Bruno Carnevale Sini

**Estudo dos polimorfismos das paraoxonases 1 e 2
em pacientes portadores de imunodeficiência
comum variável e avaliação do potencial
de peroxidação lipídica**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Myrthes Anna Maragna Toledo Barros

**São Paulo
2013**

DEDICATÓRIA

Dedico estas muitas páginas
àqueles que muito fizeram por mim.
Não há o um sem o todo.
Não há futuro sem passado
Não há como eu ser quem sou
Sem ser aquilo que vocês me ensinaram a ser
Pai, mãe, irmão e família...
Essa é para vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiro, aos meus pais que, com muito esforço, puderam me dar esta oportunidade de realizar algo que sempre busquei, desde sempre, me fascina. Sempre fui apaixonado por ciência e hoje transformo aquelas brincadeiras de criança, com copos de gelo, vinagre e fermento em pó, em realidade. Claro que esta não foi uma jornada fácil, muito menos uma jornada sem obstáculos, mas são as jornadas mais difíceis aquelas cuja recompensa é mais valiosa.

Gostaria também de agradecer à minha orientadora, Dra. Myrthes Toledo Barros, por todo o apoio e por todas as horas que passamos juntos ao longo deste processo. Foram sextas, segundas, quartas e até finais de semana. Sem ela, nada disto seria possível.

Agradeço também ao prof. Sérgio Paulo Bydlowski. Foi dele que partiu a primeira oportunidade que tive de ingressar na ciência, ainda nos idos de 2008. Foi dessa oportunidade que nasceu tudo isto e foi nesta oportunidade que eu comecei a construir aquilo em que quero pautar minha carreira.

Às dras. Luciana Morganti e Débora Levy, devo também profundo agradecimento. Desde o começo tenho aprendido com elas como trabalhar com ciência. Sei que não foi fácil tentar me ensinar algo...mas tudo aquilo que disseram ao longo de todos esses anos estará sempre guardado comigo (mesmo que eu demore um pouco para lembrar).

Ao prof. Jorge Kalil pela oportunidade de ingressar na pós graduação em seu departamento e pelas incontáveis reuniões de quinta feira à noite (e que, invariavelmente, se prolongavam por mais algumas horas pela paulista).

À Linah Akemi Fukuya, minha mãe adotiva de outra nacionalidade, com quem passei a maior parte destes anos e que me ensinou boa parte daquilo que sei hoje. Obrigado por me mostrar que a sinceridade, mesmo aquela nua e crua, pode ser melhor do que a melhor das intenções.

À Tânia Joyce, também chamada constantemente de TJ, pela ajuda que me deu durante todos esses anos e por ser a minha agenda reserva, fornecedora de informações, datas, prazos e também de algumas boas risadas.

Ao pessoal do LIM-31: Cleide, Denise, Adriana, Jorge, Livia, Ana, Nany, todas as Carolinas... obrigado por todos esses anos que compartilhamos o mesmo espaço de trabalho. Colegas e amigos que gostaria de carregar comigo por longos e longos anos.

Aos meus colegas de pós-graduação, obrigado por compartilharem e dividirem comigo este pequeno transtorno que foram nossas pós graduações. Em especial, agradeço também ao Wesley e à Nathália...porque só entre amigos e copos de cerveja que se sobrevive às quintas feiras.

Agradeço a todos os meus amigos. Aos que cursaram o colégio comigo, pelo apoio que me deram ainda antes de eu decidir ser quem quero ser hoje. Foi lá que descobri que, por mais que eu evitasse, a ciência, a pesquisa e longas noites sem dormir era aquilo que me deixava feliz. Agradeço também aos meus amigos de todas as jogatinas pelo apoio que me deram sempre, tanto aqui quanto no Rio de Janeiro. Agradeço ao Alexandre e ao Jorge, dois grandes irmãos mais velhos com quem aprendi muito. À Andréia e à Suzy, por todos os bolos, refeições e noites que passei em suas casas. Agradeço Também ao João, ao Diogo e ao Filipe por terem me recebido e me fornecido um teto para passar o Carnaval no Rio de Janeiro.

Aos dois professores que, no colégio, me ensinaram aquilo que sei hoje e que me mostraram o quanto fazer ciência pode ser divertido: Célio e Silvana.

Ao meu irmão, Caio, por ser o inconveniente mais bem vindo em minha vida. Não preciso explicar nada para ele... ele sabe o que isso significa.

Aos pacientes com quem trabalhei por todos esses anos. Sei que mantive pouco contato com todos, mas sem eles, sem a boa vontade e sem a participação, nada disso seria possível.

E gostaria, por fim, de agradecer a todos aqueles que, direta ou indiretamente, sabendo ou não, ajudaram a tornar este trabalho em realidade.

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

Referências: adaptado de *International Committe of Medical Hournals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Mecinia. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Gia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Marua Júlia de A.L. Freddi, Maria F Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Carodos, Valéria Vilhena. 2a Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1.Introdução	1
1.1 Estresse Oxidativo	2
1.2 Paraoxonases	2
1.2.1 Paraoxonase 1	3
1.2.2 PON1 e HDL	4
1.2.3 Polimorfismos de PON1 e atividade enzimática	5
1.2.4 Paraoxonase 2	6
1.2.5 Associação de Polimorfismos no gene de PON2	7
1.2.6 Paraoxonase 3	8
1.3 Imunodeficiência Comum Variável	9
2. Objetivos	13
3. Metodologia	15
3.1 Locais do estudo	16
3.2 Casuística	16
3.2.1 Pacientes	16
3.2.2 Critérios Diagnósticos	16
3.2.3 Critérios de exclusão	16
3.2.4 Exames laboratoriais de rotina	17
3.2.5 Indivíduos controle saudáveis	17
3.3 Obtenção das amostras de soro/ plasma	17
3.4 Obtenção de DNA genômico a partir de células de sangue periférico	18
3.5 Genotipagem para os polimorfismos	19

3.5.1 Determinação dos polimorfismos Q192R e L55M no gene da enzima paraoxonase 1 e S311C no gene da enzima paraoxonase 2 (PCR Multiplex).....	19
3.5.2 Determinação do polimorfismo PON2-A148G no gene da paraoxonase 2	22
3.6 Análise da atividade arilesterase de PON1 sérica	23
3.7 Análise do perfil clínico/laboratorial dos pacientes com ICV	24
3.8 Análise estatística	25
4. Resultados	26
4.1 Casuística	27
4.2 Descrição individual dos polimorfismos de PON1-L55M e PON1-Q192R.....	28
4.3 Descrição individual dos polimorfismos de PON2-A148G e PON2-S311C.....	29
4.4 Determinação do perfil lipídico dos pacientes com ICV.....	30
4.5 Atividade arilesterase.....	30
4.6 Relação entre atividade arilesterase e perfil lipídico	32
4.7 Relação entre parâmetros clínicos e laboratoriais.....	34
5. Discussão	38
6. Conclusões	53
7. Referências.....	55
8. Anexos	65
ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	66
ANEXO 2 – GENOTIPAGEM DOS PACIENTES ICV	70
ANEXO 3 – GENOTIPAGEM DOS CONTROLES SAUDÁVEIS.....	72
ANEXO 4 – PERFIL LIPÍDICO DOS PACIENTES COM ICV	75
ANEXO 5 – DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES ICV (expressos em anos)	77
ANEXO 6 – DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM ICV EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS DE PON1	79
ANEXO 7 – DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM ICV EM RELAÇÃO AOS ALELOS DOS POLIMORFISMOS DE PON1	83

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs absorbância

Aids do termo inglês Acquired immunodeficiency syndrome. Síndrome da Imunodeficiência adquirida

ANCA anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos

anti-LKM do termo inglês anti liver kidney miscrosomal

apoA-I apolipoproteína A-I

APS persulfato de amônio

Baff do termo em inglês B-cell activating factor. Fator ativador de célula B

CAPPesq omissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

DlgA deficiência de IgA

E caminho óptico

EDTA do termo inglês (Ethylenedinitrilo) tetraacetic acid disodium. Ácido etilenodiaminotetracético

HHV herpes vírus humano

Hinf I enzima de restrição derivada de *Haemophilus influenzae*

hiper-IgM síndrome de Hiper-IgM

HIV do termo inglês Human immunodeficiency virus. Vírus da Imunodeficiência humana

HNL hiperplasia nodular linfoide

HTLV do termo inglês human T lymphotropic virus

ICOS do termo inglês inducible costimulator. Coestimulador Induzível

ICV imunodeficiência comum variável

IMC índice de massa corpórea

LIM31 Laboratório de Investigação Médica 31

LNH linfoma não-Hodgkin

MAL do termo inglês mucosa-associated lymphoid tissue. Tecido linfoide associado à mucosa

PON Paraoxonases

PON1 Paraoxonase 1

PON2 Paraoxonase 2

PON3 Paraoxonase 3

Primer sequência de oligonucleotídeo iniciadora

Probes sondas

RCLB do termo inglês Red Cell Lysis Buffer. Tampão de lise de glóbulos vermelhos

RFLP do termo inglês restriction fragment length polymorphism. Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição

ROS Reactive Oxygen Species. Espécies Reativas de Oxigênio.

SDS sódio dodecil sulfato

SNP do termo inglês single nucleotide polymorphism. Polimorfismo de nucleotídeo simples

TAC1 do inglês Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor.

TE tampão tris-EDTA

Temed N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino

TEN tampão tris-EDTA-NaCl

TGI trato gastrointestinal

TNF do termo inglês Tumor Necrosis Factor. Fator de necrose tumoral

TNFRSF do termo inglês Tumor necrosis factor receptor superfamily. Receptor da superfamília do fator de necrose tumoral

Tris tris (hidroximetil) aminometano

Va volume da amostra

VLDL do termo inglês very low density lipoprotein. Lipoproteína de densidade muito baixa

Vtr volume total da reação

XLP do inglês X-Linked lymphoproliferative Disorder. Síndrome Linfoproliferativa ligada ao X

ϵ coeficiente de absorção molar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 correlação entre a atividade arilesterase de PON1 e o valor de colesterol total do grupo de pacientes com ICV.....32

Figura 2: correlação entre a atividade arilesterase de PON1 e o valor de HDL do grupo de pacientes com ICV.....33

Figura 3: correlação entre a atividade arilesterase de PON1 e o valor de LDL do grupo de pacientes com ICV.....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas de pacientes com ICV e controles saudáveis.	27
Tabela 2: Descrição das frequências dos alelos e genótipos dos polimorfismos de PON1	28
Tabela 3: Descrição das frequências dos alelos e genótipos dos polimorfismos de PON2	29
Tabela 4: Descrição do perfil lipídico dos pacientes ICV. Os dados estão expressos em mg/dL	30
Tabela 5: Atividade arilesterase da PON1 referentes aos genótipos Q192R e L55M em pacientes com ICV e controles saudáveis.....	31
Tabela 6: Relação entre parâmetros clínicos e laboratoriais e genótipos do polimorfismo PON1-L55M	34
Tabela 7: Relação entre os parâmetros clínicos e laboratoriais e presença do alelo 55L	35
Tabela 8: Relação entre os genótipos do polimorfismo PON1-L55M e internações	36
Tabela 9: Relação entre a presença do alelo 55L ou 55M e quadro de internações em pacientes com ICV	37

RESUMO

Sini BC. *Estudo dos polimorfismos das paraoxonases 1 e 2 em pacientes portadores de Imunodeficiência comum variável e avaliação do potencial de peroxidação lipídica.*

[dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 88p

INTRODUÇÃO. Os genes da família paraoxonase (PON1, PON2 e PON3) apresentam grande homologia estrutural. PON1 está associada à molécula de HDL e possui funções fisiológicas, sendo a principal a de lactonase. PON1 também pode proteger as moléculas de LDL de modificações oxidativas. Embora o papel biológico mais conhecido das paraoxonases seja a prevenção da aterosclerose, elas também atuam sobre o estresse oxidativo envolvido na patogênese de outras condições como doenças inflamatórias, infecções e neoplasias. Toda a família PON parece estar implicada no desenvolvimento de linfomas. O polimorfismo L55M de PON1 foi relacionado a um maior risco para linfomas em indivíduos da população geral, enquanto PON3 e PON2 foram relacionadas à sobrevida de células tumorais. 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 não-Hodgkin (LNH) e câncer gástrico. **OBJETIVO:** estudar os polimorfismos de PON1 e PON2 bem como a atividade arilesterase de PON1 e sua relação com o perfil lipídico, morbidade, mortalidade e presença de fatores de risco para linfoma LNH em pacientes com ICV. **MÉTODOS/RESULTADOS:** Foram avaliadas as frequências alélicas dos polimorfismos de PON1 e PON2, o perfil lipídico e a atividade arilesterase da PON1 em 63 pacientes com ICV e 130 controles saudáveis. No grupo de pacientes foi analisada a presença de fatores de risco para LNH e parâmetros de morbidade e gravidade da doença. O polimorfismo Q192R da PON1 e os polimorfismos de PON2 (S311C e A148G) não diferiram entre os grupos e não apresentaram relação com os parâmetros analisados. O genótipo 55MM e o alelo 55M foram mais frequentes no grupo ICV em relação ao grupo controle. A atividade arilesterase foi similar em pacientes e controles apresentando correlação positiva com os níveis de HDL. Pacientes com o genótipo 55MM apresentaram menor atividade de PON1 associada a maior morbidade da doença

representada pela maior frequência de infecções de vias aéreas e maior taxa de internações. O genótipo 55MM também apresentou relação com a presença de fatores de risco para LNH como hiperplasia nodular linfoide (HNL) e linfonodomegalias. Por outro lado, a análise dos alelos demonstrou que a menor morbidade da doença foi associada à presença do alelo 55L, que apresentou relação com menor frequência de HNL e linfonodomegalia e menor ocorrência de óbitos. O alelo 55M apresentou relação com história familiar de imunodeficiências e neoplasias hematológicas. **CONCLUSÃO:** Este constitui o primeiro relato demonstrando maior frequência do genótipo 55MM e do alelo 55M em pacientes com ICV. Nossos resultados são sugestivos de que a presença do alelo 55L possa estar associado a um melhor prognóstico da doença. Inversamente, sugerem que pacientes com o genótipo 55MM apresentem maior morbidade e, possivelmente, maior risco para LNH.

Descritores: 1.Paraoxonase 2.Arildialquilfosfatase 3.Polimorfismo genético
4.Imunodeficiência de variável comum 5.Infecção 6.Linfoma não Hodgkin 7.Morbidade
8.Peroxidação de lipídeos

SUMMARY

Sini BC. *Study of the polymorphisms of paraoxonases 1 and 2 in patients with Common variable immunodeficiency and evaluation of lipid peroxidation potential* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 88p

INTRO: The paraoxonase gene family (PON1, PON2 and PON3) has great structural homology. PON1 is associated with the HDL molecule and possess many physiological roles, the major one being of a lactonase. PON1 also protects LDL molecules against oxidative modifications. Although the best known biological role of PONs is the prevention of atherosclerosis, they also act on the oxidative stress involved in the pathogenesis of different conditions such as inflammatory diseases, infections and malignancies. The whole PON family appears to be implicated in the development of lymphomas. The L55M polymorphism of PON1 was related with a higher risk for lymphoma in the general population while PON3 and PON2 were related to survival of tumor cells. The Common Variable Immunodeficiency (ICV) is a heterogeneous disease characterized by reduced levels of IgG, IgA and/or IgM and antibody function. Clinical manifestations include the presence of chronic or recurrent infections, inflammatory/autoimmune diseases and increased incidence of malignancies such as non-Hodgkin lymphoma (NHL) and gastric cancer. **OBJECTIVE:** to study the PON1 and PON2 polymorphisms and the arylesterase activity of PON1 and its correlation with the lipid profile, morbidity, mortality and the presence of risk factors for NHL in CVID patients. **METHODS/RESULTS:** We evaluated the allele frequencies of polymorphisms of PON1 and PON2, lipid profile and arylesterase activity of PON1 in 63 patients with CVID and 130 healthy controls. In the group of patients we analyzed the presence of risk factors for NHL and parameters of morbidity and disease severity. The Q192R polymorphism of the PON1 and PON2 polymorphisms (A148G and S311C) did not differ between groups and did not correlate with the parameters analyzed. The 55MM genotype and the 55M allele were more frequent in the CVID group than in control group. The arylesterase activity was similar in patients and controls showing a positive correlation with HDL levels. Patients with genotype 55MM had lower PON1 activity, associated with increased morbidity of the disease represented by the higher frequency of respiratory

infections and a higher rate of hospitalization. The 55MM genotype also was correlated with the presence of risk factors for NHL, such as lymphoid nodular hyperplasia (HNL) and lymphadenopathy. Moreover, analysis of the alleles showed that less morbidity of the disease was associated with the presence of the allele 55L, which was correlated with a lower frequency of HNL and lymphadenopathies and fewer deaths. The 55M allele was correlated with a family history of immunodeficiency and hematological malignancies.

CONCLUSION: This is the first report showing a greater frequency of 55MM genotype and 55M allele in patients with CVID. Our results suggest that the presence of 55L allele may be associated with a better prognosis. Conversely, these results suggest that patients with the 55MM genotype show higher morbidity and, possibly, higher risk for NHL

Keywords: 1.Paraoxonase 2.Aryldialkylphosphatase 3.Genetic Polymorphism 4.Common Variable Immunodeficiency 5.Infection 6.non-Hodgkin lymphoma 7.Morbidity 8.Lipid Peroxidation

1.Introdução

1.1 Estresse Oxidativo

As alterações oxidativas são essenciais para as células aeróbicas, que deste modo estão permanentemente expostas a numerosas substâncias oxidantes. A produção em estado estacionário (*steady-state*) de espécies reativas do oxigênio (ROSs) durante o metabolismo celular é normalmente contrabalanceada por uma taxa similar de consumo por antioxidantes. O desbalanço entre o equilíbrio pró-oxidante – antioxidante pode resultar no estresse oxidativo devido à produção aumentada de oxidantes, diminuída de antioxidantes ou da combinação destes dois fatores (Yu BP, 1994).

O estresse oxidativo tem sido envolvido na patogênese de diversas doenças humanas, como as doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias intestinais, neoplasias, imunossenescência, aids e infecções (Camps, 2009)

O sistema antioxidante natural inclui enzimas antioxidantes e numerosos componentes que protegem as células contra a citotoxicidade mediada pelas ROSs, evitando assim a lesão tecidual. Uma vez que as ROSs têm meia-vida muito curta, torna-se praticamente impossível quantificá-las diretamente. Deste modo, o estresse oxidativo tem sido avaliado indiretamente através da quantificação de enzimas antioxidantes com atividade *scavenger* ou de subprodutos da oxidação de proteínas ou de lípidos (Aukrus, 2005; Aukrust, 2007; Camps, 2009).

1.2 Paraoxonases

As paraoxonases (PON) provêm de uma família multigene de enzimas - a qual inclui PON1, PON2 e PON3 - localizadas no braço longo do cromossomo 7 (entre q21.3 e q22.1) em humanos e no cromossomo 6 de ratos (Primo-Parmo, 1996) e estão envolvidas na peroxidação lipídica.

Entre si, os genes PON são similares, apresentando grande homologia estrutural (Campo, 2004; Draganov, 2000). Em humanos, possuem aproximadamente 60% de identidade em aminoácidos e cerca de 70% de identidade em nucleotídeos (Campo, 2004). Entre as espécies de mamíferos, cada um dos três genes apresenta 79-90% de identidade em aminoácidos e 81-91% de identidade em nucleotídeos (Primo-Parmo, 1996; La Du, 1999).

As paraoxonases parecem pertencer a uma família de enzimas ancestrais que apareceram muito cedo durante a evolução e em diversos organismos, desde invertebrados até mamíferos (Furlong, 2008). Jensen (1976) propôs a hipótese de que, ao contrário das enzimas mais recentes na escala filogenética, as enzimas “primitivas” apresentariam uma maior amplitude de substratos, possibilitando assim que mesmo um número relativamente pequeno de enzimas possa tornar viável um organismo primitivo (Copley, 2003; Kazlauskas, 2005).

A PON1 foi, dentre as três, a primeira a ser descrita e é a mais estudada. Foi descoberta através de sua capacidade de hidrolisar organofosforados xenobióticos no soro humano. As funções da PON2 e PON3, mais recentemente identificadas, ainda constituem alvos de especulação na literatura (Mackness, 2004).

1.2.1 Paraoxonase 1

Em 1946, Abraham Mazur sugeriu a existência de uma enzima em tecido animal capaz de hidrolisar compostos organofosforados. Este achado conduziu à descoberta da enzima PON1 no início dos anos 50, quando Aldridge (1953) classificou as esterases em dois grupos, A e B baseado em suas interações com compostos organofosforados (Mackness, 1991a). Sabe-se hoje que as duas atividades propostas pertencem a uma mesma enzima, PON1 (Sorenson, 1995), cujo nome deriva de paraoxon, o metabólito do pesticida parathion.

Em humanos, possui uma massa molecular de 43 a 45 kDa, contendo três cadeias de carboidrato que correspondem a 15,8% de seu peso (Mackness, 1998). É uma glicoproteína com atividade de esterase, aparentemente sintetizada e secretada pelo fígado, completamente dependente de cálcio para sua ação hidrolítica contra substratos organofosforados (Aviram, 2005a; Aviram, 2005b; Campo, 2004; Durrington, 2001) e irreversivelmente inibida pelo EDTA (Gonzalvo, 1997). Seus maiores níveis de atividade, em todos os órgãos, foram observados em mamíferos, enquanto que pássaros, peixes e insetos possuem pouca ou nenhuma atividade enzimática (Mackness, 1991a).

A PON1 está presente no soro, fortemente associada à apoA-I integrante das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Recentemente, utilizando-se de estudos de evolução

direcionados em conjunto com análises de função e estrutura, foi estabelecido que a função “primordial” de PON1 é a de uma lipolactonase (Aharoni, 2005; Khersonsky, 2005) e que, com o decorrer do tempo, teve sua especificidade expandida para outros substratos. É também capaz de proteger a lipoproteína de baixa densidade (LDL) contra modificações oxidativas (Aviram, 1998a; Aviram, 1999). O interesse científico pela enzima aumentou imediatamente quando, em 1991, Mackness e colaboradores (Mackness, 1991b) demonstraram que a PON1 poderia prevenir o acúmulo de lipoperóxidos na LDL, correlacionando-a, assim, à proteção contra doença cardiovascular.

1.2.2 PON1 e HDL

A ação da PON1 sérica se dá, muito provavelmente, por seu envolvimento no transporte reverso do colesterol, uma propriedade antiaterogênica bem estabelecida da HDL (Noto, 2001). Ao lado de outras enzimas, a PON1 é capaz de inibir a oxidação da LDL reduzindo de modo significativo a enzima peroxidase lipídica, o que, por sua vez, diminui o acúmulo de colesterol nos tecidos periféricos (Mackness, 1993). Sabe-se que a modificação oxidativa da LDL na parede arterial tem papel central na patogênese da aterosclerose (Mackness, 1999).

É conhecido que a inibição da oxidação da LDL pela HDL é atribuída ao alto conteúdo de antioxidantes nesta lipoproteína, pelas propriedades antioxidativas da apoA-I e pela presença de muitas enzimas, dentre elas a PON, as quais previnem a formação ou degradam produtos bioativos da oxidação da LDL (Assman, 2003). Já foram relatadas várias funções antioxidativas da PON ligada à HDL as quais incluem a inibição da geração induzida por cobre de peróxidos lipídicos na LDL, a catalização da quebra dos fosfolipídios oxidados na LDL e a atividade fosfolipase A2-like que hidrolisa fosfolipídios oxidados biologicamente ativos (Assman, 2003; Li, 2003; Watson, 1995). Também já foi reportado um papel similar ao da peroxidase (peroxidase-like) para a PON, dado a sua capacidade de inibir a oxidação também da HDL, preservando assim suas funções antiaterogênicas e a habilidade para eliminar oxidantes potentes (como os hidroperóxidos e o peróxido de hidrogênio), os quais estão envolvidos na aterosclerose (Aviram, 1998a; Li, 2003).

Sabe-se que a PON1 inibe o influxo de colesterol através da redução da formação de LDL oxidada (inibindo a liberação pelos macrófagos do ânion superóxido e sua consequente oxidação da LDL mediada por células), do aumento da quebra de lípidos oxidados específicos na LDL oxidada e pela diminuição da captação, pelos macrófagos, da LDL oxidada (Aviram, 2004; Rozenberg, 2003), reforçando a função antiaterogênica e de redução do estresse oxidativo sérico de PON1.

1.2.3 Polimorfismos de PON1 e atividade enzimática

Mais de 160 polimorfismos já foram descritos no gene da PON1 (Costa, 2005). Entretanto, a base molecular dos polimorfismos na atividade da PON1 baseia-se em uma mutação missense que faz com que sua atividade seja parcialmente determinada de modo genético: uma substituição de aminoácido na posição 192, onde há a troca de uma glutamina (Q) por uma arginina (R) (G/A: Gln/Arg), origina duas aloenzimas cujas atividades relativas são substrato-dependentes (Costa, 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 identificadas, PON1-Q promove melhor proteção da LDL contra o acúmulo de peróxidos lipídicos *in vitro* (Mackness, 2003). Por outro lado, o alelo R parece constituir fator de risco independente para doença coronariana, ao qual é atribuída menor capacidade antioxidativa (Draganov, 2000).

A Paraoxonase 1 possui ainda um segundo polimorfismo exônico, localizado na posição 55. Neste há a troca de um aminoácido leucina (L) por metionina (M) (T/A: Leu/Met), afetando menos intensamente e de modo independente quanto ao primeiro polimorfismo, a atividade da enzima no plasma (Mackness, 2000; Mackness, 2003). A presença do alelo PON1m55 está associada a alteração nas concentrações séricas e à baixa eficiência da PON1 plasmática (Costa, 2005). A homozigose para o alelo Leu55 foi fator de

risco independente para doença cardiovascular em pacientes com diabetes em estudo realizado por Garin, 1997.

O alelo R no gene da PON-1 parece ser mais frequente na África Central, em alguns aborígenes ou regiões isoladas, enquanto que o alelo Q parece ser mais frequente em regiões temperadas da Europa e da América do Norte (Draganov, 2000).

Um único estudo realizado em euro e afro-brasileiros revelou distribuições distintas para a PON1 entre a população de caucasianos, afro-americanos e asiáticos analisados (Allebrandt, 2002). Em 2003, uma pesquisa sobre a distribuição mundial do polimorfismo 192 na PON1 apresentou o alelo R como o de maior frequência na maioria das populações estudadas e o alelo Q apresentou frequência mais alta apenas em Europeus e Índios Asiáticos (Scacchi, 2003).

1.2.4 Paraoxonase 2

Draganov e colaboradores (Draganov, 2004) sugeriram que a atividade lactonase de PON2 seja a maior dentre as 3 enzimas PON, ao passo que Khersonsky e colaboradores (Khersonsky, 2005) afirmaram que a atividade lactonase talvez seja a atividade fisiológica da família de enzimas PON. Sugere-se também, através dos resultados de análises filogenéticas, que a PON2 seja filogeneticamente a mais antiga das paraoxonases (Salzer, 2005)

Sabe-se hoje que o RNA mensageiro da PON2 é amplamente expresso em diversos tecidos humanos, incluindo coração, cérebro, fígado, rim, pulmão, testículos e placenta (Campo, 2004; Li, 2003). Apesar de ausente no plasma, a enzima PON2 parece possuir propriedades antioxidantes similares à PON1. Entretanto, seu substrato *in vivo* ainda não foi identificado (Campo, 2004). PON2 é capaz de diminuir o estresse oxidativo intracelular e de prevenir a oxidação da LDL mediada por células (Li, 2003). Também já foi demonstrado que o estresse oxidativo inativa a PON1 sérica enquanto a expressão de PON2 por macrófagos aumenta nesta situação (Nguyen, 2003).

Assim, dado a sua distribuição dar-se não só em células, mas também em diversos tecidos, a PON2 parece atuar na redução do estresse oxidativo intracelular ou no estresse oxidativo localizado (Aviram, 2004; Li, 2003; Oliveira, 2004).

Além de sua capacidade anti-oxidativa, PON2 também exibe uma importante atividade lactonase. Em um estudo realizado em 2006, Stoltz e colaboradores (Stoltz, 2006), concluíram que a deficiência de PON2, num modelo murino, favorecia a colonização do epitélio traqueal por *Pseudomonas aeruginosa*. Essa função se dá pelo envolvimento da PON2 na hidrólise de moléculas de N-3-oxododecanoyl homoserina lactona (3OC12-HSL), uma molécula de “quorum sensing” produzida pelas bactérias durante a infecção.

1.2.5 Associação de Polimorfismos no gene de PON2

A enzima PON2, assim como PON1, também possui diversos polimorfismos. Em um deles, que ocorre no códon 311 no gene da PON2, caracterizado pela troca do aminoácido cistina (C) por serina (S) (G/A: Cis/Ser), parece interagir com o alelo PON1-192R sendo, assim, fator de risco para doença coronariana (Sanghera, 1998). Ao avaliarem-se populações afro-americana, caucasianos e asiáticos, não foram observadas diferenças na frequência alélica da PON2 para esta mutação (Chan, 2000); este mesmo trabalho encontrou diferença nas frequências para a mutação PON1 L55M em asiáticos canadenses e para PON1 Q192R em caucasianos canadenses, sendo os genótipos L55 e Q192 mais comuns em caucasianos (Chan, 2000).

Um segundo estudo realizado por Stoltz e colaboradores (Stoltz, 2009) encontrou uma relação muito forte entre o polimorfismo de PON2-311C em humanos e a infecção de vias aéreas por *Pseudomonas aeruginosa*, em virtude deste polimorfismo apresentar uma capacidade de hidrólise de lactonas reduzida.

Um segundo polimorfismo no gene da PON2, caracterizado pela troca de um nucleotídeo adenina por guanina no codon 148 também vem sendo estudado quanto à diabetes mellitus não dependente de insulina (Hegele, 1997), sendo que a homozigose para esta mutação parece acelerar a hiperglicemia em portadores deste tipo de diabetes. Existem evidências de que alterações na glicose plasmática constituam fator predisponente para diversas anormalidades, como o aumento de triglicerídeos plasmáticos, o decréscimo da concentração de HDL, aumento da pressão sanguínea, hiperuricemia e a redução da densidade das partículas de LDL - situações onde há aumento da oxidação lipídica - os quais constituem fator de risco para aterosclerose e doença coronariana (Li, 2003).

1.2.6 Paraoxonase 3

O produto do gene da PON3 é uma glicoproteína de 40-kDa com atividade esterase dependente de cálcio, a qual hidrolisa uma grande variedade de substratos incluindo arilésteres e lactonas (Lu, 2006). PON3, como PON1, encontra-se associada à fração de HDL e ausente na LDL, e seu sítio primário de expressão parece ser o fígado, apesar de já terem sido detectadas quantidades significativas do mRNA da PON3 no rim (Campo, 2004).

Draganov e colaboradores demonstraram que a PON3 sérica de coelho também está fortemente associada à fração HDL, apresentando ação lactonase e sendo cerca de 100 vezes mais eficaz que a PON1 na proteção da LDL contra a oxidação induzida por cobre. PON1 é 200 vezes mais abundante que PON3, mas a contribuição total de PON1 à atividade lactonase em coelhos é menor que 1% durante a purificação de PON1 e PON3 a partir de soro de coelho (Draganov, 2000). Sob estresse oxidativo, a expressão de PON1 está diminuída enquanto a expressão de PON3 permanece inalterada (Reddy, 2001). Em contraste com PON1, PON3 apresenta atividade arilesterase muito limitada e nenhuma atividade paraoxonase, apesar de hidrolisar rapidamente lactonas (Aviram, 2004) e de sua atividade protetora contra a oxidação da LDL – induzida por cobre – ser melhor do que a relatada para a proteína PON1 (Esparragon, 2006).

Em trabalhos mais recentes foi possível observar e compreender melhor as funções desempenhadas pela PON3. Camundongos transgênicos, mantidos em dieta aterogênica e cuja expressão hepática de PON3 foi regulada para ser de 4 a 7 vezes maior do que o normal, apresentaram menos lesões ateroscleróticas do que os animais controle (Shih, 2007). Ainda neste estudo, foi observado que PON3 não circulava ligada à HDL do soro e que suas funções antioxidativas poderiam ocorrer em nível celular, primariamente nos hepatócitos. Além disso, a expressão de PON3 em camundongos *knock-out* para o receptor de LDL apresentaram também poucas lesões ateroscleróticas e diminuição da quimiotaxia de monócitos em relação ao MCP-1 (Shih, 2007). O equilíbrio entre pró-oxidação e oxidação e/ou condição redox foi recentemente determinado em pacientes com imunodeficiência adquirida (HIV), bem como entre indivíduos com imunodeficiência comum variável (Van der Ven, 1997).

Na imunodeficiência adquirida foi relatado o aumento de produtos da peroxidação lipídica (Sönnernborg, 1988) - avaliado por diferentes parâmetros de stress oxidativo – além da diminuição da quantidade de alguns antioxidantes (selênio e vitaminas A e E) (Beck, 1990; Begin, 1989; Semba, 1993) e de homocisteína (Miller, 1996). Aukrust e colaboradores (Aukrust, 1995a) e Van der Vem e colaboradores (Van der Vem, 1997) demonstraram, em pacientes soropositivos para HIV, concentrações significativamente mais elevadas de glutatona total e de glutatona oxidada em linfócitos CD4+, mas não em outras células, indicando alterações no estado redox do antioxidante nestes linfócitos que poderiam influenciar na patogênese da infecção pelo HIV.

Corroborando com as modificações oxidativas relatadas em pacientes com aids, Maselli (2007) observou recentemente ausência de relação entre os polimorfismos no gene da enzima paraoxonase 1 (PON1-192QR e/ou PON1-55LM) e a atividade enzimática basal da enzima, em indivíduos saudáveis e em um grupo de infectados por este vírus. Foi observado, entretanto, aumento da atividade enzimática nos portadores de HIV cuja contagem de linfócitos T CD4+ encontrava-se acima de 500 células/mm³, e que esta atividade não estava relacionada ao número de partículas virais (carga viral). Mais ainda, o aumento da peroxidação lipídica no plasma destes pacientes, avaliado por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), não dependeu do genótipo de PON1, de sua atividade enzimática, da contagem de células CD4+ ou ainda da carga viral.

No entanto, são escassos os estudos encontrados na literatura que abordam o papel das paraoxonases em imunodeficiências primárias que cursam com infecções recorrentes ou crônicas, como a imunodeficiência comum variável (Aukrust, 1995; Aukrust, 1997).

1.3 Imunodeficiência Comum Variável

A ICV é a imunodeficiência primária sintomática mais comum. Caracteriza-se pela redução dos níveis séricos de IgG e de pelo menos outra imunoglobulina (IgA e/ou IgM) e ausência ou deficiência da produção de anticorpos (Cunningham-Rundles, 2012).). Atinge igualmente ambos os sexos, com prevalência entre 1:20.000 e 1:50.000. A idade de apresentação da ICV varia, embora o início dos sintomas seja mais comum na primeira e na terceira décadas de vida (Cunningham-Rundles, 1999).

O diagnóstico é estabelecido em pacientes com hipogamaglobulinemia nos quais outras causas de hipogamaglobulinemias primárias bem definidas foram excluídas (agamaglobulinemia, hiper-IgM e doença linfoproliferativa ligada ao X). Também devem ser excluídas outras condições associadas às hipogamaglobulinemias secundárias, tais como: a) neoplasias (timoma, leucemia linfocítica crônica e linfomas; b) uso de drogas, sendo as mais comuns os imunossupressores e os anticonvulsivantes; c) infecções virais (vírus Epstein-Barr, HIV, citomegalovírus, rubéola congênita e parvovírus B19); d) enteropatias perdedoras de proteínas, como a linfangiectasia intestinal; e) síndrome nefrótica; f) queimaduras; g) doenças sistêmicas associadas à supressão da medula óssea. (Janeway, 1953; Hutloff, 1999; Salzer, 2005)

Estudos mais antigos já haviam descrito anormalidades em monócitos de pacientes com CVID, assim como defeitos na sinalização pela via do receptor toll-like (TLR)-9 em células B e em células dendríticas plasmocitóides (Cambroner, 2000).

Contudo, um número significativamente maior de anomalias foi descrito envolvendo o sistema imune adaptativo. A maioria dos pacientes apresenta níveis normais de linfócitos B no sangue periférico; entretanto, pode haver uma redução dos níveis de células B de memória (CD27), assim como de linfócitos B de memória que já sofreram troca de isotipo (IgD-IgM-CD27+). Caracteristicamente, células produtoras de anticorpos não estão presentes na medula óssea e outros tecidos (Warnatz, 2002).

A imunidade celular pode estar comprometida em 50% dos pacientes (Cunningham-Randles, 1999; Kokron, 2004) caracterizando-se pela inversão da relação CD4/CD8, tanto por diminuição de TCD4+ como por aumento de TCD8+, e por testes de hipersensibilidade cutânea negativos (PPD, tricofitina, candidina) Kokron, 2004).

Diversos defeitos de células T, incluindo baixa proliferação pós-estímulo com antígeno (Sneller, 1990), falha na geração de antígenos T-específicos pós-vacinação (Kondratenko, 1997), redução da expressão de moléculas de superfície (CD-40L) (Farrington, 1994) e uma alta taxa de apoptose de células T (Di, 2001) foram encontrados. Também foram observados, em um subgrupo de pacientes com ICDV com alta contagem de células T-CD8+, níveis elevados de IL-7 sérica, que está envolvida na proliferação de linfócitos (Holm,

2005). Estes pacientes possuíam uma alta incidência de esplenomegalia e autoimunidade com baixa resposta *in vitro* à estimulação com IL-7.

Apesar dos avanços em relação às bases genéticas da ICV, mais de 90% dos pacientes ainda não possuem diagnóstico genético estabelecido.

Recentemente, houve um grande aumento no número de pesquisas buscando identificar defeitos genéticos que possam levar à ICV. Das análises feitas, diversos genes apresentaram 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 (revisto em Patrick, 2008).

Dentre estas mutações destacam-se as encontradas no gene ICOS, responsável pela superindução de interleucina (IL)-10, necessária para a diferenciação terminal das células B para plasmócitos ou células de memória. Em pacientes com deficiência de ICOS é possível observar níveis reduzidos de imunoglobulinas, bem como redução na contagem de células B, principalmente nas subpopulações de memória, sugerindo anormalidades na maturação de células B dependente de células T nos centros germinativos (revisto em Patrick, 2008).

Também foram identificadas mutações no receptor TACI, membro da superfamília dos receptores de TNF (TNFRSF), que tem papel importante na sobrevivência, desenvolvimento e produção de anticorpos pelas células B. Em modelos murinos, a deficiência de TACI caracteriza-se pelas contagens de células B elevadas e presença de autoimunidade (principalmente lúpus eritematoso sistêmico). Diferentemente, em humanos, a deficiência de TACI foi descrita associada à ICV e à deficiência de IgA em alguns casos (revisto em Patrick, 2008).

As manifestações clínicas podem variar bastante de um indivíduo para outro. A grande maioria dos pacientes apresenta infecções bacterianas recorrentes ou crônicas, mas entre as suas manifestações incluem-se também doenças autoimunes/inflamatórias, doença granulomatosa, citopenias e neoplasias (Al-Herz, 2011).

Na ICV as neoplasias mais comuns são o carcinoma gástrico e os linfomas. A prevalência de câncer gástrico é 50 vezes maior do que na população geral, possivelmente

como decorrência de gastrite atrófica multifocal secundária à infecção por *H. pylori* ou anemia perniciosa (Cunningham-Rundles, 2009). A prevalência dos linfomas é cerca de 300 vezes maior em relação à população geral, sendo mais comuns em mulheres. Os mais frequentes são os linfomas não-Hodgkin (LNH), embora também possam ser detectados linfomas de linhagens T e NK (Chapel, 2008; Mellenkjaer, 2002).

Outras condições também encontradas na ICV e que, clinicamente, constituem diagnóstico diferencial com linfomas são a hiperplasia nodular linfoide (HNL) em sítios extranodais (Pereira da Silva, 2011) e a doença celíaca like (Notarangelo, 2006).

Pelo fato dos pacientes com ICV poderem apresentar infecções recorrentes e/ou crônicas, assim como doenças autoimunes/inflamatórias e neoplasias, foi sugerido que estas condições possam levar a um estímulo imunológico persistente e aumento do estresse oxidativo (Aukrust, 1994). Neste contexto, foram realizados alguns estudos abordando a atividade das paraoxonases nesta imunodeficiência.

Aukrust e colaboradores observaram o aumento de malonaldeído plasmático correlacionado a contagens baixas de linfócitos CD4+, presença de esplenomegalia e hiperplasia nodular linfoide do intestino (Aukrust, 1995). O mesmo grupo de pesquisadores relatou alterações no metabolismo da glutatona e da cisteína e aumento dos níveis plasmáticos da homocisteína (Aukrust, 1997) em subgrupos de pacientes com ICV.

Existem evidências de que os polimorfismos da PON 1 estejam relacionados a fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias, especialmente câncer de mama (Daí-Hua, 2012; Hussein, 2011; Liu & Liu, 2011), pulmão (Elkiran, 2007), câncer renal (Uyar, 2011), leucemia (de Aguiar Gonçalves, 2012; Kokouva, 2012) e linfomas não-Hodgkin (De Roos, 2006; Kerridge, 2002).

No entanto, mesmo após extensa revisão de literatura, não foram encontradas publicações referentes ao estudo do polimorfismo genético das PONs e suas possíveis implicações quanto à presença de infecções e processos linfoproliferativos em pacientes com imunodeficiência comum variável.

2. Objetivos

- Analisar em pacientes com imunodeficiência comum variável:
 - a distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos da PON1 e PON2.
 - a relação entre a atividade arilesterase das paraoxonases e seus polimorfismos com o perfil lipídico.
 - a relação entre os polimorfismos da PON1 e a presença de condições consideradas de risco para linfoma não-Hodgkin.
 - a relação entre os polimorfismos da PON1 e a presença de condições associadas à morbidade e mortalidade da doença.

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 ariesterase e a genotipagem das paraoxonases foram realizadas 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.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP em 12 de fevereiro de 2009, sob o número 0507/08 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi previamente obtido para cada paciente (anexo I).

3.2 Casuística

3.2.1 Pacientes

Foi avaliada uma coorte retrospectiva de 63 pacientes com diagnóstico de imunodeficiência comum variável sendo 28 homens (44,5%) e 35 mulheres (55,5%), com idades variando entre 24 e 81 anos e média de $42,35 \pm 14,62$ anos. O período de acompanhamento médico destes pacientes nesta instituição variou entre 6 e 25 anos à época do início deste estudo.

3.2.2 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 pela Organização Mundial de Saúde (Notarangelo, 2006) e pelo Grupo Latino Americano de Imunodeficiências Primárias - LAGID (Leiva, 2007).

3.2.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes sob corticoterapia sistêmica prolongada, infecções agudas, em uso de drogas imunossupressoras, tabagistas e gestantes.

3.2.4 Exames laboratoriais de rotina

Os exames foram realizados de acordo com os quadros clínicos que cada paciente apresentou durante sua avaliação e posterior evolução.

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); frações C3 e C4 do complemento; biópsias (linfonodos, estômago, intestino).

3.2.5 Indivíduos controle saudáveis

A frequência dos polimorfismos das PONs e a atividade arilesterase da PON1 foram estudados em 130 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, doadores de sangue na Fundação Pró-Sangue/ Hemocentro de São Paulo, com idades variando entre 22 a 60 anos (41,22 ± 10,895). Não foram consideradas as diferenças étnicas entre os indivíduos integrantes do grupo de estudo e controles sãos.

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 encontravam-se em jejum de 12 horas quando da coleta das amostras de sangue. Os controles saudáveis 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 e colaboradores (1998). Neste método, há remoção de proteínas celulares pela desidratação e precipitação com solução saturada de NaCl.

Utilizando-se uma pipeta de transferência, 500 μL da camada de leucócitos foram colocados em tubo de 1,5 mL. Foram acrescentados a seguir 750 μL de tampão de lise de sacarose (Tris-HCl 10mM, pH 7,5, sacarose 34mM, MgCl_2 10mM, Triton X-100 1%). Procedeu-se então 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*. Adicionou-se então 1mL de tampão de lise e foi realizada uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos, com novo descarte de sobrenadante. Esse processo foi repetido mais uma vez.

Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 500 μL 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 a vácuo.

A seguir, foram adicionados ao *pellet* 500 μL de solução TEN (Tris-HCl 10mM, pH8,2, EDTA 2mM e NaCl 400mM), 5 μL de SDS 10% e 3 μL de Proteinase K. Homogeneizou-se 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 150 μL de NaCl(5M). Após agitação vigorosa, a amostra foi centrifugada a 5.000 rpm durante 10 minutos.

O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo de 1,5mL contendo 600 μL de Isopropanol. A amostra então foi homogeneizada por inversão.

Sequencialmente, procedeu-se à centrifugação da amostra 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. Este processo foi repetido 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 feita por espectrofotometria utilizando-se o equipamento NanoDrop (NanoDrop, EUA).

3.5 Genotipagem para os polimorfismos

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

3.5.1 Determinação dos polimorfismos Q192R e L55M no gene da enzima paraoxonase 1 e S311C no gene da enzima paraoxonase 2 (PCR Multiplex)

As análises foram realizadas conforme descritas por Motti e colaboradores (2001). Para a digestão dos produtos da PCR-multiplex, foi utilizada a enzima de restrição Hinf-I, originando assim fragmentos capazes de caracterizar os três polimorfismos – PON1-Q192R, PON1-L55M e PON2-S311C.

O processo de PCR seguiu as seguintes relações: em uma reação de 25µL de volume utilizou-se 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 seguiu-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;

PON1-192F (5'→3'): TTG AAT GAT ATT GTT GCT GTG GGA CCT GAG;

PON1-192R (5'→3'): CGA CCA CGC TAA ACC CAA ATA CAT CTC CCA GaA;

PON2-311F (5'→3'): TTC AAC AGC ATG TCC CCT TAA;

PON2-311R (5'→3'): CTT CCC ATC ATA CAC TGA GGC TA;

Os produtos amplificados possuíam, respectivamente, 111pb, 144pb e 196pb. Deu-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 apresentariam da seguinte forma: caso houvesse um fragmento de tamanho 111pb, este seria denominado como alelo PON1-192Q, resultado da não digestão do fragmento amplificado pela enzima de restrição. Caso o fragmento amplificado fosse digerido pela enzima, restariam dois fragmentos, de 77 e 34pb. Na leitura do gel, a banda de 77pb foi determinada como sendo o alelo PON1-192R. Da mesma forma, se o fragmento contendo 144pb não fosse digerido pela enzima, este seria determinado como sendo o alelo PON1-55M. Se a amostra possuísse o alelo PON1-55L, o resultado seria o de uma banda de 122pb, resultante da digestão do DNA pela enzima de restrição. Para os alelos de PON2-S311C, as amostras que possuíam o alelo PON2-311S apresentavam o fragmento digerido após a reação, com 173pb. Caso o fragmento se mantivesse íntegro, com 196pb, foi determinada a presença do alelo PON2-311C.

As amostras amplificadas e posteriormente digeridas foram colocadas em gel de agarose a 3% com brometo de etídio (30μg), para corrida eletroforética (para os polimorfismos de PON1, tanto Q192R quanto L55M) e visualizadas em um transluminador VDS Image Master, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). Para tanto, as amostras foram diluídos 1:5 em tampão contendo 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e glicerol 30%. Foram aplicados 20μL do produto final da reação PCR-RFLP diluídos em 4μL do

tampão anteriormente descrito, 5µL de 50bpl foi utilizado como marcador de peso molecular

Para os polimorfismos de PON2-S311C, a visualização foi feita utilizando-se gel de poli(acrilamida) a 10%. O gel foi construído sobrepondo-se um gel UPPER a um gel LOWER, onde ocorria uma variação de concentração e pH com intuito de favorecer a dispersão das amostras no gel.

A eletroforese foi realizada em sistema Mini-PROTEAN® II da BioRad, utilizando-se espaçadores de 0,5mm de espessura. A construção do gel LOWER foi realizada utilizando-se solução contendo 4mL de tampão LOWER (150,24mM Tris, 1,39mM SDS e pH 8,8), 5,3mL de solução Acrilamida-Bisacrilamida (5,09mM Bisacrilamida e 42,21mM Acrilamida), 6,7mL de H₂O deionizada, 12,5 µL de Temed (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino) e 25µL de persulfato de amônio (APS) (10%). Após breve homogeneização, com o auxílio de uma pipeta de transferência, transferiu-se o tampão para o espaço entre as placas de vidro até que este atingisse a altura do pente de amostras, sem ultrapassá-lo. A solução então foi isolada do contato com o ar utilizando-se H₂O deionizada para a polimerização do gel.

Após a polimerização do gel LOWER, deu-se então o preparo do gel UPPER. Utilizou-se nesta 1,25mL de tampão UPPER (24,76mM Tris, 0,69mM SDS e pH 6,8), 0,8mL de solução Acrilamida-Bis Acrilamida (5,09mM Bisacrilamida e 42,21mM Acrilamida), 2,95mL de H₂O deionizada, 5 µL de Temed (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino) e 15µL de persulfato de amônio (APS) 10%). Novamente com uma pipeta de transferência, transferiu-se a solução para o espaço entre as placas de vidro. Após este passo, foi colocado o pente de separação de amostras, cobrindo-se os espaços restantes com a solução de acrilamida para a polimerização do gel.

Após a polimerização do gel UPPER e remoção do pente de amostras, o sistema foi transferido para a cuba de eletroforese, sendo então imerso em tampão de corrida (Tris 250mM, Glicina 1,92M e SDS 1%). Deu-se então a remoção das sobras de acrilamida não polimerizada do interior dos poços com a utilização de uma seringa e agulha, utilizando-se o próprio tampão de corrida para tal.

Para esta eletroforese, utilizou-se 8µL de cada amostra após a reação PCR-RFLP diluídos em 2µL do tampão contendo 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e glicerol 30%. Utilizou-se 50pb como marcador de peso molecular. A separação deu-se aplicando-se uma corrente constante de 170V por aproximadamente 50 minutos. Para a observação das bandas referentes aos polimorfismos foi utilizada coloração com nitrato de prata do Kit BioRad® Silver Stain foi utilizado o seguinte protocolo: descanso do gel em solução fixadora contendo 10% de ácido acético glacial, 40% etanol e 50% H₂O deionizada por 1 hora, seguida de lavagem com tampão oxidante utilizando-se 90mL de H₂O deionizada e 10mL do reagente oxidante por 5 minutos. Lavagem do gel por 15 minutos com H₂O deionizada (pelo menos 5 lavagens). Nova lavagem do gel, por 20 minutos, com solução de nitrato de prata empregando-se 10mL deste reagente diluído em 90mL de H₂O deionizada. A seguir, breve lavagem do gel empregando-se água deionizada (máximo de 30 segundos) seguida por aplicação de solução reveladora (3,2g de reagente revelador em 100mL de água deionizada). As lavagens foram realizadas da seguinte forma: após uma lavagem breve com 30mL de solução até a formação de precipitado, seguiram-se duas lavagens, de 5 minutos cada, até que fosse possível a observação das bandas. Por fim, para a interrupção do processo de revelação foi utilizado um banho de solução de 5% de ácido acético por 15 minutos. Após este tempo, a solução foi trocada por água deionizada para que se realizasse a leitura das bandas.

3.5.2 Determinação do polimorfismo PON2-A148G no gene da paraoxonase 2

A genotipagem para o códon 148 da PON2 foi realizada através de PCR de acordo com Hegele (1997). As sequências de primers utilizados foram:

PON2-148F (5'→3'): AGT GAA AAT TTT TAA ATT TGA AGC AT e

PON2-148R (5'→3'): TTG TTT GCA AAT GCT GGG GAT.

O processo de PCR utilizou Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, pH 8,3, MgCl₂ 7mM, 600mM de cada nucleotídeo trifosfato, 0,3mM de primers *forward* e *reverse* PON2-148, 1µg de DNA genômico e 1U de Taq-polimerase. A reação seguiu-se conforme descrito: 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.

Os produtos amplificados possuíam 130pb. Deu-se então a digestão de tais produtos, seguindo uma reação com 2 horas de duração, a 37°C constantes, com 2U de enzima Fnu4H-I, preparadas em tampão contendo Tris-HCl 10mM, pH 8,0, NaCl 60mM, MgCl₂ 10mM e β-Mercaptoetanol 1mM.

Ao final da digestão, o fragmento digerido pela enzima gerava dois fragmentos menores, representando o alelo A. Para o alelo G, o fragmento de DNA original não foi clivado pela enzima de restrição. As amostras foram, então, analisadas em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (30μg) e visualizados em sistema VDS Image Master, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). Para tanto, os produtos amplificados e posteriormente digeridos foram diluídos 1:5 em tampão contendo 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e glicerol 30%. Foram aplicados 16μL do produto final da reação PCR-RFLP diluídos em 4μL do tampão anteriormente descrito, além de 5μL de marcador de peso molecular de 50pb.

3.6 Análise da atividade arilesterase de PON1 sérica

A atividade arilesterase da PON1 foi realizada conforme descrita por Lorentz e colaboradores (1979) e modificada por Oliveira-Silva e colaboradores (1998). 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) taxa de internações por grupo (genótipo e alelos) nos últimos 5 anos; número, tempo total em dias de internação e duração de cada internação em relação a cada paciente nos últimos 5 anos; 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, bronquiectasias; 5) alterações histológicas do trato gastrointestinal compatíveis doença celíaca (padrão celíaco-like), hiperplasia nodular linfóide (HNL), metaplasia intestinal e/ou gástrica; 6) diagnóstico prévio de linfoma não-Hodgkin (LNH); 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.

Perfil Laboratorial. Os exames de perfil lipídico foram realizados na rotina do Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP, empregando-se um analisador automático Modular Analytics P-800 (Roche/Hitachi) e kits compatíveis (CHOL, HDL-C Plus e TG 2ª geração) fornecidos pelo fabricante do equipamento e os resultados, expressos em mg/dL.

O método empregado para as determinações de triglicérides, colesterol total, bem como das frações HDL-colesterol e VLDL-colesterol foi o enzimático colorimétrico automatizado. Para a determinação da LDL-colesterol, o método utilizado foi o cinético automatizado. Os valores de perfil lipídico considerados normais para a verificação de dislipidemia foram: colesterol total acima de 196mg/dL, HDL abaixo de 40mg/dL, LDL acima de 116mg/dL e triglicérides acima de 150,57 mg/dL (Parra ., 2010).

3.8 Análise estatística

Os dados contínuos, semicontínuos e semicategóricos foram inicialmente comparados com a Curva Normal pelo teste de Distância K-S e de Shapiro e classificados quanto à normalidade pela aderência a Curva de Gauss. Os dados paramétricos foram representados por média e desvio padrão da amostra e comparados através do teste T de Student, com ou sem a correção de Welch, dependendo da performance do Teste de Levene. Quanto à comparação das variâncias, para mais de duas amostras, pelo teste de Análise de Variância para medidas não repetidas com pós-teste de Student-Newman e Keuls, sendo considerada a performance do Teste de Bartlett's quanto à comparação das Variâncias e Análise de Resíduo do Tratamento. Os dados categóricos foram representados por frequência absoluta (n) e relativa(%); para a análise das matrizes de contingência utilizou-se o teste de Qui-quadrado de Pearson.

Os dados contínuos, semicontínuos e semicategóricos foram categorizados obedecendo dois critérios: 1) data de corte estabelecida por três ou mais referências bibliográficas concordantes e 2) através da curva ROC, estabelecendo quando havia assimetria significativa para os dados a soma da especificidade e sensibilidade, para obter o ponto de corte para a categorização dos dados (não se utilizou o produto para não hiper-estimar a sensibilidade).

Foi considerado para todo o estudo risco alfa menor ou igual a 5% de cometer erro tipo I ou de 1ª espécie e risco beta menor ou igual a 20% de cometer erro tipo II ou de 2ª espécie.

4.Resultados

4.1 Casuística

O grupo inicial de pacientes com ICV foi constituído por 63 indivíduos, sendo 28 (45,9%) do gênero masculino e 33 (55,1%) feminino e com média de idade de $42,34 \pm 14,62$ anos. A média de idade de início dos sintomas foi $16,90 \pm 12,78$ anos. A média de idade ao diagnóstico foi de $29,98 \pm 13,91$ anos, com um intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico de $13,08 \pm 12,13$ anos. Em média, o tempo total de doença dos pacientes foi de $25,44 \pm 13,98$ anos (Tabela 1).

No grupo controle foram avaliados 130 indivíduos normais, doadores de sangue, sendo 80 do gênero masculino (61,54%) e 50 do feminino (38,46%). A média de idade foi de $41,22 \pm 10,89$ anos.

Houve discreto predomínio de mulheres no grupo de pacientes e maior número de homens no grupo controle. A média de idade foi similar em ambas as populações. A idade de início dos sintomas variou desde 1 até 59 anos de idade com média de 17,16 anos. A média de idade ao diagnóstico foi de 30,20 anos e a do período de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico da ICV foi de 13,33, variando de 1 a 58 anos. O tempo de doença, representado período de tempo entre a idade de início dos sintomas e a idade atual (ao final deste estudo) variou dos 6 aos 73 anos com média de 25,4 (Tabela 1).

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

Dados Gerais	Pacientes (n=63)		Controles (n=130)	
Masculino	28 (45,90%)		80 (61,54%)	
Feminino	33 (55,1%)		50 (38,46%)	
Idade atual	$42,57 \pm 14,77$	39 (24 - 81)	$41,22 \pm 10,89$	39 (22 - 60)
Idade de início dos sintomas	$16,90 \pm 12,78$	15 (1 - 59)	-	-
Idade ao diagnóstico	$29,98 \pm 13,91$	27 (6 - 66)	-	-
ΔT	$13,07 \pm 12,13$	10 (1 - 58)	-	-
Tempo de doença	$25,44 \pm 13,98$	22 (6 - 73)	-	-

Os dados estão apresentados em anos na forma de média+ desvio padrão e mediana (IQR 25th, 75th).

ΔT = Intervalo entre início dos sintomas e diagnóstico da ICV.

4.2 Descrição individual dos polimorfismos de PON1-L55M e PON1-Q192R

As frequências alélicas dos polimorfismos PON1-55L, PON1-55M, PON1-192R e PON1-192Q do grupo de pacientes e controles saudáveis estão demonstradas na tabela 2. Em duas 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 PON1-55M ($p=0,0025$) e do genótipo 55MM ($p=0,003$) no grupo de pacientes em relação ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2: Descrição das frequências dos alelos e genótipos dos polimorfismos de PON1

Polimorfismo		Pacientes (n=61)		Controles (n=130)		p
		n	%	n	%	
PON1-Q192R	Genótipo					
	(n=61)					
	QQ	26	42,62	63	48,46	0.3627
	QR	26	42,62	43	33,08	
	RR	9	14,75	24	18,46	
	Alelo					
PON1-L55M	Q	78	63,93	169	65,00	0.8047
	R	44	36,07	91	35,00	
	Alelo					
PON1-L55M	Genótipo					
	(n=61)					
	LL	23	37,70	59	45,38	0.003
	LM	12	19,67	50	38,46	
	MM*	26	42,62	21	16,15	
	Alelo					
PON1-L55M	L	58	48,39	168	64,62	0.0025
	M*	64	51,61	92	35,38	

4.3 Descrição individual dos polimorfismos de PON2-A148G e PON2-S311C

Em três indivíduos do grupo controle não foi possível identificar o genótipo para os dois polimorfismos da PON2, provavelmente devido a mutações alélicas que não foram contempladas neste estudo. As frequências alélicas observadas não diferiram entre ambos os grupos, conforme se pode observar na tabela 3. A determinação do genótipo S311C não foi possível em 3 indivíduos controles, possivelmente decorrente da existência de mutações não abordadas neste estudo.

Tabela 3: Descrição das frequências dos alelos e genótipos dos polimorfismos de PON2

Polimorfismo		Pacientes (n=63)		Controles (n=130 ⁺)		p
		n	%	n	%	
PON2-S311C	Genótipo					
	SS	30	47,62	65	51,18	0.1505
	SC	27	42,85	40	31,50	
	CC	6	9,52	22	17,32	
	Alelo					
	S	87	69,04	170	66,93	0.7198
	C	39	30,95	84	33,07	
PON2-A148G	Genótipo					
	AA	45	71,42	79	60,77	0.3650
	AG	17	26,98	45	34,62	
	GG	1	1,6	6	4,62	
	Alelo					
	A	107	84,92	203	78,08	0.1436
	G	19	15,08	57	21,92	

⁺ valor de n para o polimorfismo S311C foi de 127, sendo o n para o polimorfismo A148G igual a 130

4.4 Determinação do perfil lipídico dos pacientes com ICV

Os valores de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos, bem como a relação HDL/LDL, para o grupo de pacientes com ICV, encontram-se descritos na tabela 4.

Tabela 4: Descrição do perfil lipídico dos pacientes ICV. Os dados estão expressos em mg/dL

	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
COLESTEROL	161,45	37,49	91,00	274,00
HDL	42,44	15,04	17,00	78,00
LDL	95,03	25,51	46,00	162,00
TRIGLICÉRIDES	113,45	73,20	16,00	488,00
VLDL	21,95	11,53	7,00	79,00
RELAÇÃO HDL/LDL	0,46	0,17	0,19	0,92

Os dados da tabela acima demonstram que, como grupo, os pacientes com ICV não apresentaram perfil lipídico compatível com dislipidemia em relação aos valores de referência (Parra, 2010) (colesterol total acima de 196mg/dL, HDL abaixo de 40mg/dL, LDL acima de 116mg/dL e triglicérides acima de 150,57 mg/dL).

4.5 Atividade arilesterase

A determinação da atividade arilesterase de PON1, nos 63 pacientes com ICV, apresentou os seguintes resultados: média de $85,59 \pm 21,38$ U/L, com valor máximo de 137,07 U/L e valor mínimo de 30,08U/L.

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. Não houve, portanto, diferença significativa em relação à atividade de PON1 nos dois grupos estudados ($p=0,090$).

Relação entre atividade arilesterase e os polimorfismos de PON-1. Não houve diferença quanto à atividade arilesterase entre os grupos ICV e controle. No entanto, a comparação entre os vários genótipos demonstrou que pacientes com o genótipo 55MM apresentaram atividade menor em relação aos genótipos 55LL e 55LM ($p < 0,001$). No grupo controle foi observada maior atividade arilesterase da PON1 associada ao genótipo 55LL ($p < 0,001$)(Tabela 5).

Tabela 5: Atividade arilesterase da PON1 referentes aos genótipos Q192R e L55M em pacientes com ICV e controles saudáveis.

	Polirmorfismo	Genótipo	Atividade (média+desvio)	p	
Pacientes	Q192R	QQ	80,78 + 25,34	p=0,373	
		QR	88,38 + 18,18		
		RR	89,46 + 19,69		
	L55M	LL	93,81 + 20,48	p< 0,001	
		LM	93,83 + 11,29		
		MM	73,63 + 21,44*		
	Controles	Q192R	QQ	95,35 + 26,82	p=0,102
			QR	95,64+21,16	
			RR	86,96 + 21,76	
L55M		LL	100,64 + 23,1*	p< 0,001	
		LM	84,9 + 18,56		
		MM	80,48 + 22,06		

4.6 Relação entre atividade arilesterase e perfil lipídico

A atividade arilesterase dos pacientes com ICV foi analisada em relação aos valores encontrados para colesterol total, HDL e LDL. Utilizando-se do cálculo dos coeficientes de relação de Pearson, observa-se que a atividade arilesterase de PON1 tem relação positiva para com estes indicadores.

O gráfico 1 demonstra a correlação entre a atividade arilesterase de PON1 e os valores de colesterol total dos indivíduos. O gráfico 2 mostra a correlação entre a atividade arilesterase de PON1 e os valores de HDL dos pacientes com ICV e no gráfico 3 está representada a correlação existente entre os níveis de LDL e a atividade arilesterase de PON1.

Figura 1: correlação entre a atividade arilesterase de PON1 e o valor de colesterol total do grupo de pacientes com ICV.

Figura 2: correlação entre a atividade arilesterase de PON1 e o valor de HDL do grupo de pacientes com ICV.

Figura 3: correlação entre a atividade arilesterase de PON1 e o valor de LDL do grupo de pacientes com ICV.

Conforme observado, os gráficos demonstram a existência de correlação positiva para colesterol total ($p=0,0104$), HDL ($p=0,0083$) e LDL ($p=0,0217$).

4.7 Relação entre parâmetros clínicos e laboratoriais

Características clínicas. As principais características clínicas estão descritas nas tabelas 6 e 7.

Comparação entre parâmetros clínicos e laboratoriais e genótipos do polimorfismo PON1 L55M. Pacientes com o genótipo 55MM apresentaram maior frequência de linfonodomegalia ($p=0,026$), HNL ($p=0,012$), IVAS ($p=0,001$), pneumonias ($p<0,001$) e maior taxa de internações ($p=0,029$). Não houve diferença entre os 3 grupos genotípicos em relação aos demais parâmetros analisados neste estudo (anexos 6 e 7).

Tabela 6: Relação entre parâmetros clínicos e laboratoriais e genótipos do polimorfismo PON1-L55M

Condição	Genótipo	Frequência	p<0,05
HNL	LL	0	0,026
	LM	0	
	MM	5 (19,20%)*	
Linfonodomegalia ⁺	LL	8 (34,80%)	0,012
	LM	3 (25%)	
	MM	18 (69,20%)*	
Taxa de Internações	LL	9 (39,10%)	0,029
	LM	2 (16,70%)	
	MM	16 (61,50%)*	
IVAS ⁺⁺	LL	18(38,3%)*	0,001
	LM	8(17,0%)	
	MM	21(44,7%)	
Pneumonias	LL	16(59,56%)*	< 0,001
	LM	10(83,33%)	
	MM	23(88,43%)	

HNL: hiperplasia nodular linfoide; ⁺Linfonodomegalia mediastinal e/ou abdominal; ⁺⁺IVAS: infecções de vias aéreas superiores

Comparação entre parâmetros clínicos e laboratoriais e alelos 55L e 55M. Pacientes com o alelo 55L apresentaram menor frequência de HNL ($p=0,007$), linfonodomegalia ($p=0,003$), IVAS ($p<0,001$), pneumonias ($p<0,001$), taxa de internações ($p=0,019$) e ocorrência de óbitos ($p=0,039$) (Tabela 7), não havendo relação com os demais parâmetros analisados (Anexo 7).

A presença de história familiar de imunodeficiências primárias e/ou neoplasias de linhagem hematológica foi mais frequente em pacientes com o alelo 55M ($p=0,045$) (Anexo 7).

Tabela 7: Relação entre os parâmetros clínicos e laboratoriais e presença do alelo 55L

Condições		Alelo L	Alelo M	$p<0,05$
IVAS	Sim	26 (55,30%)	21 (44,70%)	0,0001
	Não	9 (64,30%)*	5 (35,7%)	
Pneumonia	Sim	26 (53,10%)	23 (46,90%)	0,0001
	Não	9 (75%)*	3 (25%)	
Linfonodomegalia ⁺	Sim	11 (37,9%)	18 (62,1%)*	0,003
	Não	24 (75%)	8 (25%)	
HNL	Sim	0 (0%)	5 (100%)	0,007
	Não	35 (62,5%)*	21 (37,5%)	
Taxa de Internações	Sim	11 (40,7%)	16 (59,3%)	0,019
	Não	24 (70,6%)*	10 (29,4%)	
Óbitos	Sim	0 (0%)	3 (100%)*	0,039
	Não	35 (60,3%)	23 (39,7%)	

HNL: hiperplasia nodular linfoide; ⁺Linfonodomegalia mediastinal e/ou abdominal; ⁺⁺IVAS: infecções de vias aéreas superiores

Relação entre os polimorfismos PON1-L55M e internações hospitalares. Não foi observada diferença quanto ao número de internações ($p=0,683$) e tempo total de internação ($p=0,771$) realizadas nos últimos 5 anos entre os três grupos genotípicos (Tabela 8). No entanto, pacientes com o genótipo 55LM apresentaram maior média referente à duração de cada internação ($p=0,031$) (Tabela 8).

Não houve diferença quanto a estes 3 parâmetros em relação à presença dos alelos 55L ou 55M (Tabela 9).

Tabela 8: Relação entre os genótipos do polimorfismo PON1-L55M e internações

Internações	Genótipo	Média±Desvio	p
Número	LL	4,91±5,32	0,683
	LM	2,5±2,12	
	MM	5,79±5,45	
Tempo total de internação ⁺	LL	62,1±81,59	0,771
	LM	38,5±9,19	
	MM	77,05±84,95	
Duração de cada internação ⁺⁺	LL	10,04±3,87	0,031
	LM	26,5±26,16*	
	MM	12,29±6,59	

⁺Representada em dias; ⁺⁺Relação entre o número de dias de internação dividido pelo número de internações nos últimos 5 anos

Tabela 9: Relação entre a presença do alelo 55L ou 55M e quadro de internações em pacientes com ICV

		Alelo	Média±Desvio	p
Alelo LL/L_	Número de Internações	L	4,54±4,98	0,607
		M	5,79±5,45	
	Tempo total de internação ⁺	L	58,17±74,42	0,521
		M	77,05±84,95	
	Duração de cada internação ⁺⁺	L	12,79±10,75	0,887
		M	12,29±6,59	
Alelo MM/M_	Número de Internações	L	4,91±5,32	0,777
		M	5,48±5,29	
	Tempo total de internação	L	62,1±81,59	0,723
		M	73,38±81,44	
	Duração de cada internação	L	10,04±3,87	0,148
		M	13,64±9,57	

LL/L_: presença do alelo L em homozigotos LL ou heterozigotos LM; MM/M_ presença do alelo M em homozigotos MM ou heterozigotos LM;

⁺ Representada em dias;

⁺⁺ Relação entre o número de dias de internação dividido pelo número de internações nos últimos 5 anos.

Comparação entre parâmetros clínicos e laboratoriais e polimorfismos PON1

Q192R. Foi observada relação entre a presença de hepatomegalia e o genótipo PON1-192QR em pacientes com ICV ($p=0,045$). Contudo, não houve relação entre o polimorfismo Q192R de PON1 e os demais parâmetros analisados neste estudo (anexos 6 e 7).

5.Discussão

Neste estudo de uma coorte de pacientes com ICV foram realizadas a genotipagem dos polimorfismos L55M e Q192R da PON1 e A148G e S311C da PON2, a determinação da atividade hidrolítica de PON1 e a posterior comparação destes dados com a gravidade da doença e presença de possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin.

A família das enzimas paraoxonases compreende os membros PON1, PON2 e PON3, que compartilham homologia estrutural entre si. Embora o papel biológico mais conhecido das paraoxonases seja a prevenção da aterosclerose, estas enzimas também atuam sobre o estresse oxidativo envolvido na patogênese de outras condições como doenças inflamatórias intestinais, imunossenescência, aids, neoplasias, infecções e imunodeficiências primárias (revisto em Camps, 2009).

Clinicamente, o termo ICV engloba um grupo heterogêneo de síndromes caracterizadas por infecções bacterianas de repetição ou crônicas que ocorrem na grande maioria dos pacientes, embora também possam estar presentes infecções virais e oportunistas, doenças inflamatórias, autoimunidade e neoplasias (Cunningham-Rundles, 1999; Kokron, 2004; Quint, 2007). Esta grande heterogeneidade de manifestações clínicas pode dificultar o reconhecimento da doença retardando seu diagnóstico em torno de 6 ou mais anos (Cunningham-Rundles, 2012).

Nesta casuística, o período médio entre o início dos sintomas e o estabelecimento do diagnóstico de ICV foi de aproximadamente 13 anos, o que está acima dos relatos da literatura atual (Cunningham-Rundles, 2012). Considerando-se a longa evolução da doença em nossos pacientes (média de 25,4 anos), é possível que esta demora do diagnóstico seja devida ao fato de que em muitos deles os sintomas iniciais ocorreram em épocas em que havia grande desconhecimento da ICV por médicos generalistas (Cunningham-Rundles, 2012), agravado pelo falso conceito de que as imunodeficiências primárias teriam apresentação inicial quase exclusivamente em crianças.

Na maioria dos pacientes o diagnóstico de ICV é estabelecido entre a 3ª e a 4ª décadas da vida, sendo que apenas 20% dos casos são diagnosticados abaixo dos 20 anos de idade (Cunningham-Rundles, 1999; Cunningham-Rundles&Bodian, 2012). Nossos dados

corroboram essas observações, uma vez que a média e a mediana de idade ao diagnóstico foram 30,20 e 28 anos, respectivamente.

Pacientes com ICV apresentaram maior frequência tanto do alelo 55M quanto do genótipo 55MM em relação ao grupo controle, não sendo observadas diferenças em relação a outros polimorfismos L55M ou Q192R da PON1. A distribuição das frequências alélicas e dos genótipos da PON1-L55M e PON1-Q192R no grupo controle foi semelhante àquela anteriormente descrita em São Paulo em doadores de sangue (Ferreira, 2007).

Em ambos os grupos não houve diferença quanto à distribuição dos genótipos dos polimorfismos A148G e S311C da PON2, observando-se maior frequência dos genótipos AA e CS, respectivamente.

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, sendo que no soro encontra-se mais comumente associada ao HDL. Tem atividades de paraoxonase, arilesterase e lactonase e em condições fisiológicas está correlacionada à proteção contra doenças cardiovasculares. As enzimas PON2 e PON3 apresentam atividade de lactonase e também apresentam propriedades antioxidativas prevenindo a aterosclerose (revisto em Camps, 2009).

Neste estudo, a atividade arilesterase foi similar em pacientes e controles. A diferença observada quanto à distribuição de gêneros entre os dois grupos não deve ter interferido nesta análise, uma vez que as diferenças quanto aos fatores gênero, assim como idade, não são consideradas primordiais. A atividade da PON1 está presente já em recém-nascidos, atingindo os níveis encontrados em adultos a partir do primeiro ano de vida. Estes níveis parecem manter-se constantes por toda a vida e sem diferença entre homens e mulheres (Précourt, 2011).

Entretanto, este achado deve ser cuidadosamente analisado, considerando-se que pode haver variações individuais na atividade arilesterase associadas a diferentes causas, como sedentarismo e hábitos de vida (Précourt, 2011), doença coronariana, diabetes,

acidente vascular isquêmico, cirrose hepática e doença renal (Ayanacioglu, 1999; Li, 2003; Mackness, 2003).

As doenças acima não foram analisadas neste estudo dado sua baixa frequência no grupo de pacientes. Também não foram consideradas no grupo controle, uma vez que os indivíduos por elas acometidos não são aceitos como doadores de sangue. No entanto, não foi possível descartar totalmente a existência de outros fatores que diminuem (tabagismo passivo, dieta aterogênica) ou aumentam (ingestão moderada de álcool, polifénóis e vitaminas C e E) a atividade da enzima (Li, 2003; Van der Gaag, 1999).

A PON1 está presente no soro, fortemente associada à apoA-I, que é integrante das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Sua ação ocorre, muito provavelmente, por seu envolvimento no transporte reverso do colesterol, uma propriedade antiaterogênica bem estabelecida da HDL (Noto, 2001). Ao lado de outras enzimas, a PON1 é capaz de inibir a oxidação da LDL reduzindo de modo significativo a enzima peroxidase lipídica, o que, por sua vez, diminui o acúmulo de colesterol nos tecidos periféricos (Mackness, 1993).

Nos pacientes com ICV, os valores médios de colesterol total, LDL, triglicérides e VLDL mantiveram-se dentro dos limites considerados como de risco cardiovascular baixo, enquanto os valores de HDL corresponderam a um risco moderado de aterogênese. Também foi observada forte correlação positiva entre a atividade arilesterase e os níveis de colesterol total ($p=0,0104$), HDL ($p=0,0083$) e LDL ($p=0,0217$) (Figuras 1, 2 e 3).

Embora uma avaliação mais detalhada tenha demonstrado que 45,9% dos pacientes no grupo ICV apresentaram níveis de HDL reduzidos (abaixo de 40 mg/dL), apenas dois deles apresentavam história anterior de infarto do miocárdio e seis de hipertensão arterial leve ou moderada, não sugerindo um aumento de risco cardiovascular neste grupo de pacientes com ICV, o que está de acordo com outros relatos dados da literatura (Cunningham-Rundles, 1999).

Alguns fatores podem estar associados às modificações do perfil lipídico observadas. Um destes fatores são as infecções frequentes, que constituem as principais manifestações clínicas na ICV (Cunningham-Rundles, 1999). Nesta casuística, 52,38% dos pacientes apresentavam diarreia crônica ou recorrente, 77,79% infecções de vias aéreas superiores,

79,36% pneumonias e 52,38 bronquiectasias (58,73%) consequentes a pneumonias de repetição, o que está de acordo com o conhecimento de que níveis séricos diminuídos de colesterol podem estar presentes em diversas infecções bacterianas, virais e parasitárias (Rosenson, 2012). Outro fator possivelmente envolvido é a perda entérica decorrente de diarreia crônica e/ou má absorção intestinal levando à desnutrição moderada ou grave em alguns casos (Cunningham-Rundles, 1999; Goldberg AC, 2009; Kokron, 2004).

Também é possível que as modificações do perfil lipídico observadas sejam secundárias a alterações da função hepática, uma vez que 37,7% dos pacientes apresentavam hepatomegalia. Como já citado, o principal órgão responsável pela produção da enzima PON é o fígado (Aviram, 2005a; Aviram, 2005b; Campo, 2004; Durrington 2001) e, desta forma, é possível que a disfunção hepática interfira tanto no metabolismo lipídico como na produção das enzimas da família das PONs.

Existem várias condições associadas à diminuição dos níveis séricos de HDL bem documentadas na literatura que podem ser primárias (genéticas) ou secundárias a outras doenças (revistas por Rosenson, 2012). Entre estas são citadas: 1) doenças genéticas como: a hipoalfalipoproteinemia familiar devida a mutações no gene da apo A-I; a deficiência familiar de HDL, doença autossômica dominante associada a níveis séricos muito baixos de HDL e coronariopatia precoce; doença de Tangier, moléstia autossômica codominante na qual os níveis séricos de HDL são indetectáveis nos homozigotos e em concentrações muito baixas nos heterozigotos; hipolipidemia familiar combinada na qual os membros afetados apresentam níveis séricos de HDL, LDL e triglicérides muito baixos; 2) Resistência à insulina: os níveis séricos reduzidos de HDL constituem um dos componentes de um fenótipo aterogênico caracterizado por obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo2, dislipidemia e hipertensão (Macness, 1991).

Essas doenças genéticas são muito raras e não foram pesquisadas neste estudo. Também não foram observadas alterações clínico/laboratoriais compatíveis com o diagnóstico de resistência à insulina.

Outras causas de valores diminuídos de HDL estão relacionadas a alguns tipos de medicamentos (beta-bloqueadores, benzodiazepínicos e esteróides androgênicos anabólicos), tabaco, obesidade, dietas alimentares inadequadas. Neste estudo, poucos

pacientes estavam fazendo uso de benzodiazepínicos e nove apresentavam sobrepeso ou obesidade grau I ou II, sendo que nestes, níveis baixos de HDL foram detectados em apenas quatro. No entanto, não se pode descartar a ingestão de dietas inadequadas, principalmente nos indivíduos que apresentavam diarreia crônica.

Finalmente, cabe considerar que talvez possa haver alguma interferência na dosagem do HDL decorrente da reposição mensal da imunoglobulina IV realizada em todos os pacientes do grupo. É conhecido que as dosagens de HDL podem estar falsamente baixas em pacientes com gamopatias monoclonais (Murali, 2006) ou policlonais (Zapico-Muñiz, 2005) quando são utilizados analisadores automáticos.

Zapico-Muñiz e colaboradores (2005) observaram níveis muito baixos ou até mesmo indetectáveis de HDL em quatro pacientes com aids e hipergamaglobulinemia policlonal quando foi utilizado o método direto baseado no uso de enzimas modificadas por polietilenoglicol; posteriormente, estes valores baixos de HDL não foram confirmados quando foi utilizado um método de precipitação por ácido fosfotungstênio e ultracentrifugação. Os autores sugerem que no método direto possa ocorrer interação entre dextran sulfato, o primeiro reagente a ser colocado, e as imunoglobulinas em alta concentração, levando à formação de complexos ou agregação induzida pela imunoglobulina e que determinam alta dispersão da luz. É altamente improvável que este fenômeno esteja ocorrendo nos pacientes aqui analisados, uma vez as coletas de sangue foram realizadas imediatamente antes da infusão da imunoglobulina IV, momento no qual os níveis séricos de IgG encontram-se no seu nadir.

Interessantemente, Murali e colaboradores (2006) sugeriram que os valores séricos falsamente baixos de colesterol observados nos distúrbios monoclonais possam ser explicados pela existência de especificidades para vários antígenos nas paraproteínas, como DNA de dupla-hélice, tireoglobulina, insulina e apolipoproteína. Neste contexto, não se pode descartar a possibilidade da presença anticorpos antiapoliproteínas na imunoglobulina infundida nos pacientes com ICV, correspondente a um “pool” de no mínimo 5.000 doadores, sendo necessários estudos adicionais.

À semelhança de outras doenças como hepatites virais (Sandler, 2011), aids (Brenchley, 2006), cirrose (Urbaschek, 2001; Hart, 2010) e doença de Crohn (Pastor, 2007), a

ICV tem sido associada a um estado de ativação imune persistente (Aukrust, 1997; Litzman, 2012) decorrente de estímulo antigênico por agentes infecciosos e/ou associação com doenças inflamatórias, autoimunidade ou neoplasias (Cunningham-Rundles, 1999; Kokron, 2004; Quint, 2007).

Nesta casuística, a maioria dos pacientes apresentou evidências de ativação imune persistente, sendo detectadas infecções recorrentes ou crônicas, doenças autoimunes e neoplasias. Entre as infecções, as mais frequentes foram as de vias aéreas superiores (77,77%), pulmonares (79,36%) e diarreia (58,73%), o que está de acordo com relatos da literatura (Cunningham-Rundles, 1999; Cunningham-Rundles, 2012; Kokron, 2004), sendo que as IVAS e pneumonias foram mais comuns em indivíduos com genótipo 55MM em relação aos genótipos 55LL e 55LM (Tabela 6).

As bactérias encapsuladas mais comumente encontradas nas infecções respiratórias são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Branhmella catarrhalis* (Cunningham-Rundles, 1999). Infelizmente, não foi possível identificar os agentes causadores das infecções ou colonização pulmonar em grande número dos nossos pacientes, em virtude do uso contínuo de antibioticoterapia profilática ou de automedicação.

Também as doenças autoimunes foram diagnosticadas em uma parcela significativa de pacientes (29,5%), sendo mais comuns a doença celíaca-like (13,11%), a tireoidite (11,47%) e o vitiligo (6,55%). As demais doenças foram a anemia megaloblática (3 casos), anemia hemolítica (2 casos) PTI (3 casos), pancolite (2 casos), síndrome de Sjögren (1 caso), retocolite ulcerativa (1 caso) e diabetes insulino-dependente (1 caso). Não foi observada diferença na prevalência de autoimunidade entre os genótipos do polimorfismo L55M da PON1.

Finalmente, em relação às neoplasias, três pacientes apresentaram linfoma não-Hodgkin, sendo dois com o genótipo 55MM e um deles com 55LL. As demais neoplasias observadas foram câncer gástrico, de vesícula, intestino, adenocarcinoma de pele espinocelular e basocelular e tireoide, sendo observado apenas um caso em cada categoria. Com exceção do carcinoma basocelular, todas estas neoplasias estavam associadas ao

genótipo 55MM, embora não tenha havido diferença estatística em relação aos outros genótipos da PON1.

Aukrust e colaboradores (1994) sugeriram que a ativação imune persistente possa ter algum papel na imunopatogênese e no desenvolvimento de determinadas manifestações clínicas em subgrupos de pacientes com ICV. Neste contexto, demonstraram aumento do estresse oxidativo evidenciado através de alterações no metabolismo de glutathione e cisteína em linfócitos TCD4+ (Aukrust, 1995b). Posteriormente, relataram aumento da peroxidação lipídica caracterizado pela elevação no plasma de malonaldeído e homocisteína sob a forma reduzida e baixas quantidades de vitamina E (Aukrust, 1997).

Não observamos diferença da atividade arilesterase entre o grupo de pacientes com ICV e controles. No entanto, o mesmo não ocorreu quando a atividade arilesterase foi comparada em relação aos polimorfismos L55M da PON1, tendo sido observada menor atividade em pacientes com o genótipo MM em comparação aos genótipos LL e LM (Tabela 5).

Este achado pode explicar, ao menos parcialmente, a menor prevalência de infecções de vias aéreas observada em portadores do alelo L que apresentaram atividade mais elevada em comparação ao alelo M (Tabela 5). Corroborando esta hipótese, atividade arilesterase mais elevada foi encontrada também nos controles sãos com o genótipo LL, o que está de acordo com os dados de literatura (Précourt, 2011).

As PONs parecem desempenhar, através de sua função antioxidante, papel importante no desenvolvimento e sobrevida de tumores. Considerando o papel desta família de enzimas no metabolismo de agentes químicos durante exposições ambientais e ocupacionais, diversos grupos de pesquisa têm investigado se os diversos polimorfismos das paraoxonases podem estar relacionados a vários tipos de neoplasias (Saadat, 2011; De Roos 2006; Hussein, 2011; Schewikert, 2012).

Estes estudos têm sido dirigidos, fundamentalmente, aos polimorfismos Q192R e L55M que podem alterar a atividade arilesterase (Costa, 2005; Mackness, 2003).

Durante estudo populacional, De Roos e colaboradores (2006) investigaram diversos genes envolvidos no metabolismo de pesticidas/inseticidas organofosforados e sua possível

contribuição para o risco de linfomas, tendo observada correlação, embora fraca, entre o genótipo 55MM e o desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin. Por outro lado, estes dados não confirmaram os relatados por Kerridge e colaboradores (2002) que observaram maior risco relacionado ao polimorfismo Q192R da PON1.

Pacientes com ICV podem desenvolver processos linfoproliferativos considerados benignos ou neoplásicos (Pereira da Silva, 2011). Entre os malignos, os mais prevalentes são os linfomas não-Hodgkin (LNH), principalmente os de linhagem B, extranodais e bem diferenciados, embora também possam ser detectados linfomas de linhagens T e NK. Mais raramente, também pode ser detectado o linfoma Hodgkin (Chapel, 2008; Mellemkjaer, 2002).

A prevalência de linfomas na ICV é 300 vezes mais alta do que na população geral (Cunningham-Rundles, 1999), com um risco aumentado da doença estimado em 18 vezes (Quinti, 2007). No entanto, este risco é considerado relativamente pequeno em comparação a outros pacientes imunocomprometidos, tais como portadores de aids (risco aumentado de 78 vezes) e receptores de transplantes de órgãos sob terapia imunossupressora (risco aumentado de 80 vezes) (Grulich, 2007) nos quais as infecções por vírus oncogênicos parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de linfomas. Nestes dois últimos casos, as principais causas da susceptibilidade aumentada para neoplasias linfoides são as deficiências do sistema imune adaptativo, particularmente de células T (Grulich, 2007).

De um modo geral, as características dos linfomas que acometem pacientes com imunodeficiências diferem daqueles presentes em indivíduos previamente imunocompetentes. Nestes últimos, por exemplo, os linfomas que aparecem no tecido linfoide associado à mucosa (MALT), denominados linfomas MALT, geram infiltração linfoide monoclonal em locais que comumente não apresentam tecido linfoide (sítios extranodais) como estômago e pulmão. Ao contrário, em pacientes com ICV, é frequente a detecção de infiltrados linfoides de caráter reativo policlonal ou, menos comumente, oligoclonal ou até mesmo monoclonal em tecidos associados ao MALT ou extranodais, não necessariamente associados a linfomas, o que torna difícil a distinção entre o caráter benigno ou maligno desses achados (Elenitoba-Johnson, 1997).

Conforme acima citado, nesta casuística apenas três pacientes apresentavam linfoma não-Hodgkin, dois deles com o genótipo 55MM e um com 55LL. Não encontramos na literatura trabalho relacionando genótipos da PON1 à presença de linfomas em pacientes com ICV para comparação de nossos resultados.

Entre as manifestações consideradas benignas na ICV, as mais comuns são esplenomegalia, linfonodomegalia e hiperplasia nodular linfoide (Pereira da Silva, 2011) que, no entanto, têm sido classificadas como fatores de risco para LNH na população geral (De Roos, 2006; Freedman, 2012; Kerridge, 2002)

Durante estudos populacionais, as condições mais frequentemente diagnosticadas ou implicadas no desenvolvimento de LNH são: 1) história familiar de linfomas ou de outra neoplasias de linhagem hematológica; 2) exposição a agentes químicos: dioxina, herbicidas, agrotóxicos, tintas de cabelo; 3) uso de medicamentos e tratamentos: radioterapia, agentes imunossupressores, quimioterapia, antagonistas do TNF, fenitoinas; 4) agentes infecciosos: HIV, vírus Epstein-Barr (EBV), vírus da leucemia/ linfoma de célula T (HTLV-1), herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8), *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, vírus da hepatite C, *Mycobacterium tuberculosis*; 5) doenças autoimunes/inflamatórias: anemia hemolítica, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, tireoidite autoimune, síndrome de Sjögren, doença celíaca, doenças inflamatórias intestinais tratadas com azatioprina e 6-mercaptopurina; 6) imunodeficiências primárias: doença linfoproliferativa ligada ao X, síndrome linfoproliferativa autoimune, ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom, síndrome de Wiskott-Aldrich, agamaglobulinemia, hipogamaglobulinemias secundárias a medicamentos e imunodeficiência comum variável (revisto em Freedman, 2012).

Neste estudo, observamos a presença de esplenomegalia em 47,54% dos pacientes do grupo ICV, o que está de acordo com relatos da literatura (Cunningham-Rundles, 1999; Kokron, 2004, não havendo diferença entre os genótipos relacionados ao polimorfismo L55M da Pon1. Deve-se ressaltar, no entanto, que embora seja considerada um processo linfoproliferativo “benigno” na ICV, geralmente secundário a citopenias autoimunes (Cunningham-Rundles, 1999; Kokron, 2004), a esplenomegalia na população geral tem um caráter de anormalidade, podendo estar associada a numerosas condições como doenças infecciosas (mononucleose, endocardite bacteriana, calazar, malária), sarcoidose, doenças

autoimunes (artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, púrpura plaquetopênica idiopática, anemia hemolítica autoimune), cirrose criptogênica e neoplasias de linhagem hematológica (leucemias e linfomas) (Armitage, 2004).

A linfonodomegalia constitui o sintoma inicial em mais de 50% dos casos de linfomas, sendo mais frequentes a adenomegalia cervical (47%) juntamente com a cadeia supraclavicular. No entanto, pode ocorrer também enfartamento ganglionar axilar (5%), inguinal (3% casos) ou generalizado (12%) sendo que a esplenomegalia ocorre em cerca de 60 a 65% dos pacientes. O comprometimento extranodal atinge principalmente pulmões, fígado e a medula óssea (Bierman, 2004).

Embora a linfonodomegalia cervical possa ser valorizada no diagnóstico de linfomas na população geral (Armitage, 2004; Bierman et al., 2004), sua presença, isoladamente, não foi considerada neste estudo, uma vez que frequentemente pode ser detectada em pacientes com ICV como decorrência de numerosos processos infecciosos e/ou associação com doenças autoimunes (Cunningham-Rundles, 1999). Neste contexto, apenas a presença de linfonodomegalia mediastinal e/ou abdominal, observada em 47,54% dos nossos pacientes, foi analisada como fator possivelmente implicado no diagnóstico ou risco para linfomas.

Outra condição linfoproliferativa presente na ICV classificada como benigna e que pode simular um linfoma é a hiperplasia nodular linfoide em sítios extranodais como pulmão e trato gastrointestinal (Pereira da Silva, 2011). Nestas lesões podem ser detectadas pequenas populações de linfócitos B monoclonais, o que dificulta o diagnóstico diferencial com neoplasia. É importante salientar que já foram descritos pacientes com HNL e proliferação monoclonal que não evoluíram para malignidade mesmo após longo período de observação (Pereira da Silva, 2011). Do mesmo modo, já foram detectados rearranjos oligoclonais da cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH) e do receptor de células T (TCR) sem relação com natureza maligna da lesão histológica presente (Gompels, 2003). Estes dados são demonstrativos de que em pacientes com ICV diversos clones de linfócitos B disfuncionais em diferentes locais podem mimetizar uma neoplasia linfoide sem necessariamente evoluírem para malignidade (Pereira da Silva, 2011).

Neste contexto, foi observado em uma coorte de pacientes com ICV que a presença de infiltrados linfocíticos policlonais e de granulomas em pulmão, linfonodos e baço estava associada a um risco aumentado de 5 vezes para o desenvolvimento de neoplasias linfoides durante evolução de longo prazo (Chapel, 2008).

Nesta casuística, a HNL foi detectada em apenas 5 pacientes sendo todos com o genótipo 55MM. O diagnóstico foi estabelecido através de biópsia de duodeno, sendo caracterizada histologicamente pela presença de folículos linfáticos hiperplásicos, com infiltração linfocitária perifolicular e centros germinativos aumentados em tamanho e com intensa atividade mitótica, localizados principalmente na lâmina própria do intestino. Adicionalmente, destaca-se a ausência de plasmócitos nestas lesões (Ersoy, 2008; Kojima, 2009).

A patogênese da HNL é desconhecida, parecendo envolver um mecanismo compensatório para o funcionamento inadequado do tecido linfoide intestinal decorrente de um defeito de maturação de linfócitos B. Embora em crianças, aparentemente, tenha remissão espontânea, em adultos a HNL está frequentemente associada à imunodeficiência de anticorpos (ICV e deficiência de IgA), podendo representar uma resposta imune local aos repetidos estímulos antigênicos presentes no intestino como *Giardia lamblia*, alimentos, infecções bacterianas e virais (Webster, 1977). No entanto, mesmo em indivíduos que não apresentam imunodeficiências de anticorpos, parece haver uma forte associação entre HNL e linfoma intestinal (revisto em Freedman, 2012; Malamut, 2010).

Deste modo, embora considerada um processo linfoproliferativo benigno na ICV, analisamos a presença da HNL como uma das possíveis condições de risco para linfoma, uma vez que há relatos de sua evolução para esta neoplasia (Cunningham-Rundles, 1999; Cunningham-Rundles, 2012; Daniels, 2007; Washington, 1996).

Pacientes com doença celíaca, que se caracteriza pela presença de enteropatia sensível ao glúten, também estão sob risco maior de desenvolverem linfomas principalmente de células T, embora existam evidências da associação menos comum também com linfomas B (revisto em Freedman, 2012; Malamut, 2010).

Neste estudo, oito pacientes apresentaram quadro clínico e histológico compatível com doença celíaca. Não surpreendentemente, a pesquisa de anticorpo IgA anti-endomísio foi negativa em todos os pacientes e o diagnóstico foi estabelecido segundo critérios histológicos para doença celíaca e boa resposta à exclusão de glúten (Sollid & Lundin, 2000) e foi aqui denominado “padrão celíaco-like”. Deve ser ressaltada a dificuldade de se estabelecer o diagnóstico de doença celíaca associada às imunodeficiências de anticorpos. Dois anticorpos possivelmente implicados na fisiopatologia da doença celíaca e que constituem marcadores diagnósticos são os anticorpos anti-endomísio do isotipo A e anti-transglutaminase do isotipo G, que estão indetectáveis na maioria dos pacientes com ICV (Sollid & Lundin, 2000). Nesta casuística, não houve associação entre a presença de padrão celíaco-like e o polimorfismo L55M da PON1.

Finalmente analisamos, entre os fatores considerados de risco para LNH, a presença de história familiar de imunodeficiência primárias e/ ou de neoplasia de linhagem hematológica em parentes de primeiro grau dos pacientes com ICV, conforme citado na literatura (Freedman, 2012; Malamut, 2010; Wheat, 2007). Neste contexto, foi encontrada relação entre história familiar e a presença do alelo 55M.

Em suma, foi observada uma frequência maior de alguns dos fatores considerados de risco para LNH em relação aos polimorfismos L55M da PON1: o alelo M apresentou relação positiva apenas com história familiar de imunodeficiência e/ou neoplasia de linhagem hematológica, enquanto os pacientes com o genótipo 55MM apresentaram maior frequência de HNL e linfonodomegalia quando comparados àqueles com genótipos LL ou LM (Tabela 6).

O polimorfismo Q192R da PON1 também parece estar relacionado ao desenvolvimento de linfomas. Kerridge e colaboradores (2002) já apontaram uma possível associação deste polimorfismo ao desenvolvimento de linfoma e a exposição a fatores ambientais (pesticidas/inseticidas). Acredita-se que isso se deva principalmente à capacidade tanto anti-oxidante quanto hidrolítica das PONs. Sabe-se que o fenótipo 192RR apresenta atividade hidrolítica mais elevada em comparação ao fenótipo 192QQ que, por sua vez, representa, *in vitro*, ser mais anti-oxidante (Précourt, 2011).

Considerando-se este quadro, pode-se supor que indivíduos com a combinação 192QQ/55MM apresentariam não só a capacidade hidrolítica menor (o que se traduziria em maior sensibilidade à compostos xenobióticos) como também menor atividade de PON1 (definida pelo fenótipo 55MM), sugerindo uma maior sensibilidade a compostos xenobióticos e risco de linfoma. Neste estudo não foi possível analisar a interação Q192R/L55M uma vez que apenas três pacientes desenvolveram LNH, apresentando os genótipos 55MM192QR, 55MM192QQ e 55LL192RR.

Embora não se tenha observado diferença significativa quanto à frequência ou a atividade de PON1 nos diferentes grupos em relação ao polimorfismo Q192R, também não foram relatados, nos 61 pacientes estudados, eventos cardiovasculares, dado este que pode sugerir a participação da PON1 como um forte fator anti-oxidativo.

A grande heterogeneidade das manifestações clínicas, ao lado do retardo no diagnóstico da ICV, pode contribuir para maior morbidade e mortalidade da doença (Cunningham-Rundles, 2012).

Pacientes com o genótipo 55MM apresentaram maior morbidade caracterizada pela maior frequência de infecções de vias aéreas, o que está de acordo com dados da literatura (Cunningham-Rundles, 2012), e maior taxa de internações. Além disto, este genótipo também apresentou relação com a presença de fatores de risco para LNH como hiperplasia nodular linfoide e linfonodomegalias. Por outro lado, a menor morbidade da doença foi associada à presença do alelo 55L uma vez que os pacientes com este alelo apresentaram menor frequência de infecções, taxa de internações, HNL e linfonodomegalia.

As sequelas das repetidas infecções do trato respiratório – sinusopatia crônica, bronquiectasias, bronquite crônica, enfisema e fibrose pulmonar – constituem as principais causas de morbidade na ICV (Cunningham-Rundles, 1999; Cunningham-Rundles, 2012; Kokron, 2004). Embora neste estudo as bronquiectasias tenham sido diagnosticadas em 58,73% dos pacientes, sua presença não apresentou relação com o polimorfismo L55M da PON1.

É interessante ressaltar que os três indivíduos que faleceram durante o estudo não eram portadores de linfoma e apresentavam o genótipo 55MM, tendo sido observada relação negativa entre a ocorrência de óbitos e a presença do alelo 55L.

Estudos anteriores apontam que o alelo 55M da PON1 estaria relacionado ao câncer de mama (Saadat, 2012), dano ao DNA (Singh, 2011) e linfomas (De Roos, 2006). É possível que, em pacientes com ICV, a presença de uma única cópia deste alelo seja capaz de elevar o risco para o desenvolvimento de LNH.

Que seja de nosso conhecimento, este constitui o primeiro relato da maior frequência do polimorfismo 55MM e do alelo 55M da PON1 em pacientes com ICV.

6.Conclusões

É possível que, em pacientes com ICV, o alelo 55L possa desempenhar um papel de proteção contra infecções e esteja associado à menor frequência de fatores de risco para linfoma não-Hodgkin.

Os pacientes com o genótipo 55MM apresentaram maior morbidade da doença associada à maior frequência de infecções de vias aéreas e maior taxa de internações.

É possível que, em pacientes com ICV e genótipo 55MM, a presença de hiperplasia nodular linfoide, linfonodomegalia mediastinal/abdominal e/ou histórico familiar de imunodeficiências e de neoplasias hematológicas possam constituir sinais de alerta para o desenvolvimento de linfomas.

Nossos resultados são sugestivos de que em pacientes com ICV, o alelo 55L possa estar associado a um melhor prognóstico da doença. Por outro lado, é possível que o genótipo 55MM esteja associado a maior morbidade e maior risco para LNH.

7.Referências

- Aharoni, A., G. Amitai, K. Bernath, S. Magdassi, and D. S. Tawfik. High-throughput screening of enzyme libraries: thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments. *Chem. Biol.* 2005; 12:1281–1289.
- Aldridge W N. 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; 53:110–117.
- Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Fischer A, Franco JL, Geha RS, Hammarström L, Nonoyama S, Notarangelo LD, Ochs HD, Puck JM, Roifman CM, Seger R and Tang ML. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front. Immun.* 2011
- Allebrandt, K.V.; Souza, R.L.R.; Chautard-Freire-Maia, E.A. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-brazilians. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2002;180:151-6.
- Armitage JO. Cecil Textbook of Medicine 22nd edition Edited by Goldman L. and Ausiello D. Saunders; 2004. P. 990-994
- Assmann G., Nofer J.R. Atheroprotective effects of High-Density Lipoproteins. *Annu Rev Med.* 2003;54:321-41.
- Aukrust P, Müller F, Froland SS. Elevated serum levels of interleukin-4 and interleukin-6 in patients with common variable immunodeficiency (CVI) are associated with chronic immune activation and low numbers of CD4+ lymphocytes. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1994; 70:217-224
- Aukrust P, Yndestad A, Waehre T, Gullestad L, Halvorsen B, Damås JK. Inflammation in coronary artery disease: potential role for immunomodulatory therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2005 Nov;3(6):1111-24.
- Aukrust P. Svardal A.M, Müller F, et al. Increased levels of oxidized glutathione in CD4+ lymphocytes associated with disturbed intracellular redox balance in human immunodeficiency virus type I infection. *Blood* 1995; 86:258-67.
- Aukrust P., Berge R.K., Müller F., Ueland P.M., Svardal A.M., Frøland S.S. Elevated plasma levels of reduced homocysteine in common variable immunodeficiency--a marker of enhanced oxidative stress. *Eur J Clin Invest* 1997; 27(9):723-30.
- Aukrust P., Svardal A.M., Müller F., Lunden B. Berge R.K., Froland S.S., Decreased levels of total and reduced glutathione in CD4+ lymphocytes in common variable immunodeficiency are associated with activation of the tumor necrosis α system: possible immunopathogenic role of oxidative stress. *Blood* 1995; 86:1383-91.
- Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, et al. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999;26:892–904. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its function: a possible role for paraoxonase. *The Journal of Clinical Investigation.* 1998; 101:1581-90

- Aviram M. Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 37: 1301–1303
- Aviram M., Kaplan M., Rosenblat M., Fuhrman B. Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. *Handb Exp Pharmacol.* 2005a;170:263-300.
- 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
- Aviram M., Rosenblat M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Curr Opin Lipidol.* 2005b;16(4):393-9
- Ayanacioglu A.S., Cascorbi I., Mrozikiewicz P.M., Nacak M., Tapanyigit E.E., Roots I. Paraoxonase 1 mutations in a turkish population. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1999;157:174-7.
- Beck K.W., Schramel P., Hedl A., Jaeger H., Kaboth W. Serum trace element levels in HIV-infected subjects. *Biol Trace Elem Res* 1990; 25(2):89-96.
- Bégin M.E., Manku M.S., Horrobin D.F. Plasma fatty acid levels in patients with acquired immune deficiency syndrome and in controls. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1989; 37(2):135-7.
- Bierman PJ, Harris NL, Armitage JO. Cecil Textbook of Medicine 22nd edition Edited by Goldman L. and Ausiello D. Saunders; 2004. P. 1174-1184;
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006; 12:1365–71.
- Cambronero R, Sewell WA, North ME, et al. Up-regulation of IL-12 in monocytes: a fundamental defect in common variable immunodeficiency. *J Immunol* 2000;164(1):488–94.
- Campo S., Sardo A.M., Campo G.M., Avenoso A., Castaldo M., D'ascola A., Giunta E., Calatroni A., Saitta A. Identification paraoxonase 3 gene (PON3) missense mutations in a population of southern Italy. *Mutation Research.* 2004;546:75-80.
- Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human disease and methodological difficulties in measurement. *Clin Rev Clin Lab Science.* 2009, 46:83.
- Chan P.C., Wong B.Y.L., Cole D.E.C. Ethnic differences in allele frequencies at polymorphic sites of the paraoxonase genes, PON1 and PON2. *Clinical Biochemistry.* 2000;33:226.
- Chapel H, Lucas M, Lee M, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood.* 2008;112:277-286.
- Copley, S. D. 2003. Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7:265–272.
- Costa L.G., Vitalone A., Cole T.B., Furlong C.E. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:541-50.
- Cunningham-Rundles C. & Bodian C., Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients, *Clin Immunol.* 1999; 92: 34–48.

- Cunningham-Rundles C. The many faces of common variable immunodeficiency. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:301-5.
- Cunningham-Rundles C. The many faces of common variable immunodeficiency. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:301-5.
- Dai-Hua F, Cong-Hai F, Qiang J.Bo-Xiang Q, Juan L, Lu W. Differential effects of paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms on cancer risk: evidence from 25 published studies. *Mol Biol Rep* 2012; 39:6801–6809
- 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; 31:1800–1812
- De Roos AJ, Gold LS, Wang S, Hartge P, Cerhan JR, Cozen W, Yeager M, Charnock S, Rothman N, Severson RK. Metabolic Gene Variants and Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1647-1653.
- Di R.M., Serrano D. and Zhou Z. et al., Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas/fasligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS, *Clin Exp Immunol*. 2001; 125 (1): 117–122.
- Draganov D.I., Stetson P..L, Watson C.E., Billecke S.S., La Du B.N. 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.
- Draganov, D. I., and La Du, B. N. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 2004; 369, 78–88
- Durrington P.N., Mackness B., Mackness MI. Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:473-80.
- Elenitoba-Johnson KS, Jaffe ES. Lymphoproliferative disorders associated with congenital immunodeficiencies. *Semin Diagn Pathol*. 1997;14(1):35–47.
- Elkiran ET, Mar N, Aygen B, Gursu F, Karaoglu A, Koca. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. *BMC Cancer* 2007, 7:48
<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/7/48>
- Ersoy E, Gündoğdu H, Uğraş NS, Aktimur R. A case of diffuse nodular lymphoid hyperplasia. *Turk J Gastroenterol*. 2008 Dec;19(4):268-70
- Esparragon F.R., trujillo Y.H., Reyes A.M., Ortega E.H., Medina A., Perez J.C.R. Concerning the significance of Paraoxonase-1 and SR-B1 genes in atherosclerosis. *Ver Esp Cardiol*. 2006;59(2):154-64.
- Farrington M., Grosmaire L.S. and Nonoyama S. et al., CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (3) 1994, pp. 1099–1103
- Freedman AS, Friedberg JW, Aster JC. Clinical presentation and diagnosis of non-Hodgkin lymphoma. *UpToDate*, Jan 2012

- Furlong, C. E. Paraoxonases: an historical perspective. B. Mackness, M. Mackness, M. Aviram, and G. Paragh (ed.), *The paraoxonases: their role in disease development and xenobiotic metabolism*. Springer, Dordrecht, Netherlands. 2008; 3–31.
- Garin M.C., James R.W., Dussoix P., Blanche H., Passa P., Froguel P., Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest*. 1997;99(1):62-6.
- Goldberg AC, Goldberg-Eliaschewitz F, Sogayar MC, Genre J, Rizzo LV. Leptin and the Immune Response: An Active Player or an Innocent Bystander? *Ann NY Acad Sci* 2009; 1153:184-192
- Gonzalvo M.C., Hernandez G.F., Villanueva E., Pla, A. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. *Chem Biol Interact*. 1997;105:169-79.
- Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet*. 2007;370:59–67.
- Harte AL, da Silva NF, Creely SJ et al. Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm (Lond)* 2010; 7:15.
- Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, Hanley AJ, Harris SB, Tsui LC, Zinman B. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(10): 3373-7
- Holm AM, Aukrust P, Damas JK, et al. Abnormal interleukin-7 function in common variable immunodeficiency. *Blood* 2005;105(7):2887–90.
- Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999;397(6716):263–6.
- Janeway C, Apt L, Gitlin D. Agammaglobulinemia. *Trans Assoc Am Physicians* 1953;66: 200–2.
- Jensen, R. A. Enzyme recruitment in the evolution of new function. *Annu. Rev. Microbiol* 1976; 30:409–425. *Annu. Rev. Microbiol*. 30:409–425.
- Kazlauskas, R. J. Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 2005; 9:195–201.
- 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;118:477 – 81.
- Khersonsky, O., and D. S. Tawfik. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 2005; 44:6371–6382.
- Kojima M, Nakamura N, Itoh H, Motoori T, Hoshi K, Enomoto Y, Johshita T, Nakamine H. Histological variety of localized lymphoid hyperplasia of the large intestine: Histopathological , immunohistochemical and genotypic findings of 16 cases. *J Clin Exp Hematopathol*, 2009; 49(1): 15-21

- Kokouva M, Koureas M, Dardiotis E, Almpanidou P, Kalogeraki A, Kyriakou D, Hadjigeorgiou GM, Hadjichristodoulou C. Relationship between the paraoxonase 1 (PON1) M55L and Q192R polymorphisms and lymphohaematopoietic cancers in a Greek agricultural population. *Toxicology* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.07.003>.
- Kokron CM, Errante PR, Barros MT, Baracho GV, Camargo MM, Kalil J, Rizzo LV. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. *An Acad Bras Cienc.* 2004 76:707-26.
- Kondratenko I., Amlot P.L., Webster A.D. et al., Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. MRC Immunodeficiency Group, *Clin Exp Immunol* 108 (1)1997, 9–13.
- La Du B.N., Aviram M., Billecke S., Navab M., Primo-Parmo S., Sorenson R.C., Standiford T.J. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact.* 1999;119(120):379-88.
- Leiva LE, Zelazco M, Oleastro M, Carneiro-Sampaio M et al. Primary immunodeficiency diseases in Latin America: the second report of the LAGID registry. *J Clin Immunol.* 2007 ;27(1):101-8.
- Li H.L., Liu D.P., Liang C.C. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med.* 2003;81(12):766-79.
- Litzman J, Nechvatalova J, Xu J, Ticha O, Vlkova M and Hel Z. Chronic immune activation in common variable immunodeficiency (CVID) is associated with elevated serum levels of soluble CD14 and CD25 but not endotoxaemia. *Clinical and Experimental Immunology.* 2012; 170: 321–332
- Liu C & Liu L. Polymorphisms in three obesity-related genes (LEP, LEPR, and PON1) and breast cancer risk: a meta-analysis. *Tumor Biol.* 2011; 32:1233–1240
- Lu H, Zhu J, Ze Y, Qin J. Cloning, purification and refolding of human paraoxonase-3 expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *Protein Expr Purif.* 2006; 46(1): 92-9
- Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation.* 2003 Jun 10;107(22):2775-9
- Mackness B., Durrington P.N., Mackness M.I. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol.* 1998;31(3):329-36.
- Mackness B., Durrington P.N., Mackness M.I. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet.* 1999;353(9151):468-9.
- Mackness B., Mackness M.I., Durrington P.N., Arrol S., Evans A.E., McMaster D., Ferrieres J., Ruidavets J.B., Williams R., Howard A.N. Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest.* 2000;30(1):4-10.
- Mackness M.I., Arrol S., Durrington P.N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991a;286(1-2):152-4.
- Mackness M.I., Durrington P.N., Mackness B. The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2004;4(4):211-7.

- Mackness M.I., Harty D., Bhatnagar D., Winocour P.H., Arrol S., Ishola M., Durrington P.N. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1991b;86:193-9
- 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
- Malamut G , Verkarre V , Suarez F, Viallard J-F, Lascaux A-S, Cosnes J , Bouhnik Y et al. The Enteropathy Associated With Common Variable Immunodeficiency: The delineated Frontiers With Celiac Disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:2262–2275
- Maselli LMF. Estudo dos polimorfismos das paraoxonases 1 e 2 em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana e avaliação do potencial de peroxidação lipídica. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007
- Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem*. 1946 Jul;164:271-89.
- Mellemkjaer L, Hammarstrom L, Andersen V, et al. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clin Exp Immunol* 2002; 130:495.
- Miller A.S., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*. 1998;16:1215.
- Motti C, Dessì M, Gnasso A, Irace C, Indigeno P, Angelucci CB, Bernardini S, Fucci G, Federici G, Cortese C. A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis*. 2001 Sep;158(1):35-40.
- Murali MR, Kratz A, Finberg KE. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 40-2006. A 64-year-old man with anemia and a low level of HDL cholesterol. *N Engl J Med* 2006; 355:2772.
- Nguyen S.D., Sok D.E. Beneficial effect of oleolytated lipids on paraoxonase 1: protection against oxidative inactivation and stabilization. *Biochem J*. 2003;375:275-85.
- Notarangelo L, Casanova JL, Conley ME, Chapel H, Fischer A, Puck J, Roifman C, Seger R, Geha RS. 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 Apr;117(4):883-96.
- Noto, H.; Hashimoto, Y.; Satoh, H.; Hara, M.; Iso-o, N.; Togo, M.; Kimura, S.; Tsukamoto, K. Exclusive association of paraoxonase 1 with high-density lipoprotein particles in apolipoprotein A-I deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;289:395-401.
- Oliveira, S. A.; Mansur, A. P.; Ribeiro, C. C.; Ramires, J. A. F.; Annichino-Bizzacchi, J. M. PON 1 M/L55 mutation protects high-risk patients against coronary artery disease. *International Journal of Cardiology*. 2004;94:73-7.

- Parra S, Marsillach J, Aragonés G, Beltrán R, Montero M, Coll B, Mackness B, Mackness M, Alonso-Villaverde C, Joven J, Camps J. Paraoxonase-1 gene haplotypes are associated with metabolic disturbances, atherosclerosis, and immunologic outcome in HIV-infected patients. *J Infect Dis*. 2010 Feb 15;201(4):627-34.
- Pastor Rojo O, López San Román A, Albéniz Arbizu E, de la Hera Martínez A, Ripoll Sevillano E, Albillos Martínez A. Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13:269–77.
- Patrick FKY, Tarzi M, Chua I, Grimbacher B, Chee R. Common Variable Immunodeficiency: an Update on Etimology and Management. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2008; 28: 367-386
- Pereira da Silva S, Resnick E , Lucas M, Lortan J, Patel S, Cunningham-Rundles C, Gatter K, Liu Q, Jaffe E, Chapel H. Lymphoid Proliferations of Indeterminate Malignant Potential arising in Adults with Common Variable Immunodeficiency Disorders: Unusual Case Studies and Immunohistological Review in the Light of Possible Causative Events . *J Clin Immunol*. 2011; 31(5): 784–791.
- Précourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, Levy E. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis*. 2011 Jan;214(1):20-36.
- Primo-Parmo S.L., Sorenson R.C., Teiber J., La Du B.N. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*.1996;33:498-507.
- Quinti I, Soresina A, Spadaro G, 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.
- Reddy S. T., Wadleigh D. J., Grijalva V., Ng C., Hama S., Gangopadhyay A., Shih D. M., Lusis A. J., Navab M., Fogelman A. M. 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: 542–547
- Rosenson RS. HDL metabolism and approach to the patient with abnormal HDL-cholesterol levels. UpToDate, Jan 2012.
- Saadat M. Paraoxonase 1 genetic polymorphisms and susceptibility of breast cancer: a meta analysis. *Cancer Epidemiol*. 2012 apr; 36(2): 101-3
- Salzer U, Chapel HM, Webster AD, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 2005;37(8): 820–8.
- Sandler NG, Koh C, Roque A et al. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology* 2011; 141:1220–30.
- Sanghera, D.K.; Aston, C.E.; Saha, N.; Kamboh, M.I.; DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *American Journal of Human Genetics*.1998;62:36-44.
- Scacchi, R.; Corbo, R. M.; Rickards, O.; DE Stefano, G. F. New data on the world distribution of paraoxonase (PON1 Gln 192®Arg) gene frequencies. *Human Biology*. 2003;75:365-73.

- Semba R.D., Graham N.M., Caiaffa W.T., Margolick J.B., Clement L., Vlahov D. Increased mortality associated with vitamin A deficiency during human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch Intern Med*, 1993; 153(18):2149-54.
- Shih DM, Xia YR, Wang XP, et al. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res* 2007;100:1200–7
- Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Ichhpujani RL, Rai A. Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 Apr 15;252(2):130-7
- Sneller MC, Strober W. Abnormalities of lymphokine gene expression in patients with common variable immunodeficiency. *J Immunol* 1990;144(10):3762–9
- Sollid ML & Lundin K. Diagnosis and treatment of celiac disease. *Mucosal Immunology*, 2009; 2(1):3-7
- Sönnerborg A., Carlin G., Akerlund B., Jarstrand C. Increased production of malondialdehyde in patients with HIV infection. *Scand J Infect Dis*, 1988; 20(3):287-90
- Sorenson R.C., Primo-Parmo S.L., Kuo C.L., Adkins S., Lockridge O., La Du B.N. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1995;92(16):7187-91
- Stoltz DA, Ozer EA, Ng CJ, Yu JM, Reddy ST, Lusic AJ, Bourquard N, Parsek MR, Zabner J, Shih DM. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Apr;292(4):L852-60
- Stoltz DA, Ozer EA, Recker TJ, Estin M, Yang X, Shih DM, Lusic AJ, Zabner J. A common mutation in paraoxonase-2 results in impaired lactonase activity. *J Biol Chem*. 2009 Dec 18;284(51):35564-71
- Urbascsek R, McCuskey RS, Rudi V et al. Endotoxin, endotoxin-neutralizing-capacity, sCD14, sICAM-1, and cytokines in patients with various degrees of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25:261–8
- Van der Gaag M.S., van Tol A., Scheek L.M., et al. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity: a diet-controlled randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis*.1999;147:405-10
- van der Ven A.J., Boers G.H. Oxidative stress in immunodeficiency. *Eur J Clin Invest*, 1997; 27(9):731-2.
- Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braum M, Groth C, Wolff –Vorbeck G et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM–IgD –) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002; 99:1544 -51
- Washington K, Stenzel TT, Buckley RH, et al. Gastrointestinal pathology in patients with common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia. *Am J Surg Pathol*. 1996;20:1240–1252

Watson J. Advanced nursing practice ... and what might be. *N HC Perspect Community*. 1995 Mar-Apr;16(2):78-83

Webster AD, Kenwright S, Ballard J, Shiner M, Slavin G, Levi AJ, Loewi G, Asherson GL. Nodular lymphoid hyperplasia of the bowel in primary hypogammaglobulinaemia: study of in vivo and in vitro lymphocyte function. *Gut*. 1977 May; 18(5): 364–372

Wheat WH, Cool CD, Morimoto Y, et al. Possible role of human herpesvirus 8 in the lymphoproliferative disorders in common variable immunodeficiency. *J Exp Med* 2005; 202(4):479–84

Yu BP. Cellular defense against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994 (7); 4:139

Zapico-Muñiz E, Jorba-Castany O, Bonet-Marqués R, Ordoñez-Llanos J. A cause of falsely low HDL concentrations in HIV-infected patients: increased polyclonal serum immunoglobulin. *Clin Biochem*. 2005 Jan;38(1):46-9

8.Anexos

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****MODELO DE 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: DDD (.....)

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: Estudo dos polimorfismos das paraoxonases 1 e 2 em pacientes portadores de imunodeficiência comum variável.

PESQUISADOR: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 28.345

UNIDADE DO HCFMUSP: Depto de Clínica Médica HCFMUSP/ LIM-31

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

☐

RISCO MAIOR

☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 03 anos

—

1 – **Desenho do estudo e objetivo(s):** Muitos pacientes com outros tipos de imunodeficiências e que também apresentam infecções (como as causadas por *Cândida albicans*, pelo vírus da herpes, entre outros) possuem uma enzima (a paraoxonase) diminuída no sangue. A amostra que será coletada hoje faz parte de um estudo realizado em pacientes portadores de imunodeficiência comum variável, acompanhados pelo Serviço de Imunologia Clínica do HCFMUSP, onde serão estudadas as diferentes formas hereditárias (herdadas de pai e de mãe) desta enzima. Queremos saber se existe alguma relação entre a atividade (funcionamento) da enzima paraoxonase e as infecções observadas nos pacientes com imunodeficiências para entendermos melhor as causas destas infecções. Trata-se de estudo onde, mesmo determinando-se a diminuição desta enzima, não o(a) senhor(a) não terá benefícios e apenas estará ajudando uma pesquisa científica.

2 – Serão realizados testes laboratoriais para pesquisar a atividade (funcionamento) da enzima, bem como para a diferenciação dos possíveis tipos da mesma enzima (através do estudo de DNA). A sua amostra de sangue coletada hoje ficará armazenada no laboratório e poderá vir a ser utilizada em outro estudo, caso o(a) senhor(a) concorde após lhe explicarmos sobre o que seria o novo projeto de pesquisa.

3 – O sangue para estes testes será coletado só uma vez, em horário combinado com o(a) senhor(a).

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 – O(A) senhor(a) não terá nenhum benefício imediato, mas estará ajudando uma pesquisa científica que, no futuro, poderá ajudar outras pessoas e a entender melhor as causas destas infecções de repetição.

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

7 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são a **Dra. Myrthes Anna Aragna Toledo de Barros**, **Dra. Luciana Morganti Ferreira Maselli**, **Bruno Carnevale Sini** e o **Prof. Dr. Sérgio Bydlowski**, que podem ser encontrados na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 (PAMB) – 1 andar – sala 43 – São Paulo – SP - fones: (11) 3061-5544 r.264. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.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: não aplicável.

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

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.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas. O risco do estudo é mínimo, sendo apenas o de uma coleta de amostra de sangue.

13 - A sua amostra de sangue coletada hoje ficará armazenada no laboratório, conforme regras de sigilo e manutenção de material biológico vigentes, e poderá vir a ser utilizada em outro estudo, somente caso o(a) senhor(a) concorde após lhe explicarmos sobre o que seria o novo projeto de pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ” Estudo dos polimorfismos das paraoxonases 1 e 2 em pacientes portadores de imunodeficiência comum variável”.

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.

----- Assinatura
do paciente/representante legal Data ____/____/____

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 – GENOTIPAGEM DOS PACIENTES ICV

Número do Paciente	Genótipo 192 Q/R	Genótipo 55L/M	Genótipo/148	Genótipo/311
1	QQ	MM	AA	SC
2	RR	LL	AA	SS
3	RR	LL	AA	SC
4	QQ	MM	AA	SC
5	QQ	LM	AG	SC
6	QR	MM	AA	SC
7	QR	LM	AG	SS
8	QR	LL	AA	SS
9	QR	MM	AA	SC
10	QR	MM	AA	SC
11	QQ	MM	AA	SS
12	QQ	MM	AA	SS
13	QR	LL	AA	CC
14	QQ	LL	AG	SC
15	QQ	LM	AA	SS
16	QQ	MM	AA	SS
17	QQ	LM	AA	SS
18	QR	MM	AA	SC
19	QQ	LL	AG	CC
20	QR	LM	AG	SC
21	QQ	MM	AA	SC
22	QQ	LL	AG	SS
23	QR	LL	AA	SS
24	QR	MM	AA	SC
25	QQ	MM	AA	SC
26	QQ	LL	AA	SS
27	QR	LL	AA	SC
28	QR	LM	AA	SS
29	QQ	MM	AA	SS
30	QQ	MM	AA	SS
31	QR	MM	AA	SS
32	QR	MM	AA	SS
33	QQ	MM	AA	SC
34	QQ	MM	GG	SC
35	RR	LL	AG	SS
36	QQ	MM	AG	SC
37	QQ	MM	AA	CC
38	QQ	LL	AA	SC
39	QQ	LL	AA	SS
40	QR	MM	AA	SS
41	RR	LL	AG	SC
42			AA	CC

43	QR	LL	AA	SS
44	QQ	MM	AA	SS
45	QR	LM	AG	SS
46	QR	LM	AA	SC
47	QR	LL	AA	SC
48	QQ	MM	AG	CC
49	QR	LM	AA	SS
50	QR	LM	AG	SS
51	RR	LM	AG	SC
52	QR	LL	AG	SS
53			AG	SC
54	QR	MM	AA	SS
55	RR	LL	AA	SC
56	QQ	MM	AA	SC
57	QR	LL	AA	SS
58	QR	LL	AA	SS
59	RR	LL	AA	SS
60	QR	LL	AA	SC
61	QQ	MM	AA	CC
62	RR	LM	AG	SC
63	RR	LL	AG	SS

ANEXO3 – GENOTIPAGEM DOS CONTROLES SAUDÁVEIS

Controle	GENÓTIPO 192	GENÓTIPO 55	GENÓTIPO 148	GENÓTIPO 311
1	QQ	LM	AA	CC
2	QQ	LM	AA	SS
3	QR	LM	AA	SS
4	RR	LL	AA	SC
5	QQ	LL	GG	CC
6	QQ	LM	AA	SS
7	QQ	LL	AA	SC
8	QR	LM	AG	SC
9	QR	LM	AA	SS
10	QR	LM	AA	SS
11	QQ	MM	AG	SC
12	QR	LL	AA	SS
13	RR	LL	AA	SC
14	QQ	LL	AA	SC
15	QR	MM	AG	SC
16	QQ	MM	AA	SS
17	QR	LL	AA	SS
18	RR	MM	AA	SS
19	QQ	MM	AA	SS
20	RR	LL	AA	SS
21	QQ	LL	GG	SS
22	QQ	LM	AA	SS
23	QQ	LM	AA	SC
24	QQ	LL	AA	SC
25	RR	LL	AA	SS
26	RR	LL	AA	
27	QQ	LL	AA	SC
28	QQ	LL	AA	SC
29	QQ	LL	AA	SC
30	RR	LL	AG	SC
31	QQ	MM	AG	SC
32	RR	LL	AA	CC
33	QQ	LM	AA	SC
34	QQ	LL	AG	SS
35	QQ	MM	AG	SC
36	RR	LL	AG	SS
37	QQ	LM	AG	SC
38	QQ	MM	AA	SS
39	QQ	LL	GG	SS
40	QQ	LM	AA	CC
41	QQ	LL	AA	CC
42	QQ	LL	AA	SC
43	RR	LM	AG	SS
44	RR	LM	AG	SS
45	QQ	LM	AG	SS
46	QQ	LL	AA	SC
47	QQ	LM	AA	SS

48	QQ	LL	AA	SC
49	QR	LL	AG	SS
50	QR	LM	AG	SS
51	QQ	LL	AA	SS
52	QQ	MM	AG	SC
53	QQ	LM	AG	SS
54	RR	LL	AG	SS
55	QR	LM	AA	SS
56	RR	LL	AA	SS
57	QQ	LM	AA	SC
58	QQ	MM	AA	SC
59	QQ	LL	GG	SC
60	QR	LM	AA	SC
61	QR	LL	AA	SS
62	QR	LL	AG	SS
63	QQ	LL	AA	SS
64	QR	LM	AG	SS
65	QR	LL	AG	SS
66	QR	LL	AA	SC
67	RR	LL	AA	SC
68	QR	LM	GG	SC
69	QR	LL	AG	SS
70	RR	LL	AA	SC
71	QQ	LL	AG	SS
72	QQ	MM	AG	CC
73	RR	LL	AG	SS
74	QR	LL	AA	CC
75	QR	LL	AA	CC
76	QQ	LM	AA	SS
77	QQ	LL	AA	
78	QR	LL	AA	CC
79	QR	MM	AG	SC
80	QQ	LL	AG	SS
81	QQ	LM	AA	SS
82	QQ	LM	AA	SS
83	RR	LL	AA	SC
84	QQ	LM	AG	SS
85	QQ	MM	AA	SS
86	QQ	LM	AA	SS
87	QQ	LM	AA	SC
88	QQ	MM	AA	SC
89	QR	LM	AG	SS
90	QR	LM	AA	SC
91	QQ	MM	AG	SC
92	QR	LM	AG	SS
93	QQ	LM	AA	SC
94	QR	LL	GG	SS
95	QR	LM	AA	SS
96	QQ	LM	AA	SS
97	RR	LL	AA	SS

98	QR	LL	AA	SS
99	QQ	MM	AA	SS
100	QR	LM	AA	SS
101	QR	LM	AA	SC
102	QQ	MM	AA	SC
103	QQ	MM	AG	SC
104	QQ	MM	AG	SC
105	RR	LL	AG	
106	QQ	LM	AA	SS
107	QQ	LM	AG	SS
108	RR	LL	AG	CC
109	QQ	LM	AA	CC
110	QR	LM	AG	CC
111	QQ	LM	AA	SS
112	RR	LL	AA	SS
113	QR	LL	AG	CC
114	QR	LL	AA	SS
115	QR	LM	AG	CC
116	QR	LL	AG	CC
117	QR	MM	AA	SS
118	QR	LM	AA	SS
119	RR	LL	AG	CC
120	QQ	MM	AG	CC
121	QR	LL	AA	CC
122	QR	LM	AA	SS
123	QQ	LM	AG	CC
124	RR	LL	AG	CC
125	QR	LM	AA	SS
126	QR	LM	AG	CC
127	QQ	LL	AA	SS
128	QR	LM	AG	CC
129	QR	LM	AA	SS
130	RR	LL	AA	SS

ANEXO 4 – PERFIL LIPÍDICO DOS PACIENTES COM ICV

Número do Paciente	Arilesterase	Colesterol	HDL	LDL	Triglicérides	VLDL
1	62	178	71	95	61	12
2	70	91	18	48	124	25
3	128	175	31	97	236	47
4	93	157	54	92	56	11
5	99	209	27	134	350	
6	67	143	57	75	53	11
7	95	100	21	60	93	19
8	114	181	48	125	42	8
9	75	93	17	46	151	30
10	89	274	74	173	134	27
11	104	123	46	57	99	20
12	45	156	50	84	112	22
13	79	107	33	50	121	24
14	75	142	34	97	56	11
15	87	106	29	60	83	17
16	58	140	26	96	91	19
17	110	161	41	105	75	15
18	45	118	21	75	108	22
19	137	188	78	96	68	14
20	92	184	35	125	118	24
21	68	161	39	106	82	16
22	72	140	48	73	94	19
23	127	193	67	110	79	16
24	102					
25	65	144	37	89	92	18
26	121	154	61	66	134	27
27	108	131	34	73	122	24
28	81	150	26	100	118	24
29	30	125	20	61	221	44
30	87	195	46	123		26
31	59	153	51	77	124	25
32	61	92	26	52	71	14
33	56	153	3	82	37	7
34	59	141	39	83	97	18
35	65	133	31	81	106	21
36	127	173	59	98	79	16
37	93	171	30	100	207	41
38	73	122	33	82	37	7
39	79	177	55	83	197	39
40	86	150	50	87	19	94
41	84	168	45	107	16	79
42	93	179	50	101	142	28

43	82	194	54	128	62	12
44	55	180	41	119	100	20
45	91	138	40	86	12	61
46	113	192	41	119	160	32
47	99	151	46	94	53	11
48	76	254	34	122	488	
49	78	233	40	162	155	31
50	95	185	24	125	180	36
51	105	234	50	160	118	24
52	106	202	62	121	97	19
53	93	200	57	122	106	21
54	84	176	36	121	97	19
55	103	148	31	92	124	25
56	86	148	61	80	7	34
57	94	193	68	112	64	13
58	86	186	36	125	25	127
59	92	187	43	111	164	33
60	81	160	48	98	71	14
61	83	162	55	87	99	20
62	82	115	27	68	99	20
63	76	171	69	86	79	16

ANEXO 5 – DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES ICV (expressos em anos)

Número do Paciente	Idade de início sintomas	idade de diagnóstico da doença	tempo entre sintomas e diagnóstico	Idade atual	Tempo de doença
1	40	45	5	66	26
2	5	24	19	33	28
3	30	40	10	44	14
4	18	34	16	39	21
5	15	37	22	44	29
6	1	28	27	64	63
7	25	38	13	50	25
8	16	19	3	24	8
9	14	17	3	30	16
10	1	30	29	68	67
11	45	46	1	53	8
12	12	20	8	35	23
13	5	25	20	36	31
14	10	17	7	26	16
15	39	45	6	59	20
16	44	50	6	56	12
17	19	29	10	59	40
18	10	17	7	26	16
19	12	39	27	45	33
20	9	46	37	58	49
21	2	12	10	25	23
22	18	20	2	40	22
23	14	22	8	50	36
24	4	16	12	28	24
25	20	27	7	36	16
26	20	34	14	47	27
27	6	13	7	25	19
28	28	29	1	55	27
29	22	29	7	38	16
30	59	64	5	76	17
31	8	66	58	81	73
32	30	39	9	66	36
33	34	42	8	54	20
34	15	27	12	36	21
35	16	18	2	25	9
36	5	10	5	26	21
37	24	49	25	54	30
38	10	25	15	36	26
39	15	66	51	66	51
40	4	6	2	25	21
41	26	31	5	32	6

42	8	26	18	41	33
43	29	50	21	56	27
44	7	22	15	32	25
45	10	25	15	36	26
46	5	19	14	29	24
47	5	18	13	29	24
48	32	33	1	47	15
49	15	60	45	66	51
50	7	20	13	29	22
51	17	18	1	29	12
52	15	20	5	27	12
53	10	21	11	30	20
54	27	28	1	38	11
55	40	42	2	52	12
56	5	35	30	49	44
57	21	26	5	39	18
58	34	35	1	46	12
59	5	19	14	27	22
60	8	13	5	27	19
61	2	32	30	43	41
62	1	15	14	33	32
63	12	21	9	27	15

**ANEXO 6 – DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM ICV EM
RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS DE PON1**

Genótipo Q192R	Condição	Genótipo	Não	Sim	p
	HNL	RR	9 (100%)	0 (0%)	0,198
		QR	25 (96,20%)	1 (3,80%)	
		QQ	22 (84,60%)	4 (15,40%)	
	LNH	RR	8 (88,90%)	1 (11,10%)	0,649
		QR	25 (96,20%)	1 (3,80%)	
		QQ	25 (96,20%)	1 (3,80%)	
	Padrão Celíaco	RR	6 (66,70%)	3 (33,30%)	0,138
		QR	24 (92,30%)	2 (7,70%)	
		QQ	23 (88,50%)	3 (11,50%)	
	Diarreia	RR	4 (44,40%)	5 (55,60%)	0,681
		QR	12 (46,20%)	14 (53,80%)	
		QQ	9 (34,60%)	17 (65,40%)	
	Infecções de VAS	RR	2 (14,3%)	7 (14,9%)	0,478
		QR	4 (28,6%)	22 (46,8%)	
		QQ	8 (57,1%)	18 (38,3%)	
	Pneumonias	RR	1 (8,3%)	8 (16,3%)	0,527
		QR	4 (33,3%)	22 (44,9%)	
		QQ	7 (58,3%)	19 (38,8%)	
	Diarreia	RR	4 (44,40%)	5 (55,60%)	0,681
		QR	12 (46,20%)	14 (53,80%)	
		QQ	9 (34,60%)	17 (65,40%)	
	Internações	RR	6 (66,70%)	3 (33,30%)	0,415
		QR	16 (61,50%)	10 (38,50%)	
		QQ	12 (46,20%)	14 (53,80%)	
	Óbito	RR	9 (100%)	0 (0%)	0,62
		QR	25 (96,20%)	1 (3,80%)	
		QQ	24 (92,30%)	2 (7,70%)	

Genótipo Q192R	Condição	Genótipo	Não	Sim	p
	Linfonodomegalia	RR	6 (66,70%)	3 (33,30%)	0,652
		QR	13 (50%)	13 (50%)	
		QQ	13 (50%)	13 (50%)	
	esplenomegalia	RR	4 (44,40%)	5 (55,60%)	0,579
		QR	16 (61,50%)	10 (38,50%)	
		QQ	13 (50%)	13 (50%)	
	História familiar	RR	6 (66,70%)	3 (33,30%)	0,764
		QR	20 (76,90%)	6 (23,10%)	
		QQ	18 (69,20%)	8 (30,80%)	
	Hepato	RR	7 (77,80%)	2 (22,20%)	0,045*
		QR	12 (46,20%)	14 (53,80%)	
		QQ	20 (76,90%)	6 (23,10%)	
	Bronquiectasia	RR	4 (44,40%)	5 (55,60%)	0,539
		QR	10 (38,50%)	16 (61,50%)	
		QQ	7 (26,90%)	19 (73,10%)	
	Metaplasia	RR	7 (77,80%)	2 (22,20%)	0,172
		QR	12 (46,20%)	14 (53,80%)	
		QQ	17 (65,40%)	9 (34,60%)	

Genótipo L55M	Condição	Genótipo	Não	Sim	p
	HNL	LL	23 (100%)	0 (0%)	0,026*
		LM	12 (100%)	0 (0%)	
		MM	21 (80,80%)	5 (19,20%)	
	LNH	LL	22 (95,70%)	1 (4,30%)	0,587
		LM	12 (100%)	0 (0%)	
		MM	24 (92,30%)	2 (7,70%)	
	Padrão Celíaco	LL	21 (91,30%)	2 (8,70%)	0,724
		LM	10 (83,30%)	2 (16,70%)	
		MM	22 (84,60%)	4 (15,40%)	
	Diarreia	LL	10 (43,50)	13 (56,50%)	0,832
		LM	4 (33,30%)	8 (66,70%)	
		MM	11 (42,30%)	15 (57,70%)	
	Infecções de VAS	LL	5 (35,7%)	18(38,3%)	0,001
		LM	4 (28,6%)	8(17,0%)	
		MM	5 (35,7%)	21(44,7%)	
	Pneumonias	LL	7 (58,3%)	16(32,7%)	0,000
		LM	2 (16,7%)	10(20,4%)	
		MM	3 (25%)	23(46,9%)	
	Diarreia	LL	10 (43,50)	13 (56,50%)	0,832
		LM	4 (33,30%)	8 (66,70%)	
		MM	11 (42,30%)	15 (57,70%)	
	Internações	LL	14 (60,90%)	9 (39,10%)	0,029*
		LM	10 (83,30%)	2 (16,70%)	
		MM	10 (38,50%)	16 (61,50%)	
	Óbito	LL	23 (100%)	0 (0%)	0,12
		LM	12 (100%)	0 (0%)	
		MM	23 (88,50%)	3 (11,50%)	

Genótipo L55M	Condição	Genótipo	Não	Sim	p
	Linfonodomegalia	LL	15 (65,20%)	8 (34,80%)	0,012*
		LM	9 (75%)	3 (25%)	
		MM	8 (30,80%)	18 (69,20%)	
	esplenomegalia	LL	13 (56,50%)	10 (43,50%)	0,164
		LM	9 (75,00%)	3 (25%)	
		MM	11 (42,30%)	15 (57,70%)	
	História familiar	LL	20 (87%)	3 (13%)	0,126
		LM	8 (66,70%)	4 (33,30%)	
		MM	16 (61,50%)	10 (38,50%)	
	Hepato	LL	16 (69,60%)	7 (30,40%)	0,35
		LM	9 (75,00%)	3 (75%)	
		MM	14 (53,80%)	12 (46,20%)	
	Bronquiectasia	LL	7 (30,40%)	16 (69,60%)	0,802
		LM	5 (41,70%)	7 (58,30%)	
		MM	9 (34,60%)	17 (65,40%)	
	Metaplasia	LL	13 (56,50%)	10 (43,50%)	0,832
		LM	8 (66,70%)	4 (33,30%)	
		MM	15 (57,70%)	11 (42,30%)	

**ANEXO 7 – DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM ICV EM
RELAÇÃO AOS ALELOS DOS POLIMORFISMOS DE PON1**

LL/L_	Condição	Alelo	Não	Sim	p
	HNL	L	35 (62,5%)	0 (0%)	0,007*
		M	21 (37,5%)	5 (100%)	
	LNH	L	34 (58,6%)	1 (33,3%)	0,388
		M	24 (41,4%)	2 (66,7%)	
	Padrão Celíaco	L	31 (58,5%)	4 (50%)	0,651
		M	22 (41,5%)	4 (50%)	
	Infecções de VAS	L	9 (64,3%)	26 (55,3%)	0,000*
		M	5 (35,7%)	21 (44,7%)	
	Pneumonias	L	9 (75%)	26 (53,1%)	0,000*
		M	3 (25%)	23 (46,90%)	
	Diarreia	L	14 (56,0%)	21 (58,3%)	0,856
		M	11 (44,0%)	15 (41,7%)	
	Internações	L	24 (70,6%)	11 (40,7%)	0,019*
		M	10 (29,4%)	16 (59,3%)	
	Óbito	L	35 (60,3%)	0 (0%)	0,039*
		M	23 (39,7%)	3 (100%)	

LL/L_	Linfonodomegalia	L	24 (75,0%)	11 (37,9%)	0,003*
		M	8 (25,0%)	18 (62,1%)	
	esplenomegalia	L	22 (66,7%)	13 (46,4%)	0,111
		M	11 (33,3%)	15 (53,6%)	
	História familiar	L	28 (63,6%)	7 (41,2%)	0,112
		M	16 (36,4%)	10 (58,8%)	
	Hepato	L	25 (64,1%)	10 (45,5%)	0,157
		M	14 (35,9%)	12 (54,5%)	
	Bronquiectasia	L	12 (57,1%)	23 (57,5%)	0,979
		M	9 (42,9%)	17 (42,5%)	
	Metaplasia	L	21 (58,3%)	14 (56,0%)	0,856
		M	15 (41,7%)	11 (44,0%)	

(MM/M_)	Condição	Alelo	Não	Sim	p
	HNL	L	23 (41,1%)	0 (0%)	0,069
		M	33 (58,9%)	5 (100%)	
	LNH	L	22 (37,9%)	1 (33,3%)	0,873
		M	36 (62,1%)	2 (66,7%)	
	Padrão Celíaco	L	21 (39,6%)	2 (25,0%)	0,426
		M	32 (60,4%)	6 (75%)	
	Infecções de VAS	L	5 (35,7%)	18 (38,3%)	0,598
		M	9 (64,3%)	29 (61,7%)	
	Pneumonias	L	7 (58,3%)	16 (32,7%)	0,166
		M	5 (41,7%)	33 67,3%)	
	Diarreia	L	10 (40,0%)	13 (36,1%)	0,758
		M	15 (60,0%)	23 (63,9%)	
	Internações	L	14 (41,2%)	9 (33,3%)	0,53
		M	20 (58,8%)	18 (66,7%)	
	Óbito	L	23 (39,7%)	0 (0%)	0,167
		M	35 (60,3%)	3 (100%)	

(MM/M_)					
	Linfonodomegalia	L	15 (46,9%)	8 (27,6%)	0,121
		M	17 (53,1%)	21 (72,4%)	
	esplenomegalia	L	13 (39,4%)	10 (35,7%)	0,768
		M	20 (60,6%)	18 (64,3%)	
	História familiar	L	20 (45,5%)	3 (17,6%)	0,045*
		M	24 (54,5%)	14 (82,4%)	
	Hepato	L	16 (41,0%)	7 (31,8%)	0,476
		M	23 (59,0%)	15 (68,2%)	
	Bronquiectasia	L	7 (33,3%)	16 (40,0%)	0,61
		M	14 (66,7%)	24 (60,0%)	
	Metaplasia	L	13 (36,1%)	10 (40,0%)	0,758
		M	23 (63,9%)	15 (60,0%)	

RR/R_	Condição	Alelo	Não	Sim	p
	HNL	Q	22 (39,3%)	4 (80,0%)	0,078
		R	34 (60,7%)	1 (20,0%)	
	LNH	Q	25 (43,1%)	1 (33,3%)	0,739
		R	33 (56,9%)	2 (66,7%)	
	Padrão Celíaco	Q	23 (43,4%)	3 (37,5%)	0,753
		R	30 (56,6%)	5 (62,5%)	
	Infecções de VAS	Q	8 (57,1%)	18 (38,3%)	0,349
		R	6 (42,9%)	29 (61,7%)	
	Pneumonias	Q	7 (58,3%)	19 (38,8%)	0,359
		R	5 (41,7%)	30 (61,2%)	
	Diarreia	Q	9 (36,0%)	17 (47,2%)	0,383
		R	16 (64,0%)	19 (52,8%)	
	Internações	Q	12 (35,3%)	14 (51,9%)	0,194
		R	22 (64,7%)	13 (48,1%)	
	Óbito	Q	24 (41,4%)	2 (66,7%)	0,388
		R	34 (58,6%)	1 (33,3%)	

RR/R_		Q	13 (40,6%)	13 (44,8%)	
	Linfonodomegalia	R	19 (59,4%)	16 (55,2)	0,74
	esplenomegalia	Q	13 (39,4%)	13 (46,4%)	0,58
		R	20 (60,6%)	15 (53,6%)	
	História familiar	Q	18 (40,9%)	8 (47,1%)	0,663
		R	26 (59,1%)	9 (52,9%)	
	Hepato	Q	20 (51,3%)	6 (27,3%)	0,069
		R	19 (48,7%)	16 (72,7%)	
	Bronquiectasia	Q	7 (33,3%)	19 (47,5%)	0,288
		R	14 (66,7%)	21 (52,5%)	
	Metaplasia	Q	17 (47,2%)	9 (36,0%)	0,383
		R	19 (52,8%)	16 (64,0%)	

(QQ/Q_)	Condição	Alelo	Não	Sim	p
	HNL	Q	47 (83,9%)	5 (100%)	0,332
		R	9 (16,1%)	0 (0%)	
	LNH	Q	50 (86,2%)	2 (66,7%)	0,352
		R	8 (13,8%)	1 (33,3%)	
	Padrão Celíaco	Q	47 (88,7%)	5 (62,5%)	0,052
		R	6 (11,3%)	3 (37,5%)	
	Infecções de VAS	Q	12 (85,7%)	40 (85,1%)	0,818
		R	2 (14,3%)	7 (14,9%)	
	Pneumonias	Q	11 (91,7%)	41 (83,7%)	0,66
		R	1 (8,3%)	8 (16,3%)	
	Diarreia	Q	21 (84,0%)	31 (86,1%)	0,819
		R	4 (16,0%)	5 (13,9%)	
	Internações	Q	28 (82,4%)	24 (88,9%)	0,475
		R	6 (17,6%)	3 (11,1%)	
	Óbito	Q	49 (84,5%)	3 (100%)	0,46
		R	9 (15,5%)	0 (0%)	

(QQ/Q_)					
	Linfonodomegalia	Q	26 (81,3%)	26 (89,7%)	0,355
		R	6 (18,8%)	3 (10,3%)	
	esplenomegalia	Q	29 (87,9%)	23 (82,1%)	0,053
		R	4 (12,1%)	5 (17,9%)	
	História familiar	Q	38 (86,4%)	14 (82,4%)	0,692
		R	6 (13,6%)	3 (17,6%)	
	Hepato	Q	32 (82,1%)	20 (90,9%)	0,349
		R	7 (17,9%)	2 (9,1%)	
	Bronquiectasia	Q	17 (81,0%)	35 (87,5%)	0,493
		R	4 (19,0%)	5 (12,5%)	
Metaplasia	Q	29 (80,6%)	23 (92,0%)	0,215	
	R	7 (19,4%)	2 (8,0%)		