

**CARLA SILVA DA SILVEIRA**

**Interrelação entre 25-hidroxivitamina D,  
atividade arilesterase da PON1 e populações  
linfocitárias na imunodeficiência comum  
variável**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges  
Kallás

(Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo**

**2021**

**CARLA SILVA DA SILVEIRA**

**Interrelação entre 25-hidroxivitamina D,  
atividade arilesterase da PON1 e populações  
linfocitárias na imunodeficiência comum  
variável**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges  
Kallás

(Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo**

**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silveira, Carla Silva da  
Interrelação entre 25-hidroxivitamina, atividade  
arilesterase da PON1 e populações linfocitárias na  
imunodeficiência comum variável / Carla Silva da  
Silveira. -- São Paulo, 2021.  
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Alergia e Imunopatologia.  
Orientador: Esper Georges Kallas.

Descritores: 1.Paraoxonase 2.Linfócitos 3.25-  
hidroxivitamina D 4.Osteoporose 5.Inflamação  
intestinal 6. Imunodeficiência comum variável

USP/FM/DBD-343/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Dedico este trabalho a cada paciente desse estudo e em especial a minha mãe Marquise e minha filha Luiza.*

## AGRADECIMENTO

Antes de tudo, agradeço a Deus, essa força inteligente e inesgotável de esperança e força em meus dias e em sua forma de se transpor em pessoas e anjos que me acompanham e em principalmente em forma da melhor filha do mundo, Luiza (você é a maior força e amor desse mundo para eu estar aqui!), isso é a nossa História!; a minha mãe Marquise por apoio, amor incondicional e exemplo de mulher guerreira, de entrega, de determinação, obrigada! E em especial a minha avó Valdete *in memoria*, que se faz sempre presente, com certeza você está orgulhosa; finalmente a todos os seres de luz que me protegem e me iluminam em todos os momentos da minha vida!

Às mulheres de força e garra e amor e eis que seus exemplos me trouxeram até aqui amadas tia Marilu, tia Carmem Lúcia, tia Marta, tia Marley, tia Márcia, Dra. Rosinha e a Leninha, dinda adotada: gratidão aos meus irmãos Junior e Marise por estarem ao lado mesmo que distantes; a Berna por “simplesmente” ser da família, obrigada por seu amor de sempre.

Ao meu irmão dado por essa vida, o Daniel Barreto: irmão, e parceiro e eis que já são onze anos juntos! Obrigada por seu apoio, amizade e por todos os momentos e realizações que ainda certamente nos esperam juntos. Essa vitória é nossa!

Aos meus grandes amigos-irmãos: Celia Nascimento, Rafael Moreira, Janaína veloso, Ricardo Lhama e Theo: a presença de cada um de vocês mesmo distantes fisicamente me sustentaram nessa empreitada. Agradeço ainda ao Edouard primeiramente pela Duda e depois pelo apoio junto à Semantix e aos controles: obrigada!

Ao Dr Manuel Hermínio que “sem querer” incutiu em mim o amor pela metabologia e fora esse presente, agradeço pelos cuidados e amizade que extrapolam os laços de saúde: meu eterno muito obrigada.

À minha incansável, orientadora, a Dra. Myrthes Anna Maragna Toledo Barros, sempre atenciosa, zelosa e disposta a ensinar: muito obrigada por tudo!

Aos colegas de pós-graduação: Fabiana e ao Fernando pelos debates sobre nossas pesquisas e muito especialmente à Érica e à Renata: a vocês um agradecimento especial pela ajuda na finalização deste mestrado! Vocês foram mais que colegas: vocês foram amigas! Essa conquista aqui é para vocês também! Obrigada!

Aos funcionários Serafim Fidalgo, Oswaldo Junior e Rosana Coutinho, do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia. Sou muito grata a vocês por toda a atenção e boa vontade em todos os momentos nos quais precisei de alguma ajuda, informação ou qualquer outra coisa.

Ao pessoal do LIM-60: à Ruth, ao Carlos e ao Eder: sempre solícitos aos nossos pedidos.

À Jhosie, com a ajuda nas técnicas laboratoriais.

Às bibliotecárias da FMUSP e em especial à Isabel Figueiredo pela sua presteza e atenção sem medidas.

À Dra. Débora Levy, pelos ensinamentos e ajuda com as análises.

À Eleni, secretária do Programa de Pós-graduação em Alergia e Imunopatologia.

Aos meus orientadores e professores das graduações, que me inspiraram a trilhar a vida acadêmica. Em especial, em ordem cronológica: à Ellen Cristina Figaldo, Tharciano Luiz Braga, Marcos Bezerra, Rogério Wichi e Anderson Marçal as suas Histórias de superação me deram força em todos os momentos que passei, momentos bem parecidos a alguns. Obrigada pela força “sem querer”, vocês fizeram a diferença!

*Ousai acreditar em vós próprios e no que tendes no ventre!  
Quem não acredita em si próprio, mente .*

*Friedrich Wilhelm Nietzsche*

## **NORMALIZAÇÃO ADOTADA**

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

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

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

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



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>1,25:</b>	Hidroxivitamina D
<b>BAFF:</b>	Receptor do fator ativador de célula
<b>NK:</b>	Células natural killer
<b>DII:</b>	Doença inflamatória intestinal
<b>LNH:</b>	Linfomas não-Hodgkin
<b>ROS:</b>	Espécies reativas do oxigênio
<b>PON / PONs:</b>	Paraoxonase / paraoxonases
<b>CYP450:</b>	Citocromo P450
<b>CYP:</b>	Citocromo
<b>mRNA:</b>	RNA mensageiro
<b>GSH:</b>	Glutationa
<b>GSTP-1:</b>	Glutationa S-transferase p1
<b>IL:</b>	Interleucina
<b>PCR-RFLP:</b>	Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism, em inglês
<b>IVAS:</b>	Infecção de vias aérea superiores

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas de pacientes com imunodeficiência comum variável.....	39
Tabela 2: Perfil lipídico dos pacientes com imunodeficiência comum variável.....	39
Tabela 3. Frequência dos genótipos e dos alelos do polimorfismo PON1-L55M em pacientes com imunodeficiência comum variável e controles são.....	40
Tabela 4: Distribuição dos genótipos do polimorfismo PON1-L55M em relação aos dados demográficos de pacientes com imunodeficiência comum variável.....	41
Tabela 5: Distribuição dos genótipos do polimorfismo PON1 L55M e doenças de vias aéreas nos pacientes com imunodeficiência comum variável.....	43
Tabela 6: Distribuição dos genótipos do polimorfismo PON1-L55M em doenças ósseas e gastrointestinais nos pacientes com imunodeficiência comum variável.....	43
Tabela 7. Distribuição dos genótipos do polimorfismo L55M da PON- 1 em diversas manifestações clínicas na imunodeficiência comum variável.....	44
Tabela 8: Polimorfismo PON1-L55M e perfil lipídico nos pacientes com imunodeficiência comum variável.....	45
Tabela 9: Relação entre o polimorfismo PON1-L55M, atividade arilesterase e parâmetros laboratoriais nos pacientes com imunodeficiência comum variável.....	46
Tabela 10 : Valores das populações linfocitárias em relação aos genótipos do polimorfismo L55M PON-1 nos pacientes com imunodeficiência comum variável.....	47
Tabela 11 :Frequência de doenças de vias aéreas distribuídas segundo as categorias de vitamina D nos pacientes com imunodeficiência comum variável.....	48
Tabela 12: Frequências de doença óssea e de manifestações gastrointestinais distribuídas segundo as categorias de vitamina D com imunodeficiência comum variável	49
Tabela 13: Frequência de comorbidades distribuídas segundo as categorias de vitamina D nos pacientes com imunodeficiência comum variável.....	49

## RESUMO

Silveira CS. *Interrelações entre 25-hidroxivitamina D, atividade arilesterase da PON1 e populações linfocitárias na imunodeficiência comum variável* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A imunodeficiência comum variável (ICV) é a imunodeficiência primária sintomática mais comum em adultos caracterizando-se pela diminuição dos níveis séricos de IgG, associados à redução de IgA e/ou IgM e resposta pobre de anticorpose baixas resposta a vacinações. Os pacientes possuem perfil pró-inflamatório e frequentemente cursam com infecções crônicas ou recorrentes do trato respiratório e gastrointestinal, hepatomegalia, esplenomegalia, doenças autoimunes, inflamatórias e malignidades, especialmente as de natureza linfoproliferativas e conseqüentemente, possuem deficiências absorptivas de vitaminas e minerais dentre as quais as de vitamina D e cálcio. As paraoxonases (PON) compõem uma família multigênica de enzimas que incluem a PON1, PON2 e PON3 sendo a PON1a mais estudada; encontra-se associada à APO-I do HDL atuando sobre o estresse oxidativo bem como em doenças inflamatórias, AIDS, infecções neoplásicas e imunosenescência. Recentemente foi observada relação entre polimorfismos da PON1, atividade arilesterase e características clínicas em pacientes com ICV. De modo similar à arilesterase, a 25-hidroxivitamina D atua no sistema imune em estados oxidativos. A 25-hidroxivitamina D é um hormônio esteróide e que tem importante papel imunorregulatório em várias células do sistema imunológico: linfócitos T CD4+, CD8+ e células dendríticas apresentadoras de antígenos. Este estudo teve como objetivo avaliar as interrelações entre os polimorfismos da PON1, atividade arilesterase, os níveis de 25-hidroxivitamina D, populações linfocitárias e características clínicas em pacientes com imunodeficiência comum variável. Foram avaliados em grupos pacientes e controles saudáveis parâmetros laboratoriais clínicos (25- hidroxivitamina-D, magnésio, cálcio, sódio, potássio, vitamina B12, colesterol total e frações, triglicerídeos, proteína C reativa, hormônio paratireoideano, IgG, IgA, IgM, IgE, contagem total de linfócitos T CD3+,CD4+e CD8+, linfócitos B CD19), e densitometria óssea. Resultados: A distribuição dos genótipos e dos alelos do polimorfismo L55M no grupo de pacientes ICV foram similares às do grupo controle. Os pacientes portadores do genótipo 55LM apresentaram início mais precoce dos sintomas característicos da ICV, sendo provável que apresentem manifestações menos graves da ICV em relação aos pacientes 55LL e

55MM. A atividade arilesterase da PON-1 foi similar entre os portadores dos genótipos 55MM, 55LL e 55LM e controles sãos e não apresentou relação com o quadro clínico. Não houve associação entre os genótipos do polimorfismo L55M e a presença da maioria das manifestações clínicas analisadas, sendo esses achados compatíveis com a presença de níveis similares de atividade arilesterase entre os três genótipos analisados. A maioria dos participantes do grupo de estudo apresentou níveis séricos de vitamina D abaixo de 30 mg/dL, não havendo diferença entre os dois gêneros e demais parâmetros laboratoriais analisados, exceto uma correlação negativa com os níveis de PTH. Houve associação entre níveis séricos mais elevados de vitamina D e a menor frequência de atelectasias. Considerando que os portadores do genótipo 55LL apresentaram maior prevalência de linfonomegalias e níveis mais elevados de vitamina D, uma possibilidade é que nesse subgrupo de pacientes a presença de atelectasia esteja parcialmente associada à compressão torácica extrínseca. A presença de doença mineral óssea foi elevada ocorrendo em 41,6% dos pacientes, sendo mais frequente a osteopenia (65,0%) do que a osteoporose (35,0%). Os portadores do genótipo 55MM apresentaram contagens mais altas de linfócitos CD8+, ao lado de valores normais de linfócitos CD4+ e CD19+. Conclusão: A ausência de associação entre os níveis séricos de vitamina D, infecções crônicas, doenças autoimunes e osteopenia/osteoporose entre os portadores dos genótipos 55L, 55LM e 55MM, ao lado do aumento de linfócitos CD8+ em portadores do genótipo 55MM, permitem aventar a hipótese de que neste subgrupo de pacientes com imunodeficiência comum variável a doença mineral óssea possa ser parcialmente secundária a um distúrbio da imunidade celular.

Descritores: Paraoxonase; Linfócitos; 25-Hidroxitamina D; Osteoporose; Inflamação intestinal; Imunodeficiência comum variável.

## ABSTRACT

Silveira SC. *Interrelations between 25-hydroxyvitamin D, PON1 arylesterase activity and lymphocyte populations in variable common immunodeficiency* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Common variable immunodeficiency (CVI) is the most common symptomatic primary immunodeficiency in adults, characterized by decreased serum IgG levels, associated with reduced IgA and/or IgM and poor antibody response and low response to vaccinations. Patients have a pro-inflammatory profile and often present chronic or recurrent infections of the respiratory and gastrointestinal tract, hepatomegaly, splenomegaly, autoimmune and inflammatory diseases and malignancies, especially those of a lymphoproliferative nature. Consequently, patients may have absorptive deficiencies of vitamins and minerals, including vitamin D and calcium. Paraoxonases (PON) comprise a multigenic family of enzymes that includes PON1, PON2 and PON3 with PON1 being the most studied; findit is associated with HDL APO-I acting on oxidative stress as well as on inflammatory diseases, AIDS, neoplastic infections and immunosenescence. Recently, a relationship between PON1 polymorphisms, arylesterase activity and clinical features in patients with CVI has been observed. Similar to arylesterase, 25-hydroxyvitamin D acts on the immune system in oxidative states. 25-hydroxyvitamin D is a steroid hormone that plays an important immunoregulatory role in several cells of the immune system: CD4+, CD8+ T lymphocytes and antigen-presenting dendritic cells. This study aimed to evaluate the interrelationships between PON1 polymorphisms, arylesterase activity, 25-hydroxyvitamin D levels, lymphocyte populations and clinical features in patients with variable common immunodeficiency. Clinical laboratory parameters (25-hydroxyvitamin-D, magnesium, calcium, sodium, potassium, vitamin B12, total cholesterol and fractions, triglycerides, C-reactive protein, parathyroid hormone, IgG, IgA, IgM, IgE, total count of T lymphocytes CD3+, CD4+ and CD8+, B lymphocytes CD19), and bone densitometry. Results: The distribution of genotypes and alleles of the L55M polymorphism in the group of CVI patients were similar to those in the control group. Patients with the 55LM genotype had an earlier onset of symptoms characteristic of CVI, being likely to present less severe manifestations of CVI compared to patients 55LL and 55MM. The arylesterase activity of PON-1 was similar between carriers of

the 55MM, 55LL and 55LM genotypes and healthy controls and was not related to the clinical picture. There was no association between the L55M polymorphism genotypes and the presence of most clinical manifestations analyzed, and these findings are compatible with the presence of similar levels of arylesterase activity among the three analyzed genotypes. Most participants in the study group had serum vitamin D levels below 30 mg/dL, with no difference between the two genders and other laboratory parameters analyzed, except for a negative correlation with PTH levels. There was an association between higher serum levels of vitamin D and a lower frequency of atelectasis. Considering that carriers of the 55LL genotype had a higher prevalence of lymph node enlargement and higher levels of vitamin D, the possibility is that in this subgroup of patients, the atelectasis presence is partially associated with extrinsic chest compression. The presence of bone mineral disease was high, occurring in 41.6% of patients, with osteopenia (65.0%) being more frequent than osteoporosis (35.0%). Carriers of the 55MM genotype had higher CD8+ lymphocyte counts, along side normal CD4+ and CD19+ lymphocyte counts. Conclusion: The absence of association between serum levels of vitamin D, chronic infections, autoimmune diseases and osteopenia/osteoporosis among carriers of the 55L, 55LM and 55MM genotypes, together with the increase in CD8+ lymphocytes in carriers of the 55MM genotype, allow us to consider the hypothesis that in this subgroup of patients with variable common immunodeficiency, bone mineral disease may be partially secondary to a disturbance of cellular immunity.

Descriptors: Paraoxonase; Lymphocytes; 25-Hydroxyvitamin D; Osteoporosis; Intestinal Inflammation; Variable common immunodeficiency.

# SUMÁRIO

<b>1 Introdução.....</b>	<b>16</b>
1.1 imunodeficiência comum variável.....	16
1.2 PON e arilesterase.....	19
1.3 25-hidroxivitamina D.....	21
1.4 25-hidroxivitamina D e populações linfocitárias.....	25
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivos gerais .....	28
2.2 Objetivos específicos .....	28
<b>3 Materiais e Métodos.....</b>	<b>29</b>
3.1 Desenho de estudo e população .....	29
3.2 Exames laboratoriais.....	30
3.2.1 Análise de 25-hidroxivitamina D.....	31
3.2.2 Obtenção das amostras de soro/plasma. ....	31
3.2.3 Obtenção de DNA genômico a partir de células de sangue periférico .....	32
3.2.4 Genotipagem para polimorfismos.....	33
3.2.4.1 Determinação dos polimorfismos L55M no gene da enzima paraoxonase 1 ....	33
3.2.5 Análise da determinação da atividade arilesterase de PON1 sérica.....	34
3.2.5.1 Cálculo da atividade ariesterase.....	35
<b>4 Análise estatística.....</b>	<b>36</b>
<b>5 Ética em pesquisa.....</b>	<b>37</b>
<b>6 Resultados.....</b>	<b>38</b>
<b>7 Discussão.....</b>	<b>51</b>
<b>8 Conclusões .....</b>	<b>64</b>
<b>Referências .....</b>	<b>66</b>
<b>Anexos</b>	

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL

A imunodeficiência comum variável (ICV) é a imunodeficiência primária sintomática mais comum na idade adulta, afeta sem distinção ambos os sexos com uma prevalência de aproximadamente 1 / 25.000 (Bonilha et al, 2016; Picard et al, 2018). A ICV é caracterizada por baixos níveis séricos de IgG, IgA e / ou IgM e síntese de anticorpos prejudicada em resposta a vacinas e patógenos (Chapel, 2008; Peter, 2012) e ainda configura-se como erro inato da imunidade (Picard et al, 2018).

O início dos sintomas pode ocorrer em qualquer idade, contudo, ocorre frequentemente entre a segunda e quarta décadas de vida, com limites de média de idade 29 anos para homens e 33 anos para mulheres (Chapel et al, 2008) e, em menor proporção, durante a infância, com pico entre 8 e 10 anos de idade (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999; Resnick et al., 2012; Salzer; Warnatz; Peter, 2012).

Há casos em que o intervalo entre o início dos sintomas e a detecção da doença atinge 8 anos, sendo o diagnóstico por muitas vezes dificultado pela própria natureza da doença que atinge vários órgãos e sistemas, assim como pelo seu desconhecimento por médicos não especialistas (Chapel et al., 2008).

Os pacientes ainda devem preencher alguns requisitos: início dos sintomas após dois anos de idade; ausência de hemaglutininas e/ou resposta insatisfatória à vacinação; exclusão de outras possíveis causas que possam afetar a produção de anticorpos (Bonilla et al, 2016).

O modo de herança é predominantemente autossômico dominante e autossômico recessivo em cerca de 15% e ocorre em mutações genéticas (Castigli e. et al, 2005). As mutações podem ocorrer em um gene ou mais, afetando a imunidade humoral e a celular; no entanto, é provável que nos 85% pacientes restantes isso ocorra sem um defeito genético conhecido. Também é provável que além dos genes já identificados, outros genes possam estar envolvidos na patogênese da ICV (Vazdani et al., 2014).

As mutações mais frequentemente identificadas foram descobertas no gene do membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) (TNFRSF13B) que codifica TACI (ativador de transmembrana ligante da ciclofilina modulador de



cálcio), um membro da superfamília do receptor TNF específico de células B (Leone, 2018; Salzer et.al, 2009).

Os defeitos do TACI dificultam a sinalização dos ligantes BAFF (B-cell activating factor) e APRIL (a proliferation-Inducing Ligand) envolvidos na sobrevivência celular, apoptose e troca de isótopos e conseqüentemente dificultam a sobrevivência plasmática, maturação e recombinação de troca de classe e produção de Ig (Castigliet.al., 2004; Romberg et.al,2015). Os defeitos também comprometem a remoção de células B autorreativas no ponto central de tolerância de células B, aumentando assim a suscetibilidade de pacientes com ICV em desenvolver doenças autoimunes (Azizg,2017).

A função dos anticorpos também é prejudicada, embora, 90% dos pacientes demonstrem valores de linfócitos B periféricos normais, o que evidencia presença de defeitos nas fases finais do seu desenvolvimento. Outros pacientes apresentam fenótipo de células B imaturas com características peculiares: aumento do volume, uso restrito de famílias de gene VH e perda da capacidade de mutação dos genes da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (Braun, et al., Farrant et al.,1989).

Disfunção de monócitos/macrófagos e linfócitos T também pode estar presentes, sendo que em aproximadamente metade dos pacientes com ICV a disfunção ocorre em linfócitos T (Cunningham-Rundles, Bodian,1999; Kokron et al, 2004). Já os pacientes que demonstram alterações em monócitos apresentam células com alto estresse oxidativo conduzindo a uma deficiente proliferação de linfócitos T( Aukrust, 1994;Aukrust, 1996)

Adicionalmente, os pacientes ainda demonstram padrões que se mostram associados a menor tolerância imunológica e à maior suscetibilidade a neoplasias: níveisdiminuídos de linfócitos T CD4+ e aumentados de CD8+ efetores de memória (Bateman et al., 2012), menor quantidade de células natural killer (NK) (Aspalter et al., 2000) e células t natural killer (nkt) (Carvalho et al, 2010; Gao et al., 2014).

Pacientes com ICV frequentemente cursam com infecções crônicas ou recorrentes do trato respiratório, bronquiectasia, atelectasia esplenomegalia, doenças autoimunes, inflamatórias, gastrointestinais, malignidades especialmente as de natureza linfoproliferativa, entre outros acometimentos (Chapel et al., 2008; Resnick et al, 2012).

Particularmente, dois sistemas são bastante afetados nesses pacientes: o gastrointestinal (Uzzan et al, 2016), e o linfóide (Gathmann et al, 2014). Em conseqüência

do comprometimento gastrointestinal ocorre redução da capacidade digestiva e absorptiva, o que possibilita a depleção de vários micronutrientes entre eles a vitamina D, (Amayamejía et al, 2013), níveis de cálcio (Baris et al, 2011) e consequente perda de massa óssea ( Barreto-de -Melo ,2017).

As ocorrências de infecções gastrointestinais se manifestam comumente pela ausência da IgA, anticorpo de proteção a mucosas, que predispõe a manifestações de *Helicobacter pylori* (Baldovino et al., 2013). As manifestações também estão relacionadas a infecções por *Giardialamblia*, *Cryptosporidiumparvum*, espécies de *Salmonella*, citomegalovírus, *Campylobacterjejuni* ou norovírus. (Daniels, 2007,Oksenhendle et al.,2008) a qual leva à ocorrência de diarreia transitória ou persistente com perda de peso acentuada, esteatorréia e má absorção (Abbott; Gelfand, 2015; Resnick et al., 2012).

A doença inflamatória intestinal também é outro acometimento comum na ICV. Neste caso, os achados histológicos obtidos a partir de biopsias do trato gastrointestinais incluem achatamento das vilosidades, apoptose das células intestinais da cripta, hiperplasia nodular linfoide, folículos linfoides hiperplásicos, ausência de plasmócitos, infiltração linfocitária intraepitelial (Abbott; Gelfand,2015) e achatamento das vilosidades do intestino delgado semelhante à doença celíaca, mas não responsiva à retirada do glúten (Cunningham-Rundles, 2012).

O tratamento mais comumente usado na ICV é com reposição de imunoglobulina intravenosa ou subcutânea, que levam a um prognóstico melhor com Emenor reincidivas às infecções e consequentemente, melhor qualidade de vida (Cunningham-Rundles, 2010).

Pacientes com ICV possuem predisposição acentuada a estresse oxidativo devido a reação do próprio sistema imune ao utilizar radicais livres no combate a patógenos. Nesses pacientes tanto as células fagocíticas quanto os linfócitos T e B são dotadas de NADPH oxidase, enzima responsável pela produção de ROS (Reactive Oxygen Species) responsiva a quadros inflamatórios (Babior, 1999).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio homeostático entre geração e consumo de compostos oxidantes e antioxidantes, com resultados exacerbados de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses radicais levando a um dano oxidativo potencial contra células e tecidos (Halliwell e Whiteman, 2004).

Por fim, e em um sentido mais amplo, na ICV, os conceitos e sintomas ainda são citados em reinterações o que faz da doença de difícil precisão nesses aspectos (Agarwal e Cunningham-Rundles, 2019).

## 1.2 PON E ARILESTERASE

A Paraoxonase (PON) é uma família de enzimas séricas com grande potencial antioxidante e quem vem amplamente sendo estudada. Ela contempla uma família multigênica de três membros de esterases: PON1, PON2 e PON3, todas elas possuem semelhança quanto à homologia estrutural. Em humanos estão localizadas adjacentes ao braço longo do cromossomo 7 (entre q21.3 e q22.1) já em ratos, no cromossomo 6 (Primo-Parmo et al., 1996).

Dentre a família das PONS, a mais estudada é a PON1 apesar do membro mais antigo parecer ser a PON2 da qual evoluíram a PON3 e depois PON1 (Mackness et al., 1991); (Aviram, 1999). Embora os PONs se assemelhe em suas sequências de aminoácidos, eles têm diferentes funções. e exibem uma ampla gama de atividades enzimáticas para vários tipos de substratos em um único sítio ativo (Aviram, 1999).

Inicialmente, observou-se que a enzima PON é responsável pela hidrólise do paraoxon, produto do catabolismo do inseticida paration. A nomenclatura dada aos membros da família paraoxonase está diretamente relacionada ao composto paraoxon (Costa et al., 2003; Khersonsky et al., 2005). A PON também é capaz de hidrolisar outros substratos metabólitos de compostos organofosforados (OPs), como oxon, diazoxon), ésteres aromáticos tais como fenilacetato, tiofenilacetato e 2-naftilacetato e lactonas aromáticas e alifáticas (Costa et al., 2003; Draganov et al., 2004; Macedo, 2013).

A PON possui três atividades principais: atividade de paraoxonase, que é observada quando há ocorrência da reação de hidrólise do paraoxon a p-nitrofenol; atividade arilesterase, que promove a reação de hidrólise de ésteres aromáticos e a atividade lactonase, que catalisa a hidrólise de lactonas aromáticas e alifáticas, entre outras reações (Hussein, 2011).

Estruturalmente, a PON1 é uma glicoproteína que possui dois sítios de ligação de cálcio, um está localizado no topo da estrutura e acredita-se que esteja relacionado com a

atividade hidrolítica e o outro, localizado mais centralmente, auxilia na estabilidade da proteína. Na verdade, a remoção do cálcio com agentes quelantes destrói irreversivelmente a atividade e estabilidade do PON1 (Mackness et al., 1991; Aviram, 1999).

A atividade da enzima PON1 está presente no soro, em eritrócitos e no cérebro sendo encontrada também no tecido hepático que além de concentrar parte desta atividade, representa a fonte primária da enzima encontrada no plasma (Mackness, 1989; Costa et al., 2003; Draganov et al., 2005; Macedo, 2013).

Em humanos, a enzima PON1 é influenciada por muitos fatores que atuam como moduladores da atividade e expressão dessa enzima seja inibindo ou estimulando essas ações. (Rios et al., 2007; Costa et al., 2005). Em recém-nascidos, a atividade da PON1 sérica é relativamente baixa e aumenta até os 15-25 meses de vida (Marchegiani et al., 2008). Os níveis da enzima voltam a diminuir com o envelhecimento, o que parece ser causado pelo aumento de reações relacionadas ao estresse oxidativo (Seres et al., 2004; Lescai et al., 2009), porém, ambos polimorfismos Q192R e L55M não têm impacto do aumento em longevidade (Weigz et al., 2015).

A atividade da PON, em uma população normal pode estar alterada entre os sexos, talvez demonstrando uma relação que se justifica por fatores hormonais (Rios et al., 2007; Costa et al., 2005). As mulheres apresentam níveis de atividade PON significativamente maiores quando comparadas às médias da mesma atividade nos homens (Faggioni, 2003; Costa et al., 2005; Sumegova et al., 2006).

Alguns outros estudos ainda sugerem alteração na atividade da PON1 na gravidez, menopausa, tabagismo e dietas aterogênicas (Holland et al., 2006; Prakash et al., 2007, Tsakaris et al., 2009) e numa variedade de doenças onde o estresse oxidativo é imperativo, incluindo a doença cardiovascular (Ayanacioglu, 1999; Mackness et al., 2003, 2004; Gupta et al., 2011), cânceres (Stevens et al., 2006; Elkiran et al., 2007; Camuzcuoglu et al., 2009), acidente vascular isquêmico, cirrose hepática e doença renal (Li, 2003; Mackness 2003,)AIDS, infecções, neoplasias e imunosenescência tendo assim importante papel não só na oxidação mas também na resposta imunológica (Camps, 2009).

Mais de 200 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) já foram encontrados no gene PON1 contribuindo para diferenças interindividuais na concentração e atividade dessa

enzima (Richter;Jarvik ;Furlong ,2010). Os mais referenciados são os polimorfismos das posições 192 e 55, com diferentes consequências biológicas. A substituição de leucina por metionina na posição 55 (L55M) afeta a concentração de PON1: o alelo PON1L apresenta um aumento nos níveis de PON1 quando comparado ao alelo PON1M, decorrente de um aumento de mRNA (Mackness et al., 2003), estando o alelo PON1-55M associado a menores concentrações séricas da enzima e também à baixa eficiência da PON1 plasmática (Costa et al., 2005).

Já a substituição de glutamina por arginina na posição 192 (Q192R) é associada à atividade de PON1, pois eleva sua atividade catalítica em relação a substratos sintéticos. Entre as isoformas Q192R, a PON1-Q parece promover melhor proteção da LDL contra o efeito aterogênico (Mackness et al., 2003) em contrapartida, o alelo R parece constituir fator de risco independente para doença coronariana, o que confere a este alelo menor capacidade antioxidativa (Draganov et al., 2000).

Adicionalmente outros estudos, demonstram que a presença do genótipo 55MM pareceu estar correlacionada à presença de fatores de risco para o desenvolvimento de linfomas, (De Roos et al., 2006), Na ICV é sugerido que a presença do genótipo 55 MM possa ser deletério com maior morbidade e mortalidade na doença e o alelo 55L parece estar envolvido na proteção contra infecções e linfoproliferação benigna sendo essa ação executada por ocasião da elevação de atividade enzimática do alelo 55L, (Sini et al.,2014).

### **1.3 25-HIDROXIVITAMINA D**

A 25-hidroxivitamina D, foi descrita inicialmente como uma vitamina e ficou bastante conhecida, a princípio, por seu papel na regulação da homeostase cálcio-fósforo e consequentemente por ser uma substância capaz de curar o raquitismo. Foi denominada 'D', pois sequencialmente era a quarta de vitaminas a ser descoberta (Deluca, 2014). Atualmente é considerada um hormônio atuante em vários mecanismos fisiológicos compondo um verdadeiro eixo endocrinológico com ações amplas imunológicas (Bouillon,1995). Além disso, a 25-hidroxivitamina D regula positivamente ações antioxidantes por participar do complexo glutatona (GSH) /glutathionaredutase e glutamato-cisteína. A GSH é o principal antioxidante dentro das células, e é a primeira linha de defesa contra oxidantes na proteção da célula contra ROS (Winterbourn, 2008).

A ativação da 25-hidroxivitamina D ocorre através da incidência dos raios UVB nas camadas mais profundas da epiderme, especificamente na membrana plasmática de queratinócitos e fibroblastos nas camadas basal onde está armazenada a substância precursora: o 7-deidrocolesterol (7-DHC) ou pré-vitamina D onde a ação da enzima deidrocolesterol-redutase (DHCR7), converte o 7-DHC em colesterol. (Morris,1999). O mecanismo dessa atividade espolia grande volume de 7-DHC que para manter o constante processo de ativação da 25-hidroxivitamina D a torna um nutriente de fonte externa obrigatória (Jira et al., 2003).

As ações posteriores à ativação na epiderme ocorrem via interação com o receptor de 25-hidroxivitamina D receptor (VDR, vitamin D receptor), um fator de transcrição que pertence à família de receptores hormonais nucleares, o VDR que por meio da heterodimerização atua em uma das três isoformas do receptor do retinoide X (RXR) e consequentemente possibilita as reações metabólicas (Plum; Deluca, 2010).

As reações metabólicas que se seguem ocorrem após processos de hidroxilação: a 25-hidroxivitamina D sofre hidroxilação no carbono 25, mediada pela CYP2R1, uma enzima microsomal expressa preferencialmente no fígado, dando origem a 25-hidroxivitamina D ou calcidiol : 25(OH) D3, e 25(OH) D2, ou ergocalciferol, sendo essa última de origem via alimentos vegetal (Bouillon,1995).

Em processo similar, a 25(OH) D, acoplada à DBP é transportada em vários tecidos e na presença da enzima 1- $\alpha$ -hidroxilase CYP27B1, proteína mitocondrial da família do CYP450 e nessa etapa, sofre hidroxilação no carbono 1 da 25(OH) D formando a 1-25-dihidroxi-vitamina D 1,25(OH) D ou calcitriol, que é a molécula metabolicamente ativa. A CYP27B1 é expressa nas células dos túbulos renais proximais, onde a grande parte do calcitriol necessário ao metabolismo sistêmico é sintetizado (Erin Yamamotoa, Trine N. Jørgensen, 2019).

A partir da ação nos túbulos renais, via 1,25(OH)<sub>2</sub> D, a vitamina D desempenha ações ao metabolismo do cálcio e fósforo regulando as concentrações de cálcio sérico por um loop feedback com o hormônio da paratireoide (PTH) via supressão da secreção deste (Holick, 2007).

A atividade do PTH e a expressão de CYP27B1 são influenciadas diretamente pela concentração sérica de 1,25-dihidroxivitamina D e pelo mecanismo de feedback: o PTH

impede a superprodução de 1,25-dihidroxitamina via liberação de fator de crescimento de fibroblasto do osso (FGF23) (Liu et al, 2008). As ações contra regulatórias do PTH na modulação da atividade do CYP27B1 e do FGF23 acontece ainda por indução do CYP24A1, uma enzima mitocondrial integrante do complexo do citocromo P450, que age pela hidroxilação dos carbonos 23 ou 24; esses elementos em conjunto constituem uma rede homeostática interativa que mantém o status da vitamina D (Fukumoto S., 2008).

O mecanismo acima citado, atua também, diretamente, na osteoclastogenese, sendo o 1,25(OH) D, via ações autócrinas com o VDR, o agente primordial na indução da expressão do ligante do ativador do receptor NF-kappa B (RANKL – receptor activator of NF-kappaB ligand) que resulta na maturação dos precursores de osteoclastos para osteoclastos nos depósitos de cálcio do esqueleto, visando a homeostase calcêmica (Naja et.al., 2009).

Além disso, a 1,25(OH)2D, via ligação entre o receptor e elementos de transcrição, desencadeia uma enorme variedade de respostas biológicas a partir da formação do complexo transcricional hormônio-receptor com o RXR: 1,25(OH)2D- VDR-RXR. Esse complexo acopla-se a uma sequência específica do DNA nos seus genes-alvos, denominada VDRE (vitamin D response element) com ações a amplas combinadas com moléculas correceptoras e coativadoras a exemplo da família SRC - steroid receptor coativator - e o NCoA-62) e correpressores (como o NcoR – nuclear receptor corepressor e SMRT - silent mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) do VDR promovendo ações que por fim são efetivadas em seus alvos objetivos (Lemon, 1996).

Os efeitos biológicos da 1,25(OH)2D são mediados pelo VDR, CYP27B1, receptores e demais atividades coreceptoras e parecem justificar boa parte da extensa ação do calcitriol uma vez que sendo expresso em quase todas as células humanas, demonstram que a 1,25(OH) D está envolvida em uma ampla rede de funções envolvendo a homeostase sistêmica dos diversos meios (Erin Yamamoto e Trine N. Jørgensen, 2019).

Os níveis de vitamina D são avaliados através da concentração da 25- hidroxivitamina D (25-OH-D) circulante e reflete a síntese endógena e a ingestão dietética; sendo portanto, o meio para avaliar o seu status (Holick, 2009). Embora o suprimento deficiente de

vitamina D seja predominantemente definido como concentrações séricas de 25 (OH) D abaixo de 25–30 nmol / l (10–12 ng / mL), não há um acordo claro sobre o intervalo ideal (Linseisen et. al, 2013; Pilz S et.al, 2019).

As comunidades mundiais como o Instituto Norte-Americano de Medicina(IOM) 2010, European Food Safety Authority (EFSA), 2016 são unânimes quanto ao nível sérico de 25 (OH) D de  $\geq 50$  nmol / l (20 ng / mL) ser designado como valor baixo (Pilz S., et.al. 2019). Apesar dos valores-alvo inconsistentes, há um amplo consenso de que os níveis sanguíneos de 25 (OH) D não devem estar abaixo de 50 nmol/ (20 ng / mL l, Linseisen.et.al,2013; Pilz S., et.al,2019). No Brasil, os valores alvos são definidos como : maior do que 20 mg/mL é o desejável para população geral saudável; entre 30 e 60 mg/mL é o recomendado para grupos de risco como idosos, gestantes, pacientes com osteomalácia, raquitismos, osteoporose, hiperparatireoidismo secundário, doenças inflamatórias, doenças autoimunes e renal crônica e pré-bariátricos; entre 10 e 20 ng/mL é considerado baixo com risco de aumentar remodelação óssea e, com isso, perda de massa óssea, além do risco de osteoporose e fraturas; menor do que 10 ng/mL muito baixa e com risco de evoluir com defeito na mineralização óssea, que é a osteomalácia,e raquitismo (Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, 2020).

Os limites da 25-hidroxivitamina D na prevenção e tratamento de doenças extra esqueléticas também é controverso. O que existem, porém, são evidências abundantes sobre uma possível associação positiva do status de vitamina D ou suplementação em doenças cardiovasculares Barnard et.al., 2010; Elamin et al,2011; diabetes mellitus tipo 2: Mitri J. et al, (2011) hipertensão: Witham et al, 2009; Golzarand M. 2016; a artrite reumatóide ,doenças neurodegenerativas e mentais bem como doenças autoimunes e respiratórias( Fu lin, et al, 2021; Martineau et al ,2019 ;Wessam et al, 2021) e em neoplasias (Yin L., 2009, Friederike Maretzke, et al., 2020, Wessam et al., 2021).

Além disso, recentemente se tem explorado as ações da 25-hidroxivitamina D e a influência ambiental na microbiota como fator essencial no desenvolvimento das doenças entre quais as relações com as doenças inflamatórias (Huang J, et al., 2019).

Adicionalmente, outros fatores externos influenciam a ativação da 25-hidroxivitamina D: protetor solar, roupas, sazonalidade, hora do dia, idade, adiposidade, prática de atividade física, dieta com ingestão de alimentos com baixo teor da vitamina , medicações



e ainda a quantidade de melanina na pele uma vez que esse elemento compete pelo fóton da radiação UVB e, portanto, favorece a menores reservas da 25-hidroxivitamina D (D. Holick, 2001). Indivíduos negros quando comparados aos caucasianos ou outras etnias, são os mais desfavorecidos. Desse modo todos esses fatores juntos ou isoladamente, têm sido responsáveis pela pandemia de déficit dessa vitamina (Huang J, et al., 2019).

#### **1.4 25-HIDROXIVITAMINA D E POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS**

A ICV tem mecanismos patogênicos complexos que são resultados de defeitos intrínsecos ou extrínsecos na diferenciação das células B e / ou de uma interferência prejudicada na funcionalidade entre as células B e T e/ou receptores que os ativam (Bryant et al., 1990).

Os linfócitos B têm como principal função o combate a microrganismos, essencialmente através da produção de anticorpos dependentes ou não de linfócitos T (Golzarand, 2016); já os linfócitos T são responsáveis por inúmeras atividades imunológicas, como a destruição de células infectadas ou transformadas, proteção contra patógenos intra ou extracelulares, parasitas e fungos, estímulo à produção de anticorpos pelos linfócitos B, imunossupressão e tolerância, com aumento ou diminuição de respostas inflamatórias (Giovannetti, 2007).

Tanto as células T quanto B liberam uma grande quantidade de citocinas que constituem a base do processo de resposta autoimune sendo que os tipos de linfócitos podem funcionalmente ser definidos pelas citocinas produzidas, desse modo, as células T “Th1” produzem IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF $\alpha$  e são predominantes nas reações do tipo “hipersensibilidade tardia” enquanto que as células T “Th2” produzem IL-4 e IL-5, estimulam células B e estão envolvidas especialmente em reações anticorpo-mediadas (Manetti R, et al 1993) enquanto que as citocinas produzidas por células Th1 aumentam a atividade deste subtipo, mas inibem células Th2 e vice versa. Esse tipo de regulação pode ser crucial na determinação de uma resposta imune e em fenômenos supressores (Mills ; McGuirk ,2004).

Adicionalmente, subtipos de Th como as células Th-17 que secretam IL-17 entre outras citocinas são fortemente pró-inflamatórias (Tokuda N, Levy R.B, 1996; Xu H., et al., 1993). As citocinas estão expressas às células Th17 de modo significativo em doenças

autoimunes como lúpus eritematosos sistêmicos, esclerose múltipla, psoríase, artrite reumatóide (Giovannetti, 2007).

Há evidências que a 25-hidroxivitamina D apresenta efeitos em vários órgãos e sistemas, destacando-se, neste contexto, seu papel sobre o sistema imunológico potencializando a imunidade inata e suprimindo a imunidade adaptativa, afetando indiretamente a polarização dos linfócitos T (Catorna et al., 2015) já em linfócitos B, atuando inibindo a produção de autoanticorpos (Arnsen Y e al., 2007).

Já está bem estabelecido que a forma ativa da 25-hidroxivitamina, 1,25 (OH) 2D3 aumenta a atividade antimicrobiana de macrófagos e monócitos, aumentando a produção de peptídeo antimicrobiano de catelicidina (CAMP) e defensina  $\beta$ 2 (Gombart et al, 2005; Wang et al, 2004), além de aumentar a atividade fagocitária de macrófagos e células dendríticas contribuindo para a eliminação de patógenos o que provavelmente contribui para a tolerância imunológica (Tokuda e Levy 1996; Xu H., et al., 1993).

Em situações de baixas concentrações de 25-hidroxivitamina-D o sistema imunológico favorece a síntese de células T autorreativas direcionadas contra tecidos do próprio organismo e a produção de interleucinas pró-inflamatórias como IL-4 e IL-5 IL-12, Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), (Catorna et al.,2015) predispondo-o a um risco aumentado de desenvolver doenças autoimunes, como o diabetes melito tipo 1, artrite reumatoide, esclerose múltipla e doenças inflamatórias intestinais (Bellan et al., 2020).

A 25-hidroxivitamina D é capaz de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias por monócitos, como a Interleucina 6 (IL-6) e o Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), que fazem parte do meio inflamatório permitindo a ativação e proliferação de células B e T atenuando a resposta inflamatória. (Catorna,2015).

Além disso, a 25- hidroxivitamina D também exerce efeito sobre as células T auxiliares (Th) fazendo com o que o calcitriol impulse a diferenciação de CD4 + Th, levando a uma redução das citocinas anti-inflamatórias Th1 e Th17 ( Mills e McGuirk ,2004). Essas citocinas são responsáveis por respostas inflamatórias intensas e exercem um papel fundamental em diferentes doenças inflamatórias crônicas. Na ICV, inclusive, além de respostas inflamatórias exacerbadas, esse mecanismo tem importância direta com o metabolismo ósseo (Barreto-de -Melo, 2017).

Adicionalmente, a 1,25 (OH) D3 induz a diferenciação de Treg, células CD4+

envolvidas na manutenção da tolerância imunológica, por aumentar a expressão de CTLA-4 e Foxp3, levando a um aumento de IL-10 e do fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (Catorna,1988) que promovem , também, ações endócrinas. Além disso, a 1,25 (OH) D3 polariza os linfócitos T CD4 + em direção a um fenótipo Th2 com suprarregulação de citocinas, como IL-4 e IL-5, mecanismos envolvidos no balanço regulatório entre respostas de células T e na inflamação (Jeffery, 2012).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Analisar a relação entre os níveis de 25-hidroxivitamina d, atividade arilesterase e polimorfismos L55M da PON1 e quadro clínico em pacientes com imunodeficiência comum variável.

### **2.2 Específicos**

- Genotipar o polimorfismo L55M;
- Avaliar a atividade arilesterase;
- Dosar níveis de 25-hidroxivitamina D;
- Quantificar populações linfocitárias CD4+, CD8+, CD19+ , NK CD3
- Caracterizar quadro clínico;
- Analisar densitometria óssea.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DESENHO DE ESTUDO E POPULAÇÃO

Realizou-se um estudo transversal, em que foram analisados 48 pacientes com imunodeficiência comum variável, havendo predomínio de mulheres (60,40%) em relação a homens (39,60%). A maioria dos indivíduos se autodeclarou como sendo de cor branca (68,75%) e a média de idade foi  $37,15 \pm 7,65$  anos. As médias correspondentes ao início dos sintomas e da idade ao diagnóstico foram  $15,92 \pm 10,15$  anos e  $24,04 \pm 9,24$  anos, respectivamente. A média do retardo diagnóstico, caracterizado como o espaço de tempo entre o início dos sintomas e o estabelecimento diagnóstico foi  $9,42 \pm 9,01$  anos. O tempo de doença, definido como o período de tempo decorrido entre o início dos sintomas até a idade do paciente à época do estudo foi  $21,00 \pm 9,78$  anos (tabela 1).

No grupo controle foram avaliados 163 indivíduos saudáveis com predomínio do sexo masculino (62,57%) e média de idade de  $36,0 \pm 9,65$  anos. Entre eles, 130 foram recrutados entre doadores de sangue, sendo 80 homens (61,54%) e 50 mulheres (38,46%) que participaram do estudo através da genotipagem do polimorfismo da PON1-55LM, avaliação do perfil lipídico e atividade arilesterase. Os dados referentes a estes indivíduos foram coletados para estudos anteriores desenvolvidos na Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia e no Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM 31) do HC- FMUSP.

Os restantes 33 indivíduos-controle representados por 11 mulheres e 22 homens também aceitaram participar voluntariamente do estudo e, além da genotipagem do polimorfismo da PON1-55LM, avaliação do perfil lipídico e atividade arilesterase, realizaram também densitometria óssea para avaliação da presença de osteoporose ou osteopenia.

Os critérios para inclusão no estudo foram idade de 18 a 50 anos e diagnóstico de ICV, conforme definido pela European Society for Immunodeficiencies (2006), determinado pelos níveis séricos de IgG e pelo menos um isótopo IgA e/ou IgM abaixo dos valores normais para o grupo etário; isohemaglutininas ausentes ou baixa resposta a vacinações, e exclusão de causas conhecidas de hipogamaglobulinemias primárias ou secundárias.

Foram excluídos os pacientes tabagistas, gestantes, portadores de malignidades não

tratadas ou em tratamento, diabéticos, em uso contínuo de glicocorticóides e suplementação de 25-hidroxivitamina D.

### **3.2 EXAMES LABORATORIAIS**

Hemograma completo, velocidade de hemossedimentação, transferrina, ferritina, ferro, cobre, magnésio, cálcio, sódio, cloro, potássio, vitamina B12, ácido fólico, glicemia de jejum, ácido úrico, colesterol total e frações, triglicerídeos, proteína C reativa, hormônio paratireoideano (PTH), albumina, IgG, IgA, IgM, IgE, contagem total de linfócitos T CD3+, CD4+ CD8+, linfócitos B CD19+ e células NK CD3sanguíneos.

Os exames de perfil lipídico serão 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 serão o enzimático colorimétrico automatizado. Para a determinação da LDL-colesterol, o método utilizado será o cinético automatizado e para verificar as contagem total de linfócitos T CD3+, CD4+ CD8+, linfócitos B CD19+ e células NK CD3sanguíneos por citometria de fluxo.

Alguns exames referentes ao estado nutricional de vitaminas e minerais não foram incluídos, visto que os pacientes rotineiramente são submetidos à reposição, assim que o diagnóstico é estabelecido.

Todas as avaliações já eram realizadas de rotina, ocorrendo entre uma e quatro vezes ao ano, sendo as coletas de sangue realizadas imediatamente antes da infusão da imunoglobulina humana. As metodologias apresentadas foram retiradas do manual de exames do Laboratório Central do HC-FMUSP.

As análises foram realizadas em diferentes laboratórios do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O Exame de densidade mineral

óssea (DMO) foi realizado no Hospital das Clínicas - FMUSP em equipamento computadorizado pelo método de absorção de fótons de raios-x de dupla energia (DEXA). Considerando-se os valores de T-score e Z-score . T-scores devem ser utilizados para classificação diagnóstica. T-score = 0: normal, T-score =1 osteopenia e T-score = 2: osteoporose. WHO, (2003).

### **3.2.1 ANÁLISE DE 25-HIDROXIVITAMINA D**

A coleta do sangue e a análise da 25-hidroxivitamina D também é parte da rotina de exames realizados no ambulatório de imunodeficiências primárias, sendo os testes realizados no laboratório central da USP, pelo método imuno quimionescência sendo os valores referendados como índices suficientes aqueles encontrados entre 30 e 60 ng/mL, que confere a esses índices entre os valores acima citados para grupos de risco como pacientes com osteomalácia, raquitismos, osteoporose, hiperparatireoidismo secundário, doenças inflamatórias, doenças autoimunes (Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, 2021).

### **3.2.2 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 secodos pacientes e indivíduos controles incluídos no estudo.

Imediatamente após a coleta, as amostras foram mantidas a 0°C (banho degelo) por no máximo 60 minutos, posteriormente centrifugadas em 3.000 rpm por 5 minutos a 8° e em seguida foram feitas alíquotas de soro e plasma (armazenados a -80°C até o uso) para análises de atividade enzimática como também para se obter apurificação do DNA genômico.

### **3.2.3 OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO**

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

Utilizando-se uma pipeta de transferência, 500µL de leucócitos foram colocados em um tubo de 1,5 mL e foi acrescentado 750µL de tampão de lise de sacarose (Tris-HCl 10mM, pH 7,5, sacarose 34mM, MgCl<sub>2</sub> 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. Foi adicionado então 1mL de tampão de lise e realizado uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos, com novo descarte de sobrenadante. O processo foi repetido mais uma vez.

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

A seguir, foram adicionados ao pellet 500µL de solução TEN (Tris-HCl 10mM, pH 8,2, EDTA 2mM e NaCl 400mM), 5µL de SDS 10% e 3µL de Proteinase K. a solução foi homogeneizada brevemente por inversão até que o pellet se desprendesse do fundo do tubo. Procedeu-se então à incubação por uma hora a 56°C, em banho- maria.

Após o período de incubação, foi adicionado 150µL de NaCl (5M). Após agitação vigorosa, a amostra foi centrifugada a 5.000 rpm durante 10 minutos.

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

Sequencialmente, procedeu-se a 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 adicionou-se 1mL de etanol 70%. Após nova centrifugação a 5.000 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado. Repetiu-se mais três vezes.

Ao final da quarta repetição, o tubo contendo o pellet de DNA foi seco em SpeedVac, durante 20 minutos. Ao final do processo de secagem do DNA, o mesmo foi reidratado



com 100µL de solução TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0, EDTA 1mM).

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

### **3.2.4 GENOTIPAGEM PARA OS POLIMORFISMOS**

A genotipagem foi feita pela técnica de análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição - RFLP que consiste em amplificar fragmentos específicos para cada região pesquisada, posteriormente digerida por enzimas de restrição, essa estratégia permite diferenciar os possíveis genótipos para cada polimorfismo estudado.

#### **3.2.4.1 DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS L55M NO GENE DA ENZIMA PARAOXONASE 1**

As análises foram realizadas conforme Motti et al.2001. Para a digestão dos produtos da PCR-multiplex, foi utilizada a enzima de restrição Hinf-I, que originam fragmentos capazes de caracterizar o polimorfismo – PON1-L55M.

O processo de PCR seguiu as seguintes relações: em uma reação de 25µL de volume utilizando Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 7mM, 600mM de cada nucleotídeo trifosfato, 0,16mM de primersforward e reverse de PON1-192 e PON1-55 e 0,3mM de primersforward e reverse PON2-311, 1µg de DNA genômico e 1U de Taq-polimerase. A reação ocorreu 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 seqüências de primers utilizados foram:

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

(5'→3'): AGT CCA TTA GGC AGT ATC TCCg;

Os produtos amplificados apresentaram 144pb. Realizou-se então a digestão de

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, MgCl<sub>2</sub> 10mM e β-Mercaptoetanol 1mM. Ao final da digestão, os produtos finais se apresentavam da seguinte forma: se o fragmento contendo 144pb não sofreu digestão pela enzima, este foi determinado como sendo o alelo PON1-55M. Se a amostra possuía o alelo PON1-55L, o resultado apresentado era o de uma banda de 122pb, resultante da digestão do DNA pela enzima de restrição.

### **3.2.5 ANÁLISE DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ARILESTERASE DE PON1 SÉRICA**

A atividade arilesterase da PON1 será realizada conforme descrita por Lorentz et al. 1979 e modificada por Oliveira-Silva et al, 1998. Para tanto, as alíquotas de soro serão diluídas 1:3 em tampão Tris-CaCl<sub>2</sub> contendo (4,45mM Tris e 0,47mM CaCl<sub>2</sub>). Em seguida, serão preparados 100mL de tampão de reação de Tris-CaCl<sub>2</sub> contendo 13μL de fenilacetato (PhenylAcetate, 99%; Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA). Após a preparação do tampão de reação, 5μL das alíquotas diluídas 1:3 serão então adicionados a 3.000μL de tampão de reação contendo fenilacetato, para iniciar a análise. Esta será 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.

#### **3.2.5.1 CÁLCULO DA ATIVIDADE ARILESTERASE**

Ativ. Arilesterase = Fator x  $\Delta$ Abs/min x diluição  
Fator =  $V_{tr} \text{ (ml)} / \epsilon_{270} \times V_a \text{ (ml)}$   
x E (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)

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados descritivos estão apresentados na forma de média e desvio padrão (DP). Desvio-padrão, mediana e quartis) para as variáveis contínuas. As variáveis categóricas foram expressas em termos de porcentagens.

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

Para estabelecer um ponto de corte na variável Ariesterase, foi utilizada a técnica de Lausen, que estima um ponto de corte maximizando a estatística de Log- Rank. Statistical package for social sciences (SPSS) version 18.0 (IBM Corp.; Armonk, NY, USA). Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

A fim de verificar se diferentes grupos têm a mesma proporção de indivíduos, com determinada característica, ou se existe associação entre duas variáveis, utilizou-se o teste Qui-quadrado. A partir deste, é verificada se a igualdade entre as proporções é estatisticamente significativa. Entretanto, em alguns casos, os pressupostos necessários para a aplicação do teste não foram atendidos, implicando na utilização do teste exato de Fisher, podendo-se interpretar da mesma forma.

Os resultados foram apresentados em números absolutos e percentís para a descrição da população estudada. Os demais dados de acordo com a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças observadas durante a análise foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade encontrada foi menor que 0,05 (5%).

## **5 ÉTICA EM PESQUISA**

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para análise. Para participação no estudo, foi solicitado aos indivíduos participantes que preenchessem e assinassem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O projeto está sendo conduzido conforme as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos presentes na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 DADOS DEMOGRÁFICOS

Foram analisados 48 pacientes com imunodeficiência comum variável, havendo predomínio de mulheres (60,40%) em relação a homens (39,60%). A maioria dos indivíduos se autodeclarou como sendo de cor branca (68,75%) e a média de idade foi  $37,15 \pm 7,65$  anos. As médias correspondentes ao início dos sintomas e da idade ao diagnóstico foram  $15,92 \pm 10,15$  anos e  $24,04 \pm 9,24$  anos, respectivamente. A média do retardo diagnóstico, caracterizado como o espaço de tempo entre o início dos sintomas e o estabelecimento diagnóstico foi  $9,42 \pm 9,01$  anos. O tempo de doença, definido como o período de tempo decorrido entre o início dos sintomas até a idade do paciente à época do estudo foi  $21,00 \pm 9,78$  anos (tabela 1).

No grupo controle foram avaliados 163 indivíduos saudáveis com predomínio do sexo masculino (62,57%) e média de idade de  $36,0 \pm 9,65$  anos. Entre eles, 130 foram recrutados entre doadores de sangue, sendo 80 homens (61,54%) e 50 mulheres (38,46%) que participaram do estudo através da genotipagem do polimorfismo da PON1-55LM, avaliação do perfil lipídico e atividade arilesterase. Os dados referentes a estes indivíduos foram coletados durante estudos anteriores desenvolvidos na Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia e no Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM 31) do HC- FMUSP.

Os restantes 33 indivíduos-controle representados por 11 mulheres e 22 homens também aceitaram participar voluntariamente do estudo e, além da genotipagem do polimorfismo da PON1-55LM, avaliação do perfil lipídico e atividade arilesterase, realizaram também densitometria óssea para avaliação da presença de osteoporose ou osteopenia.

Houve predomínio do sexo feminino no grupo de pacientes com ICV (60,40%) e de homens no grupo-controle (62,57%), sendo que a média de idade foi similar nos dois grupos ( $37,15 \pm 7,65$  anos e  $36,0 \pm 9,65$  anos, respectivamente).

**Tabela 1: Características demográficas de pacientes com imunodeficiência comum variável**

Dados Gerais	Pacientes ICV (n=48)	Controles (n=163)
<b>Femininos</b>	60,40 % (29)	37,43% (61)
<b>Masculinos</b>	39,60% (19)	62,57% (102)
<b>Cor autodeclarada</b>		
<b>Branços</b>	68,75 % (33)	
<b>Pardos</b>	22,91 % (11)	
<b>Negros</b>	6,25 % (3)	
<b>Amarelos</b>	2,09 % (1)	
	Média ± DP	Média ± DP
<b>Idade</b>	37,15±7,65	36,0 ±9,65
<b>Início dos sintomas</b>	15,92±10,15	
<b>Idade ao diagnóstico</b>	24,04±9,24	
<b>Retardo diagnóstico</b>	9,42±9,01	
<b>Tempo de doença</b>	21,00 ±9,78	

## 6.2 PERFIL LIPÍDICO DOS PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL

A avaliação do perfil lipídico demonstrou ausência de dislipidemia no grupo de pacientes com ICV tomando-se como parâmetros os valores de referência estabelecidos por Parra em 2010: colesterol total acima de 196mg/dL, HDL menor do que 40mg/dL e LDL acima de 116mg/dL (Parra et al., 2010) (tabela 2).

**Tabela 2 : Perfil lipídico dos pacientes com imunodeficiência comum variável**

Pacientes (48)	HDL	LDL	Colesterol	Triglicérides	VLDL
<b>Média ±DP</b>	45,06±24,51	98,00±33,06	161,17±43,21	111,88±61	23,85±21,14
<b>Mínimo</b>	3,01	75,5	135,5	75,00	13,5
<b>Mediana</b>	41,5	97,0	160,5	106,00	19,5
<b>Máximo</b>	52,0	121,0	189,5	134,5	25,5

### 6.3 FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS E DOS ALELOS DO POLIMORFISMO DAPON1-L55M

Na tabela 3 estão demonstradas as frequências dos genótipos 55LL, 55LM e 55MM e as frequências alélicas 55L e 55M da PON1-L55M nos grupos de pacientes e de controles saudáveis. Os genótipos foram identificados em 44 dos 48 pacientes recrutados para o estudo; nos quatro pacientes restantes os genótipos não foram identificados, provavelmente devido à presença de mutações alélicas outras que não foram analisadas neste estudo.

**Tabela 3. Frequência dos genótipos e dos alelos do polimorfismo PON1-L55M em pacientes com imunodeficiência comum variável e controles sãos**

PON1 – L55M	Pacientes ICV (n=48)	Controles (n=163)
<b>Genótipos</b>		
55MM	25,00% (11/44)	14,11% (23/163)
55LM	31,82% (14/44)	38,65% (63/163)
55LL	43,18% (19/44)	47,23% (77/163)
Não detectado	8,33 % (4)	-
<b>Alelos</b>		
55L	59,09% (52)	66,56% (217)
55M	40,90% (36)	33,43% (109)

As frequências alélicas de cada grupo foram determinadas contando-se o número de vezes que o alelo L (52 vezes) ou o alelo M (36 vezes) foram detectados, dividido pelo número total de cópias do gene (88 cópias).

#### 6.4 DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO PON1-L55M EM RELAÇÃO AOS DADOS DEMOGRÁFICOS DE PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL

Tabela 4: Distribuição dos genótipos do polimorfismo PON1-L55M em relação aos dados demográficos de pacientes com imunodeficiência comum variável

	LL (n=19)	LM (n=14)	MM (n=11)
F (n=26)	11 (42,3%)	8 (30,8%)	7 (26,9%)
M (n=18)	8 (44,5%)	6 (33,3%)	4 (22,2%)
Idade	37,05±7,07	36,14±7,49	36,91±8,90
Início dos sintomas	17,47±10,66	<b>10,43±10,0*</b>	18,82±7,99
Idade ao diagnóstico	24,79±7,74	22,36±11,30	24,55±8,99
Retardo diagnóstico	8,74±6,97	12,86±12,59	7,73±7,57
Tempo de doença	18,84±9,01	25,86±11,77	18,09±7,94

Total de pacientes caracterizados genotipicamente: 44. \* p=0,04

Conforme pode ser observado na tabela 4, os pacientes portadores do genótipo 55LM apresentaram início mais precoce dos sintomas característicos da imunodeficiência comum variável em relação aos pacientes 55LL e 55MM (p=0,04). Por outro lado, não houve diferença em relação à distribuição dos genótipos quanto ao gênero (p=0,990), média de idade atual (p=0,967), idade ao diagnóstico (p=0,696), retardo no diagnóstico (p=0,662) e tempo de doença (p=0,129).



## **6.5 RELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO PON1-L55M E PARÂMETROS CLÍNICOS**

Vários parâmetros clínicos caracteristicamente associados à imunodeficiência comum variável foram identificados no grupo de pacientes e analisados quanto a uma possível associação com os diferentes genótipos do polimorfismo PON1-L55M.

A distribuição dos genótipos 55LL, 55LM e 55MM está descrita em relação às doenças de vias aéreas (tabela 5), doenças ósseas e gastrointestinais (tabela 6) e linfonomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, hipertensão portal, doenças autoimunes, asma e rinite (tabela 7).

Conforme pode ser observado, não houve associações entre os genótipos do polimorfismo PON1-L55M e as diferentes manifestações de vias aéreas (tabela 5), presença de doença óssea (incluindo osteopenia e osteoporose), diarreia ou gastrite (tabela 6), esplenomegalia, hepatomegalia, hipertensão portal, autoimunidade, asma ou rinite (tabela 7). No entanto, cabe ressaltar que a presença de doença óssea foi elevada considerando-se os 48 pacientes incluídos neste estudo (20 pacientes correspondendo a 41,6%), entre os quais a maioria com osteopenia (13 pacientes correspondendo a 65,0%) e os demais com osteoporose (7 pacientes correspondendo a 35,0%).

Por outro lado, foi detectada associação entre os genótipos 55MM e menor frequência de doenças intestinais ( $p=0,038$ ) como apontado na tabela 6 e associação entre os genótipos 55LL e maior incidência de linfonomegalia ( $p=0,004$ ) conforme demonstrado na tabela 7.

**Tabela 5: Distribuição dos genótipos do polimorfismo PON1 L55M e doenças de vias aéreas nos pacientes com imunodeficiência comum variável**

Doença	L55M	Sim (%)	Doença	L55M	Sim (%)
<b>Vias Aéreas</b> p=0,334	55LL	44,2%	<b>DPOC</b> p=0,334	55LL	50,0%
	55LM	30,2%		55LM	50,0%
	55MM	25,6%		55MM	0,0%
<b>Pneumonia</b> p=0,910	55LL	43,6%	<b>Sinusites</b> p=0,868	55LL	41,2%
	55LM	30,8%		55LM	32,4%
	55MM	25,6%		55MM	26,5%
<b>Bronquiectasia</b> p=0,884	55LL	46,2%	<b>Otites</b> p=0,094	55LL	50%
	55LM	30,8%		55LM	50%
	55MM	23,1%		<b>55 MM</b>	0,0%
<b>Atelectasia</b> p=0,791	55LL	35,7%	<b>Tonsilites</b> p=0,153	55LL	42,9%
	55LM	35,7%		55LM	31,8%
	55MM	28,6%		55MM	25,0%

Valores de pacientes estudados em cada grupo: Total: 44; LL: 19; LM:14; MM:11

## 6.6 DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO PON1-L55M EM DOENÇAS ÓSSEAS E GASTROINTESTINAIS NOS PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL

Tabela 6: Distribuição dos genótipos do polimorfismo PON1-L55M em doenças ósseas e gastrointestinais nos pacientes com imunodeficiência comum variável

Doença	L55M	Sim (%)	Doença	L55M	Sim (%)
<b>Doença óssea</b> p=0,612	55LL	44,2%	<b>Intestinal*</b> p=0,038	55LL	46,9%
	55LM	30,2%		55LM	37,5%
	55MM	25,6%		55MM	*15,6%
<b>Osteopenia</b>	55LL	46,2%	<b>Diarreia</b> p=0,457	55LL	37,9%
	55LM	30,8%		55LM	37,9%
	55MM	23,1%		55MM	24,1%
<b>Osteoporose</b>	55LL	28,6%	<b>Gastrite</b> p=0,977	55LL	42,9%
	55LM	57,1%		55LM	31,4%
	55MM	14,3%		55MM	46,9%

Valores de pacientes estudados em cada grupo: Total: 44; LL: 19; LM:14; MM:11

## 6.7 DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO L55M DA PON- 1 EM DIVERSAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL

Tabela 7. Distribuição dos genótipos do polimorfismo L55M da PON- 1 em diversas manifestações clínicas na imunodeficiência comum variável

Doença	L55M	Sim	Doença	L55M	Sim
<b>Linfonomegalia *</b> p=0,004	55LL*	83,30%	<b>Autoimune</b> p=0,401	55LL	50,00%
	55LM	8,30%		55LM	16,70%
	55MM	8,30%		55MM	33,30%
<b>Esplenomegalia</b> p=0,464	55LL	47,40%	<b>Asma</b> p=0,533	55LL	33,30%
	55LM	36,80%		55LM	38,90%
	55MM	15,80%		55MM	27,80%
<b>Hepatomegalia</b> p=0,821	55LL	50,00%	<b>Rinite</b> p=0,532	55LL	40,00%
	55LM	28,60%		55LM	30,00%
	55MM	21,40%		55MM	30,00%
<b>Hipertensão portal</b> p=0,806	55LL	40,00%			
	55LM	40,00%			
	55MM	20,00%			

Valores de pacientes estudados em cada grupo: Total: 44; LL: 19; LM:14; MM:11

## 6.8 POLIMORFISMO L55M- PON-1 E PERFIL LIPÍDICO DOS PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL

Na tabela 8 pode-se observar que não houve associação entre os genótipos 55LL, 55LM e 55MM e os níveis de colesterol ( $p=0,551$ ), HDL ( $p=0,097$ ), LDL ( $p=0,550$ ), triglicérides ( $p=0,557$ ), VLDL ( $p=0,987$ ) e APO-1 ( $p=0,192$ ).

Tabela 8 : Polimorfismo PON1-L55M e perfil lipídico nos pacientes com imunodeficiência comum variável

	Colesterol	HDL	LDL	Triglicérides	VLDL	APO-1
<b>L55M</b>						
<b>LL</b>	166,89±35,33	46,42±13,27	100,58±26,94	96,26±39,32	21,16±11,18	115,68±24,90
<b>LM</b>	154,79±42,55	36,29±10,52	96,14±31,28	123,71±77,32	19,93±7,67	121,93±30,22
<b>MM</b>	165,00±53,75	55,64±44,67	97,09±45,58	118,27±76,96	34,09±40,51	129,36±26,00
	P=0,551	P=0,097	P=0,550	P=0,557	P=0,987	P=0,192

Valores de pacientes estudados em cada grupo: Total: 44 LL: 19 LM:14 MM:11

## 6.9 RELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO PON-1 L55M E PARÂMETROS LABORATORIAIS

Diversos parâmetros laboratoriais foram analisados quanto a uma possível associação com os diferentes genótipos do polimorfismo PON1-L55M.

Os dados apresentados na tabela 9 demonstram associação apenas entre o genótipo 55LL e níveis séricos mais elevados de vitamina D ( $p=0,04$ ) em relação aos demais genótipos. Não houve associação entre os genótipos 55LL, 55LM e 55MM e atividade

arilesterase (p=0,559) e níveis séricos de PTH (p=0,467), cálcio (p=0,593), fósforo(p=0,300) e magnésio (p=0,390).

**Tabela 9: Relação entre o polimorfismo PON1-L55M, atividade arilesterase e parâmetros laboratoriais nos pacientes com imunodeficiência comum variável**

L55M	Arilesterase	Vitamina D	PTH	Cálcio	Fósforo	Magnésio
LL	90,47±17,60	28,26±10,16*	44,63±18,81	9,13±0,44	3,52±0,84	2,35±0,62
LM	99,29±33,00	21,09±10,67	50,86±19,01	9,12±0,61	3,59±0,81	2,18±0,54
MM	86,18±33,04	21,40± 6,59	47,27±10,59	9,00±0,43	2,99±1,09	2,10±0,56
	p=0,559	*p=0,04	p=0,467	p=0,593	p=0,300	p=0,390

Valores de pacientes estudados em cada grupo: Total: 44; LL: 19; LM:14; MM:11. Valores de referência: vitamina D: > 30 ng/mL; PTH: 12 a 65 pg/mL; Cálcio total: 8,5-10,2 mg/dL; Fósforo: 2,5-4,5 mg/dL; Magnésio: 1,7-2,6 mg/dL

### 6.9.1 QUANTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS DE ACORDO COM OS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO PON1-L55M EM PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL

Na tabela 10 estão descritos os valores das populações de linfócitos CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ e NK do sangue periférico observados nos grupos de pacientes portadores dos genótipos 55LL, 55LM ou 55MM. Foi detectada associação entre o genótipo 55MM e valores mais elevados de linfócitos CD3+ (p= 0,015) e linfócitos CD8+ (p=0,034) em comparação aos genótipos 55LL e 55LM.

**Tabela 10 : Valores das populações linfocitárias em relação aos genótipos do polimorfismo L55M PON-1 nos pacientes com imunodeficiência comum variável**

L55M	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4/CD8	CD19 <sup>+</sup>	NK
LL	1320,89 ±501,19	616,42 ±284,12	680,47 ±302,45	0,96±028	128,26 ±75,02	187,79 ±125,43
LM	1559,36 ±521,68	745,93 ± 314,78	768,211 ±389,15	1,17±0,78	176,36 ±120,34	195,07 ±82,00
MM	1909,09* ±513,37	802,45 ±298,22	1012,27* ±379,63	0,79 ±0,27	215,27 ±172,03	193,73 ±86,99
	p= 0,015	p=0,094	p=0,034	p=0,268	p=0,369	p=0,767

Valores de pacientes estudados em cada grupo: Total: 44; LL: 19; LM:14; MM:11. Valores de referência: CD3+:605-2460 cel/mm<sup>3</sup>;

CD4+: 493-1666 cel/mm<sup>3</sup>; CD8+: 224-1112 cel/mm<sup>3</sup>; CD19+:72-520 cel/mm<sup>3</sup>; NK : 73-654 cel/mm<sup>3</sup>

## 6.9.2 RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D E PARÂMETROS CLÍNICOS

Os vários parâmetros clínicos observados nos pacientes com imunodeficiência comum variável também foram analisados quanto a uma possível associação com os níveis séricos de vitamina D, que foram analisados separadamente em duas categorias: até 30 mg/dL e acima de 30 mg/dL.

A maioria dos participantes do grupo de estudo (n=35 correspondendo a 72,91%) apresentou níveis séricos de vitamina D abaixo de 30 mg/dL e sua distribuição foi 62,85% (n=22) no gênero feminino e 37,14% (n=13) no gênero masculino.

Por outro lado, níveis de vitamina D acima de 30 mg/dL foram encontrados em apenas 13 pacientes do grupo de estudo (27,08%), sendo 7 mulheres (53,8%) e 6 homens (46,15%). Não houve diferença quanto à distribuição de níveis de vitamina D até 30 mg/dL ou acima deste valor de acordo com o gênero dos pacientes (p=0,551).

Os níveis séricos de vitamina D estão demonstrados em relação às doenças de vias aéreas (tabela 11), doenças ósseas e gastrointestinais (tabela 12) e linfonomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, hipertensão portal, doenças autoimunes, asma e rinite (tabela 13).

Foi observada associação entre os níveis de vitamina D acima de 30 mg/dL e menor frequência de atelectasias pulmonares ( $p=0,021$ ) conforme pode ser visto na tabela 11.

Não foi encontrada associação entre os níveis de vitamina D até 30 mg/dL ou acima deste valor quando foram analisados todos os demais parâmetros clínicos descritos na tabela 11, tabela 12 e tabela 13.

**Tabela 11 : Frequência de doenças de vias aéreas distribuídas segundo as categorias de vitamina D nos pacientes com imunodeficiência comum variável**

Doença	Vitamina D	(Sim%)	Doença	Vitamina D	Sim (%)
<b>Vias Aéreas</b> $p=0,538$	<30 (35)	97,1% (34)	<b>DPOC</b> $p=0,456$	<30 (35)	2,9 % (1)
	>30 (13)	100,0% (13)		>30 (13)	7,7 % (1)
	Total (48)	97,9 (47)		Total (48)	4,2% (2)
<b>Pneumonia</b> $p=0,492$	<30 (35)	91,4% (32)	<b>Sinusites</b> $p=0,067$	<30 (35)	85,7% (30)
	>30 (13)	84,6 % (11)		>30 (13)	71,5% (8)
	Total (48)	89,6 % (43)		Total (48)	79,2% (38)
<b>Bronquiectasia</b> $p=0,297$	<30 (35)	62,9% (22)	<b>Otites</b> $p=0,987$	<30 (35)	22,9 % (8)
	>30 (13)	46,2 % (6)		>30 (13)	23,1 % (3)
	Total (48)	58,3%(28)		Total (48)	22,9 % (11)
<b>Atelectasia*</b> $p=0,022$	<30 (35)	42,9% (15)	<b>Tonsilites</b> $p=0,310$	<30 (35)	11,4 % (4)
	<b>&gt;30 (13)</b>	<b>7,7% (1)</b>		>30 (13)	23,1 % (3)
	Total (48)	33,3%(16)		Total (48)	14,6 % (7)

Valores de pacientes estudados em cada grupo: Total: 48; Até 30: 35 Maior que 30: 13

**Tabela 12: Frequências de doença óssea e de manifestações gastrointestinais distribuídas segundo as categorias de vitamina D nos pacientes com imunodeficiência comum variável**

Doença	Vitamina	Sim (%)	Doença	Vitamina D	Sim (%)
<b>Doença óssea</b> p=0,855	<30 (35)	45,71% (16)	<b>Intestinal</b> p=0,245	<30 (34)	67,6% (23)
	>30 (13)	53,84% (7)		>30 (13)	84,6%(11)
	Total (48)	47,91(23)		Total (47)	72,3% (34)
<b>Osteopenia</b>	<30 (35)	28,6% (10)	<b>Diarreia</b> p=0,788	<30 (35)	65,7%(23)
	>30 (13)	30,8% (4)		>30 (13)	61,5% (8)
	Total (48)	29,2% (14)		Total (48)	24,1% (31)
<b>Osteoporose</b>	<30 (35)	17,1% (6)	<b>Gastrite</b> p=0,640	<30 (35)	82,9% (29)
	>30 (13)	23,1% (3)		>30 (13)	76,9%(10)
	Total (48)	18,8% (9)		Total (48)	81,3% (39)

Valores de pacientes estudados em cada grupo: Total: 48; Até 30: 35 Maior que 30: 13 \* p>0,05

**Tabela 13: Frequência de comorbidades distribuídas segundo as categorias de vitamina D nos pacientes com imunodeficiência comum variável**

Doença	Vitamina D	Sim (%)	Doença	Vitamina D	Sim (%)
<b>Linfonomegalia</b> p=0,115	<30 (35)	22,9% (8)	<b>Autoimune</b> p=0,266	<30 (35)	31,4% (11)
	>30 (13)	46,2% (6)		>30 (13)	15,4% (2)
	Total (48)	29,2% (14)		Total (48)	27,1% (13)
<b>Esplenomegalia</b> p=0,297	<30 (35)	37,1% (13)	<b>Asma</b> p=0,784	<30 (35)	42,9% (15)
	>30 (13)	37,1% (7)		<30 (35)	38,5% (5)
	Total (48)	41,7% (20)		Total (48)	41,7% (20)
<b>Hepatomegalia</b> p=0,457	<30 (35)	34,3% (12)	<b>Rinite</b> p=0,251	<30 (35)	71,4% (25)
	>30 (13)	23,1% (3)		>30 (13)	53,8% (7)
	Total (48)	31,3% (15)		Total (48)	66,7% (32)
<b>Hipertensão portal</b> p=0,987	<30 (35)	22,9% (8)			
	>30 (13)	23,1% (3)			
	Total (48)	22,9% (11)			

Valores de pacientes estudados em cada grupo: Total: 48; Até 30: 35 Maior que 30: 13



### **6.9.3      RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D E PARÂMETROS LABORATORIAIS**

Foi observada associação entre o genótipo 55LL e níveis séricos mais elevados de vitamina D ( $p=0,04$ ) em relação aos demais (tabela 9) e correlação negativa entre os níveis séricos de vitamina D e PTH ( $0,019$ ) (anexo 10). Não houve correlação com os demais parâmetros laboratoriais analisados: perfil lipídico (anexo 9), atividade arilesterase ( $p=0,264$ ), níveis séricos de cálcio ( $p=0,659$ ), fósforo ( $p=0,535$ ), magnésio ( $p=0,598$ ) (anexo 10) e populações linfocitárias (anexo 11).

### **6.9.4      ATIVIDADE ARILESTERASE DE PON 1**

A média da atividade arilesterase nos pacientes com ICV foi de  $93,25 \pm 26,83$  U/L e a mediana de  $90,05$  U/L com valor máximo de  $203,00$  U/L e valor mínimo de  $45,00$  U/L. Em controles sãos, a média foi  $94,80 \pm 25,52$  U/L e com mediana de  $92,5$  U/L, valor máximo de  $201,00$  U/L e mínimo de  $13$  U/L.

Houve correlação positiva entre níveis de arilesterase e de colesterol total ( $p=0,047$ ) e LDL ( $p=0,029$ ) conforme apontado no anexo 6. Não foi observada correlação com os demais parâmetros laboratoriais analisados: genótipos do polimorfismo L55M (Tabela 9), níveis séricos de vitamina D ( $p=0,264$ ), cálcio ( $p=0,983$ ), fósforo ( $p=0,307$ ), magnésio ( $p=0,451$ ) (anexo 7) e populações linfocitárias (anexo 8).

## 7 DISCUSSÃO

A imunodeficiência deficiência comum variável (ICV) é a deficiência imunológica primária sintomática mais frequente em adultos. A maioria dos pacientes sofre infecções recorrentes causadas por falha da produção ou resposta pobre de anticorpos. Uma parcela significativa de pacientes com ICV também está sob o risco aumentado de doenças autoimunes ou inflamatórias e, em menor proporção, neoplasias (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999; Ameratunga, 2018).

Essas doenças são parcialmente decorrentes do desequilíbrio do estado redox que aumenta o stress oxidativo; este, por sua vez, pode alterar a resposta imune desencadeando modificações celulares e comprometimento tecidual (Rahal et al., 2014). Nesse contexto, o conhecimento dos possíveis mecanismos envolvidos no controle do stress oxidativo torna-se fundamental para a prevenção das doenças infecciosas, autoimunes, inflamatórias e neoplasias. Entre esses, incluem-se as paraoxonases e a vitamina D (Cantorna, 2015).

O objetivo deste estudo foi avaliar se os níveis séricos de 25-hidroxivitamina-D estariam relacionados à atividade arilesterase dos polimorfismos PON1-L55M, aos valores de populações linfocitárias do sangue periférico e às principais manifestações clínicas da imunodeficiência comum variável.

Para tanto, foi realizada a investigação dos pacientes quanto à presença de infecções, doenças autoimunes, doenças inflamatórias, doença óssea (osteopenia e osteoporose), asma e rinite. A seguir, foi coletado sangue para a genotipagem dos polimorfismos PON1-L55M e avaliação da atividade arilesterase da PON1, populações linfocitárias (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ e NK), perfil lipídico, níveis séricos de vitamina D, cálcio, fósforo e magnésio. Foram analisados exames de imagem realizados de rotina para ICV (CT de tórax e abdômen) e densitometria óssea. Finalmente, foi realizada a comparação entre os dados clínicos e laboratoriais.

A maioria dos participantes do estudo se autodeclarou como de cor branca, o que está de acordo com os estudos encontrados na literatura que descrevem predomínio de caucasianos na ICV (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999). Neste trabalho, três

pacientes apresentavam pele de cor negra e apenas um tinha etnia oriental.

Com relação ao sexo, o predomínio do gênero feminino no grupo de pacientes com ICV foi atribuído ao fato das mulheres terem demonstrado maior predisposição à participação no projeto e maior aderência a todas as etapas do mesmo. A média de idade foi 37,5 anos, o que está de acordo com o critério de inclusão de indivíduos até no máximo 50 anos.

No grupo controle houve predomínio de homens, justificado pelo fato dos voluntários terem sido recrutados entre doadores de sangue ou em uma empresa de perfil predominantemente masculino. Quanto à média de idade, foi similar entre pacientes e controles saudáveis e está de acordo com a grande maioria dos casos de ICV, onde o diagnóstico é estabelecido entre a terceira e a quarta décadas de vida (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999; Cunningham-Rundles, 2012).

A média do retardo diagnóstico, definido como o espaço de tempo entre o início dos sintomas e o estabelecimento diagnóstico foi de aproximadamente 9 anos e 6 meses, o que está em consonância com a literatura, na qual atualmente são referidos períodos que variam de 6 a 10 anos (Cunningham-Rundles, 2012). Este retardo pode ser explicado pela ampla heterogeneidade clínica da ICV, agravada pela presença de numerosas comorbidades em adultos e desconhecimento da doença por profissionais de outras especialidades médicas que ainda têm o falso conceito de que as imunodeficiências primárias têm apresentação inicial quase exclusivamente em crianças (Cunningham-Rundles, 2012).

A média do tempo de doença, correspondendo ao período decorrido entre o início dos sintomas até a idade do paciente à época do estudo, foi 21 anos (tabela 1) e, ao lado do retardo diagnóstico, pode estar associado à gravidade da ICV, à presença de numerosas comorbidades e ao comprometimento da qualidade de vida (Cunningham-Rundles e Bodian, 1999; Cunningham-Rundles, 2012).

Nossos resultados referentes às frequências dos genótipos e dos alelos dos polimorfismos PON1-L55M em pacientes e controles saudáveis estão demonstrados na tabela 3. Não foi observada diferença nas frequências dos genótipos e dos alelos no grupo de pacientes ICV em relação ao grupo controle. Em quatro pacientes os genótipos da PON1 não foram identificados e provavelmente isso foi devido à presença de mutações alélicas

não contempladas neste estudo.

Conforme pode ser observado na tabela 4, não houve diferença em relação à distribuição dos genótipos quanto ao gênero, média de idade atual, idade ao diagnóstico, retardo no diagnóstico e tempo de doença. Por outro lado, os pacientes portadores do genótipo 55LM apresentaram início mais precoce dos sintomas característicos da ICV em relação aos pacientes 55LL e 55MM. Uma provável explicação para isso é que os portadores do genótipo 55LM apresentem manifestações menos graves da ICV, uma vez que mesmo tendo início mais precoce dos sintomas, apresentam o mesmo tempo de doença que os pacientes portadores dos genótipos 55LL e 55 MM.

Esta hipótese encontra um respaldo fortíssimo através da análise do número de óbitos de nossos pacientes com ICV que já foram tipados para os polimorfismos L55M da PON-1 ao longo dos últimos 10 anos (Sini et al., 2014; Sini, 2017) e durante o estudo atual. Em seu total, foram submetidos à genotipagem 118 pacientes assim distribuídos: 55MM = 36; LM = 36; LL = 39; não determinados = 7. Entre os pacientes com genótipos conhecidos houve 24 óbitos no período analisado, entre os quais 16 (66,66%) eram portadores do genótipo MM (8 mulheres e 8 homens) e 8 (33,33%) apresentavam o genótipo LL (6 homens e 4 mulheres). É importante ressaltar que não houve mortes até o momento entre pacientes conhecidos com o genótipo 55LM (dados não divulgados em fase de publicação).

Entre esses óbitos, contabilizamos quatro em participantes masculinos do estudo atual nos últimos 15 meses: dois pacientes portadores do genótipo 55MM (um deles por morte súbita e outro por linfoma do sistema nervoso central recém- diagnosticado) e dois em portadores do genótipo 55LL (um deles por morte súbita e outro por covid-19).

Há evidências em estudos anteriores de nosso grupo de que pacientes com o genótipo MM sejam mais graves devido à ausência do alelo L, que parece ter papel protetor (Sini et al., 2014; Sini, 2017). No entanto, isso não esclarece porque os portadores do genótipo LM apresentam uma evolução menos grave da doença, sendo possível que outras enzimas anti-oxidativas estejam envolvidas.

A PON1 é altamente polimórfica sendo um dos polimorfismos mais importantes o da posição 55, onde há troca de uma leucina por uma metionina (PON1 - L55M) (Precourt et al., 2011). Este polimorfismo está associado à modulação da estabilidade enzimática

e sua função de hidrólise. Entre os alelos, há evidências de que o 55L esteja ligado à maior estabilidade e atividade enzimática (Precourt et al., 2011).

Os polimorfismos L55M da PON-1 associam-se a inúmeras condições patológicas (Goswami et al., 2009; Hussein et al., 2011; Rajković et al., 2011). Alguns estudos demonstraram a relevância dos polimorfismos L55M da PON-1 em doenças autoimunes, câncer de mama, câncer de rim e linfomas (De Roos et al., 2006, Hussein et al., 2011; Mackness e Mackness, 2015; Tanhapour, 2019; Saadat, 2012).

A PON1 é uma glicoproteína com propriedades anti-aterogênicas e antioxidantes e está fortemente ligada ao HDL (Hussein et al., 2011), além de possuir atividades de lactonase e arilesterase (Aviram, 1998). Esta última atividade é responsável pela hidrólise de lipídios oxidados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Aviram, 1998).

Em nosso estudo, a média da atividade arilesterase nos pacientes com ICV foram similares às encontradas nos controles sãos, não sendo observada diferença entre os genótipos do polimorfismo L55M (Tabela 9). Houve correlação positiva entre níveis de arilesterase e de colesterol total e LDL, conforme apontado no anexo 6.

Precourt e colaboradores descreveram menores valores de atividade arilesterase em indivíduos com o genótipo 55MM (Precourt et al., 2011). Recentemente, Meisinger e colaboradores evidenciaram que níveis muito elevados de inflamação podem estar associados a uma atividade arilesterase diminuída (Meisinger et al. 2021). Também foi demonstrada relação entre atividade arilesterase reduzida e os genótipos do polimorfismo L55M da PON-1 em pacientes com doenças autoimunes (Tanhapour, 2019).

Entretanto, nossos resultados não estão de acordo com os relatos acima, uma vez que tanto a atividade arilesterase como a frequência elevada de processos infecciosos e doenças autoimunes, intrinsecamente associados à atividade inflamatória, não diferiram entre os genótipos do polimorfismo L55M. Uma possível explicação baseia-se no relato recente de que a atividade arilesterase da PON-1 é mais elevada nas frações HDL3 do que HDL2, independente do polimorfismo Q192R e/ou LM55 (Valencia et al., 2021), enquanto em nosso estudo analisamos apenas o HDL total.

Também não observamos associação entre os genótipos 55LL, 55LM e 55MM e os níveis de colesterol total, HDL, LDL, triglicérides, VLDL e ApoA-1, confirmando estudo anterior realizado por nosso grupo (Sini et al., 2014); isto nos permite aventar a hipótese

de que talvez este seja um padrão relacionado à própria ICV e/ou ao seu tratamento padrão-ouro que constitui a infusão mensal de imunoglobulina humana em altas doses.

A PON1 está presente no soro associada à apoA-1, que é integrante das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Adicionalmente, essa enzima também é capaz de proteger contra modificações oxidativas tanto de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) quanto de alta densidade (HDL) (Aviram et al., 1998; Aviram et al., 2013).

Não observamos associação entre ApoA-1 e os demais parâmetros analisados; contudo, o que pode justificar parcialmente a ausência de associação entre a ligação da PON1 com HDL, mais estritamente com a ApoA-I, é que esta constitui um pré-requisito para a estabilidade da atividade sérica da enzima, não sendo por outro lado necessária para a secreção e ligação da PON1 ao HDL, uma vez que também pode estar ligada à ApoA-II, ApoE e ApoJ (Forti; Diament, 2006).

Além de exercer importante papel biológico antiteratogênico, a PON também atua sobre o stress oxidativo (Devarajan et al., 2011). Já foi descrita redução importante da expressão do mRNA de PON1 em nível hepático durante infecções agudas, enquanto inflamações crônicas provocam alterações estruturais nas moléculas de HDL, que é sua principal carreadora (Soran et al., 2015). Em última análise, o aumento do stress oxidativo pode resultar na redução da atividade de PON1 e, conseqüentemente, desempenhar um papel na patogênese de infecções agudas e crônicas ou recorrentes, além de diversas outras condições como doenças autoimunes/inflamatórias, neoplasias, imunosenescência, AIDS e neoplasias (Camps et al., 2009).

Em relação às neoplasias, isso se reveste de grande importância, uma vez que em pacientes com ICV o risco para essas doenças, especialmente linfomas e carcinomas, pode variar de 300 a 500 vezes, dependendo do estudo (Cunningham- Rundles, 2009, Malphettes et al., 2009).

Um de nossos objetivos foi analisar se os principais parâmetros clínicos caracteristicamente associados à imunodeficiência comum variável guardariam associações com os diferentes genótipos do polimorfismo PON1-L55M.

Contrariamente ao esperado, tendo como base relatos na literatura de doenças outras que não ICV, não encontramos associações entre os genótipos 55LL, 55LM e 55MM e a presença da maioria das manifestações clínicas analisadas, tais como: infecções de vias

aéreas (tabela 5), doença metabólica óssea (osteogenia e osteoporose), diarreia ou gastrite (tabela 6), esplenomegalia, hepatomegalia, hipertensão portal, autoimunidade, asma ou rinite (tabela 7). Embora discordantes dos relatos da literatura, esses achados são compatíveis com a presença de níveis similares de atividade arilesterase entre os três genótipos analisados.

As únicas associações detectadas em nossa casuística foram entre o genótipo 55LL e frequência de linfonomegalia (tabela 7) e entre o genótipo 55MM e menor frequência de doenças intestinais (tabela 6).

Em 2006, De Roos e colaboradores demonstraram maior incidência de linfonodomegalia associada ao genótipo 55MM da PON1 em uma população geral, considerando essa associação como possível fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias na população estudada (De Roos et al., 2006). Estudos posteriores demonstraram a relevância dos polimorfismos L55M da PON-1 em doenças como câncer de mama, câncer de rim e linfomas (Hussein et al., 2011, Mackness e Mackness, 2015, Saadat, 2012).

Em nosso estudo, exceto a correlação positiva entre o genótipo LL e presença de linfonodomegalias, não encontramos associação com outros parâmetros clínicos como doenças autoimunes (tabela 7) ou infecções de repetição ou crônicas de vias aéreas (tabela 5). Cabe ressaltar que um dos critérios de exclusão durante a seleção de pacientes foi a presença de doenças neoplásicas atuais ou em tratamento.

São raros na literatura estudos na ICV referentes ao stress oxidativo e paraoxonases. Neste contexto, Aukrust e colaboradores encontraram correlação entre níveis plasmáticos elevados da homocisteína reduzida e aumento do stress oxidativo em pacientes com ICV (Aukrust et al. 1997). Em 1994, esses mesmos pesquisadores já haviam descrito também na ICV níveis elevados de IL-4 e IL-6 associados à ativação imunológica crônica e valores baixos de linfócitos CD4+ (Aukrust et al. 1994). Em nosso grupo, durante estudo relacionando stress oxidativo e polimorfismos 55LM da PON-1 na ICV, Sini e colaboradores encontraram dados sugestivos de maior associação do genótipo 55MM a linfomas (Sini et al, 2014); posteriormente, o mesmo grupo descreveu que os portadores do alelo 55L da PON1 apresentaram sobrevida cerca de três vezes mais elevada quando comparados aos indivíduos não portadores desse alelo, sugerindo que ele possa

desempenhar um papel protetor (Sini et al, 2017).

Outro de nossos objetivos foi analisar se os níveis de vitamina D guardariam associações com os principais parâmetros clínicos caracteristicamente associados à imunodeficiência comum variável, parâmetros laboratoriais e os diferentes genótipos do polimorfismo PON1-L55M. Para tanto, os níveis séricos de vitamina D foram analisados separadamente em duas categorias: até 30 mg/dL e acima de 30 mg/Dl; tal ponto de corte foi selecionado uma vez que a recomendação preconiza se manter níveis de vitamina D acima de 30 mg/mL em pacientes adultos portadores de doenças crônicas, independentemente da idade.

A maioria dos participantes do grupo de estudo (72,91%) apresentou níveis séricos de vitamina D abaixo de 30 mg/dL, não havendo diferença quanto à sua distribuição entre os dois gêneros. Essa mesma análise não foi aplicada em relação às características melanodérmicas dos pacientes, uma vez que neste estudo consideramos acor da pele segundo a autodeclaração de cada um deles. No entanto é notório que apenatrês entre eles tinham pele de cor negra, que está associada a uma menor síntese de vitamina D após exposição solar (Maeda et al., 2014).

Como era esperado, foi observada correlação negativa entre os níveis séricos de vitamina D e PTH (anexo 10), não havendo correlação com os demais parâmetros laboratoriais analisados: perfil lipídico (anexo 9), atividade arilesterase, níveis séricos de cálcio, fósforo, magnésio (anexo 10) e populações linfocitárias (anexo 11).

É amplamente conhecido que pacientes com ICV cursam com diversas manifestações clínicas que podem estar relacionadas à hipovitaminose D, como asinfecções crônicas, doenças autoimunes, doenças inflamatórias gastrointestinais, asma e malignidades, especialmente os linfomas e os carcinomas (Chapel et al., 2008; Chapel&Cunningham-Rundles, 2009; Kokron et al., 2004; Sini et al., 2014; Resnick et al., 2012).

Entre os vários parâmetros clínicos analisados neste estudo, encontramos associação apenas entre os níveis de vitamina D acima de 30 mg/dL e menor frequência de atelectasias pulmonares (tabela 11). Níveis séricos de vitamina D mais elevados foram encontrados entre portadores do genótipo 55LL (tabela 9), cabendo ressaltar que mesmo assim estavam no limiar dos níveis considerados suficientes (30 mg/dL) em indivíduos sob diversas condições que frequentemente podem estar associadas à ICV, tais como:



senilidade, osteoporose, insuficiência renal ou hepática, uso de medicamentos que interferem no metabolismo da vitamina D (glicocorticoides, anticonvulsivantes, antifúngicos), síndromes de má-absorção, linfomas, gestação e lactação (eventualmente) (Moreira et al., 2020).

Pacientes com ICV frequentemente cursam com infecções crônicas ou recorrentes do trato respiratório que podem deixar sequelas teciduais em graus variados como bronquiectasias e atelectasias, além de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), que pode levar à insuficiência respiratória e morte (Chapel et al., 2008; Chapel & Cunningham-Rundles, 2009; Kokron et al., 2004; Sini et al., 2014; Resnick et al., 2012). Nesse contexto, já está bem estabelecido que a vitamina D pode estar associada a infecções do trato respiratório (Cantorna, 2015) e doenças de vias aéreas como bronquiectasias, DPOC e asma (Martineau et al., 2019; Autier et al., 2017). Mais recentemente, há evidências de que a vitamina D possa desempenhar algum papel também nas sequelas consequentes à infecção pelo Sars- COV2 (Osman et al, 2021).

Contudo, não encontramos na literatura associação direta entre a presença de atelectasias e níveis de vitamina D, cabendo ressaltar que a atelectasia pode ser desencadeada por numerosas condições, tais como infecções crônicas, tuberculose, bronquiectasias, DPOC e fatores de compressão extrínseca como tumores e linfonodomegalias (Woodring et al., 1996)

Neste estudo, não encontramos diferença quanto às frequências de manifestações de vias aéreas entre os portadores dos vários genótipos dos polimorfismos L55M. Entre os vários parâmetros clínicos analisados, encontramos associação apenas entre os níveis de vitamina D acima de 30 mg/dL e menor frequência de atelectasias pulmonares (tabela 11).

Neste contexto, a análise conjunta dos dados referentes à menor frequência de atelectasias associada a níveis séricos mais elevados de vitamina D, assim como à maior prevalência de linfonodomegalias entre portadores do genótipo 55LL (tabela 9) ao lado de níveis mais elevados de vitamina D, é sugestiva que nesse subgrupo de pacientes a presença de atelectasia esteja parcialmente associada à compressão torácica extrínseca e não apenas à presença de infecções pulmonares crônicas.

Além de desempenhar papel fundamental na homeostase mineral óssea e no

metabolismo do cálcio e de estar associada à osteopose e risco de fraturas ósseas, a vitamina D regula potencialmente diversas outras funções celulares (Jeffery et al., 2012; Cantorna et al., 2015).

Embora relatos na literatura tenham demonstrado evidências de que níveis séricos de vitamina D abaixo de 20 ng/mL estejam associados também ao risco aumentado de doenças infecciosas, autoimunes, cardiovasculares e neoplasias (Cantorna & Mahon, 2004; Arnson et al, 2007), ainda não está suficientemente esclarecido como baixos níveis de vitamina D poderiam estar relacionados ao desencadeamento dessas doenças.

Também são comuns as infecções do trato gastrointestinal que dependendo de sua gravidade chegam a causar perda ponderal significativa e até mesmo desnutrição (Cantorna & Mahon, 2004). Neste estudo não encontramos associação entre os níveis de vitamina D quando foram analisadas as frequências de doença óssea (incluindo osteopenia e osteoporose) e doenças inflamatórias gastrointestinais (tabela 12).

Embora a prevalência de doença óssea tenha sido diagnosticada em 23 pacientes com ICV (47,91%), entre os quais 14 apresentaram osteopenia (correspondendo a 29,2% do total analisado) e os 9 demais osteoporose (18,8%), não encontramos associação com os níveis de vitamina D (tabela 12). Essa alta frequência de doença óssea é relevante, uma vez que não foi observada em nenhum dos 33 participantes do grupo controle que realizaram densitometria óssea.

Uma possível explicação para isso é que há outros fatores implicados na etiopatogenia da doença mineral óssea além dos níveis séricos de vitamina D; entre outros, são citados como por exemplo, a contagem de células B e de células T (Deluca&Cantorna, 2001; (Jeffery et al., 2012; Cantorna et al., 2015) com produção de citocinas que atuam na homeostase do metabolismo ósseo (Cantorna et al., 2015; Holm et al., 2005; Toraldo et al., 2003;)

Há poucos relatos na literatura sobre a presença osteopenia e osteoporose em pacientes com ICV com os quais pudéssemos comparar nosso estudo.

Nossos achados são parcialmente concordantes com os de Mohebbi e colaboradores que detectaram densidade baixa de massa óssea em 40.5% de pacientes com ICV e média de idade de 20 anos (Mohebbi et al. 2017), com a ressalva de que em nossa casuística a média de idade dos pacientes foi mais elevada (37 anos).

Também Baris e colaboradores encontraram baixa densidade mineral óssea em cerca de 68% de pacientes jovens com ICV, além de histórico de fraturas ósseas em torno de 22% deles. Ao contrário desses pesquisadores, não houve casos de fratura óssea em nossos pacientes, assim como também não encontramos associações entre a densidade mineral óssea e níveis mais baixos IgG, contagem de linfócitos B e presença de bronquiectasias relatadas naquele mesmo estudo (Baris et al., 2011).

O osso constitui um órgão dinâmico que se encontra em remodelação contínua mediada pelos osteoclastos, que são as principais células ósseas reabsortivas (Boyle et al., 2003). A reabsorção excessiva por osteoclastos leva à perda óssea patológica, como ocorre em doenças ósseas metabólicas, como artrite reumatoide e osteoporose (Nakashima & Takayanagi, 2009).

Ainda nos dias atuais, os mecanismos envolvidos na perda óssea não estão totalmente esclarecidos, havendo numerosos estudos desenvolvidos nesta área. O papel das células TCD4+ ativadas na homeostase óssea tem sido extensivamente estudado, especialmente na diferenciação de osteoclastos (Sato et al., 2006). O mesmo ocorre em relação às citocinas pró-inflamatórias, em especial IL-1, IL-6 e TNF-alfa, produzidas por células CD4+ auxiliares (Th1) (Ogino et al., 2011), além da IL-17, produzida pela população linfocitária Th17 (Koshy et al., 2002), que são potencialmente importantes na patogênese da perda óssea.

As células T reguladoras (Tregs) desempenham um papel vital na supressão do sistema imunológico atuando sobre as populações celulares Th1, Th2 e Th17 (Abbas et al., 2019). Mais recentemente, as células Treg foram implicadas também nos mecanismos de homeostase mineral óssea regulando as populações linfocitárias Th1 e Th17 (Saito et al., 2010), além de poderem suprimir diretamente a diferenciação de osteoclastos na artrite reumatoide (Kelchtermans et al., 2009). Também foi demonstrado por Zaiss e colaboradores que células Treg de camundongos podem inibir a formação de RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B) pelos osteoclastos (Zaiss et al., 2007).

Uma das principais citocinas que atuam na reabsorção óssea é o RANKL, produzido principalmente por osteoblastos, mas também por osteócitos, fibroblastos, células dendríticas maduras e linfócitos T ativados (Yuan et al., 2010). O RANKL liga-se ao seu

receptor (RANK) expresso em numerosas células como linfócitos T e B, mas principalmente em células precursoras de osteoblastos, que são ativadas e promovem reabsorção óssea. Por outro lado, a osteoprotegerina (OPG), uma citocina produzida por osteoblastos, linfócitos B e células dendríticas, impede a ligação do RANKL ao seu ligante RANK, diminuindo a reabsorção óssea (Yuan et al., 2010). Durante processos inflamatórios, ocorre aumento da produção RANKL causando um desequilíbrio na relação entre RANKL e OPG e, conseqüentemente, maior osteoclastogênese (Yuan et al., 2010).

Neste contexto, o comprometimento numérico e principalmente funcional dos linfócitos B, que constitui um dos aspectos mais marcantes da ICV, pode estar associado a uma produção mais baixa de OPG que pode, conseqüentemente, levar a uma maior ocorrência de osteopenia e osteoporose em pacientes com essa imunodeficiência (Baris et al., 2011). Ao contrário do relatado por Baris e colaboradores, em nosso trabalho não observamos associação entre a presença de doença óssea e a contagem de células B.

Em 2017, Barreto-de-Melo e colaboradores, durante estudo realizado por nosso grupo, relataram associação positiva entre valores de linfócitos T CD4 + abaixo de 650 células / mm<sup>3</sup> e a densidade mineral óssea em pacientes com ICV (Barreto-de-Melo, 2017). Os autores sugeriram que isso pudesse ser explicado pelo comprometimento do eixo CD40/CD40L que promove uma diminuição da produção de OPG por células B (Li et al., 2007; Panach et al., 2016). Na síndrome de hiper-IgM ligada ao X, uma imunodeficiência primária na qual ocorre comprometimento do sistema coestimulatório CD40/CD40L, os pacientes apresentam osteopenia como uma característica clínica proeminente (De la Morena, 2016).

A interleucina-7 (IL-7) desempenha um papel crítico na linfopoiese e homeostase de linfócitos (Abbas et al., 2019). Altos níveis plasmáticos de IL-7 têm sido correlacionados a linfopenia de células TCD4+ refletindo uma resposta homeostática à depleção de células T em pacientes infectados pelo HIV (Napolitano et al., 2001). Por outro lado, deficiências da cadeia do receptor de IL-7 (IL-7R) ou da cadeia c comum podem levar à imunodeficiência grave combinada (Abbas et al., 2019), enquanto uma deficiência parcial de IL-7R está associada a uma apresentação tardia de imunodeficiência podendo causar hipogamaglobulinemia (Roifman et al., 2001)

A IL-7 é uma citocina linfopoiética que desempenha forte papel osteoclastogênico capaz de induzir perda de massa óssea in vivo. Há evidências de que possa atuar sobre precursores iniciais de células B (B220+) que têm a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos (van Rom&Lafer, 2008). No entanto, estes dados não foram confirmados por Toraldo e colaboradores que demonstraram elegantemente que em camundongos nude a IL-7 é capaz de regular positivamente as células B220+ sem induzir a secreção de RANKL e TNF-alfa e perda óssea significativa. Por outro lado, a transferência adotiva de linfócitos T para essa mesma linhagem de camundongos foi capaz de induzir a secreção de RANKL e TNF-alfa, demonstrando que as células T são essenciais para a perda óssea in vivo (Toraldo et al., 2003).

Holm e colaboradores descreveram em pacientes com ICV uma associação positiva entre níveis plasmáticos mais elevados de IL-7 (acima de 10 pg / mL) e presença de esplenomegalia, bronquiectasias e autoimunidade (Holm et al., 2005), características clínicas estas semelhantes às que foram associadas à baixa densidade mineral óssea no relato de Baris e colaboradores (Baris et al., 2011).

No mesmo estudo, Holm e colaboradores também demonstraram em pacientes com ICV que apresentavam níveis mais elevados de IL-7, aumento de linfócitos CD8+ com redução da apoptose e predominância de linfócitos T de memória efetora negativos para CCR7 (células de memória diferenciadas terminalmente). Em alguns destes pacientes, observaram redução da produção de IFN-gama e TGF-beta após estímulo in vitro com IL-7. Esses pesquisadores sugeriram que o feedback negativo prejudicado pela produção aumentada de IL-7 poderia, portanto, estar implicado nas funções anormais de células T e consequente prejuízo da função de B em pacientes com ICV (Holm et al., 2005).

A ICV engloba um grupo heterogêneo de doenças com diversas manifestações clínicas incluindo infecções, doenças autoimunes e neoplasias, tendo como principal característica a redução do número ou função de linfócitos B, no entanto, aproximadamente 50% dos pacientes apresentam também defeitos de células T que podem contribuir para o prejuízo na produção e função de anticorpos (Kokron et al., 2004). Neste estudo observamos que pacientes com ICV portadores do genótipo 55MM apresentaram contagens mais altas de linfócitos CD8+, ao lado de valores normais de linfócitos CD4+ e CD19+ (tabela 10).

As características clínicas descritas na ICV como por exemplo as infecções crônicas ou de repetição e a maior prevalência de doenças autoimunes/inflamatórias, osteopenia/osteoporose e neoplasias encontram similaridade com aquelas que ocorrem durante o processo de envelhecimento (Torres et al., 2011). Durante a senescência ocorre expansão da população de linfócitos T CD8+28neg consideradas células exauridas, tendo como consequência a redução da capacidade proliferativa após estímulo antigênico natural e vacinal (Franceschi et al., 1995; Ferguson et al., 1995, Yang et al., 2008).

Espera-se que tais características acometam apenas indivíduos mais velhos; no entanto, estudos avaliando portadores do HIV sem tratamento e com diferentes idades, mostraram que o sistema imunológico desses indivíduos está precocemente envelhecido, apresentando expansão de linfócitos T CD28neg e a densidade mineral óssea diminuída, isso provavelmente pela constante e persistente inflamação (Deeks & Phillips, 2009; Effros et al., 2008; Guaraldi et al., 2011).

Deste modo, em nosso estudo, a presença elevada de doença óssea em adultos jovens e o aumento de linfócitos CD8+ no subgrupo de portadores do genótipo 55MM da PON-1 que cursaram com maior número de óbitos, permitem aventar a hipótese de que na ICV possa ocorrer uma senescência precoce.

## 8 CONCLUSÕES

- 1) A distribuições dos genótipos e dos alelos do polimorfismo L55M no grupo de pacientes ICV foram similares às do grupo controle;
- 2) os pacientes portadores do genótipo 55LM apresentaram início mais precoce dos sintomas característicos da ICV, sendo provável que apresentem manifestações menos graves da ICV em relação aos pacientes 55LL e 55MM;
- 4) A atividade arilesterase da PON-1 foi similar entre os portadores dos genótipos 55MM, 55LL e 55LM e controles sãos e não apresentou relação com o quadro clínico;
- 5) Não houve associação entre os genótipos do polimorfismo L55M e a presença da maioria das manifestações clínicas analisadas, sendo esses achados compatíveis com a presença de níveis similares de atividade arilesterase entre os três genótipos analisados;
- 6) A maioria dos participantes do grupo de estudo apresentou níveis séricos de vitamina D abaixo de 30 mg/dL, não havendo diferença entre os dois gêneros e demais parâmetros laboratoriais analisados, exceto uma correlação negativa com os níveis de PTH;
- 7) Houve associação entre níveis séricos mais elevados de vitamina D e a menor frequência de atelectasias. Considerando que os portadores do genótipo 55LL apresentaram maior prevalência de linfonodomegalias e níveis mais elevados de vitamina D, uma possibilidade é que nesse subgrupo de pacientes a presença de atelectasia esteja parcialmente associada à compressão torácica extrínseca;
- 8) A presença de doença mineral óssea foi elevada ocorrendo em 41,6% dos pacientes, sendo mais frequente a osteopenia (65,0%) do que a osteoporose (35,0%).
- 9) Os portadores do genótipo 55MM apresentaram contagens mais altas de linfócitos CD8+, ao lado de valores normais de linfócitos CD4+ e CD19+;
- 10) A ausência de associação entre os níveis séricos de vitamina D, infecções crônicas, doenças autoimunes e osteopenia/osteoporose entre os portadores dos genótipos 55L, 55LM e 55MM, ao lado do aumento de linfócitos CD8+ em portadores do genótipo

55MM, permitem aventar a hipótese de que neste subgrupo de pacientes com imunodeficiência comum variável a doença mineral óssea possa ser parcialmente secundária a um distúrbio da imunidade celular.



## REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K. et al. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 6e: Sae-E-Book. Elsevier India, 2019.

AGARWAL S, CUNNINGHAM-RUNDLES C. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2019 Nov;123(5):454-460. doi: 10.1016/j.anai.2019.07.014.

AMAYA-MEJÍA, A. S. et al. Deficiência de vitamina D em pacientes com imunodeficiência comum variável, com enfermidades autoimunes y bronquiectasias. *Revista Alergia México*, v. 60, p. 110-116, 2013.

ARDENIZ O, AVCI CB, SIN A, OZGEN G, GUNSAR F, METE N, GULBAHAR O, KOKULUDAG A. Vitamin D deficiency in the absence of enteropathy in three cases with common variable immunodeficiency. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008

ARNSON Y, AMITAL H, SHOENFELD Y. Vitamin D and autoimmunity: new etiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1137-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2007.069831>.

ASPALTER, R. M.; SEWELL, W. A. C.; DOLMAN, K.; FARRANT, J.; WEBSTER, A. D. B. Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 121, p. 506-514, 2000.

AUTIER P, MULLIE P, MACACU A, DRAGOMIR M, BONIOL M, COPPENS K, PIZOT C, BONIOL M. Effect of vitamin D supplementation on non-skeletal disorders: a systematic review of meta-analyses and randomised trials. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 Dec;5(12):986-1004. doi: 10.1016/S2213-8587(17)30357-1. Epub 2017 Nov 5.

AVIRAM M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today*; v.5: p 381–386,1999.

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.

AZIZI G. et.al. Autoimmunity and its association with regulatory T cells and B cell subsets in patients with common variable immunodeficiency. *Allergol. Immunopathol.* 2017

BARRETO-DE-MELO. Estado nutricional, massa óssea, aptidão cardiorrespiratória, força muscular e populações linfocitárias de pacientes com imunodeficiência comum variável. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2018.

BARIS, S. et al. Osteoporosis: an ignored complication of CVID. *Pediatric Allergy and Immunology*, v. 22, p. 676-683, 2011.

BARNARD K., COLÓN-EMERIC C. EXTRASKELETAL effects of vitamin D in older adults: Cardiovascular disease, mortality, mood, and cognition. *Am. J. Geriatr. Pharmacother.* 2010;8:4–33. doi: 10.1016/j.amjopharm.2010.02.004.

BELLAN M, ANDREOLI L, MELE C, ET AL. Pathophysiological Role and Therapeutic Implications of Vitamin D in Autoimmunity: Focus on Chronic Autoimmune Diseases. *Nutrients.* 2020;12(3):789. Published 2020 Mar 17. doi:10.3390/nu12030789

BIERWIRTH, J. et al. Association of common variable immunodeficiency with vitamin B6 deficiency. *Eur J Clin Nutr.* v. 62, n. 3, p. 332–335, 2008.

BIERWIRTH, J.; ULBRICHT, K. U.; SCHMIDT, R. E.; WITTE, T. Association of common variable immunodeficiency with vitamin B6 deficiency. *European Journal of Clinical Nutrition.* v. 62, p. 332–335, 2008.

BONILLA FA, BARLAN I, CHAPEL H, COSTA-CARVALHO BT, CUNNINGHAM-RUNDLES C, de la Morena MT, et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016;4(1):38-59. doi: 10.1016/j.jaip.2015.07.025.

BOYLE, W. J., SIMONET, W. S., LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.

VELDMAN, M. T. CANTORNA; H. F. DELUCA, “Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in the immune system,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 374, no. 2, pp. 334–338, 2000.

CAMPS J, MARSILLACH J, JOVEN J. The paraoxonases: role in human disease and methodological difficulties in measurement. *Clin Rev Clin Lab Science.* v.106,p. 46:83, 2009.

CANTORNA MT, MAHON BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004 Dec;229(11):1136-42. doi: 10.1177/153537020422901108. PMID: 15564440.

CANTORNA MT, MUNSICK C, BEMISS C, MAHON BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J Nutr.* 2000;130:2648–52. doi: 10.1093/jn/130.11.2648

CANTORNA, M.T. Vitamin D and 1,25(OH)<sub>2</sub>D regulation of T cells. *Nutrients* ,v.7(4), p. 3011-3021, 2015.

CARVALHO, K. I. et al. Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). *PLoS ONE*, v. 5, n. 9, e12652, p. 1-8, 2010.

CASTIGLI E., et al. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* p:3903–3908, 2004.

CASTIGLI E., WILSON S.A., GARIBYAN L., RACHID R., BONILLA F., SCHNEIDER L., GEHA R.S. TAC1 is mutant in common variable immunodeficiency

and IgA deficiency. *Nat. Genet.* 2005; 37:829–834. doi: 10.1038/ng1601.

CHAPEL H, CUNNINGHAM-RUNDLES C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *Br J Haematol.* 2009 Jun;145(6):709-27. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07669.x. Epub 2009 Mar 30. PMID: 19344423; PMCID: PMC2718064.

CHAPEL H. et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*, v. 112, n. 2, p. 277-286, 2008.

CHAPEL, H.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *British Journal of Haematology*, v. 145, n. 6, p. 709–727, 2009.

CUNNINGHAM-RUNDLES, C. How I treat common variable immune deficiency. *Blood*, v. 116, n. 1, p. 7–15, 2010.

CUNNINGHAM-RUNDLES, C. How I treat common variable immune deficiency. *Blood*, v. 116, n. 1, p. 7-15, 2012.

COSTA LG, VITALONE A, COLE TB, FURLONG CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(4):541-50.

DANIELS JA, LEDERMAN HM, MAITRA A, MONTGOMERY EA. Patologia do trato gastrointestinal em pacientes com imunodeficiência comum variável (IDCV): um estudo clínico-patológico e uma revisão . *Am J SurgPathol* . 2007; 31 : 1800–1812doi:http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra070553.

DEEKS, STEVEN G.; PHILLIPS, ANDREW N. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. *Bmj*, v. 338, 2009.

DEVARAJAN A, BOURQUARD N, HAMA S, NAVAB M, GRIJALVA VR, MORVARDI S, et al. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(3):341-51.

EFFROS RB, FLETCHER CV, GEBO K, et al. Aging and infectious diseases: workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions. *Clin Infect Dis.* 2008;47(4):542-553. doi:10.1086/590150

ELAMIN M.B., ABU ELNOUR N.O., ELAMIN K.B., FATOURECHI M.M., ALKATIB A.A., ALMANDOZ J.P., LIU H., LANE M.A., MULLAN R.J., HAZEM A., et al. Vitamin D and cardiovascular outcomes: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96:1931–1942. doi: 10.1210/jc.2011-0398.

EREN E; AKAR Y;NECAT Y. Acute phase response: implication in st-segment elevation myocardial infarction; *Open Biochem J.* 16;8:44-51, 2014.

ERIN YAMAMOTO, TRINE N. JORGENSEN, Immunological effects of vitamin D and their relations to autoimmunity, *Journal of Autoimmunity*, Volume 100,2019,Pages 7-16,ISSN 0896-8411,<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.03.002>.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY( EFSA) Dietary reference values for vitamin D: EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) EFSA J. 2016;14:e04547. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4547.

EUROPEAN SOCIETY FOR IMMUNODEFICIENCIES. ESID registry: workingDefinitions for clinical diagnosis of PID, 2016. Disponível em: [http://esid.org/content/download/13053/372959/file/ESIDRegistry\\_ClinicalCriteria.pdf](http://esid.org/content/download/13053/372959/file/ESIDRegistry_ClinicalCriteria.pdf). Acesso em 29 de setembro de 2021

FORTI N, DIAMANT J. High-density lipoproteins: metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic intervention aspects. An update for clinicians. *Arq Bras Cardiol.* 2006 Nov;87(5):671-9. English, Portuguese. doi: 10.1590/s0066-782x2006001800019. PMID: 17221046.

FU, L., FEI, J., TAN, Z. X., CHEN, Y. H., HU, B., XIANG, H. X., ZHAO, H., & XU, D. X. (2021). Low Vitamin D Status Is Associated with Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 206(3), 515–523. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000964>

GAO, Y; WORKMAN, S; GADOLA, S.; ELLIOTT, T.; GRIMBACHER, B; WILLIAMS, A. P. Common variable immunodeficiency is associated with a functional deficiency of invariant natural killer T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2014 [Epub ahead of print].

GATHMANN B., MAHLAOUI N., GERARD L., OKSENHENDLER E., WARNATZ K., SCHULZE I., KINDLE G., KUIJPERS T.W., DUTCH W.I.D., et al. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014; 134:116–126. doi: 10.1016 Julho de 2014 Volume 134, Edição 1, Páginas 116–126.e1

GUGLIUCCI A, MENINI T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin Chim Acta.* 2015;439:5- 13.

GIOVANNETTI, A. et al. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol*, v. 178, n. 6, p. 3932–3943, 2007.

GOLZARAND M., SHAB-BIDAR S., KOOCHAKPOOR G., SPEAKMAN J R.DJAFARIAN K. Effect of vitamin D3 supplementation on blood pressure in adults: An updated meta-analysis. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2016;26:663–673. doi: 10.1016/j.numecd.2016.04.0

GOMBART A.F., BORREGAARD N., KOEFFLER H.P. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB J.* 2005;19:1067–1077. doi: 10.1096/fj.04-3284

GUARALDI, et al, Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. *Clinical infectious diseases*, 2011 ;53(11), 1120-1126.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in

vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2):231-55.

HELLEBERG, M. et al. Course and clinical significance of CD8+ T-cell counts in a large cohort of HIV-infected individuals. *J Infect Dis,* v. 211, n. 11, p. 1726–1734,2015.

HOLICK M.F. Vitamin D status: Measurement, interpretation, and clinical application. *Ann. Epidemiol.* 2009;19:73–78. doi: 10.1016/j.annepidem.2007.12.001

HOLICK MF. Medical progress: vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266– 81

HOLM, AM et al. Abnormal interleukin-7 function in common variable immunodeficiency. *Blood,* v. 105, n. 7, p. 2887-2890, 2005.

HUANG J, CHEN T, LIU Y, LYU L, LI X, YUE W. How would serum 25(OH)D level change in patients with inflammatory bowel disease depending on intestinal mucosa vitamin D receptor (VDR) and vitamin D1- $\alpha$  hydroxylase (CYP27B1)? *Turk J Gastroenterol.* 2019 Feb;30(2):132-138. doi: 10.5152/tjg.2018.17828. PMID: 30429108; PMCID: PMC6408158.

HUEN, K.; HARLEY, K.; BROOKS, J.; HUBBARD, A.; BRADMAN, A.; ESKENAZI, B., et al. Developmental Changes in PON1 Enzyme Activity in Young Children and Effects of PON1 Polymorphisms. *Environmental Health Perspectives,* v.117, n.10, 2009.

HUSSEIN Y, GHARIB A, ETEWA R, ELSAWY W. Association of L55M and Q192R polymorphisms in paraoxonase 1 (PON1) gene with breast cancer risk and their clinical significance. *Mol Cell Biochem.* . p351:117-23,2011.Institute of Medicine . Dietary Reference Intakes: Calcium and Vitamin D. The NationalAcademic Press; Washington, DC, USA: 2011.

JIRA PE, WATERHAM HR, WANDERS RJ, SMEITINK JA, SENGENS RC, WEVERS RA. Smith-Lemli-Opitz syndrome and the DHCR7 gene. *Ann Hum Genet.* 2003;67(Pt 3):269-80.

JOLLIFFE DA, GANMAA D, WEJSE C, RAQIB R, HAQ MA, SALAHUDDINN, et al. Adjunctive vitamin D in tuberculosis treatment: metaanalysis of individual participant data. *EurRespir J.* (2019) 53:1802003. doi: 10.1183/13993003.02003-2018

KELCHTERMANS, H .et al. Activated CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit osteoclastogenesis and collagen-induced arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases,* v. 68, n. 5, p. 744-750, 2009.

KOKRON CM, et al. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. *An Acad Bras Cienc.* 2004;76(4):707- 26.

KOSHY S, WU D, HU X, et al. Blocking KCa3.1 channels increases tumor cell killing by a subpopulation of human natural killer lymphocytes. *PLoS One.* 2013;8(10):e76740. Published 2013 Oct 11. doi:10.1371/journal.pone.0076740

LEMON BD, FREEDMAN LP. Selective effects of ligands on vitamin D3 receptor- and

retinoid X receptor-mediated gene activation in vivo. *Mol Cell Biol.* 1996;16:1006–1016.

LI, Y. et al. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood*, v. 109, n. 9, p. 3839–3848, 2007.

LINSEISEN J., BECHTHOLD A., BISCHOFF-FERRARI H.A., HINTZPETER B., LESCHIK-BONNET E., REICHRATH J., STEHLE P., et al.: Vitamin D und PräventionA. [(accessed on 2 June 2020)]; Available online: <http://www.dge.de/pdf/ws/DGE-Stellungnahme-VitD-111220.pdf>. 677-687, 2012.

LITZMAN, J. et al. Chronic immune activation in common variable immunodeficiency (CVID) is associated with elevated serum levels of soluble CD14 and CD25 but not endotoxaemia. *ClinExpImmunol*, v. 170, n. 3, p. 321–332, 2012.

LIU, et al. FGFR3 and FGFR4 do not mediate renal effects of FGF23. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 19, n. 12, p. 2342-2350, 2008.

LORENZ K., FLATTER B., AUGUSTINE E. Arylesterase in serum: elaboration and clinical application of fixed incubation METHOD. *CLIN CHEM.* 1979;25:1714-20

MAEDA, S. S. et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia [online]*. 2014, v. 58, n. 5 [Acessado 7 Setembro 2021] , pp. 411-433. Disponível em: . ISSN 1677-9487. <https://doi.org/10.1590/0004-2730000003388>.

MACKNESS B, DURRINGTON P, MCEL DUFF 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

MANETTI R, PARRONCHI P, GIUDIZI MG, PICCINI MP, MAGGI E, TRINCHIERI G, et al Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med.* 1993;177:1199-204

MAKARIOU SE, ELISAF M, CHALLA A, TELLIS C, TSELEPIS AD, LIBEROPOULOS EN. Effect of combined vitamin D administration plus dietary intervention on oxidative stress markers in patients with metabolic syndrome: A pilot randomized study. *Clin Nutr ESPEN.* 2019 Feb;29:198-202. doi: 10.1016/j.clnesp.2018.10.004. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30661687.

MARETZKE, FRIEDERIKE et al. “Role of Vitamin D in Preventing and Treating Selected Extraskelatal Diseases-An Umbrella Review.” *Nutrients* vol. 12,4 969. 31 Mar. 2020, doi:10.3390/nu12040969

MARTINEAU A.R., JOLLIFFE D.A., GREENBERG L., ALOIA J.F., BERGMAN P., DUBNOV-RAZ G., ESPOSITO S., GANMAA D., GINDE A.A., GOODALL E.C., et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory infections: Individual participant data meta-analysis. *Health Technol. Assess.* 2019;23:1–44. doi: 10.3310/hta23020.

MARTINEAU AR, THUMMEL KE, WANG Z, JOLLIFFE DA, BOUCHER BJ, GRIFFIN SJ, et al. differential effects of oral boluses of vitamin D2 vs vitamin D3 on vitamin D metabolism: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* (2019)

MEISINGER, C., FREUER, D., BUB, A. et al. Association between inflammatory markers and serum paraoxonase and arylesterase activities in the general population: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis* 20, 81 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01508-7>

MILLS KH, MCGUIRK P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. *Semin Immunol.* 2004;16:107-17.

MOREIRA, C. A. et al. Reference values of 25-hydroxyvitamin D revisited: a position statement from the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM) and the Brazilian Society of Clinical Pathology/Laboratory Medicine (SBPC). *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* [online]. 2020, v. 64, n. 4 [Acessado 7 Setembro 2021] , pp. 462-478. Disponível em: . Epub 05 June 2020. ISSN 2359-4292. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000258>.

MORRIS JG. Ineffective vitamin D synthesis in cats is reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol- $\Delta^7$ -reductase. *J Nutrition.* 1999;129:903-8

NAJA RP, DARDENNE O, ARABIAN A, ST ARNAUD R. Chondrocyte-specific modulation of Cyp27b1 expression supports a role for local synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in growth plate development. *Endocrinology.* 2009;150(9): 4024-32

NAKASHIMA T, TAKAYANAGI H. Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems. *J Clin Immunol.* 2009 Sep;29(5):555-67. doi: 10.1007/s10875-009-9316-6. Epub 2009 Jul 8. PMID: 19585227.

NEDER, J. A.; ANDREONI, S.; CASTELO-FILHO, A.; NERY, L. E. Reference values for lung function tests I: static volumes. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, v. 32, n. 6, p 703-717, 1999.

NIEMAN, D. C. et al. Physical activity and immune function in elderly women. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 25, n.7, p. 823-831, 1993.

OGINO H, NAKAMURA K, IHARA E, AKIHO H, TAKAYANAGI R. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress Th17-responses in an experimental colitis model. *Dig Dis Sci.* 2011 Feb;56(2):376-86. doi: 10.1007/s10620-010-1286-2. Epub 2010 Jun 3. PMID: 20521112.

OKSENHENDLER E, GÉRARD L, FIESCHI C, MALPHETTES M, MOUILLOT G, JAUSSAUD R, VIALARD JF, GARDEMBAS M, GALICIER L, et al.; Study Group. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis.* 2008 May 15;46(10):1547-54. doi: 10.1086/587669.

OLENDZKI, B. C.; SILVERSTEIN, T. D.; PERSUITTE, G. M.; MA, Y.; BALDWIN, K. R.; CAVE, D. An anti-inflammatory diet as treatment for inflammatory bowel disease: a case series report. *Nutrition Journal*, v. 13, n. 5, p. 1-7, 2014.

OOI JH1, CHEN J, CANTORNA MT. Vitamin D regulation of immune function in the gut: why do T cells have vitamin D receptors? *Mol Aspects Med.* 2012 fev; 33 (1): 77-82. doi: 10.1016 / j.mam.2011.10.014. Epub 2011 6 de novembro.

OSMAN W, AL FAHDI F, AL SALMI I, AL KHALILI H, GOKHALE A, KHAMIS F. Serum Calcium and Vitamin D levels: Correlation with severity of COVID-19 in hospitalized patients in Royal Hospital, Oman. *Int J Infect Dis.* 2021 Jun;107:153-163. doi: 10.1016/j.ijid.2021.04.050. Epub 2021 Apr 20. PMID: 33892191; PMCID: PMC8057687.

PALACIOS C, GONZALEZ L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *J Steroid BiochemMolBiol* (2014) 144(Pt A):138–45. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.11.003

PATRIZIA LEONE ANGELO VACCA, FRANCO DAMMACCO, AND VITORACANELLI. Common Variable Immunodeficiency and Gastric Malignancies. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb; 19(2): 451. Published online 2018 Feb 2. doi: 10.3390/ijms19020451

PANACH, L. et al. The role of CD40 and CD40L in bone mineral density and in osteoporosis risk: A genetic and functional study. *Bone*, v. 83, p. 94–103, 2016

PARAGH , et al. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 252 (2002)

PERANDINI, L. A. et al. Exercise as a therapeutic tool to counteract inflammation and clinical symptoms in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmunity Reviews*, v. 12, n. 2, p. 218-224, 2012.

PICARD C, BOBBY GASPAR H, AL-HERZ W, BOUSFIHA A, CASANOVA JL, CHATILA T, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol.* 2018;38(1):96-128. doi: 10.1007/s10875-017-0464-9.

PILZ S., ZITTERMANN A., TRUMMER C., THEILER-SCHWETZ V., LERCHBAUM E., KEPPEL M.H., GRÜBLER M.R., MÄRZ W., PANDIS M. Vitamin D testing and treatment: A narrative review of current evidence. *Endocr. Connect.* 2019;8:R27–R43. doi: 10.1530/EC-18-0432

PLUM LA, DELUCA HF. Vitamina D, doença e oportunidades terapêuticas . *Nat RevDrugDiscov* 2010; 9 : 941-955.

PRECOURT LP, AMRE D, DENIS MC, LAVOIE JC, DELVIN E, SEIDMAN E, et al. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis.* 2011;214(1):20- 36

PRIMO-PARMO SL, SORENSON RC, TEIBER J, LA DU BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996;33(3):498-507

QUARLES LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin*



Invest. 2008;118:3820–3828.

RAHAL A, KUMAR A, SINGH V, YADAV B, TIWARI R, CHAKRABORTY S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int.* 2014;2014:761264.

RESNICK, E. S.; MOSHIER, E. L.; GODBOLD, J. H.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*, v. 119, n. 7, p. 1650-1657, 2012.

RICHTER RJ, JARVIK GP, FURLONG CE. Paraoxonase 1 status as a risk factor for disease or exposure. *AdvExp Med Biol.* 2010;660:29-35. doi:10.1007/978-1-60761-350-34.

ROMBERG N.,et.al. Hemizygoty reveals transmembrane activator and CAML interactor haploinsufficiency at later stages of B-cell development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015; v.136:1315–1325.

ROSE A. M.; HALL, C. S.; MARTINEZ-ALIER, N. Aetiology and management of malnutrition in HIV-positive children. *Archives of Disease in Childhood*, v. 99, n. 6, p. 546-551, 2014.

SALZER U., BACCHELLI C., BUCKRIDGE S., PAN-HAMMARSTROM Q., JENNINGS S., LOUGARIS V., BERGBREITER A., HAGENA T., BIRMELIN J.,PLEBANI A., et al. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibodydeficiency syndromes. *Blood.* 2009;113: 1967–1976. doi: 10.1182/blood-2008-02- 141937

SAXON, A.; KELD, B.; BRAUN, J.; DOTSON, A; SIDELL, N. Long-term administration of 13-cis retinoic acid in common variable immunodeficiency: circulating interleukin-6 levels, B-cell surface molecule display, and in vitro and in vivo B-cell antibody production. *Immunology*, v. 80, p. 477-487, 1993.

SAADAT .Paraoxonase 1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol.* 2012;36(2):e101-3.

SATO, K., SUEMATSU, A., NAKASHIMA, T. et al. Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway. *Nat Med* **12**, 1410–1416 (2006). [/doi.org/10.1038/nm1515](https://doi.org/10.1038/nm1515)

SAITO, Shigeru et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *American journal of reproductive immunology*, v. 63, n. 6, p. 601-610, 2010.

SERES I; PARAGH G; DESCHENE E; FULOP T JR; KHALIL A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol.* 2004 Jan;39(1):59-66

SINI B.C, BYDLOWSKI S.P, LEVY D, KOKRON C.M, MASELLI L.M.F., COHON A, et al. Estaria o polimorfismo 55MM da PON1 associado à maior gravidade da

doença em pacientes com imunodeficiência comum variável?. *Braz J Allergy Immunol.* 2(1):35-43, 2014.

SINI, BC; BARROS, M Relação entre os polimorfismos da paraoxonase 1 e do citocromo P450 em pacientes com imunodeficiência comum variável em uso de medicamentos ou exposição a poluentes ambientais. 2017. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5146/tde-15032018-095238/>>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA- SBEM. Posicionamento sobre novas diretrizes da vitamina D. Disponível em: <http://www.sbpc.org.br/noticias-e-comunicacao/sbpcml-e-sbem-atualizam-posicionamento-de-vitamina-d/>. Acesso em 5 de fevereiro de 2021.

SORAN H, SCHOFIELD JD, LIU Y, DURRINGTON PN. How HDL protects LDL against atherogenic modification: paraoxonase 1 and other dramatis personae. *Curr Opin Lipidol.* 2015;26(4):247- 56.

STRASSER, B.; SIEBERT, U.; SCHOBERSBERGER, W. Effects of resistance training on respiratory function in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Breath*, v. 17, n. 1, p. 217-226, 2013.

TANHAPOUR M, Shahmohamadnejad S, Vaisi-Raygani A, Kiani A, Shakiba Y, Rahimi Z, Bahrehmand F, Shakiba E, et al., Association between activity and genotypes of paraoxonase1 L55M (rs854560) increases the disease activity of rheumatoid arthritis through oxidative stress. *MolBiol Rep.* 2019 Feb;46(1):741-749. doi: 10.1007/s11033-018-4530-z. Epub 2018 Dec 1. PMID: 30506510.

TSAKIRIS, et al. Alpha-tocopherol supplementation prevents the exercise-induced reduction of serum paraoxonase 1/arylesterase activities in healthy individuals. *European journal of clinical nutrition*, v. 63, n. 2, p. 215-221, 2009.

TOKUDA N., LEVY R.B. 1,25-dihydroxyvitamin D3 estimula a fagocitose, mas suprime a expressão de hla-DR e antígeno CD13 em fagocitos mononucleares humanos. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1996; 211:244-250. doi: 10.3181/00379727-211-43967

UZZAN M., KO H.M., MEHANDRU S., CUNNINGHAM-RUNDLES C. Gastrointestinal Disorders Associated with Common Variable Immune Deficiency (CVID) and Chronic Granulomatous Disease (CGD) *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2016;18:17. doi: 10.1007/s11894-016-0491-3.

VALENCIA C SY, ISAZA M CA, HENAO B J, BELTRÁN A L, LOANGO N, LANDÁZURI P. Arylesterase activity of paraoxonase 1 (PON1) on HDL3 and HDL2: Relationship with Q192R, C-108T, and L55M polymorphisms. *BiochemBiophys Rep.* 2021 Mar 18;26:100971. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100971. PMID: 33778169; PMCID: PMC7985468.

VARRICCHI, GILDA et al. “Microbioma intestinal e imunodeficiência comum variável: poucas certezas e muitas perguntas pendentes.” *Frontiers in immunology* vol. 12 712915. 2 de agosto de 2021, doi: 10.3389 / fimmu.2021.712915

WANG T.T., Nestel F.P., Bourdeau V., Nagai Y., Wang Q., Liao J., Tavera-Mendoza L., Lin R., Hanrahan J.W., et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J. Immunol.* 2004;173:2909–2912. doi: 10.4049/jimmunol.173.5.2909

WEI GZ, ZHU MY, WANG F, ZHAO YG, LI SS, LIU TY, LUO Y, TANG WR. Paraoxonase (PON1) polymorphisms Q192R and L55M are not associated with human longevity: A meta-analysis. *Z GerontolGeriatr.* 2016 Jan;49(1):24-31. doi: 10.1007/s00391-015-0892-1. Epub 2015 May 12. PMID: 25962362

WITHAM M.D., NADIR M.A., STRUTHERS A.D. Effect of vitamin D on blood pressure: A systematic review and meta-analysis. *J. Hypertens.* 2009

WINTERBOURN CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* 2008;4:278–286.

WOODRING J, DILLON M. Pulmonary coccidioidomycosis in Kentucky. *J Ky Med Assoc.* 1996 Nov;94(11):490-7. PMID: 8973079.

XU H., SORURI A., GIESELER R.K.H., PETERS J.H. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> exerts opposing effects to IL-4 on MHC class II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. *Scand. J. Immunol.* 1993;38:535–540. doi: 10.1111/j.1365-3083.1993.tb03237.

YAZDANI, R.; HAKEMI, M. G.; SHERKAT, R.; HOMAYOUNI, V.; FARAHANI, R. Genetic defects and the role of helper T-cells in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Advanced Biomedical Research*, v. 3, 2, 2014.

YIN L., GRANDI N., RAUM E., HAUG U., ARNDT V., BRENNER H. Meta-analysis: Longitudinal studies of serum vitamin D and colorectal cancer risk. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2009;30:113–125. doi: 10.1111/j.1365-2036.2009.04022

YUAN, Feng-Lai et al. Regulatory T cells as a potent target for controlling bone loss. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 402, n. 2, p. 173-176, 2010.

ZAISS, Mario M. et al. Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, v. 56, n. 12, p. 4104-4112, 2007.

## ANEXOS

**Anexo A - Características demográficas dos pacientes com imunodeficiência comum variável**

	Sexo	Cor	Idade	Idade de início	Idade ao Dx	Tempo de doença	Retardo Dx		Sexo	Cor	Idade	Idade de início	Idade ao Dx	Tempo de doença	Retardo Dx
<b>P1</b>	M	bca	49	36	39	13	3	<b>P25</b>	M	bca	49	33	35	12	2
<b>P2</b>	F	bca	32	9	12	23	3	<b>P26</b>	F	bca	29	5	19	25	14
<b>P3</b>	M	par	27	15	19	12	4	<b>P27</b>	M	pda	36	5	11	31	6
<b>P4</b>	F	bca	35	25	31	10	6	<b>P28</b>	M	negra	49	28	31	21	3
<b>P5</b>	F	bca	34	17	26	17	9	<b>P29</b>	M	pda	37	1	15	36	14
<b>P6</b>	F	bca	38	17	19	21	2	<b>P30</b>	F	bca	33	12	21	21	9
<b>P7</b>	M	amar	40	5	26	35	21	<b>P31</b>	M	bca	45	33	37	12	4
<b>P8</b>	M	negra	29	10	16	19	6	<b>P32</b>	F	bca	49	41	43	8	2
<b>P9</b>	M	bca	44	14	25	19	10	<b>P33</b>	F	bca	31	15	18	16	3
<b>P10</b>	M	bca	31	22	23	9	1	<b>P34</b>	F	pda	48	17	36	31	19
<b>P11</b>	F	negra	44	5	26	39	21	<b>P35</b>	F	pda	33	14	20	19	6
<b>P12</b>	F	bca	31	5	18	26	13	<b>P36</b>	F	pda	32	7	13	25	6
<b>P13</b>	F	pda	39	15	26	24	11	<b>P37</b>	F	bca	22	1	3	23	2
<b>P14</b>	F	bca	33	28	28	5	0	<b>P38</b>	F	bca	28	21	21	7	1
<b>P15</b>	M	bca	45	30	38	15	8	<b>P39</b>	F	bca	46	2	37	44	35
<b>P16</b>	M	bca	37	22	27	15	5	<b>P40</b>	M	bca	37	5	27	32	25
<b>P17</b>	M	bca	36	20	28	16	8	<b>P41</b>	M	bca	32	23	23	9	0
<b>P18</b>	F	pda	35	10	24	25	14	<b>P42</b>	M	pda	46	11	37	35	28
<b>P19</b>	F	bca	34	17	19	17	2	<b>P43</b>	M	bca	46	32	16	14	9
<b>P20</b>	F	bca	34	5	18	29	13	<b>44</b>	F	pda	43	3	42	40	38
<b>P21</b>	M	pda	34	7	20	27	13	<b>P45</b>	F	bca	52	23	31	30	8
<b>P22</b>	F	bca	32	15	16	17	1	<b>P46</b>	F	bca	36	7	31	29	24
<b>P23</b>	F	bca	43	27	18	16	2	<b>P47</b>	F	pda	26	17	11	9	5
<b>P24</b>	F	bca	42	17	26	25	9	<b>P48</b>	F	bca	20	15	8	5	4

**Anexo B: Características clínicas dos pacientes com imunodeficiência comum variável: vias aéreas, linfonomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia e hipertensão portal**

	Vias aéreas	OMA	SIN	Tonsilite	Pneumonia	Bronquiectasias	Atelectasia	DPOC	Linfonomegalia	Esplenomegalia	Hepatomegalia	Hipertensão portal
P1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
P2	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
P3	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
P4	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
P5	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
P6	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0
P7	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P8	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
P9	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0
P10	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
P11	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
P12	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
P13	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
P14	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
P15	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
P16	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1
P17	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
P18	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
P19	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
P20	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0
P21	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
P22	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
P23	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0
P24	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P25	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P26	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
P27	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
P28	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
P29	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
P30	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0

P31	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
P32	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
P33	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
P34	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
P35	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
P36	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
P37	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
P38	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
P39	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
P40	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
P41	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
P42	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
P43	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
P44	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
P45	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
P46	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
P47	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
P48	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Anexo C: Características clínicas dos pacientes com imunodeficiência comum variável: doenças autoimunes, diarreia, alterações intestinais, gastrite, asma, rinite e doença óssea**

	Autoimunidade	Diarreia/Padrão	Intestino/Padrão	Gastrite	Asma	Rinite	Doença óssea	Osteopenia	Osteoporose
P1	PTI	0	0	1	0	0	1		1
P2	0	0	0	1	1	1	1	1	
P3	0	0	HLR (cólon )	0	0	1	1	1	
P4	0	0	HNL	1	0	0	0		
P5	Tireoidite	Recorrente	Sem biópsia	1	1	1	1	1	
P6	AHA + SS	Intermitente	Duodenite crônica + HNL	1	0	0	0		
P7	PTI + Hipoparatiroidismo 1º	Padrão celíaco	Duodenite crônica + Ileíte + retíte	1	0	1	0		
P8	0	Padrão celíaco	Duodenite crônica + HLR	0	0	0	0		
P9	0	Padrão celíaco	Pólipo+ úlcera em válvula	1	0	0	0		
P10	0	Ocasional	0	1	1	1	0		
P11	0	Crônica	Sem biópsia	1	1	1	1		1
P12	0	Crônica	Bulboduodenite erosiva e + atrofia	1	0	1	0		
P13	0	Crônica	Sem biópsia	1	0	1	1	1	
P14	0	0	Ileíte erosiva distal + lesão	1	0	0	1		1
P15	0	Padrão celíaco	Duodenite crônica + HLR)	1	0	0	1		1
P16	0	Padrão celíaco	. Duodenite crônica (padrão	1	0	0	0		
P17	Psoríase	Padrão celíaco	Duodenite crônica (padrão celíaco +	1	1	1	1	1	
P18	0	Recorrente	Duodenite crônica	0	1	1	1	1	
P19	0	0	Duodenite crônica	1	1	1	1	1	
P20	0	Recorrente	Duodenite crônica	1	0	0	0		
P21	0	Recorrente	Enterite granulomatosa + HLR	1	1	1	0		
P22	0	Recorrente	Sem biópsia	0	0	1	0		
P23	0	0	0	1	1	1	1	1	
P24	Tireoidite	0	0	1	0	1	1	1	
P25	0	0	Duodenite crônica + colite	1	0	0	0		
P26	Tireoidite	0	Duodenite crônica + HLR	1	0	1	0		

<b>P27</b>	Vitiligo	Ocasional	Sem biópsia	0	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	
<b>P28</b>	0	Recorrente	Normal	1	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		
<b>P29</b>	<b>0</b>	Padrão celíaco	Duodenite crônica	1	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		
<b>P30</b>	PTI + psoríase	Ocasional	0	0	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		
<b>P31</b>	Tireoidite+ vitiligo	Ocasional	Duodenite crônica + metaplasia	1	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		
<b>P32</b>	Vasculite	0	Bulboduodenite + colite + retite +	1	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	
<b>P33</b>	<b>0</b>	Ocasional	0	1	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		
<b>P34</b>	AHA + SS	Recorrente	0	1	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
<b>P35</b>	<b>0</b>	Recorrente	Duodenite crônica com padrão	1	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		
<b>P36</b>	0	0	0	0	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	
<b>P37</b>	<b>0</b>	0	Colite,+ ileite, pólipos	1	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		
<b>P38</b>	<b>0</b>	Padrão celíaco	Duodenite crônica + padrão celíaco	0	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
<b>P39</b>	<b>0</b>	Intermitente	Infiltrado inflamatório leve	1	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		
<b>P40</b>	<b>0</b>	Crônica	Duodenite crônica	1	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	
<b>P41</b>	Tireoidite + DM1	0	0	1	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		
<b>P42</b>	<b>0</b>	Crônica	Duodenite crônica + HNL + HLR	1	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	
<b>P43</b>	<b>0</b>	Crônica	Enterite crônica + HLR + retite	1	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		
<b>P44</b>	<b>0</b>	Crônica	Duodenite crônica + HNR	1	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
<b>P45</b>	<b>0</b>	0	0	1	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
<b>P46</b>	<b>0</b>	0	0	1	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		
<b>P47</b>	0	Recorrente	Duodenite crônica + lesão erosiva +	1	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
<b>P48</b>	0	0	0	0	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		



**Anexo D– Genotipagem e atividade arilesterase de PON1 dos pacientes com ICV**

Pacientes	Arilesterase	L55M	Pacientes	Arilesterase	L55M	Pacientes	Arilesterase	L55M
<b>P1</b>	99	LM	<b>P17</b>	85	LL	<b>P33</b>	102	MM
<b>P2</b>	136	0	<b>P18</b>	91	LM	<b>P34</b>	86	MM
<b>P3</b>	114	LL	<b>P19</b>	113	LM	<b>P35</b>	106	LL
<b>P4</b>	125	LL	<b>P20</b>	99	LL	<b>P36</b>	81	LL
<b>P5</b>	45	MM	<b>P21</b>	95	LM	<b>P37</b>	100	LM
<b>P6</b>	100		<b>P22</b>	105	LM	<b>P38</b>	122	LL
<b>P7</b>	79	LL	<b>P23</b>	84	MM	<b>P39</b>	203	LM
<b>P8</b>	45	MM	<b>P24</b>	94	LL	<b>P40</b>	86	LM
<b>P9</b>	94	LL	<b>P25</b>	86	LL	<b>P41</b>	121	MM
<b>P10</b>	55	LM	<b>P26</b>	92	LL	<b>P42</b>	76	LL
<b>P11</b>	81	LM	<b>P27</b>	105	LM	<b>P43</b>	65	LL
<b>P12</b>	65	LL	<b>P28</b>	83	MM	<b>P44</b>	90	LM
<b>P13</b>	59	MM	<b>P29</b>	82	LM	<b>P45</b>	84	0
<b>P14</b>	73	LL	<b>P30</b>	76	LL	<b>P46</b>	122	MM
<b>P15</b>	99	0	<b>P31</b>	143	MM	<b>P47</b>	85	LM
<b>P16</b>	84	LL	<b>P32</b>	103	LL	<b>P48</b>	58	MM

Anexo E: Genotipagem e atividade arilesterase de PON1 em controles sãos

Control e	L55 M	Arilesteras e	Control e	L55 M	Arilesteras e	Control e	L55 M	Arilesteras e
C1	LM	69	C36	LL	108	C71	LL	75
C2	LM	91	C37	LM	79	C72	MM	84
C3	LM	82	C38	MM	62	C73	LL	126
C4	LL	117	C39	LL	123	C74	LL	68
C5	LL	141	C40	LM	85	C75	LL	93
C6	LM	69	C41	LL	97	C76	LM	84
C7	LL	112	C42	LL	78	C77	LL	100
C8	LM	84	C43	LM	13	C78	LL	161
C9	LM	92	C44	LM	98	C79	MM	91
C10	LM	102	C45	LM	107	C80	LL	48
C11	MM	70	C46	LL	107	C81	LM	69
C12	LL	137	C47	LM	72	C82	LM	78
C13	LL	131	C48	LL	94	C83	LL	70
C14	LL	108	C49	LL	129	C84	LM	68
C15	MM	103	C50	LM	105	C85	MM	
C16	MM	66	C51	LL	85	C86	LM	100
C17	LL	118	C52	MM	125	C87	LM	109
C18	MM	78	C53	LM	89	C88	MM	93
C19	MM	47	C54	LL	111	C89	LM	79
C20	LL	62	C55	LM	78	C90	LM	84
C21	LL	76	C56	LL	83	C91	MM	91
C22	LM	55	C57	LM	104	C92	LM	64
C23	LM	87	C58	MM	91	C93	LM	128
C24	LL	66	C59	LL	70	C94	LL	92
C25	LL	75	C60	LM	74	C95	LM	92
C26	LL	109	C61	LL	127	C96	LM	77
C27	LL	105	C62	LL	96	C97	LL	126
C28	LL	105	C63	LL	116	C98	LL	96
C29	LL	120	C64	LM	92	C99	MM	64
C30	LL	94	C65	LL	66	C100	LM	84
C31	MM	62	C66	LL	68	C101	LM	84
C32	LL	95	C67	LL	62	C102	MM	51
C33	LM	90	C68	LM	88	C103	MM	101
C34	LL	107	C69	LL	110	C104	MM	68
C35	MM	67	C70	LL	87	C105	LL	105

Anexo F. Genotipagem do polimorfismo L55M e dosagem de arilesterase em controles sãos (continuação)

Control e	L55 M	Arilesteras e	Control e	L55 M	Arilesteras e	Control e	L55 M	Arilesteras e
-----------	-------	---------------	-----------	-------	---------------	-----------	-------	---------------

<b>C106</b>	LM	71	<b>C126</b>	LM	124	<b>C146</b>	LM	58
<b>C107</b>	LM	78	<b>C127</b>	LL	114	<b>C147</b>	LM	122
<b>C108</b>	LL	111	<b>C128</b>	LM	90	<b>148</b>	LM	76
<b>C109</b>	LM	95	<b>C129</b>	LM	79	<b>C149</b>	LM	120
<b>C110</b>	LM	119	<b>C130</b>	LL	96	<b>C150</b>	LL	157
<b>C111</b>	LM	65	<b>C131</b>	LL	154	<b>C151</b>	LM	119
<b>C112</b>	LL	112	<b>C132</b>	LM	128	<b>C152</b>	MM	63
<b>C113</b>	LL	126	<b>C133</b>	LL	102	<b>C153</b>	LL	121
<b>C114</b>	LL	99	<b>C134</b>	LL	109	<b>C154</b>	LL	96
<b>C115</b>	LM	102	<b>C135</b>	LL	122	<b>C155</b>	LM	83
<b>CC116</b>	LL	126	<b>C136</b>	LL	77	<b>C156</b>	LL	117
<b>C117</b>	MM	75	<b>C137</b>	LL	80	<b>C157</b>	MM	46
<b>C118</b>	LM	93	<b>C138</b>	LL	125	<b>C158</b>	LM	84
<b>C119</b>	LL	128	<b>C139</b>	LM	112	<b>C159</b>	LM	76
<b>C120</b>	MM	128	<b>C140</b>	LL	98	<b>C160</b>	LL	141
<b>C121</b>	LL	87	<b>C141</b>	LL	90	<b>C161</b>	LL	102
<b>C122</b>	LM	89	<b>C142</b>	LM	124	<b>C162</b>	LM	
<b>C123</b>	LM	70	<b>C143</b>	LM	122	<b>C163</b>	LL	
<b>C124</b>	LL	98	<b>C144</b>	LM	119			
<b>C125</b>	LM	76	<b>C145</b>	LL	201			

**Anexo G : Correlação entre atividade arilesterase de PON1 e perfil lipídico dos pacientes com imunodeficiência comum variável (correlação de Pearson)**

		COL	HDL	LDL	TG	VLDL	APO1
<b>Aril</b>	r pN	,288* ,047 48	,030 ,840 48	,315* ,029 48	,238 ,104 48	,087 ,556 48	,267 ,067 48
<b>VLDL</b>	r pN	-,042 ,778 48	,472** ,001 48	-,229 ,117 48	-,002 ,991 48	1 48	,373** ,009 48
<b>LDL</b>	r pN	,872** ,000 48	-,085 ,566 48	1 48	,524** ,000 48	-,229 ,117 48	,286* ,049 48
<b>HDL</b>	r pN	-,095 ,520 48	1 48	-,085 ,566 48	-,284 ,051 48	,472** ,001 48	,497** ,000 48
<b>COL</b>	r pN	1 48	-,095 ,520 48	,872** ,000 48	,503** ,000 48	-,042 ,778 48	,255 ,080 48
<b>TG</b>	r pN	,503** ,000 48	-,284 ,051 48	,524** ,000 48	1 48	-,002 ,991 48	,064 ,667 48
<b>APO1</b>	r pN	,255 ,080 48	,497** ,000 48	,286* ,049 48	,064 ,667 48	,373** ,009 48	1 48

**Anexo H: Correlação entre atividade arilesterase de PON1 e níveis séricos de vitamina D,PTH, cálcio, magnésio e fósforo de pacientes com ICV (correlação de Pearson)**

		VIT_D	PTH	Ca	Mg	P
Arl	r pN	,164	-,082	-,003	-,111	,150
		,264	,581	,983	,451	,307
		48	48	48	48	48
VIT_D	r pN	1	-,338*	,065	-,078	,092
		48	,019	,659	,598	,535
		48	48	48	48	48
PTH	r pN	-,338*	1	-,241	,030	-,193
		,019	48	,099	,841	,188
		48	48	48	48	48
Ca	r pN	,065	-,241	1	,135	,092
		,659	,099	48	,360	,534
		48	48	48	48	48
Mg	r pN	-,078	,030	,135	1	-,274
		,598	,841	,360	48	,060
		48	48	48	48	48
P	r pN	,092	-,193	,092	-,274	1
		,535	,188	,534	,060	48
		48	48	48	48	48

Anexo I : Correlação entre atividade arilesterase de PON1 e populações linfocitárias dosangue periférico de pacientes com ICV (correlação de Pearson)

		CD3 cel/mm3	CD4 cel/mm3	CD8 cel/mm3	CD4/CD8	CD19 cel/mm3	NK cel/mm3
Aril	r	,087	,162	,033	,156	,273	,001
	p	,555	,270	,824	,289	,060	,993
	N	48	48	48	48	48	48
CD3	r	1	,795**	,843**	-,149	,340*	,324*
	p		,000	,000	,311	,018	,024
	N	48	48	48	48	48	48
CD4	r	,795**	1	,367*	,355*	,258	,321*
	p	,000		,010	,013	,077	,026
	N	48	48	48	48	48	48
CD8	r	,843**	,367*	1	-,520**	,288*	,268
	p	,000	,010		,000	,047	,066
	N	48	48	48	48	48	48
CD4/CD8	r	-,149	,355*	-,520**	1	-,113	,002
	p	,311	,013	,000		,446	,990
	N	48	48	48	48	48	48
CD19	r	,340*	,258	,288*	-,113	1	,314*
	p	,018	,077	,047	,446		,030
	N	48	48	48	48	48	48
NK	r	,324*	,321*	,268	,002	,314*	1
	p	,024	,026	,066	,990	,030	
	N	48	48	48	48	48	48

**Anexo J: Correlação entre níveis séricos de vitamina D e perfil lipídico dos pacientes com imunodeficiência comum variável (correlação de Pearson)**

		VLDL	LDL	HDL	COL	TG	APO1
VIT_D	r	,088	-,143	,096	-,037	-,034	,099
	p	,551	,334	,516	,800	,821	,503
	N	48	48	48	48	48	48
VLDL	r	1	-,229	,472**	-,042	-,002	,373**
	p		,117	,001	,778	,991	,009
	N	48	48	48	48	48	48
LDL	r	-,229	1	-,085	,872**	,524**	,286*
	p	,117		,566	,000	,000	,049
	N	48	48	48	48	48	48
HDL	r	,472**	-,085	1	-,095	-,284	,497**
	p	,001	,566		,520	,051	,000
	N	48	48	48	48	48	48
COL	r	-,042	,872**	-,095	1	,503**	,255
	p	,778	,000	,520		,000	,080
	N	48	48	48	48	48	48
TG	r	-,002	,524**	-,284	,503**	1	,064
	p	,991	,000	,051	,000		,667
	N	48	48	48	48	48	48
APO1	r	,373**	,286*	,497**	,255	,064	1
	p	,009	,049	,000	,080	,667	
	N	48	48	48	48	48	48

**Anexo K: Correlação entre níveis séricos de vitamina D e atividade arilesterase,PTH, cálcio, magnésio e fósforo de pacientes com ICV (correlação de Pearson)**

		<b>Aril</b>	<b>PTH</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>P</b>
<b>VIT_D</b>	r	,164	-,338	,065	-,078	,092
	p	,264	,019	,659	,598	,535
	N	48	48	48	48	48
<b>Aril</b>	r	1	-,082	-,003	-,111	,150
	p		,581	,983	,451	,307
	N	48	48	48	48	48
<b>PTH</b>	r	-,082	1	-,241	,030	-,193
	p	,581	,099	,841	,188	,188
	N	48	48	48	48	48
<b>Ca</b>	r	-,003	-,241	1	,135	,092
	p	,983	,099		,360	,534
	N	48	48	48	48	48
<b>Mg</b>	r	-,111	,030	,135	1	-,274
	p	,451	,841	,360	,060	,060
	N	48	48	48	48	48
<b>P</b>	r	,150	-,193	,092	-,274	1
	p	,307	,188	,534	,060	
	N	48	48	48	48	48



Anexo L: Correlação entre níveis séricos e vitamina D e populações linfocitárias dosangue periférico de pacientes com ICV (correlação de Pearson)

		CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	CD19	NK
VIT_D	r	,006	,001	,036	-,051	-,118	-,078
	p	,967	,994	,810	,731	,426	,597
	N	48	48	48	48	48	48
CD3	r	1	,795**	,843**	-,149	,340*	,324*
	p		,000	,000	,311	,018	,024
	N	48	48	48	48	48	48
CD4	r	,795**	1	,367*	,355*	,258	,321*
	p	,000		,010	,013	,077	,026
	N	48	48	48	48	48	48
CD8	r	,843**	,367*	1	-,520**	,288*	,268
	p	,000	,010		,000	,047	,066
	N	48	48	48	48	48	48
CD4/CD8	r	-,149	,355*	-,520**	1	-,113	,002
	p	,311	,013	,000		,446	,990
	N	48	48	48	48	48	48
CD19	r	,340*	,258	,288*	-,113	1	,314*
	p	,018	,077	,047	,446		,030
	N	48	48	48	48	48	48
NK	r	,324*	,321*	,268	,002	,314*	1
	p	,024	,026	,066	,990	,030	
	N	48	48	48	48	48	48

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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**DADOS DA PESQUISA**

**Título da pesquisa** - Associação entre 25-hidroxivitamina D e atividade arilesterase em pacientes com imunodeficiência comum variável.

**Pesquisador principal** – Esper Georges Kallás

Cargo/função: Professor-associado da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia e vice-coordenador do Programa de Pós-graduação em Alergia e Imunopatologia da FMUSP

Inscrição conselho regional Nº 67395

**Departamento/Instituto** - Departamento de Clínica Médica HCFMUSP/ -  
Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia

**Avaliação do risco da pesquisa:**

Risco mínimo Duração da

Pesquisa: 24 meses

**Convite à participação** - Este documento contém informações sobre uma pesquisa que estamos iniciando e convidamos você a participar deste estudo porque você tem uma doença com imunidade baixa por deficiência de anticorpos e já se encontra em tratamento neste hospital.

**Justificativa e objetivos do estudo** – Informações para os pacientes

Indivíduos com imunodeficiência comum variável (ICV) apresentam alterações na produção de anticorpos. Os anticorpos são proteínas presentes em todo o corpo humano e têm como função defender o organismo contra micróbios como bactérias e vírus. Por causa da deficiência dos anticorpos, os pacientes com ICV apresentam infecções de repetição como otite, sinusite e diarreia e, além disso, possuem maior risco de desenvolverem doenças inflamatórias e até mesmo câncer.

A vitamina D está sendo cada vez mais pesquisada nos últimos anos, demonstrando funções que vão além do aproveitamento sobre o metabolismo do cálcio e da formação da massa óssea, como ainda mais

sobre sua interação com o sistema imunológico.

Estudos atuais têm relacionado a deficiência de vitamina D com várias doenças autoimunes, incluindo ICV, diabetes melitos (DM), doença inflamatória intestinal (DII), lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide (AR), entre outras. Essas

associações sugerem que a vitamina D seja um fator capaz de afetar o início e a evolução de algumas doenças autoimunes.

A vitamina D regula a atividade celular, também tem efeitos sobre: imunidade inata e adaptativa, funções antimicrobiana, anti-inflamatória e imunomoduladora. Tem sido sugerida uma possível associação entre a deficiência de vitamina D e aumento do risco e duração das infecções em pacientes com imunodeficiência comum variável (ICV).

O objetivo do nosso trabalho é avaliar a atividade da arilesterase da PON1 com 25-hidroxivitamina D e os genótipos L 55 M em pacientes com imunodeficiência comum variável.

### **Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados**

1- Será colhida uma amostra de sangue de 20 mL pela veia do antebraço e após a coleta serão realizados alguns testes laboratoriais para pesquisar: o polimorfismo L55M: os polimorfismos são alterações (mutações) que ocorrem no gene responsável pela produção de uma substância (enzima) presente no sangue (arilesterase). Dependendo da genética de cada indivíduo (polimorfismo), a enzima produzida será menos estável e menos funcionante, podendo estar associada a inflamações, infecções e até mesmo alguns tipos de câncer.

2- Os demais exames de sangue importantes para este estudo já são realizados como rotina no seu acompanhamento médico e incluirão: dosagem de vitamina D, fosfatase alcalina, hemograma, dosagem de linfócitos T e B (imunofenotipagem), dosagem de colesterol e triglicérides, apolipoproteínas, proteínas totais e frações do sangue, velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa (PCR).

3- Outros exames complementares que também já são realizados na rotina: ultrassonografia de abdômen, tomografia de tórax e densitometria óssea (para analisarse existem alterações dos ossos como osteopenia e osteoporose).

**Possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa** – Fora da rotina de coleta de exames que você normalmente já faz, os desconfortos esperados são apenas os da punção venosa (picada da agulha) para a coleta do sangue na veia do antebraço. Os riscos são considerados mínimos.

**Benefícios esperados para o participante** – O presente estudo busca contribuir para o melhor entendimento dos processos envolvidos no desencadeamento e gravidade das alterações vistas na imunodeficiência

comum variável, e acreditamos que mais informações a respeito serão de grande importância para os pacientes que sofrem com a doença.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direitos **participantes da pesquisa** – Independentemente da sua participação ou não no estudo, você continuará com o acompanhamento e assistência iguais aos que têm tido

até agora. Não haverá mudança de conduta no tratamento que você está tendo até este momento.

**Garantias de plena liberdade ao participante de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento** - Após receber explicações sobre estes procedimentos e suas perguntas terem sido respondidas, você poderá decidir se deseja participar ou não deste estudo. É garantida sua liberdade de recusar-se a participar do estudo e da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição, em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade.

**Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento** – Se você decidir participar dessa pesquisa será solicitado que assine duas vias desse termo de consentimento e assine todas as páginas, ou coloque suas digitais em frente a uma testemunha. É obrigatório que uma via desse documento seja entregue a você.

**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. 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. No entanto, cabe lembrar que neste estudo o risco é mínimo, sendo apenas o de uma coleta de amostra de sangue da veia do braço como é feito na rotina.

**Coleta e guarda de material na forma de repositório** - O sangue coletado para este estudo será armazenado de acordo com a resolução 441/2011 e será destruído após o término do estudo.

Garantimos que sua identificação pessoal será preservada e que seus resultados serão fornecidos a você assim que a pesquisa estiver finalizada.

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 Maragna Toledo Barros e Carla Silva da Silveira** que podem ser contatados na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 (PAMB) – 5º andar – Bloco 4B, (11) 2661-9571 ou PAMB Bloco 3, 8º andar, 2661-6225 ou 2661-7976 ou Instituto Central, 6º andar, sala 6118, 2661-6016.

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: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548,

(11) 2661-1549; e-mail:  
cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “**Associação entre 25- hidroxivitamina D e atividade arilesterase da PON1 em pacientes com imunodeficiência comum variável**”.

Eu discuti as informações acima com a Pesquisadora Responsável (**Dr. Esper Georges Kallás**) ou pessoa (s) por ela delegada (s) (**Carla Silva da Silveira**) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

-----  
Assinatura do paciente/representante legal

Data

...../...../.....

-----  
Assinatura da  
testemunha

Data

...../...../.....

Para casos de pacientes 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

...../...../.....

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE 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  
(.....).....