência de manifestações intestinais, esofagite, gastrite, *H.pylori*, linfoproliferações e linfonodomegalia.

Tabela 12: Presença de alterações gastrointestinais, linfonodomegalia e linfoproliferações benígnas em relação aos alelos do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS

		Pacientes ICV*		P (<0,05)	Pacientes HS *		P (<0,05)**
		Presente	Ausente		Presente	Ausente	
Gastrointestinais	55L	81,03	18,97	0,531	60,00%	40,00%	-
	55M	82,35	17,65%		-	-	
Intestinais	55L	88,14%	11,86%	0,25	60,00%	40,00%	-
	55M	97,06%	2,94%		-	-	
Esofagite	55L	79,41%	20,59%	1	46,67%	53,33%	-
	55M	79,66%	20,34%		-	-	
Gastrite	55L	38,98%	61,02%	0,385	53,33%	46,67%	-
	55M	50,00%	50,00%		-	-	
<i>H. pylori</i>	55L	25,42%	17,65%	0,367	13,33%	86,67%	-
	55M	74,58%	82,35%		-	-	
Linfonodomegalia	55L	33,90%	66,10%	0,062	46,67%	53,33%	-
	55M	41,18%	58,82%		-	-	
Linfoproliferação	55L	36,36%	63,64%	1	33,33%	66,67%	-
	55M	44,07%	55,93%		-	-	

* Valores de n dos grupos estudados: ICV - M: 34, ICV - L: 59; HS - MM: 0, HS - LM: 8, HS - LL: 7. $p < 0,05$

** Em relação aos valores de p no grupo HS, por não terem sido encontrados pacientes 55MM, não foi possível calcular esse valor.

A tabela 13 demonstra a relação entre a incidência de diversas comorbidades comumente associadas aos pacientes e a presença do alelo PON1 – 55L. Dentre as comorbidades estudadas, não foi possível observar relação entre o alelo e a presença

de asma, rinite, doenças autoimunes, bronquiectasias, DPOC, esplenomegalia, hepatomegalia e hipertensão portal. Por outro lado, foi possível observar que houve menor incidência de malignidades nos pacientes que possuíam ao menos uma cópia do alelo 55L.

Tabela 13: Presença de parâmetros de gravidade em relação aos alelos do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS

		Pacientes ICV *		P (<0,05)	Pacientes HS *		P (<0,05) **
		Presente	Ausente		Presente	Ausente	
Asma	55L	37,29%	62,71%	1	20%	80,00%	-
	55M	35,29%	64,71%		-	-	
Rinite	55L	61,02%	38,98%	1	66,67%	33,33%	-
	55M	58,82%	41,18%		-	-	
Autoimunidade	55L	50,00%	50,00%	0,073	73,33%	26,67%	-
	55M	29,31%	70,69%		-	-	
Malignidades	55L	11,86%	88,14%*	0,004	0,00%	100%	-
	55M	38,24%	61,76%*		-	-	
Bronquiectasia	55L	60,34%	39,66%	0,519	33,33%	66,67%	-
	55M	52,94%	47,06%		-	-	
DPOC	55L	7,02%	92,98%	0,647	26,67%	73,33%	-
	55M	2,94%	97,06%		-	-	
Esplenomegalia	55L	45,76%	54,24%	0,526	13,33%	86,67%	-
	55M	52,94%	47,06%		-	-	
Hepatomegalia	55L	24,14%	75,86%	0,063	0,00%	100%	-
	55M	44,2%	55,88%		-	-	
Hipertensão Portal	55L	16,95%	83,05%	0,296	0,00%	100%	-
	55M	26,47%	73,53%		-	-	

* Valores de n dos grupos estudados: ICV - M: 34, ICV - L: 59; HS - MM: 0, HS - LM: 8, HS - LL: 7. $p < 0,05$

** Em relação aos valores de p no grupo HS, por não terem sido encontrados pacientes 55MM, não foi possível calcular esse valor.

Na tabela 14 estão demonstradas as relações entre o alelo 55L e os critérios de gravidade adotados para os pacientes. Foi possível observar que houve associação entre

o menor número de pacientes com o alelo 55L e quadros mais graves de ICV. De maneira semelhante, houve também menor incidência de óbitos nos pacientes possuidores desse alelo. Em relação aos pacientes secundários, não houve diferença tanto na gravidade quanto no número de óbitos em relação aos alelos 55L e 55M.

Tabela 14: Presença de parâmetros de gravidade em relação aos alelos do polimorfismo PON1 L55M nos grupos ICV e HS

		Pacientes ICV *		P (<0,005)	Pacientes HS *		P (<0,05) **
		Presente	Ausente		Presente	Ausente	
Gravidade	55L	45,76%	54,24%	0,01	73,33	26,67	-
	55M	73,53%	26,47%		-	-	
Óbitos	55L	8,47%	91,53%	0,017	13,33%	86,67%	-
	55M	29,41%	70,59%		-	-	

* Valores de n dos grupos estudados: ICV - M: 34, ICV - L: 59; HS - MM: 0, HS - LM: 8, HS - LL: 7. $p < 0,05$

** Em relação aos valores de p no grupo HS, por não terem sido encontrados pacientes 55MM, não foi possível calcular esse valor.

4.6 Sobrevida

As análises das curvas de sobrevida encontram-se demonstradas nas tabelas 15, 16 e 17. Em relação à idade atual (tabela 15) e o tempo de doença (tabela 17) dos pacientes, as análises apontam menor sobrevida em indivíduos que apresentaram linfonodomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia e sepse. De maneira semelhante, a avaliação em relação ao retardo diagnóstico (tabela 17) aponta para essa mesma direção, embora também aponte menor sobrevida em pacientes que apresentaram histórico de neoplasias ao longo da evolução clínica ($p=0,045$).

Ao avaliar-se as curvas de sobrevida em relação ao genótipo, é possível observar maior sobrevida nos pacientes que apresentavam uma cópia do alelo L da PON1 – L55M

e que essa sobrevida esteve associada ao tempo de doença ($p=0,049$) e também ao retardo diagnóstico ($p=0,02$).

Os demais fatores analisados não apresentaram influência na sobrevida dos pacientes.

Tabela 15: Sobrevida em relação à Idade atual dos pacientes ICV

Fator	Risco Relativo	Intervalo de confiança (95%)		p <0,05	p.logrank
Alelo 55L	0,5	0,17	1,48	0,21	0,2
Alelo 55M	0,49	0,16	1,55	0,226	0,21
Linfonodomegalia	6,36	1,79	22,61	0,004	<0,001
Neoplasias	1,31	0,45	3,8	0,614	0,6
Esplenomegalia	6,13	1,38	27,25	0,017	0,01
Hepatomegalia	7,1	2	25,24	0,002	<0,001
Sepse	6,25	1,99	19,65	0,002	<0,001
Gravidade	3,6845x10 ⁸	0	∞	0,998	0,01

Tabela 16: Sobrevida relação ao retardo diagnóstico (Δt) nos pacientes ICV

Fator	Risco Relativo	Intervalo de confiança (95%)		p<0,05	p.logrank
Alelo 55L	0,28	0,09	0,81	0,02	0,01
Alelo 55M	0,86	0,29	2,55	0,784	0,78
Linfonodomegalia	7,28	2,05	25,82	0,002	<0,001
Neoplasias	2,83	1,02	7,82	0,045	0,04
Esplenomegalia	7,38	1,66	32,72	0,009	<0,001
Hepatomegalia	8,81	2,48	31,25	0,001	<0,001
Sepse	4,76	1,59	14,26	0,005	<0,001
Gravidade	4,9x10 ⁸	0	∞	0,997	<0,001

Tabela 17: Sobrevida em relação ao tempo de doença nos pacientes ICV

Fator	Risco Relativo	Intervalo de confiança (95%)		p<0,05	p.logrank
Alelo 55L	0,33	0,11	0,99	0,049	0,04
Alelo 55M	0,75	0,25	2,28	0,617	0,62
Linfonodomegalia	6,76	1,9	24	0,003	<0,001
Esplenomegalia	6,78	1,53	30,1	0,012	<0,001
Hepatomegalia	7,51	2,11	26,79	0,002	<0,001
Sepse	5,28	1,77	15,75	0,003	<0,001
Gravidade	4,8x10 ⁸	0	∞	0,131	0,12

4.7 Fatores preditivos

Através do cálculo da razão de possibilidades (*Odds ratios* - *OR*) foi possível observar que a presença do genótipo PON1 – 55MM foi fator preditivo em relação à gravidade da doença em pacientes com ICV (tabela 18). Nestes, a presença de linfonodomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia e hipertensão portal também se enquadram como preditivos de um quadro mais grave da doença. De maneira semelhante, a presença de manifestações gastrointestinais, sepse e de neoplasias também foram indicativos de pior prognóstico nos pacientes estudados.

Em análise dos fatores preditivos em relação ao óbito (tabela 19), foi possível observar que a presença de uma cópia do alelo 55L conferia proteção ao indivíduo, sendo o risco desse indivíduo ir à óbito cinco vezes menor do que o risco encontrado nos pacientes sem o alelo L. Foi também observado que a presença de atelectasias, DPOC, linfonodomegalias, malignidades, esplenomegalia, hepatomegalia e sepse podem ser considerados fatores preditivos de óbito.

Tabela 18: Odds ratio (OR) para complicações associadas à gravidade da ICV

Fator	OR	Intervalo de confiança (95%)		p <0,05
Alelo 55L	0,3	0,12	0,76	0,011
Alelo 55M	1,59	0,68	3,75	0,286
Genótipo 55MM	2,95	1,06	8,21	0,038
Linfonodomegalia	2,49	1,05	5,89	0,037
Esplenomegalia	4,79	2,05	11,2	<0,001
Hepatomegalia	6,76	2,32	19,67	<0,001
Hipertensão Portal	11,05	2,41	50,55	0,002
Manifestações Gástricas	3,57	1,04	12,3	0,044
Sepse	7,87	1,69	36,59	0,008
Neoplasia	24,43	3,13	190,96	0,002

Tabela 19: Odds ratio (OR) associado aos fatores predisponentes para óbito nos pacientes ICV

Fator	OR	Intervalo de confiança (95%)		p <0,05
Alelo 55L	0,6	0,22	0,72	0,012
Alelo 55M	1,12	0,35	3,6	0,849
Atelectasia	3,75	1,09	12,95	0,036
DPOC	6,75	1,22	37,38	0,029
Linfonodomegalia	10,33	2,68	39,86	0,001
Neoplasia	4,5	1,4	14,41	0,011
Esplenomegalia	8,61	1,83	40,5	0,006
Hepatomegalia	13,9	3,55	54,39	<0,001
Sepse	4,54	1,35	15,26	0,014

5.Discussão

5. Discussão

Neste estudo os pacientes com imunodeficiência comum variável (ICV) e hipogamaglobulinemia secundária (HS) foram genotipados para os polimorfismos L55M da PON1 e CYP2E1*5 do CYP450. Foi realizada a determinação da atividade arilesterase de PON1 e feita a comparação destes dados com o quadro clínico dos grupos estudados, perfil de colesterol e populações linfocitárias CD4+ e CD8+. Finalmente, essas comparações foram relacionadas à gravidade da doença e a presença de fatores que possam alterar a sobrevida ou serem preditivos do prognóstico dos pacientes.

As infecções bacterianas recorrentes ou crônicas incidem na maioria dos pacientes, embora também sejam frequentes as infecções virais e oportunistas, as doenças autoimunes/inflamatórias, além de neoplasias (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999, Kokron *et al.*, 2004, Quinti *et al.*, 2007). Devido a essa ampla heterogeneidade clínica, o reconhecimento e o diagnóstico da ICV pode ser difícil, resultando em um retardo do diagnóstico de aproximadamente 6 a 10 anos (Cunningham-Rundles, 2012).

No presente estudo, o período médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico de ICV foi de 13,38, estando portanto, acima da média relatada na literatura atual (Cunningham-Rundles, 2012). Considerando-se a longa evolução de tempo de doença em nossa casuística, de aproximadamente de 26 anos, é possível que esse retardo seja devido ao fato de que muitos dos casos analisados tenham tido início em uma época em que havia grande desconhecimento da ICV por médicos generalistas (Cunningham-Rundles, 2012). Este retardo diagnóstico pode ter sido agravado pelo falso conceito de que imunodeficiências primárias teriam apresentação inicial quase que exclusivamente em crianças.

Neste estudo, a média de idade diagnóstica observada foi de 30,2 anos e média de início dos sintomas de 16,8 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, 2012).

A análise desta casuística demonstrou que, em todos os grupos estudados, a maior parcela dos indivíduos referiu-se como branca. Este dado 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). 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 ((IBGE)).

Durante a análise dos parâmetros laboratoriais foi possível observar que os pacientes do grupo ICV apresentaram valores de HDL próximos aos valores mínimos estipulados, embora ainda dentro da normalidade. Contudo, durante a análise caso a caso, foi detectado que aproximadamente 30% das mulheres e 66% dos pacientes do sexo masculino apresentaram valores de colesterol abaixo do recomendado (40 mg/dL) para risco cardíaco. A relevância deste dado, ao lado do perfil lipídico como um todo, se entrelaça com o estudo das paraoxonases, uma vez que estas enzimas, conforme será descrito abaixo, dependem do HDL (e de seus constituintes) tanto para circular no organismo quanto para desempenhar suas funções (Aukrust *et al.*, 1994, Gugliucci e Menini, 2015).

Outro papel importante do HDL envolve o metabolismo oxidativo e a maneira como seus constituintes atuam na redução do *stress* provocado pelo aumento da concentração de oxidantes. Esse *stress* oxidativo acarreta modificações provocadas pelo desequilíbrio do estado redox, e caso permaneçam ativas, podem provocar alterações em diversos processos fisiológicos, inibindo a resposta imunológica ou desencadeando respostas persistentes e provocando modificações moleculares ou estruturais em células e tecidos, podendo evoluir até para um quadro neoplásico (Rahal *et al.*, 2014). Nesse cenário, o estudo de mecanismos capazes de controlar o *stress* oxidativo adquirem grande importância científica.

Diversos estudos apontam para a importância das enzimas PON1, PON2 e PON3 no metabolismo oxidativo (Aviram e Vaya, 2013, Rajkovic *et al.*, 2011, Zayed *et al.*, 2015). Seu papel biológico é a prevenção da doença aterosclerótica, prevenindo a oxidação de moléculas de LDL e HDL e hidrolisando essas moléculas quando oxidadas (Mackness *et al.*, 1993). São capazes, ainda, de remover o colesterol oxidado das células espumosas (do inglês *foam cells*) presentes na placa aterosclerótica (Aviram e Rosenblat, 2004) e, ao menos em modelos experimentais, conseguem também impedir que monócitos se diferenciem em macrófagos, tendo assim importante papel não só na oxidação mas também na resposta imunológica (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. Esta enzima possui atividade paraoxonase, arilesterase e lactonase. Em condições fisiológicas, a

PON1 está correlacionada à proteção contra doenças cardiovasculares (Camps *et al.*, 2009)).

No presente estudo analisamos a frequência dos polimorfismos da L55M da PON-1 e de sua atividade arilesterase em pacientes com ICV e HS em comparação a um grupo de controles saudáveis. A frequência alélica encontrada no grupo controle para o polimorfismo PON1-L55M foi semelhante àquela anteriormente descrita por Ferreira *et al.*, em indivíduos doadores de sangue em São Paulo (Ferreira, 2007). Entre os pacientes estudados, os pacientes com HS apresentaram tanto maior frequência do genótipo 55LM quanto do alelo 55L em relação aos pacientes com ICV. Contudo, não existem diferenças entre os grupos de pacientes e o grupo controle estudado.

Também foram observadas pequenas diferenças quanto à atividade arilesterase da PON1 entre os grupos estudados, sendo o grupo ICV o que apresentou os menores valores. O grupo de pacientes ICV com genótipo 55MM foi também, dentre todos aqueles estudados, o que apresentou os menores valores de atividade enzimática, resultados estes já esperados, conforme dados da literatura (Precourt *et al.*, 2011).

Neste contexto, já está bem estabelecido que a PON1 é altamente polimórfica, sendo um dos mais importantes o polimorfismo da posição 55, em que ocorre a troca de uma leucina por uma metionina (PON1 - L55M). A importância deste polimorfismo reside na sua capacidade de modular a estabilidade da enzima e sua função hidrolítica, sendo que o alelo 55L confere à enzima maior atividade enzimática e também maior estabilidade (Precourt *et al.*, 2011).

Apesar do seu papel biológico na prevenção da aterosclerose ter sido bem explicado (Devarajan *et al.*, 2011), estas enzimas também possuem importante atuação sobre o *stress* oxidativo. Infecções agudas, por exemplo, provocam a redução de quase 90% da expressão hepática do mRNA de PON1 (Reddy *et al.*, 2001) e inflamações persistentes também provocam alterações estruturais nas moléculas de HDL, principal carreadora da enzima (Soran *et al.*, 2015). 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 e infecções (Camps *et al.*, 2009).

Neste estudo foi observado que aproximadamente 96% dos indivíduos com ICV analisados possuíam histórico de infecções recorrentes, principalmente de vias aéreas superiores, o que está de acordo com os dados de literatura (Resnick *et al.*, 2012). No entanto, ao contrário do esperado, não foram observadas associações entre as diferentes infecções e os genótipos do polimorfismo L55M da PON1, embora pacientes com o genótipo MM tenham apresentado menor atividade arilesterase.

Também não foram observadas alterações das populações linfocitárias CD4+ e CD8+ assim como também aumento de infecções oportunistas em pacientes com o genótipo MM da PON1. Estes dados não estão de acordo com aqueles 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 da doença, assim como desencadear determinadas condições como infecções oportunistas ou neoplasias (Aukrust *et al.*, 1997).

Interessantemente, durante a análise dos dados clínicos dos pacientes, foi observado que os portadores do genótipo 55MM foram aqueles que apresentaram de modo significativo maior frequência de algumas comorbidades como malignidades ($p=0,018$) e hepatomegalia ($p=0,027$) sugerindo, possivelmente, uma relação entre a presença deste genótipo e o prognóstico da doença. Também foi observada associação entre o genótipo LM da PON1 e menor incidência de linfonomegalia ($p=0,021$).

Por outro lado, neste estudo, não foram observadas associações estatísticas entre os vários genótipos da PON-1 L55M e outras comorbidades como atopia, bronquiectasias, doença pulmonar obstrutiva crônica, doenças autoimunes, esplenomegalia e hipertensão portal.

Em conjunto, nossos dados estão de acordo com dados de literatura segundo os quais, sob o ponto de vista clínico, a ICV pode ser dividida em dois fenótipos: pacientes que apresentam apenas infecções e aqueles que, além destas, também manifestam outras comorbidades, sendo os indivíduos com múltiplas comorbidades os de pior prognóstico (Resnick *et al.*, 2012).

A análise de nossos pacientes corrobora tais dados, sendo possível observar que, entre os indivíduos estudados, aqueles com o genótipo MM foram os que apresentaram mais comorbidades como neoplasias e hepatomegalia e que apresentaram também pior prognóstico com maior número de óbitos. Ainda dentre as manifestações típicas da ICV, a presença de linfonomegalia mostrou-se importante na presentecasuística; nestes pacientes foi observada menor prevalência de linfonomegalias mediastinais e abdominais nos pacientes com genótipo 55LM (Figura 1).

Figura 1: Incidência de comorbidades associadas em pacientes com ICV e HS

Alguns estudos demonstraram a relevância dos polimorfismos L55M da PON-1 em doenças como câncer de mama, de rim e linfomas (De Roos *et al.*, 2006, Hussein *et al.*, 2011, Mackness e Mackness, 2015, Saadat, 2012). Em 2006, De Roos e colaboradores já haviam demonstrado maior incidência de linfonodomegalia em relação ao genótipo 55MM de PON1 em uma população geral (De Roos *et al.*, 2006). No referido estudo foram analisados diversos polimorfismos de enzimas atuantes sobre o *stress* oxidativo, tendo a relação com o L55M despontado como possível fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias na população estudada. Em relação à ICV, contudo, não existe na literatura uma avaliação clínica similar em relação ao polimorfismo PON1-L55M. Todavia, segundo a literatura, em pacientes com ICV, o risco para o desenvolvimento de neoplasias, especialmente linfomas e carcinomas, pode variar de 300 a 500 vezes (a depender do estudo) (Cunningham-Rundles, 2009, Malphettes *et al.*, 2009).

Em nossa casuística foram observados, principalmente, nos pacientes 55MM, câncer de pele, de mama, neoplasias gástricas e três casos de linfoma não-Hodgkin. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura nos quais está relatada maior incidência de malignidades nos pacientes ICV portadores do genótipo 55MM como câncer de mama rim e linfomas (Mackness e Mackness, 2015). Devido a maior frequência do alelo 55M e do genótipo 55MM no grupo ICV, em relação à população normal, pode-se inferir a existência de uma maior susceptibilidade destes indivíduos a neoplasias.

Outra variável importante detectada foi a presença mais frequente de hepatomegalia em pacientes com genótipo 55MM. Em relação às hepatopatias, cabe lembrar que o principal local da síntese das paroxonases é o fígado, o que pode resultar em menor produção enzimática e pior prognóstico dos pacientes com o genótipo 55MM (Precourt *et al.*, 2011).

Não foram observadas, nos pacientes com hipogamaglobulinemia secundária, diferenças significativas entre a presença de infecções, linfonodomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia ou outras comorbidades em relação aos diferentes genótipos de PON1 ou de CYP2E1*5.

Neste estudo, os pacientes com genótipo 55MM se enquadraram no grupo de pacientes graves com maior frequência. Definimos como manifestações graves neste grupo, de maneira arbitrária, aquelas que têm sido consideradas mais críticas nos pacientes com ICV, como o histórico de neoplasias, episódios de sepse excluindo-se a fase terminal, internações em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), linfonodomegalias hepatoesplenomegalia e, naturalmente, evolução para óbito. Aproximadamente 73%

dos pacientes 55MM apresentaram pelo menos uma das manifestações graves, contra 42% dos pacientes LM e 48% dos pacientes LL. Um maior número de pacientes desse grupo apresentou histórico de neoplasias (tratadas ou em curso) assim como evoluiu para óbito (Tabela 14).

Contudo, a análise da gravidade da doença pelo polimorfismo L55M deve ser feita de maneira criteriosa. Nas curvas de sobrevida realizadas neste estudo, embora seja visível a diferença entre os grupos, a modelagem através do genótipo não pôde ser considerada a melhor ferramenta de análise.

Conforme dito anteriormente, estudos recentes, tanto da literatura quanto do nosso grupo, apontam que as relações de gravidade não se dão pelo fato do indivíduo em questão possuir o genótipo 55MM, mas sim pela falta do alelo 55L, que pode desempenhar papel protetor nos diversos processos fisiológicos que a PON1 está envolvida (De Roos *et al.*, 2006, Mackness e Mackness, 2015). Seguindo esta linha de pensamento, todas as análises de correlação deste estudo foram refeitas, bem como as curvas de sobrevida, tendo como foco a diferença entre os alelos desse polimorfismo.

Na avaliação da linfonodomegalia e hepatomegalia, resultados anteriores de nosso grupo sugeriram que o alelo 55L possa desempenhar papel protetor na ICV (Sini, 2013). Apesar dos pacientes 55LM apresentarem menor número de comorbidades, o mesmo não se repetiu em relação aos indivíduos com genótipo 55LL, fato que deve ser mais cuidadosamente avaliado no futuro (Figuras 2 e 3).

Figura 2: Incidência de linfonodomegalia em relação aos genótipos de PON1 em pacientes com ICDV

Figura 3: Incidência de hepatomegalia em relação aos genótipos de PON1 em pacientes com ICDV

Partindo desse ponto foi possível observar, conforme previsto pela literatura, que a presença do alelo 55L possa desempenhar papel protetor nas principais manifestações associadas à gravidade da ICV. Uma hipótese é que estes indivíduos estejam sob constante ativação imune e consequente alta produção de metabólitos oxidantes, o que confere maior importância ao papel protetor da PON, possivelmente por esta combater as modificações causadas pelo aumento do *stress* oxidativo.

Pacientes que apresentaram ao menos uma cópia deste alelo (tanto genótipo 55LL como 55LM) possuíam níveis de atividade de PON1 mais próximos da normalidade, além de melhor prognóstico e menor incidência de manifestações consideradas graves. É possível que em pacientes com o genótipo 55MM, que apresentam uma atividade enzimática menos capacitada a desempenhar seu papel anti-oxidativo protetor, exista maior suscetibilidade a tais ativações imunes levando a maior gravidade da doença se os fatores desencadeantes não forem controlados.

Na população normal é previsto que a presença do alelo 55L atue de maneira protetora, por conferir maior estabilidade e atividade à enzima, facilitando assim que a PON desempenhe seu papel no metabolismo oxidativo (Abello *et al.*, 2014). De forma pioneira pudemos observar a associação entre a PON e a ICV, demonstrando o impacto que as comorbidades e a ausência do alelo 55L podem provocar na sobrevida dos pacientes.

De maneira geral, a idade atual dos pacientes não repercutiu na sobrevida nem nas principais manifestações clínicas analisadas neste estudo. Muito embora seja possível observar diferenças entre as curvas, as mesmas não representam bons modelos de análise, conforme observado na Tabela 15. Tais circunstâncias podem ser facilmente

observadas em uma análise mais individual dos casos estudados, como a presença de muitos pacientes de idade avançada em nossa casuística.

Contudo, ao se avaliar a sobrevida em relação ao retardo diagnóstico e ao tempo de doença foi possível observar que esses dois fatores podem ter influência no quadro clínico da doença. De início, pode-se observar que a presença do alelo 55L teve impacto na sobrevida dos pacientes com genótipos LM ou LL, com esses pacientes apresentando os menores valores, corroborando a tese de que esse alelo possa desempenhar papel protetor.

O retardo diagnóstico foi definido como o intervalo entre o aparecimento dos primeiros sintomas da doença, seu diagnóstico e início do tratamento específico com a reposição mensal de imunoglobulina intravenosa. Nesta casuística, a média de retardo diagnóstico foi de cerca de 13 anos. É altamente provável que esse intervalo tenha tido impacto negativo sobre o quadro clínico do paciente, uma vez que pode se traduzir em um período em que o paciente esteve distante da terapia específica para a doença bem como para suas comorbidades (Salzer *et al.*, 2012).

Em nossa casuística, o retardo diagnóstico também demonstrou ter influenciado a sobrevida dos pacientes. Valores de retardo diagnóstico mais elevados apresentaram correlação com a presença de linfonodomegalias, hepatomegalia e esplenomegalia. Esses intervalos de retardo diagnóstico mais longos também foram associados à presença das manifestações mais graves observadas, como sepse e neoplasias.

Figura 4: Curva de sobrevida em relação ao Δt dos pacientes com ICV em relação aos alelos L e M do polimorfismo PON1-L55M

De maneira semelhante, o tempo de doença demonstrou afetar a sobrevida dos pacientes. Novamente, o alelo 55L demonstrou papel protetor, com diminuição do risco relativo médio em 67%. O tempo de doença também mostrou ser capaz de influenciar a expressão de outras manifestações importantes como linfonodomegalias, hepato e esplenomegalias. É importante destacar que, independente do tempo total da ICV, não foi observada correlação entre essa variável e o desenvolvimento de doenças neoplásicas. Este dado sugere que estas manifestações possam estar associadas a outros fatores como agentes infecciosos principalmente virais ou exposição a fatores tóxicos ambientais.

Figura 5: Curva de sobrevida em relação ao tempo de doença dos pacientes com ICV em relação aos alelos L e M do polimorfismo PON1-L55M

A análise dos dados destes grupos permitiu a avaliação de alguns fatores preditivos tanto da gravidade quanto da probabilidade de óbito. Manifestações como linfonomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, hipertensão portal, manifestações gástricas, sepse e neoplasias foram preditivas da gravidade da ICV, conforme demonstrado pela Tabela 18. Os fatores de risco observados para óbitos foram a presença de atelectasia, DPOC, linfonomegalias, malignidades, hepatomegalia, esplenomegalia e sepse (Tabela 19).

A presença do alelo 55L demonstrou estatisticamente ser significativa como preditora de doença menos grave. O risco dos pacientes 55L de apresentar manifestações graves foi de apenas 33% em relação ao risco observado nos pacientes 55MM e o risco de evolução para óbito de apenas 22% em relação a este valor

Nossa casuística considerou também pacientes com hipogamaglobulinemia secundária. Entre 16 casos estudados, nove pacientes faziam ou fizeram uso de algum medicamento que reconhecidamente pode atuar no sistema imune sendo: sulfassalazina (2), anticonvulsivantes (4), inibidores da ECA (1), corticosteroides (4), rituximab 1; três pacientes apresentavam doença possivelmente secundária a linfomas e um era receptor de transplante de medula óssea.

Nesses pacientes, a frequência genotípica do polimorfismo PON1-L55M foi diferente dos demais grupos, embora a frequência alélica tenha sido semelhante àquela encontrada nos controles saudáveis. Nenhum dos pacientes estudados apresentou o genótipo 55MM, sendo o genótipo predominante o 55LM, seguindo o esperado pela literatura (Ferreira, 2007).

Diferente também dos pacientes com ICV, não houve diferença entre os valores de atividade arilesterase observados nesse grupo e os valores observados nos demais grupos genotípicos. Do mesmo modo, não foi observada diferença entre as manifestações clínicas e a distribuição genotípica e alélica da L55M da PON1.

As enzimas da família do citocromo p450, do mesmo modo que as paraoxonases, têm importante participação nos processos metabólicos, constituindo o principal grupo de enzimas responsáveis pelo metabolismo de substâncias tóxicas tanto exógenas quanto endógenas (Coura, 2007), sendo essa ação detoxificante essencial para a manutenção da saúde do indivíduo. Das quase 60 subfamílias existentes de CYP450, uma das de maior destaque é a subfamília CYP2E1.

Estudos recentes apontam para a importância do estudo dessa subfamília principalmente em casos de indivíduos expostos a compostos xenobióticos e solventes,

além da associação da CYP2E1 com diversas condições patológicas, como alterações do sistema imune (Haro-Garcia *et al.*, 2012), do aparelho (Hannigan e Bowen, 2010), doenças do aparelho respiratório (Al-Batanony *et al.*, 2012) e por alterações neurotóxicas causadas pela exposição a solventes como tolueno (Shih *et al.*, 2011), estando alguns desses estudos encontrado relações entre efeitos adversos causados pela exposição a tolueno mesmo em níveis reduzidos, em âmbito profissional (Jimenez-Garza *et al.*, 2015).

As bases moleculares para esses efeitos adversos ainda não são completamente compreendidas. Estudos de células em cultura implicaram a participação do *stress* oxidativo, de vias inflamatórias e também da indução de apoptose na toxicidade induzida por este solvente (Haro-Garcia *et al.*, 2012, Sarma *et al.*, 2011). Não obstante, a enzima CYP2E1 parece estar relacionada também à ativação de muitos compostos pró-carcinogênicos, ativando, particularmente, as N-nitrosaminas presentes nos cigarros e também diversos carcinógenos tanto endógenos quanto de origem industrial (Agundez, 2004, Naselli *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2002). Possui também a capacidade de atuar sobre o *stress* oxidativo, provocando a redução de moléculas de oxigênio em ROS, podendo provocar desnaturação proteica, inativação de certas enzimas ou mutações no DNA (Lu e Cederbaum, 2008, Lu *et al.*, 2008).

Um dos polimorfismos de destaque presente na CYP2E1 é o Rsa I (-1053C/T, RS 2031920) com potencial para alterar a atividade da enzima e ter relação com a carcinogênese influenciada pelas N-nitrosaminas, além de ser um dos polimorfismos mais estudados e também ter associação com diversos tipos comuns de câncer (Saeed

et al., 2013). Diversas meta-análises têm associado esse polimorfismo ao desenvolvimento de câncer gástrico, colorretal, bexiga, entre outros (He e Feng, 2015).

Tendo em vista a importância da enzima CYP2E1 no metabolismo de compostos xenobióticos e de pró-carcinogênicos endógenos e exógenos, o estudo dessa família de enzimas torna-se relevante não só em pacientes mais susceptíveis a modificações oxidativas e ao desenvolvimento de neoplasias, como os pacientes ICV, como aqueles que desenvolveram um quadro clínico semelhante ao desses pacientes, sem que possam ser classificados como imunodeficientes primários.

Em nossa casuística não foram observadas diferenças significativas nas frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo CYP2E1*5 em nenhuma das três populações estudadas. Os dados encontrados em nosso estudo também seguem o mesmo padrão encontrado na literatura para a população brasileira (Guaoua *et al.*, 2014), com predominância do alelo C1 em relação ao C2. Não obstante, nossos dados também seguem o mesmo padrão encontrado em outras populações de maioria caucasianas, como alemães, sérvios, franceses e ingleses.

A avaliação do quadro clínico dos pacientes em relação ao polimorfismo CYP2E1*5 não mostrou diferença entre nenhum dos grupos estudados. Não foi possível observar, tanto nos pacientes com ICV quanto nos pacientes com HS, correlações significativas entre o genótipo desses pacientes e nenhuma das variáveis clínicas selecionadas para este estudo.

Cabe ressaltar aqui, contudo, as limitações que o estudo das enzimas CYP450. Apesar da importância do polimorfismo -1053C/T na função enzimática da CYP2E1, seu papel metabólico parece estar muito além da avaliação genotípica.

Muitos estudos apontam para a relevância dos fenômenos epigenéticos associados ao próprio polimorfismo. Em um estudo de 2015, Jimenéz-Garza e colaboradores levantam a possibilidade de que processos de metilação *de novo* possam acelerar processos deletérios associados à CYP2E1. Nesse estudo, os autores sugerem que a exposição a tolueno, tanto em profissionais diretamente expostos à esse composto como em pessoas com contato mínimo, porém crônico, pode desencadear o aumento do *stress* oxidativo (Jimenez-Garza *et al.*, 2015). Além disso, o aumento dos níveis de tolueno pode provocar a redução da produção de IL-6, afetando a resposta linfocitária no combate a infecções. Outro ponto importante é que os níveis de tolueno também regulam a expressão de mRNA de CYP2E1 e, conseqüentemente, podem regular de maneira positiva a biotransformação de outros compostos xenobióticos em metabólitos tóxicos (Guengerich *et al.*, 1991).

Assim, a avaliação genética do polimorfismo CYP2E1*5, embora importante, deve ser considerada levando-se em conta também os fenômenos epigenéticos aos quais esses pacientes estão sujeitos. Nossa casuística demonstrou que, dos 101 pacientes com ICV estudados, 32 apresentaram histórico profissional de exposição a solventes (como benzeno, tolueno ou xileno), ou a agrotóxicos. É possível que existam relações entre a doença desses pacientes e os compostos aos quais foram expostos. Contudo, é difícil quantificar essa relação, principalmente pelos obstáculos em determinar os níveis de exposição aos quais esses pacientes estiveram sujeitos.

6.Conclusões

6. Conclusões

1) Em pacientes com ICV, o alelo PON1-55L esteve associado a papel protetor contra comorbidades comumente associadas a quadros mais graves da doença, como hepatomegalia, esplenomegalia, neoplasias e sepse.

2) Os pacientes portadores do alelo 55L da PON1 também apresentaram sobrevida cerca de três vezes mais elevada quando comparados aos indivíduos não portadores desse alelo.

3) Em pacientes com ICV, o genótipo PON1-55MM esteve associado ao maior risco de complicações graves mas não a maior risco de óbito.

4) O pior prognóstico observado em pacientes portadores do genótipo 55MM não esteve associado, aparentemente, a alguma característica deletéria do alelo 55M mas, possivelmente relacionada ao caráter protetor do alelo 55L.

5) Foi observada maior frequência do genótipo PON1-55LM em pacientes HS quando comparados aos pacientes com ICV. Foi possível observar, ainda em pacientes com HS, maior frequência do alelo 55L.

6) Não houve diferença na atividade arilesterase entre os grupos de pacientes, não apresentando correlação com parâmetros laboratoriais. Contudo, pacientes com ICV possuem valores de atividade mais baixos em comparação à população saudável, bem como os menores níveis de atividade nos pacientes com genótipo 55MM.

Este constitui o primeiro relato do papel protetor desempenhado pelo alelo PON1-55L em pacientes com ICV e sua associação ao melhor prognóstico e evolução da

doença. Foi possível observar, em pacientes com HS, maior frequência do alelo 55L. Entre os grupos de pacientes e o grupo controle não houveram diferenças.

7) Não houve correlação entre os valores de atividade arilesterase em relação aos valores de colesterol e linfócitos CD4 + e CD8+.

8) Não foram observadas associações entre o polimorfismo CYP2E1*5 do citocromo p450 e os principais parâmetros clínicos avaliados neste estudo.

9) Mais estudos são necessários para compreender o papel desempenhado pelos fatores ambientais, e também pelos medicamentos utilizados por esses pacientes, no desenvolvimento de complicações da ICV ou de quadros de hipogamaglobulinemia secundária.

7.Referências

1. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016;4(1):38-59.
2. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol*. 1999;92(1):34-48.
3. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. 2012;119(7):1650-7.
4. Salzer U, Warnatz K, Peter HH. Common variable immunodeficiency: an update. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):223.
5. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *Br J Haematol*. 2009;145(6):709-27.
6. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol*. 2014;5:162.
7. Yong PF, Tarzi M, Chua I, Grimbacher B, Chee R. Common variable immunodeficiency: an update on etiology and management. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2008;28(2):367-86, ix-x.
8. Braun J, Berberian L, King L, Sanz I, Govan HL, 3rd. Restricted use of fetal VH3 immunoglobulin genes by unselected B cells in the adult. Predominance of 56p1-like VH genes in common variable immunodeficiency. *J Clin Invest*. 1992;89(5):1395-402.
9. Farrant J, Bryant A, Almandoz F, Spickett G, Evans SW, Webster AD. B cell function in acquired "common-variable" hypogammaglobulinemia: proliferative responses to lymphokines. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989;51(2):196-204.
10. Kokron CM, Errante PR, Barros MT, Baracho GV, Camargo MM, Kalil J, et al. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. *An Acad Bras Cienc*. 2004;76(4):707-26.
11. Yazdani R, Hakemi MG, Sherkat R, Homayouni V, Farahani R. Genetic defects and the role of helper T-cells in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Adv Biomed Res*. 2014;3:2.
12. Bateman EA, Ayers L, Sadler R, Lucas M, Roberts C, Woods A, 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(2):202-11.
13. Aspalter RM, Sewell WA, Dolman K, Farrant J, Webster AD. Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol*. 2000;121(3):506-14.

14. Carvalho KI, Melo KM, Bruno FR, Snyder-Cappione JE, Nixon DF, Costa-Carvalho BT, et al. Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). *PLoS One*. 2010;5(9).
15. Gao Y, Workman S, Gadola S, Elliott T, Grimbacher B, Williams AP. Common variable immunodeficiency is associated with a functional deficiency of invariant natural killer T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1420-8, 8 e1.
16. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. 2008;112(2):277-86.
17. Jolles S. The variable in common variable immunodeficiency: a disease of complex phenotypes. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2013;1(6):545-56; quiz 57.
18. Abbott JK, Gelfand EW. Common Variable Immunodeficiency: Diagnosis, Management, and Treatment. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2015;35(4):637-58.
19. Cunningham-Rundles C. How I treat common variable immune deficiency. *Blood*. 2010;116(1):7-15.
20. King P. Pathogenesis of bronchiectasis. *Paediatr Respir Rev*. 2011;12(2):104-10.
21. Baldovino S, Montin D, Martino S, Sciascia S, Menegatti E, Roccatello D. Common variable immunodeficiency: crossroads between infections, inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2013;12(8):796-801.
22. Cunningham-Rundles C. The many faces of common variable immunodeficiency. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:301-5.
23. Daniels JA, Lederman HM, Maitra A, Montgomery EA. Gastrointestinal tract pathology in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a clinicopathologic study and review. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(12):1800-12.
24. De Petris G, Dhungel BM, Chen L, Chang YH. Gastric adenocarcinoma in common variable immunodeficiency: features of cancer and associated gastritis may be characteristic of the condition. *Int J Surg Pathol*. 2014;22(7):600-6.
25. Dhalla F, da Silva SP, Lucas M, Travis S, Chapel H. Review of gastric cancer risk factors in patients with common variable immunodeficiency disorders, resulting in a proposal for a surveillance programme. *Clin Exp Immunol*. 2011;165(1):1-7.
26. Kinlen LJ, Webster AD, Bird AG, Haile R, Peto J, Soothill JF, et al. Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinaemia. *Lancet*. 1985;1(8423):263-6.
27. Cunningham-Rundles C. Lung disease, antibodies and other unresolved issues in immune globulin therapy for antibody deficiency. *Clin Exp Immunol*. 2009;157 Suppl 1:12-6.
28. Grulich AE, Vajdic CM, Cozen W. Altered immunity as a risk factor for non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(3):405-8.

29. da Silva SP, Resnick E, Lucas M, Lortan J, Patel S, Cunningham-Rundles C, et al. 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;31(5):784-91.
30. Notarangelo L, Casanova JL, Conley ME, Chapel H, Fischer A, Puck J, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee Meeting in Budapest, 2005. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(4):883-96.
31. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*. 2014;2014:761264.
32. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem*. 2004;11(9):1163-82.
33. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001;107(1):7-11.
34. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999;93(5):1464-76.
35. Valero N, Mosquera J, Anez G, Levy A, Marcucci R, de Mon MA. Differential oxidative stress induced by dengue virus in monocytes from human neonates, adult and elderly individuals. *PLoS One*. 2013;8(9):e73221.
36. Hodgson PD, Aich P, Stookey J, Popowych Y, Potter A, Babiuk L, et al. Stress significantly increases mortality following a secondary bacterial respiratory infection. *Vet Res*. 2012;43:21.
37. Khatami M. Unresolved inflammation: 'immune tsunami' or erosion of integrity in immune-privileged and immune-responsive tissues and acute and chronic inflammatory diseases or cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;11(11):1419-32.
38. Schneider R, Mohebiany AN, Ifergan I, Beauseigle D, Duquette P, Prat A, et al. B cell-derived IL-15 enhances CD8 T cell cytotoxicity and is increased in multiple sclerosis patients. *J Immunol*. 2011;187(8):4119-28.
39. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol*. 2013;2013:965212.
40. 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(3):498-507.
41. Furlong CE. Paraoxonases: An Historical Perspective. In: Bharti Mackness MM, Michael Aviram, György Paragh, editor. *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism*. 6: Springer, Dordrecht; 2008. p. 3-31.
42. Campo S, Sardo MA, Trimarchi G, Bonaiuto M, Fontana L, Castaldo M, et al. Association between serum paraoxonase (PON1) gene promoter T(-107)C polymorphism, PON1 activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians. *Exp Gerontol*. 2004;39(7):1089-94.

43. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33435-42.
44. Mackness M, Mackness B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Radic Biol Med*. 2004;37(9):1317-23.
45. Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(16):7187-91.
46. Aldridge WN. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J*. 1953;53(1):110-7.
47. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett*. 1991;286(1-2):152-4.
48. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol*. 1998;31(3):329-36.
49. Aviram M, Kaplan M, Rosenblat M, Fuhrman B. Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. *Handb Exp Pharmacol*. 2005(170):263-300.
50. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Curr Opin Lipidol*. 2005;16(4):393-9.
51. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(4):473-80.
52. Gonzalvo MC, Gil F, Hernandez AF, Villanueva E, Pla A. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. *Chem Biol Interact*. 1997;105(3):169-79.
53. Aharoni A, Amitai G, Bernath K, Magdassi S, Tawfik DS. High-throughput screening of enzyme libraries: thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments. *Chem Biol*. 2005;12(12):1281-9.
54. Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry*. 2005;44(16):6371-82.
55. Aviram M. [Cholesterol oxidation, macrophage foam cells and atherosclerosis: importance of antioxidants and paraoxonase]. *Harefuah*. 1999;136(8):620-6.
56. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*. 1998;101(8):1581-90.
57. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1991;86(2-3):193-9.

58. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(4):541-50.
59. Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation.* 2003;107(22):2775-9.
60. Scacchi R, Corbo RM, Rickards O, De Stefano GF. New data on the world distribution of paraoxonase (PON1 Gln 192 --> Arg) gene frequencies. *Hum Biol.* 2003;75(3):365-73.
61. Allebrandt KV, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;180(3):151-6.
62. MacKness B, Mackness MI, Durrington PN, Arrol S, Evans AE, McMaster D, et al. Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest.* 2000;30(1):4-10.
63. Daly AK. Polymorphic Variants of Cytochrome P450: Relevance to Cancer and Other Diseases. *Adv Pharmacol.* 2015;74:85-111.
64. He X, Feng S. Role of Metabolic Enzymes P450 (CYP) on Activating Procarcinogen and their Polymorphisms on the Risk of Cancers. *Curr Drug Metab.* 2015;16(10):850-63.
65. Jimenez-Garza O, Baccarelli AA, Byun HM, Marquez-Gamino S, Barron-Vivanco BS, Albores A. CYP2E1 epigenetic regulation in chronic, low-level toluene exposure: Relationship with oxidative stress and smoking habit. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;286(3):207-15.
66. Xu L, Yang M, Zhao T, Jin H, Xu Z, Li M, et al. The polymorphism of CYP2E1 Rsa I/Pst I gene and susceptibility to respiratory system cancer: a systematic review and meta-analysis of 34 studies. *Medicine (Baltimore).* 2014;93(27):e178.
67. Chong ET, Goh LP, See EU, Chuah JA, Chua KH, Lee PC. Association of CYP2E1, STK15 and XRCC1 Polymorphisms with Risk of Breast Cancer in Malaysian Women. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(2):647-53.
68. Elingarami S, Liu H, Kalinjuma AV, Hu W, Li S, He N. Polymorphisms in NEIL-2, APE-1, CYP2E1 and MDM2 Genes are Independent Predictors of Gastric Cancer Risk in a Northern Jiangsu Population (China). *J Nanosci Nanotechnol.* 2015;15(7):4815-28.
69. Aukrust P, Muller F, Froland SS. Elevated serum levels of interleukin-4 and interleukin-6 in patients with common variable immunodeficiency (CVI) are associated with chronic immune activation and low numbers of CD4+ lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994;70(3):217-24.
70. Aukrust P, Berge RK, Muller F, Ueland PM, Svardal AM, Froland SS. 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.
71. Sini BC. Estudo dos polimorfismos das paraoxonases 1 e 2 em pacientes portadores de imunodeficiência comum variável e avaliação do potencial de peroxidação lipídica. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

72. De Roos AJ, Gold LS, Wang S, Hartge P, Cerhan JR, Cozen W, et al. Metabolic gene variants and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(9):1647-53.
73. 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;351(1-2):117-23.
74. Kerridge I, Lincz L, Scorgie F, Hickey D, Granter N, Spencer A. Association between xenobiotic gene polymorphisms and non-Hodgkin's lymphoma risk. *Br J Haematol.* 2002;118(2):477-81.
75. de Aguiar Goncalves BA, Vasconcelos GM, Thuler LC, Andrade C, Faro A, Pombo-de-Oliveira MS, et al. NQO1 rs1800566 (C609T), PON1 rs662 (Q192R), and PON1 rs854560 (L55M) polymorphisms segregate the risk of childhood acute leukemias according to age range distribution. *Cancer Causes Control.* 2012;23(11):1811-9.
76. Beghi E, Shorvon S. Antiepileptic drugs and the immune system. *Epilepsia.* 2011;52 Suppl 3:40-4.
77. Eom SY, Yim DH, Zhang Y, Yun JK, Moon SI, Yun HY, et al. Dietary aflatoxin B1 intake, genetic polymorphisms of CYP1A2, CYP2E1, EPHX1, GSTM1, and GSTT1, and gastric cancer risk in Korean. *Cancer Causes Control.* 2013;24(11):1963-72.
78. Ozaras N, Goksugur N, Eroglu S, Tabak O, Canbakan B, Ozaras R. Carbamazepine-induced hypogammaglobulinemia. *Seizure.* 2012;21(3):229-31.
79. Pereira LF, Sanchez JF. Reversible panhypogammaglobulinemia associated with phenytoin treatment. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(10):785-7.
80. Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(5):1033-44.
81. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol.* 1999;93(3):190-7.
82. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
83. Motti C, Dessi M, Gnasso A, Irace C, Indigeno P, Angelucci CB, et al. A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis.* 2001;158(1):35-40.
84. Tan W, Song N, Wang GQ, Liu Q, Tang HJ, Kadlubar FF, et al. Impact of genetic polymorphisms in cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferases M1, T1, and P1 on susceptibility to esophageal cancer among high-risk individuals in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(6):551-6.
85. Lorentz K, Flatter B, Augustin E. Arylesterase in serum: elaboration and clinical application of a fixed-incubation method. *Clinical chemistry.* 1979;25(10):1714-20.

86. Parra S, Marsillach J, Aragonés G, Beltrán R, Montero M, Coll B, et al. Paraoxonase-1 gene haplotypes are associated with metabolic disturbances, atherosclerosis, and immunologic outcome in HIV-infected patients. *J Infect Dis.* 2010;201(4):627-34.
87. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, et al. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2007;27(3):308-16.
88. (IBGE) IBdGeE. Indicadores Sociais Mínimos [cited 2017 17/09]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/conceitos.shtm>.
89. Gugliucci A, Menini T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin Chim Acta.* 2015;439:5-13.
90. Aviram M, Vaya J. Paraoxonase 1 activities, regulation, and interactions with atherosclerotic lesion. *Curr Opin Lipidol.* 2013;24(4):339-44.
91. Rajkovic MG, Rumora L, Barisic K. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. *Biochem Med (Zagreb).* 2011;21(2):122-30.
92. Zayed AA, Ahmed AI, Khattab AM, Mekdad AA, AbdelAal AG. Paraoxonase 1 and cytochrome P450 polymorphisms in susceptibility to acute organophosphorus poisoning in Egyptians. *Neurotoxicology.* 2015;51:20-6.
93. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 1993;104(1-2):129-35.
94. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(9):1304-16.
95. Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46(2):83-106.
96. Ferreira PRS. Frequência das mutações Gln192Arg e Leu55Met no gene da paraoxonase 1 e das mutações Ser311Cis e A148G no gene da paraoxonase 2 em brasileiros de diferentes origens étnicas. [Dissertação de Mestrado]. In press 2007.
97. Precourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, et al. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis.* 2011;214(1):20-36.
98. Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva VR, Morvardi S, et al. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(3):341-51.
99. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(4):542-7.

100. Soran H, Schofield JD, Liu Y, Durrington PN. How HDL protects LDL against atherogenic modification: paraoxonase 1 and other dramatis personae. *Curr Opin Lipidol*. 2015;26(4):247-56.
101. Mackness M, Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene*. 2015;567(1):12-21.
102. Saadat M. Paraoxonase 1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol*. 2012;36(2):e101-3.
103. Malphettes M, Gerard L, Carmagnat M, Mouillot G, Vince N, Boutboul D, et al. Late-onset combined immune deficiency: a subset of common variable immunodeficiency with severe T cell defect. *Clin Infect Dis*. 2009;49(9):1329-38.
104. Abello D, Sancho E, Camps J, Joven J. Exploring the role of paraoxonases in the pathogenesis of coronary artery disease: a systematic review. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):20997-1010.
105. Haro-Garcia LC, Juarez-Perez CA, Aguilar-Madrid G, Velez-Zamora NM, Munoz-Navarro S, Chacon-Salinas R, et al. Production of IL-10, TNF and IL-12 by peripheral blood mononuclear cells in Mexican workers exposed to a mixture of benzene-toluene-xylene. *Arch Med Res*. 2012;43(1):51-7.
106. Hannigan JH, Bowen SE. Reproductive toxicology and teratology of abused toluene. *Syst Biol Reprod Med*. 2010;56(2):184-200.
107. Al-Batanony MA, Abdel-Rasoul GM, Abu-Salem MA, Al-Ahmar IA, Al-Badry AS. Cohort study on respiratory and neurological disorders among workers in a bone glue factory in Egypt. *Int J Occup Environ Med*. 2012;3(2):84-91.
108. Shih HT, Yu CL, Wu MT, Liu CS, Tsai CH, Hung DZ, et al. Subclinical abnormalities in workers with continuous low-level toluene exposure. *Toxicol Ind Health*. 2011;27(8):691-9.
109. Sarma SN, Kim YJ, Song M, Ryu JC. Induction of apoptosis in human leukemia cells through the production of reactive oxygen species and activation of HMOX1 and Noxa by benzene, toluene, and o-xylene. *Toxicology*. 2011;280(3):109-17.
110. Agundez JA. Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer. *Curr Drug Metab*. 2004;5(3):211-24.
111. Naselli F, Catanzaro I, Bellavia D, Perez A, Sposito L, Caradonna F. Role and importance of polymorphisms with respect to DNA methylation for the expression of CYP2E1 enzyme. *Gene*. 2014;536(1):29-39.
112. Wang AH, Sun CS, Li LS, Huang JY, Chen QS. Relationship of tobacco smoking CYP1A1 GSTM1 gene polymorphism and esophageal cancer in Xi'an. *World J Gastroenterol*. 2002;8(1):49-53.
113. Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(5):723-38.

114. Lu Y, Zhuge J, Wang X, Bai J, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1 contributes to ethanol-induced fatty liver in mice. *Hepatology*. 2008;47(5):1483-94.
115. Saeed HM, Alanazi MS, Nounou HA, Salaby MA, Semlali A, Azzam N, et al. Cytochrome P450 1A1, 2E1 and GSTM1 gene polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer in the Saudi population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(6):3761-8.
116. Guaoua S, Ratbi I, Laarabi FZ, Elalaoui SC, Jaouad IC, Barkat A, et al. Distribution of allelic and genotypic frequencies of NAT2 and CYP2E1 variants in Moroccan population. *BMC Genet*. 2014;15:156.
117. Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol*. 1991;4(2):168-79.

8.Anexos

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO.....Nº.....APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE:(.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD
(.....).....**DADOS SOBRE A PESQUISA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Relação entre os polimorfismos da paraoxonase 1 e do citocromo P450 em pacientes com imunodeficiência comum variável em uso de medicamentos ou exposição a poluentes ambientais

PESQUISADOR: Myrthes Toledo Barros

CARGO/FUNÇÃO: Médica Supervisora do Serviço de Imunologia da Divisão de Clínica Médica

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 16038

UNIDADE DO HCFMUSP: Depto de Clínica Médica HCFMUSP/ - Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 03 anos

INFORMAÇÕES PARA O PACIENTE

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): Você sabe que tem uma doença da imunidade com prejuízo da produção de anticorpos denominada imunodeficiência comum variável. Os anticorpos são proteínas presentes em todo corpo mas principalmente no sangue das pessoas e que defendem contra micróbios como bactérias e vírus. Por causa da deficiência dos anticorpos, os pacientes com ICV apresentam infecções de repetição ou crônicas e uma maior frequência de doenças inflamatórias e câncer. É conhecido que alguns medicamentos como antidepressivos e corticoides podem desencadear a ICV. Ainda não se sabe se a exposição a agentes tóxicos do meio ambiente como inseticidas, agrotóxicos e tintas também podem influenciar o desencadeamento da doença.

No nosso organismo existem substâncias denominadas enzimas que são capazes de filtrar substâncias tóxicas, assim como medicamentos utilizados de rotina na prática médica. Dependendo da genética de cada pessoa, algumas destas enzimas não são eficientes nessa filtragem, levando ao acúmulo de substâncias tóxicas e desencadeamento de doenças do sistema imunológico. Duas famílias destas enzimas são a família das paraoxonases (PON) e a família do citocromo P450. A amostra de sangue que será coletada hoje faz parte de um estudo realizado em pacientes com imunodeficiência comum variável, acompanhados pelo Serviço de Imunologia Clínica do HCFMUSP, onde serão estudadas as diferentes formas hereditárias (herdadas de pai e de mãe) destas enzimas. O nosso objetivo é estudar se os genes envolvidos na produção das PONs e do citocromo P450 têm relação com a menor atividade (funcionamento) dessas enzimas e o aparecimento de infecções de repetição, de doenças inflamatórias e, em menor proporção, também de câncer, nos pacientes com imunodeficiência comum variável.

INFORMAÇÕES PARA O CONTROLE SÃO

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): Existe uma doença da imunidade na qual ocorre um prejuízo da produção de anticorpos denominada imunodeficiência comum variável. Os anticorpos são proteínas presentes em todo corpo mas principalmente no sangue das pessoas e que defendem contra micróbios como bactérias e vírus. Por causa da deficiência dos anticorpos, os pacientes com ICV apresentam infecções de repetição ou crônicas e uma maior frequência de doenças inflamatórias e câncer. É conhecido que alguns medicamentos como antidepressivos e corticoides podem desencadear a ICV. Ainda não se sabe se a exposição a agentes tóxicos do meio ambiente como inseticidas, agrotóxicos e tintas também podem influenciar o desencadeamento da doença.

No nosso organismo existem substâncias denominadas enzimas que são capazes de filtrar substâncias tóxicas, assim como medicamentos utilizados de rotina na prática médica. Dependendo da genética de cada pessoa, algumas destas enzimas não são eficientes nessa filtragem, levando ao acúmulo de substâncias tóxicas e desencadeamento de doenças do sistema imunológico. Duas famílias destas enzimas são a família das paraoxonases (PON) e a família do citocromo P450. A amostra de sangue que será coletada hoje faz parte de um estudo realizado em pacientes com imunodeficiência comum variável, acompanhados pelo Serviço de Imunologia Clínica do HCFMUSP, onde serão estudadas as diferentes formas hereditárias (herdadas de pai e de mãe) destas enzimas. O nosso objetivo é estudar se os genes envolvidos na produção das PONs e do citocromo P450 têm relação com a menor atividade (funcionamento) dessas enzimas e o aparecimento de infecções de repetição, de doenças inflamatórias e, em menor proporção, também de câncer, nos pacientes com imunodeficiência comum variável. ***Para isto, precisamos comparar os resultados a serem obtidos com aqueles de indivíduos sãos, como o Sr(a) e é por isto que precisamos de sua colaboração no projeto.***

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros. Serão realizados testes laboratoriais para pesquisar a atividade (funcionamento) da enzima paraoxonase, bem como para a diferenciação dos possíveis tipos da mesma enzima e do citocromo P450 (através do estudo de DNA). Estes testes não feitos de rotina e serão realizados uma única vez. A sua amostra de sangue coletada hoje ficará armazenada no laboratório até o término deste estudo e depois será destruída. O Sr(a) também deverá responder a um questionário sobre exposição a agentes tóxicos do meio ambiente (venenos utilizados em lavoura, combustíveis, solventes, tintas de pintura, tintas de cabelos), relacionado à sua vida e de seus pais.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos. Serão coletados 12 mL (2 tubos de coleta) de sangue para estes testes, uma única vez, antes da administração da imunoglobulina.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: somente os da punção venosa (picada da agulha) para a coleta do sangue.

5 – Benefícios para o participante. Trata-se de estudo inicial do papel dessas enzimas e o(a) senhor(a) não terá benefícios imediatos para o tratamento ou cura de sua doença. No entanto, estará contribuindo para uma pesquisa científica.

6 – Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: não há.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são:

- **Dra. Myrthes Anna Maragna Toledo Barros:** Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 (PAMB) – 5º andar – Bloco 4B, (11) 2661-9571.

Bruno Carnevale Sini: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 (PAMB) – 1º andar – (11) 3082-2398

Prof. Dr. Sérgio Bydlowski, que podem ser encontrados na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 (PAMB) – 1º andar – (11) 3082-2398

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato como Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição: sim

09 – **Direito de confidencialidade** – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as dos outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles.

10 – **Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.** O andamento e os resultados da pesquisa habitualmente são divulgados pessoalmente aos pacientes durante as reuniões anuais do Ambulatório de Imunodeficiências Primárias destinadas aos pacientes em seguimento.

11 – **Despesas e compensações:** não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, exceto sua vinda para o hospital para coleta de exames e consultas de rotina e tratamento.

Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. O risco do estudo é mínimo, sendo apenas o de uma coleta de amostra de sangue.

12 - A sua amostra de sangue coletada hoje ficará armazenada no laboratório, conforme regras de sigilo e manutenção de material biológico vigentes e será destruída após o término do estudo.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Relação entre os polimorfismos da paraoxonase 1 e do citocromo P450 em pacientes com imunodeficiência comum variável em uso de medicamentos ou exposição a poluentes ambientais".

Eu discuti com a Dra. Myrthes Anna Maragna Toledo de Barros sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Data ____/____/____

Assinatura do paciente/representante legal

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo 2 - PRESENÇA DE INFECÇÕES EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS DE CYP2E1 NOS GRUPOS ICV E HS

		Pacientes ICV*	P (<0,05)	Pacientes HS*	P (<0,05)
Vias Aéreas	C1-C1	97,8%	1	80,0%	1
	C1-C2	100%		0%	
Pneumonia	C1-C1	92,31%	0,579	60,0%	0,619
	C1-C2	90,0%		0%	
Sinusites	C1-C1	79,12%	0,682	60,0%	1
	C1-C2	90,00%		0%	
Oportunistas	C1-C1	45,05%	0,043	13,33%	0,2
	C1-C2	10,00%		0%	
Sepse	C1-C1	17,58%	1	26,67%	0,077
	C1-C2	10,0%		0%	
ITUs	C1-C1	14,29%	1	13,33%	1
	C1-C2	10,00%		0%	
Meningite	C1-C1	6,59%	0,529	26,67%	0,569
	C1-C2	10,00%		0%	

* Valores de n dos grupos estudados: ICV - MM: 34, ICV - LM:26 e ICV - LL: 33; HS - MM: 0, HS - LM: 8, HS - LL: 7.
p <0,05

Anexo 3 - PRESENÇA DE ALTERAÇÕES GASTROINTESTINAIS, LINFONODOMEGALIA E LINFOPROLIFERAÇÕES BENÍGNAS EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO CYP2E1 NOS GRUPOS ICV E HS

		Pacientes ICV*	P (<0,05)	Pacientes HS*	P (<0,05)
Gastrointestinais	C1-C1	71,43%	1	57,14%	1
	C1-C2	90,0%		100%	
Intestinal	C1-C1	79,89%	1	57,89%	-
	C1-C2	80,00%		100%	
Diarréia	C1-C1	71,43%	0,281	53,33%	1
	C1-C2	90,0%		100%	
Esofagite	C1-C1	62,64%	0,188	42,11%	0,438
	C1-C2	40,00%		100%	
Gastrite	C1-C1	85,56%	1	52,63%	1
	C1-C2	88,89%		100%	
<i>H.pylori</i>	C1-C1	24,18%	0,112	15,79%	1
	C1-C2	0%		0%	
Linfonodomegalia	C1-C1	35,16%	0,741	46,67%	1
	C1-C2	40,0%		0%	
Linfoproliferação	C1-C1	44,44%	1	26,67%	0,313
	C1-C2	40,00%		100%	

* Valores de n dos grupos estudados: ICV - MM: 34, ICV - LM:26 e ICV - LL: 33; HS - MM: 0, HS - LM: 8, HS - LL: 7.

p <0,05

Anexo 4 - PRESENÇA DE ASMA, RINITE, BRONQUIECTASIAS, DPOC, AUTOIMUNIDADE, MALIGNIDADES, ESPLENOMEGALIA, HEPATOMEGALIA E HIPERTENSÃO PORTAL EM RELAÇÃO AO POLIMORFISMO CYP2E1 NOS GRUPOS ICV E HS

		Pacientes ICV*	P (<0,05)	Pacientes HS*	P (<0,05)
Asma	C1-C1	37,36%	0,503	20,0%	1
	C1-C2	50,00%		0%	
Rinite	C1-C1	57,14%	0,006	73,33%	0,313
	C1-C2	100%		0%	
Autoimunidade	C1-C1	35,16%	0,719	66,67%	1
	C1-C2	44,44%		100%	
Malignidades	C1-C1	21,98%	0,683	40,0%	-
	C1-C2	10,00%		0%	
Bronquiectasias	C1-C1	57,78%	0,741	33,33%	1
	C1-C2	50,00%		0%	
DPOC	C1-C1	5,62%	0,481	26,67%	1
	C1-C2	10,00%		0%	
Esplenomegalia	C1-C1	51,65%	0,318	13,33%	1
	C1-C2	30,00%		0%	
Hepatomegalia	C1-C1	31,11%	1	0%	-
	C1-C2	30,00%		0%	
Hipertensão Portal	C1-C1	20,88%	1	0%	-
	C1-C2	20,00%		0%	

* Valores de n dos grupos estudados: ICV - MM: 34, ICV - LM:26 e ICV - LL: 33; HS - MM: 0, HS - LM: 8, HS - LL: 7.
 $p < 0,05$

Anexo 5 - PRESENÇA DE PARÂMETROS DE GRAVIDADE EM RELAÇÃO AO POLIMORFISMO CYP2E1**NOS GRUPOS ICV E HS**

		Pacientes ICV*	P (<0,05)	Pacientes HS*	P (<0,05)
Gravidade	C1-C1	56,04%	0,748	78,95%	0,313
	C1-C2	50,00%		0%	
Óbitos	C1-C1	13,19%	0,167	15,79%	1
	C1-C2	30,00%		0%	
Malignidade	C1-C1	21,98%	0,683	42,11%	1
	C1-C2	10,00%		0%	
Sepse	C1-C1	17,58%	1	21,05%	1
	C1-C2	10,00%		0%	

* Valores de n dos grupos estudados: ICV - MM: 34, ICV - LM:26 e ICV - LL: 33; HS - MM: 0, HS - LM: 8, HS - LL: 7.
p <0,05