

**Renata Moreno Lima de Oliveira**

**Análise de fatores prognósticos da evolução da deficiência seletiva  
de IgA para 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

Orientadora: Dra. Myrthes Anna Maragna  
Toledo Barros

**São Paulo**

**2022**

**Renata Moreno Lima de Oliveira**

**Análise de fatores prognósticos da evolução da deficiência seletiva  
de IgA para 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

Orientadora: Dra. Myrthes Anna Maragna  
Toledo Barros

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo**

**2022**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Renata Moreno Lima de  
Análise de fatores prognósticos da evolução da  
deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência  
comum variável / Renata Moreno Lima de Oliveira. --  
São Paulo, 2022.  
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Alergia e Imunopatologia.  
Orientadora: Myrthes Anna Maragna Toledo Barros.

Descritores: 1.Síndromes de imunodeficiência  
2.Deficiência de IgA 3.Imunodeficiência comum  
variável 4.Linfócitos 5.Paraoxonase 6.Doenças  
autoimunes 7.Infecções

USP/FM/DBD-048/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esse trabalho à minha avó Helena, pela preocupação e por ser um modelo  
de força e amor.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço aos pacientes que com sua gentileza trouxeram os melhores momentos deste trabalho e por isso foram a força que me motivou a levar este trabalho até o fim.

Agradeço muito minha família, em especial minha mãe, por darem suporte e incentivo ao meu trabalho.

Agradeço a Carla Silveira, Erica Coutinho e Daniele Pazotti pelo apoio, ensinamentos e conversas que tivemos ao longo desses anos.

Agradeço a Dra. Myrthes por tudo que me ensinou não só academicamente, mas sobretudo o amor e cuidado aos pacientes.

Aos funcionários Oswaldo Junior e Rosana Coutinho, do serviço de Imunologia Clínica e Alergia, agradeço a disposição de sempre em me ajudar, mesmo quando as coisas não saiam como planejado.

Aos colaboradores do LIM 60, Amanda e a Ariane por me ajudarem tanto nos experimentos de citometria de fluxo. E Ruth que sempre me ajudou com muita boa vontade.

À Eleni, secretaria do programa de pós-graduação, por ter ajudado em diversas situações.

À Dra. Débora Levy, pela paciência, ensinamentos e ajuda com os experimentos.

E especialmente ao Pablo, agradeço por ter sido meu ouvinte, meu incentivador, por me dar broncas quando eu precisei, e estar sempre do meu lado, sem você não teria conseguido.

## **Normalização adotada**

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

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

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

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

# Sumário

|   |    |
|---|----|
| 1 Introdução .....                                    | 1  |
| 1.1 IgA.....  | 2  |
| 1.2 Manifestações clínicas e doenças associadas ..... | 4  |
| 1.3 Patogênese e genética.....                        | 7  |
| 1.4 DSIgA e ICV .....                                 | 9  |
| 1.5 Paraoxonase 1 .....                               | 11 |
| 2 Objetivos .....                                     | 14 |
| 2.1 Objetivo geral .....                              | 14 |
| 2.2 Objetivos específicos.....                        | 14 |
| 3 Métodos.....  | 16 |
| 3.1 Locais do estudo .....                            | 16 |
| 3.2 Casuística.....                                   | 16 |
| 3.3. Critérios de inclusão .....                      | 17 |
| 3.4. Critérios de exclusão .....                      | 18 |
| 3.5. Exames laboratoriais .....                       | 18 |
| 3.6 Células B imaturas e de memória.....              | 19 |
| 3.7 Genotipagem do polimorfismo L55M da PON 1 .....   | 23 |

|   |    |
|---|----|
| 3.8 Desenho do estudo .....   | 26 |
| 3.9 Estatística.....  | 27 |
| 4 Resultados .....  | 29 |
| 4.1 Dados demográficos.....   | 29 |
| 4.2 Histórico familiar de deficiências predominantemente de anticorpos e de consanguinidade. .... | 30 |
| 4.3 Manifestações clínicas .....  | 31 |
| 4.4 Frequência dos genótipos e dos alelos do polimorfismo PON1-L55M.....                          | 32 |
| 4.5 Relação entre os genótipos do polimorfismo PON1- L55M e parâmetros clínicos .....             | 33 |
| 4.6 Níveis séricos de imunoglobulinas. ....   | 34 |
| 4.7 Avaliação dos valores das várias populações linfocitárias no sangue periférico. ....          | 34 |
| 4.8 Avaliação de subpopulações de linfócitos B no sangue periférico. ....                         | 36 |
| 5 Discussão.....  | 37 |
| 6 Conclusão .....   | 50 |
| ANEXOS .....  | 51 |
| REFERÊNCIAS.....  | 64 |

## Resumo

Oliveira RML. *Análise de fatores prognósticos da evolução da deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência comum variável* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

**INTRODUÇÃO:** A deficiência seletiva de IgA (DSIgA) é definida por níveis séricos de IgA abaixo de 7 mg/dL e níveis normais ou aumentados de IgG e IgM, após os 4 anos de idade. Um pequeno grupo de pacientes com DSIgA evolui para Imunodeficiência Comum Variável (ICV) que é definida por níveis séricos baixos de IgG, IgA e/ou IgM, após os 4 anos de idade, podendo ter alterações linfocitárias. As células B CD27+ de memória podem estar diminuídas em pacientes com ICV e DSIgA. Análises dos pacientes que evoluíram de DSIgA para ICV sugerem que alguns dados clínicos possam ser considerados fatores de risco para essa evolução como: alta prevalência de infecções, autoimunidade, presença dos haplótipos do MHC descritos em ambas doenças, histórico familiar e deficiência associada de subclasses de IgG. As manifestações clínicas de ambas doenças estão relacionadas a um estado pró-oxidativo. Mecanismos envolvidos tanto na geração de estresse oxidativo quanto em sua regulação podem ter grande importância no prognóstico de pacientes com erros inatos da imunidade. A família das enzimas paraoxonases (PON) tem papel nestes mecanismos e por isso estudamos o polimorfismo L55M da Paraoxonase 1 para avaliar sua possível influência na evolução da DSIgA para ICV. **OBJETIVO:** Avaliar parâmetros laboratoriais e clínicos em pacientes com DSIgA em busca de marcadores prognósticos de progressão para ICV. **MÉTODOS:** Foram selecionados 34 pacientes diagnosticados com DSIgA e 14 pacientes que evoluíram de DSIgA para ICV. Os pacientes foram avaliados quanto ao histórico familiar de imunodeficiências primárias e de consanguinidade, ocorrência de infecções recorrentes, alergias, presença de doenças autoimunes e neoplasias; também foram avaliadas as populações linfocitárias, as subpopulações de células B e a genotipagem do polimorfismo L55M do gene PON1. **RESULTADOS:** O grupo que

evoluiu para ICV (grupo ICV) apresentou frequências maiores de diarreia não-infecciosa, neoplasias e esplenomegalia que o grupo DSIGa. Não houve diferença significativa entre os grupos na análise dos genótipos do polimorfismo L55M. O grupo ICV apresentou diminuição significativa de populações linfocitárias (CD3, CD4, CD19, NK) quando comparado ao grupo DSIGa. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação a história familiar. Os pacientes DSIGa apresentaram maior porcentagem de linfócitos B CD27+IgD+IgM+ do que o grupo controle. CONCLUSÃO: São sugestivos de evolução de DSIGa para ICV os seguintes fatores: presença de diarreia não-infecciosa, neoplasias, esplenomegalia, diminuição de populações linfocitárias (CD19 e CD4) e aumento de células B de memória sem troca de classe.

Descritores: Síndromes de imunodeficiência; Deficiência de IgA; Imunodeficiência comum variável; Linfócitos; Paraoxonase; Doenças autoimunes; Infecções.

## Abstract

Oliveira RML. *Analysis of prognostic factors in the evolution of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

**INTRODUCTION:** Selective IgA deficiency (SIgAD) is defined by serum IgA levels below 7 mg/dL and normal or increased levels of IgG and IgM after 4 years of age. A small group of patients with SIgAD progresses to Common Variable Immunodeficiency (CVID), which is defined by low serum levels of IgG, IgA and/or IgM, after 4 years of age, and may have lymphocytic alterations. Memory CD27+ B cells may be decreased in patients with CVID and SIgAD. Analysis of patients who progressed from SIgAD to CVID suggest that some clinical data may be considered risk factors for this evolution, such as: high prevalence of infections, autoimmunity, presence of the MHC haplotypes described in both diseases, family history of primary immunodeficiencies and associated deficiency of IgG subclasses. The clinical manifestations of both diseases are related to a pro-oxidative state. Mechanisms involved in both the generation of oxidative stress and its regulation may be of great importance in the prognosis of patients with inborn errors of immunity. The family of paraoxonase enzymes (PON) plays a role in these mechanisms and therefore we studied the L55M polymorphism of Paraoxonase 1 to assess its possible influence on the evolution of SIgAD to CVID. **OBJECTIVE:** To evaluate laboratory and clinical parameters in patients with SIgAD in search of prognostic markers of progression to CVID. **METHODS:** 34 patients diagnosed with SIgAD and 14 patients who progressed from SIgAD to CVID were selected. Patients were evaluated for family history of primary immunodeficiencies and consanguinity, occurrence of recurrent infections, allergies, presence of autoimmune diseases and cancer; lymphocyte populations, subpopulations of B cells and genotyping of the L55M polymorphism of the PON1 gene were also evaluated. **RESULTS:** The group that evolved into CVID (CVID group) had higher frequencies of non-infectious

diarrhea, cancer and splenomegaly than the SIgAD group. There was no significant difference between the groups on the L55M polymorphism genotypes analysis. The CVID group showed a significant decrease in lymphocyte populations (CD3, CD4, CD19, NK) when compared to SIgAD. There was no significant difference between the groups regarding family history of immunodeficiencies. SIgAD patients had a higher percentage of CD27+IgD+IgM+ B lymphocytes than the control group. CONCLUSIONS: The following factors suggest the evolution of SIgAD to CVID: presence of non-infectious diarrhea, neoplasms, splenomegaly and decrease in lymphocyte populations (CD19, CD4) and the increase of B memory cell without class switch.

Descriptors: Immunologic deficiency syndromes; IgA deficiency Common variable immunodeficiency; Lymphocytes; Paraoxonase; Autoimmune diseases; Infections.

## 1 Introdução

As imunodeficiências primárias, recentemente renomeadas e reclassificadas como Erros Inatos da Imunidade (EII) (Picard et al., 2018), constituem um grupo heterogêneo de doenças causadas por disfunções nos diversos compartimentos do sistema imune. O comprometimento das imunidades inata e/ou adaptativa pode aumentar a susceptibilidade a infecções e os indivíduos acometidos podem também apresentar comorbidades, como doenças autoimunes, doenças inflamatórias e câncer. Os erros inatos da imunidade podem ser classificados em: imunodeficiências que afetam imunidades celular e humoral; imunodeficiências combinadas com características associadas ou sindrômicas; deficiências predominantemente de anticorpos; doenças de desregulação imunológica; defeitos congênitos de número ou função de fagócitos; defeitos na imunidade intrínseca e inata; distúrbios autoinflamatórios; deficiências de complemento; falência da medula óssea; fenocópias de erros inatos da imunidade (Tangye et al., 2020).

As doenças mais comuns entre as deficiências predominantemente de anticorpos são a deficiência seletiva de IgA (DSIgA) e a imunodeficiência comum variável (ICV). Assim como o próprio nome diz, a DSIgA é definida por níveis séricos praticamente indetectáveis de IgA (<7mg/dL), com níveis normais de IgG, IgM e números normais de linfócitos. O diagnóstico só pode ser estabelecido após os quatro anos de idade e após a exclusão de causas secundárias de hipogamaglobulinemia, como o uso de medicamentos e infecções virais (Yel, 2010; Ballou, 2002; Conley et al., 1999). Sua frequência varia de 1:163 a 1:14.840 conforme a etnia, sendo mais comum em caucasianos e rara em asiáticos. (Kanoj et al., 1986; Pereira et al., 1997; Rezvan et al., 2009; Feng et al., 2011; Urbonas et al., 2016). No Brasil foi encontrada a frequência de 1:965 em doadores de banco de sangue (Carneiro-Sampaio, 1989).

Na maioria dos indivíduos, a DSIgA é assintomática; por outro lado, cerca de 30% dos indivíduos são acometidos por pelo menos uma das seguintes doenças: atopia, infecções de repetição ou crônicas, principalmente de trato respiratório e

gastrointestinal, doenças autoimunes e doenças inflamatórias intestinais (Yel, 2010). Uma pequena parcela dos indivíduos com DSIGa evolui para ICV (Aghamohammadi et al., 2008).

## 1.1 IgA

A imunoglobulina A (IgA), identificada pela primeira vez em 1959 (Heremans et al., 1959), é a imunoglobulina mais frequente no organismo humano, presente em grandes quantidades nas mucosas. Em humanos, ela é dividida em duas subclasses IgA1 e IgA2 que são codificadas por genes diferentes  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ . A principal diferença na estrutura molecular das subclasses é a presença de uma deleção de 13 aminoácidos na região de dobradiça da IgA2, consistindo em uma imunoglobulina mais resistente a ação de proteases de patógenos, como o tipo 1 do *Haemophilus influenzae* e o tipo 2 da *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* (de Souza-Pereira e Woof, 2019, Woof e Kerr, 2008).

A IgA1 é majoritariamente sérica, sendo aproximadamente 90% desta monomérica. O restante de IgA1 está presente na saliva, nas glândulas mamárias, trato respiratório e parte superior do trato gastrointestinal de forma dimérica. Já a IgA2 se apresenta mais na forma dimérica em secreções, como saliva, muco dos tratos respiratório e gastrointestinal (Davis et al., 2020).

A IgA sérica é produzida por plasmócitos de longa vida, encontrados na medula óssea. A IgA é considerada principalmente anti-inflamatória, porém quando interage com antígeno pode se ligar a receptores específicos para IgA (FcaR) em fagócitos e participar de sua ativação. Quando neutrófilos interagem com o antígeno revestido por IgA, há o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, também da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e da secreção de leucotrieno B4 (LTB4), aumentando a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos. A IgA

não ativa complemento pela via clássica, mas pode ativar pela via alternativa ou das lectinas (Roos et al., 2001).

A IgA2 dimérica (dIgA) é composta de duas unidades monoméricas ligadas por uma cadeia J. Para chegar ao lúmen, a dIgA se liga ao receptor específico de transporte de imunoglobulinas (pIgR) na face basolateral da célula epitelial é endocitada e atravessa a célula até o lúmen. No lúmen pIgR é clivado e sua parte que continua vinculada a dIgA passa a ser chamada de componente secretório. O componente secretório protege a IgA de degradação quando secretada nas mucosas (Breedveld, van Egmond, 2019).

A IgA secretória (sIgA) tem origem nas células B IgM+ das placas de Peyer que são ativadas por antígenos que passaram pelas células M e trocam de classe de IgM para IgA. Essas células migram das placas de Peyer para a circulação sanguínea e posteriormente para a lâmina própria das mucosas gastrointestinal, respiratória e gênito-urinária, onde se diferenciam em plasmócitos secretores de IgA. A sIgA é encontrada em secreções como saliva, lágrimas, leite materno, colostro e na lâmina própria das mucosas (Delacroix et al., 1982; Zhang et al., 2021).

A IgA secretada é capaz de neutralizar e ajudar a remover bactérias e vírus, suas toxinas e enzimas, no lúmen, impedindo a adesão e entrada dos patógenos no organismo. Ela também pode criar complexos sem antígeno específico quando se liga a partir de sua porção Fc a açúcares como a manose, encontrados em patógenos. Também funciona como âncora da microbiota no muco, impedindo a sua entrada na mucosa; neste contexto, a IgA modula a relação microbiota-hospedeiro diminuindo a expressão de epítomos pró-inflamatórios das bactérias, neutralizando compostos pró-inflamatórios como lipopolissarídeo (LPS), e facilitando a formação de um biofilme que favorece a manutenção da microbiota e diminui o crescimento de patógenos. Há indícios que a IgA use um sistema de ligações de alta afinidade contra toxinas e patógenos e, por outro lado, utilize um sistema de ligações de baixa afinidade com a microbiota, evitando assim o rompimento da barreira mucosa. A IgA de mucosa também aumenta a capacidade da resposta imune ao apresentar

antígenos se ligando a Dectina-1 das células M, um tipo especializado de célula epitelial encontrado próximo às placas de Peyer, ou por meio do receptor de transferrina (CD71) em células epiteliais (Cerutti, 2008; Zhang et al., 2021).

A IgA pode desencadear tanto uma resposta pró-inflamatória quanto uma resposta anti-inflamatória/homeostática em células que possuem um de seus receptores, o FcαRI. Complexos de IgA são capazes de gerar uma resposta inflamatória, já IgA monomérica gera uma resposta inibitória (Davis et al., 2020).

A troca de classe das células B IgM+ para células B IgA+ pode ser um processo T-dependente ou um processo T-independente. O primeiro tipo ocorre de maneira semelhante a produção de IgG dependente de célula T (Pabst, Slack, 2020; Biram, 2019). Já o segundo ocorre por meio da interação das citocinas BAFF (B-cell activating fator) e APRIL (A proliferation-inducing ligand), liberadas por células dendríticas e células linfoides inatas (ILCs). E grande parte da IgA é constantemente produzida, sem um novo estímulo, além de ser polireativa e de baixa afinidade, por isso essas imunoglobulinas são consideradas parte da imunidade natural (Macpherson et al., 2012).

Apesar da grande importância da IgA, sua deficiência é comum e boa parte dos indivíduos acometidos são assintomáticos, mostrando a redundância do sistema imune que mesmo na ausência dessa imunoglobulina consegue manter o organismo sem infecções. No entanto, entre 30 a 35% dos pacientes a ausência da IgA pode estar associada ao aumento da frequência de infecções, assim como à produção de autoanticorpos (Jacob et al., 2008; Cunningham-Rundles, 2001).

## **1.2 Manifestações clínicas e doenças associadas**

As manifestações clínicas são divididas em 5 fenótipos: O assintomático, o de infecções leves, o fenótipo alérgico, o autoimune e o grave.

O primeiro grupo, o assintomático é o mais dificilmente estudado e sua frequência é estimada em 65 a 75% dos casos de DSIgA. São indivíduos diagnosticados por acaso em doações de sangue, exames de rotina ou em estudos familiares, por isso sua frequência é provavelmente subestimada. Fazem parte indivíduos sem nenhum quadro clínico e por isso, geralmente sem seguimento futuro. Acredita-se que estes indivíduos tenham mecanismos compensatórios para se manterem assintomáticos, como aumento de células produtoras de IgM na mucosa gastrointestinal e aumento da produção de IgG no organismo todo. Estes indivíduos devem ser seguidos por um tempo pois seus níveis de IgA podem normalizar ou seu fenótipo pode mudar. O único cuidado é que esses indivíduos podem ter anticorpos anti-IgA e podem sofrer reações anafiláticas ao receber hemocomponentes (Yazdani et al., 2015). Não há relação entre o resultado da dosagem de IgA e o quadro clínico (Swain et al., 2019).

Já o fenótipo de infecções leves é composto de aproximadamente 12% dos indivíduos DSIgA, estes apresentam apenas infecções leves de repetição. Apesar de 40-90% dos pacientes apresentarem este quadro inicialmente, aqueles que mantêm esse perfil são bem menos frequentes. Este grupo pode ter um diagnóstico tardio, caso a frequência de suas infecções não seja investigada. Uma minoria pode apresentar infecções graves, nesse caso deve-se investigar associação de DSIgA e deficiência de subclasses de IgG ou de lectina ligadora de manose. Na ausência de IgA, o sistema imune das mucosas tenta compensar com IgM secretória, porém nem sempre é bem-sucedido, principalmente nas vias aéreas. Essas infecções geralmente são por vírus e bactérias, principalmente as encapsuladas, como *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Sinusite, bronquite, otite, pneumonia, outras infecções de vias aéreas superiores e infecções gastrointestinais leves sem complicações são o que caracteriza esse grupo (Yazdani et al., 2015; Yazdani et al., 2017; Swain et al., 2019).

Quando falamos do fenótipo alérgico, a DSIgA já foi associada a rinite, conjuntivite alérgica, asma, dermatite atópica, eczema, urticária e alergia alimentar (Swain et al., 2019). Sem a sIgA mais alérgenos conseguem ultrapassar a barreira epitelial e interagir com o sistema imune de mucosas, podendo gerar sensibilização. Foi visto

que IgA2 tem papel no desenvolvimento de tolerância (Hägström et al., 2002). Indivíduos DSIgA podem apresentar níveis aumentados de IgE sérica, possivelmente é um mecanismo compensatório. Ainda há controvérsias sobre a frequência de alergia ser maior na DSIgA comparando a população geral, mas Cinicola et al. (2022) apontam que há sim uma maior suscetibilidade.

As doenças autoimunes, vistas especialmente no fenótipo autoimune, são especialmente relevantes na DSIgA. Sua frequência pode variar dependendo do tipo de doença, mas são maiores que a população em geral (Erkoçoğlu et al., 2017). Há indícios de que certas doenças possuam elo genético com a DSIgA. O haplótipo HLA 8.1 é associado não só a DSIgA, mas a diabetes tipo 1 e artrite reumatóide. A presença de algumas doenças autoimunes em parentes de primeiro grau de indivíduos DSIgA também é sugestiva. Mas não são todas as doenças autoimunes que tem associação com DSIgA, estas são: Lupus sistêmico eritematoso, Escleroderma/esclerose sistêmica, Síndrome de Sjögren, sarcoidose, tireoidite, diabetes mellitus tipo 1, anemia perniciosa, gastrite autoimune, doença celíaca, doença de Crohn, colite ulcerativa, hepatite autoimune, colangite esclerosante primária, artrite reumatoide, artrite idiopática juvenil, espondilite anquilosante, miosites, vitiligo, psoríase, alopecia areata, estomatite aftosa recorrente, líquen plano, glomerulonefrite, miastenia grave, esclerose múltipla, púrpura trombocitopênica imune, anemia hemolítica autoimune. Outras doenças autoimunes foram descritas em pacientes DSIgA, mas não há dados sobre frequência para avaliar associação com DSIgA (Odineal et al., 2020).

Indivíduos que apresentam infecções graves ou recorrentes e doenças autoimunes são considerados do fenótipo grave. Este fenótipo é mais comum em pacientes mais velhos. Alguns indivíduos deste fenótipo inclusive evoluem para ICV (Yazdani et al., 2015). Neste grupo, podem aparecer infecções graves e de repetição de vias aéreas inferiores, que podem levar a bronquiectasias, na parte gastrointestinal aparecem diarreia crônica e má-absorção associadas geralmente à *Giardia lamblia*, podendo inclusive estarem associadas a hiperplasia nodular linfoide (Swain et al., 2019). Estar neste grupo traz aumento do risco de alguns tipos de neoplasias: linfoma,

adenocarcinoma de estômago e outras neoplasias gastrointestinais. Outros tipos de câncer também são vistos na DSIgA, como carcinoma de cólon, câncer de ovário, melanoma, linfossarcoma e timoma. Contudo, em geral, pacientes DSIgA não tem um risco elevado para câncer (Yazdani et al., 2017).

### **1.3 Patogênese e genética**

A patogênese da deficiência de IgA é desconhecida, contudo há indicativos que falhas na diferenciação de células B em plasmócitos produtores de IgA sejam as responsáveis. Pode haver aumento de presença de células B imaturas que apresentam IgD e IgM de superfície (Conley e Cooper, 1981, Rivas et al., 2010).

Também foram descritos defeitos intrínsecos na célula B, diminuição de células de memória CD19+CD27+ e redução de células de memória com troca de isótipo CD19+IgD-CD27+ (Rivas et al., 2010; Aghamohammadi et al., 2011), deficiência na produção de citocinas (IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-21), disfunções em células T auxiliares e T reguladoras e mutações em TACI (Transmembrane activator and calcium-modulator and cytophilin ligand interactor) (Yazdani et al., 2017, Castigli, Wilson, Scott et al., 2005).

Polimorfismos do gene TNFRSF13B, responsável pela codificação do TACI, já foram associados à DSIgA. O TACI é um membro da família dos receptores de fator de necrose tumoral presente em células B e que pode se ligar ao fator de ativação de células B (BAFF) e ao ligante indutor de proliferação (APRIL) que são importantes na troca de classes de imunoglobulina, diferenciação de plasmócitos e a formação de células de memória secretoras de imunoglobulinas que já sofreram troca de classes. Mutações em genes que codificam CD19, BAFF-R, ICOS e TACI (TNFRSF13B) foram encontradas em indivíduos DSIgA e em indivíduos ICV (Castigli, Wilson, Garibyan et al., 2005; Rachid et al., 2006). Contudo essas mutações foram encontradas em indivíduos sem imunodeficiência e não são

encontradas em todos os indivíduos DSIGa ou ICDV, por isso provavelmente não são causa da imunodeficiência e sim fator de suscetibilidade da doença.

Aproximadamente 20% dos casos de DSIGa são herdados, porém essa imunodeficiência não possui herança definida, apesar de já terem sido descritos casos de heranças tanto autossômica dominante, quanto recessiva e herança esporádica. Como a produção de IgA depende de diversos genes, diferentes defeitos podem ser herdados. Histórico familiar se mostra importante, pois a prevalência de DSIGa em parentes de primeiro grau de indivíduos com DSIGa é de 38 a 50 vezes maior que aqueles sem grau de parentesco (Zhang et al., 2021) e o risco de um familiar ter alguma alteração imunológica é de 20% (Karaca et al., 2018).

Há também indicativos de que mecanismos epigenéticos estejam envolvidos no desenvolvimento da DSIGa. Em um estudo em que foi investigado um locus do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade), em indivíduos DSIGa e seus parentes de primeiro grau, foi observado que há uma maior prevalência de mães afetadas terem filhos afetados, do que pais afetados terem filhos afetados (Vorechovský et al., 1999). Foi observado em cães com diminuição de níveis de IgA e doença inflamatória intestinal, a diminuição da expressão de mRNA dos genes TNFRSF13B (responsável por TACI) e TNFRSF13C (responsável por Baff-R) com correlação negativa com hipermetilação das ilhas CpG dos mesmos genes em células B. Foi encontrada também uma correlação negativa entre níveis de IgA sérica e metilação do gene TNFRSF13B e uma correlação positiva entre níveis séricos de IgA e expressão de mRNA de TACI. Porém não houve as mesmas correlações com BAFF-R (Maeda et al., 2014). Cães são uma espécie modelo de DSIGa, por apresentarem um fenótipo da doença semelhante ao encontrado em humanos, por isso, é possível que a metilação dos mesmos genes tenha relação com os níveis séricos de IgA em humanos também.

Apesar da influência ser considerada pequena dos haplótipos dos genes de HLA, alguns deles foram associados com a DSIGa, sendo os mais comuns, no norte

européu, A1, B8, DR3 e DQ2, já no Sul da Europa foram encontrados B14 e DR1. Já outros haplótipos foram descritos como “protetores” em relação a imunodeficiência, como DR15, DQ6, DR2 (Cunningham-Rundles, 2001; Zhang et al., 2021).

Locus e alterações estruturais do cromossomo 18 foram associados a DSIGa, porém ainda não está claro quais genes afetados, suas consequências e frequência nos pacientes com DSIGa (Zhang et al., 2021).

## **1.4 DSIGa e ICV**

Cerca de 10% dos pacientes com DSIGa podem evoluir para uma deficiência de anticorpos mais grave denominada imunodeficiência comum variável (ICV) (Carvalho Neves Forte et al., 2007; Espanol et al., 1996).

Esta doença é a imunodeficiência primária sintomática mais comum e é caracterizada por níveis séricos de IgG, IgA e/ou IgM abaixo da normalidade; os níveis de IgG devem ser baixos em duas dosagens separadas por pelo menos três semanas. Aproximadamente 50% dos pacientes apresentam alterações da imunidade celular, sendo que os valores de linfócitos B podem estar normais ou baixos, seguindo os valores de referência por faixa etária. A ICV pode incidir em qualquer idade e o diagnóstico é estabelecido acima dos 4 anos de idade. A maioria dos pacientes é diagnosticada na fase adulta, geralmente entre 20 e 40 anos, embora haja um pico de incidência na infância entre os 8 e 10 anos de idade. A prevalência da doença varia de 1:10.000 a 1:100.000 de acordo com as diferentes etnias (Conley et al., 1999; Bonilla et al., 2016).

A patogênese da ICV é desconhecida. As manifestações clínicas são muito heterogêneas, estando descritas infecções de repetição dos trato digestório e respiratório, artrite infecciosa, doenças granulomatosas, esplenomegalia, hepatomegalia, hiperplasia linfóide, doenças inflamatórias intestinais, autoimunidade e neoplasias (Gupta et al., 2019; Bonilla et al., 2016; Chapel, 2008).

Embora não faça parte do diagnóstico de ICV, níveis séricos baixos de IgE total são observados na grande maioria dos pacientes, que apresentam também pesquisa negativa de IgE específica *in vivo* ou *in vitro* (Salek et al., 2013), mesmo naqueles que referem histórico de atopia pessoal e/ou familiar (Agondi et al., 2010).

Apesar dos indivíduos com ICV apresentarem em sua maioria valores normais de linfócitos B (CD19+) no sangue periférico, está descrita a diminuição de células B de memória com troca de isótipo (IgD-IgM-CD27+) (Warnatz et al., 2002; Sánchez-Ramón, 2008). No estudo pediátrico de Lougaris et al. (2019) os pacientes que evoluíram para DSIGa apresentaram diminuição de linfócitos B de memória, com ou sem troca de isótipo.

Mutações de pelo menos 13 genes foram associadas à ICV, porém essas mutações só podem ser relacionadas em cerca de 10% dos casos. Foram associadas mutações nos genes responsáveis pela expressão de CD19, CD21, CD81, CD20, receptor de BAFF e ICOS (Picard C, et al., 2015). Os polimorfismos C104R, A181E e ins204A do gene TNFRSF13B, responsável pela codificação de TACI, foram associados à doença por terem uma prevalência maior do que a população geral (Pan-Hammarström, 2007).

Há grandes evidências de que a deficiência de IgA e a imunodeficiência comum variável compartilhem algum tipo de herança genética comum. Haplótipos do MHC HLA A1, B8, DR3, DQ2 e B14-DR1 foram descritos tanto na ICV como na DSIGa (Schaffer et al., 1989; Olerup, 1990). Em pacientes com DSIGa que evoluem para ICV foi relatado a alta prevalência de mutações no gene TNFRSF13B, codificador de TACI (Aghamohammad et al., 2008; Salzer, 2005). Há estudos que relatam famílias que apresentam mais de um membro com imunodeficiência, sendo frequente as duas imunodeficiências serem encontradas em uma mesma família (Fuchs et al., 1984; Volanakis et al., 1992).

Análises dos pacientes que progrediram demonstraram que alguns dados clínicos e laboratoriais podem ser considerados fatores de risco para evolução da DSIGa para ICV, como: deficiência de subclasses de IgG, principalmente IgG2 e IgG4, levando a

maior prevalência de infecções; presença dos haplótipos do MHC acima citados que estão descritos em ambas doenças; histórico familiar de imunodeficiências; associação com doenças autoimunes/inflamatórias (Aghamohammadi et al., 2008; Preud'homme e Hanson, 1990).

Cabe ressaltar que as infecções crônicas ou recorrentes, as doenças autoimunes/inflamatórias e as neoplasias são caracterizadas por um estado pró-inflamatório.

A suscetibilidade a infecções gerada pela DSIgA e pela ICV pode induzir a um acúmulo de radicais livres produzidos pela resposta imune a patógenos. Células fagocíticas e linfócitos são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio no combate a infecções (Yang et al., 2014). Mecanismos envolvidos tanto na geração de estresse oxidativo quanto em sua regulação podem ter grande importância no prognóstico de pacientes com erros inatos da imunidade. A família das enzimas paraoxonases (PON) tem papel nestes mecanismos e estudamos um de seus genes para avaliar sua possível influência na evolução da DSIgA para ICV.

## **1.5 Paraoxonase 1**

As paraoxonases são uma família de enzimas codificadas por três genes PON1, PON2 e PON3, sendo que cada gene é responsável por uma única proteína. Esses genes são encontrados no braço longo do cromossomo 7 em humanos (Primo-Parmo, 1996) e estão envolvidas na peroxidação lipídica. As paraoxonases atuam principalmente na circulação sanguínea, e apresentam entre si cerca de 60% de identidade em aminoácidos e cerca de 70% de identidade em nucleotídeos, nas enzimas humanas. Elas possuem propriedades antioxidantes e embora a atividade fisiológica das paraoxonases esteja associada à prevenção da aterosclerose, elas atuam também sobre o metabolismo de organofosfatos, medicamentos e no estresse oxidativo envolvido em doenças como doenças inflamatórias intestinais,

neoplasias, AIDS e infecções crônicas, também tendo papel na imunossenescência (Taler-Verčič, Goličnik, Bavec, 2020; Campo et al., 2004; Precourt et al., 2011).

PON1 é sintetizada principalmente no fígado e secretada na corrente sanguínea onde se associa predominantemente a molécula HDL (Deakin, Leviev et al., 2002). Alguns trabalhos indicam a presença de PON1 em outros tecidos de camundongos, que pode ser devido à síntese local ou transporte da enzima do fígado para outros locais (Marsillach et al., 2008, Rodrigo, 2001).

PON1 foi descrita na década de 1940 por Mazur (1946) com uma atividade enzimática encontrada em tecidos de mamíferos capaz de hidrolisar pesticidas organofosforados.

As enzimas foram classificadas por Aldridge (1953) como A-esterases, que são esterases capazes de hidrolisar organofosfatos. No entanto, o nome paraoxonase foi adotado por causa do extenso uso do paroxon como substrato da enzima. A PON1 não é encontrada no sangue de aves, peixes e na maioria dos répteis (Mackness e Mackness, 2015).

PON1 é uma glicoproteína de 354 aminoácidos e massa molecular aproximada de 43 KDa; sua porção hidrofóbica encontra-se na região N-terminal o que possibilita sua associação ao HDL (Mackness et al., 1998). PON1 se associa a espécies específicas de HDL, subespécies que também contêm apo A1. Após ultracentrifugação, a maior parte de PON1 encontra-se na fração pequena e densa do HDL3 (Davidson et al., 2009).

A PON1 é capaz de hidrolisar de lactonas, tiolactonas, arilésteres, carbonatos cíclicos e pesticidas organofosforados, gases tóxicos, como sarin e soman e drogas glucuronidas (Rajkovic et al., 2011).

O gene da PON1 está localizado entre q21.3 e q22.1 no braço longo do cromossomo 7 em humanos e no cromossomo 6 em camundongos. A estrutura da PON1 possui 6 folhas  $\beta$  e necessita de 2 íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , um para a atividade e outro para estabilidade (Harel et al., 2004).

O gene PON1 possui muitos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs). Nenhum SNP é capaz de anular totalmente a atividade enzimática. Os SNPs mais estudados são Q192R, L55M e o C-108T da região promotora (Mackness e Mackness, 2015).

O polimorfismo PON-1-Q192R tem a capacidade de determinar a atividade da enzima dependendo do substrato; alguns substratos são hidrolisados mais rapidamente sob a isoforma R, como o paraoxon, e outros sob a isoforma Q, como o diaxozon. Os polimorfismos PON1-T-108C e L55M associam-se a diferentes níveis séricos da enzima e atividades: o alelo 55L está associado a uma maior concentração sérica da proteína e de mRNA da PON1 em comparação ao 55M (Mackness et al., 1998; Schrader, 1997).

O polimorfismo, identificado na região codificadora do gene da PON, ocorre na posição 55 do gene e afeta de modo menos intenso e independente a atividade da enzima no plasma, em comparação ao polimorfismo PON1 192. O polimorfismo L55M consiste na troca de um aminoácido leucina (L) por metionina (M) (T/A: Leu/Met) (Mackness et al., 2003; Mackness et al., 2000). A presença do alelo M55 está associada à alteração nas concentrações séricas e à baixa eficiência da PON1 plasmática (Costa, 2005; Garin et al., 1997; Dardiotis et al., 2019).

Em um trabalho recente de nosso grupo, o polimorfismo L55M da enzima Paraoxonase 1 (PON1) foi associado à gravidade do quadro clínico em um grupo de 93 pacientes com ICV, sendo o alelo L considerado protetor (Sini, 2017). Esses resultados e a conexão entre DSIGa e ICV mostram um potencial papel da PON1 na evolução da DSIGa para ICV a ser investigado neste trabalho.

O histórico familiar para imunodeficiências, a presença de infecções crônicas ou de repetição e/ou doenças autoimunes, a diminuição de linfócitos B de memória, o genótipo MM do polimorfismo L55M podem constituir isoladamente fatores preditivos da evolução de DSIGa para ICV.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar parâmetros laboratoriais e clínicos em pacientes com DSIGa em busca de marcadores prognósticos de progressão para ICV.

### **2.2 Objetivos específicos**

#### **2.2.1 Avaliar em pacientes com DSIGa:**

- Níveis séricos de IgA, IgG, IgM e IgE atuais e no início da doença;
- Populações de linfócitos T CD4+ e CD8+, células NK e linfócitos B e suas subpopulações: células B imaturas (CD19+CD27-IgD+IgM+) e de memória com troca de isótipo (CD19+CD27-IgD-IgM-) e sem troca de isótipo (CD19+CD27-IgD+IgM+);
- Genotipagem do polimorfismo L55M do gene PON1;
- Histórico familiar de imunodeficiências primárias e consanguinidade;
- Presença de doenças associadas (infecções crônicas ou recorrentes, atopia, doenças autoimunes/inflamatórias).

#### **2.2.2. Avaliar em pacientes que evoluíram de DSIGa para ICV:**

- Níveis séricos de IgA, IgG, IgM e IgE no início da doença;
- Populações de linfócitos T CD4+ e CD8+, células NK e linfócitos B;
- Genotipagem do polimorfismo L55M do gene PON1;
- Histórico familiar de imunodeficiências primárias e consanguinidade;

- Presença de doenças associadas (infecções crônicas ou recorrentes, atopia, doenças autoimunes/inflamatórias).

## **3 Métodos**

Este estudo foi submetido à Comissão Ética em Pesquisa e aprovado e encontra-se com o número do parecer 2.670.637 e CAAE:89168218.2.0000.0068.

### **3.1 Locais do estudo**

Os pacientes estudados estão em acompanhamento no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As imunofenotipagens das subpopulações linfocitárias B foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica (LIM 60) da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP. A genotipagem da paraoxonase 1 foi realizada no Laboratório de Genética e Hematologia Molecular da FMUSP. Os demais exames já solicitados normalmente no seguimento dos pacientes com DSIGa ou ICV foram realizados na rotina no Laboratório Central do HC-FMUSP.

### **3.2 Casuística**

Foram estudados 34 pacientes com idade superior a 16 anos de ambos os sexos com diagnóstico de deficiência seletiva de IgA (Grupo DSIGa). Como comparação foram avaliados, para os mesmos parâmetros, 14 pacientes que evoluíram de deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência comum variável (Grupo ICV).

Os pacientes foram avaliados quanto ao sexo, idade, idade de início de sintomas, idade de diagnóstico, tempo de doença (tempo entre o início dos sintomas e a idade

do estudo), retardo diagnóstico (tempo entre início dos sintomas e a idade de diagnóstico), história familiar de imunodeficiências primárias e de consanguinidade, presença de doenças associadas como infecções de repetição, doenças alérgicas, doenças autoimunes/inflamatórias e neoplasias. Também foram avaliadas populações linfocitárias (CD3, CD4, CD8, CD19, NK), linfócitos B imaturos e de memória com e sem troca de classe e o polimorfismo L55M da PON-1.

O diagnóstico das doenças associadas (infecções de repetição, doenças autoimunes, doenças atópicas e neoplasias) foi estabelecido obedecendo a critérios clínicos e laboratoriais recomendados pelas sociedades internacionais das várias especialidades envolvidas.

Neste estudo a coorte foi estudada retrospectivamente.

### **3.3. Critérios de inclusão**

Incluímos no estudo pacientes de ambos os sexos acima de 16 anos de idade com diagnóstico de deficiência de IgA estabelecido na presença de níveis séricos de IgA menores do que 7 mg/dL e níveis de IgG e de IgM normais ou elevados, segundo critérios definidos por grupo de especialistas em Imunodeficiências Primárias da World Health Organization (Notarangelo, 2009) e pelo Latin American Group for Primary Immunodeficiency Diseases – PAGID (Leiva, 2007).

Foram estudados também pacientes com diagnóstico de imunodeficiência comum variável estabelecido na presença de níveis de IgG dois desvios-padrão abaixo da média e níveis baixos de IgA e/ou IgM segundo critérios definidos por grupo de especialistas em Imunodeficiências Primárias da World Health Organization (Notarangelo, 2009) e pelo Latin American Group for Primary Immunodeficiency Diseases – PAGID (Leiva, 2007).

A idade de 16 anos foi escolhida, pois Grecco (1996) observou que até os 14 anos há possibilidade de normalização dos níveis séricos de IgA no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias não há pacientes menores de 16 anos.

### **3.4. Critérios de exclusão**

Excluimos do estudo pacientes com neoplasias em tratamento; sob corticoterapia sistêmica prolongada; em uso prévio ou atual de drogas citotóxicas, sulfassalazina, antidepressivos, anticonvulsivantes; e gestantes. As condições descritas anteriormente podem interferir nos resultados dos exames e análises aqui estudadas, como alterações linfocitárias associadas à gestação.

### **3.5. Exames laboratoriais**

Foram realizados de acordo com a rotina de acompanhamento no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias considerando-se as manifestações clínicas que cada paciente apresentar durante sua avaliação e posterior evolução; a) Exames de triagem: hemograma completo, dosagem de imunoglobulinas no soro (os valores de referência utilizados são aqueles da época de cada levantamento), bioquímica de sangue, fosfatase alcalina, urina tipo I, protoparasitológico de fezes, raio-x de tórax; b) Infecções recorrentes: cultura de urina, fezes e secreções; sorologia e proteína C reativa (PCR) para os possíveis agentes implicados; exames radiológicos e ultrassonográficos relevantes para o diagnóstico; c) doenças autoimunes: pesquisa de anticorpos anti-nucleares, anti-tireoglobulina, anti-tireoperoxidase, anti-mitocondria, anti-célula parietal gástrica, anti-LKM, ANCA (anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos), fator reumatoide, teste de Coombs; frações C3 e C4 do complemento, anticorpo anti-transglutaminase; d) Atopia: testes cutâneos de leitura imediata para alérgenos inalantes e alimentares; avaliação da função pulmonar; e)

Neoplasias: endoscopia digestiva alta com pesquisa de *H. pylori* e biópsia gástrica e de segunda porção do duodeno; pesquisa de sangue oculto nas fezes e eventual colonoscopia; ultrassonografia de abdômen; tomografia computadorizada de tórax e abdome; mamografia ou ultrassonografia de mamas; colpocitologia oncótica.

### **3.6 Células B imaturas e de memória**

#### **3.6.1 Obtenção das amostras**

Para a identificação das subpopulações de linfócitos B (B imatura e B de memória) foram colhidos 5 mL de sangue periférico em tubo EDTA, após a aplicação e o aceite do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### **3.6.2 Imunofenotipagem para identificação das subpopulações de linfócitos B imaturos e de memória**

Para a imunofenotipagem de células B imaturas e de memória, foi realizado um protocolo de marcação de moléculas de superfície em sangue total, o qual foi padronizado no Laboratório de Investigação Médica 60 – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram rotulados os tubos de citometria (5 mL) de acordo com a tabela 1. Adicionou-se 100 uL de sangue total em cada tubo. Em seguida, foram colocados os respectivos anticorpos em cada tubo, em quantidades pré-estabelecidas por titulação, e foram homogeneizados e incubados por 15 minutos, em temperatura ambiente, cobertos com papel alumínio.

Após a incubação, adicionou-se 3 mL de solução de lise (eBioscience™ 1X RBC lysis buffer) em cada tubo e foram homogeneizados com a pipeta e incubados por 14 minutos, em temperatura ambiente, cobertos com papel alumínio;

Em seguida, os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 1800 RPM, por 5 minutos, desprezando o sobrenadante após centrifugação. Foram realizadas três etapas de lavagem idênticas, em que foram adicionados 4 mL de MACs Buffer em cada tubo, homogeneizou-se com a pipeta e centrifugou-se a 1800 RPM, por 5 minutos, desprezando o sobrenadante posteriormente.

Para fixação adicionou-se 100 uL de Paraformaldeído 1% em cada tubo, foram homogeneizados e incubados por 15 minutos, em temperatura ambiente, coberto com papel alumínio. Para a retirada do paraformaldeído, adicionou-se 2 mL de MACS buffer em cada tubo, foram homogeneizados e centrifugados a 1800 RPM por 5 minutos, desprezando o sobrenadante ao final da etapa.

Finalmente, foram adicionados 300 uL de PBS 1X e em seguida, homogeneizou-se os tubos. Os tubos foram guardados a 4°C, cobertos com alumínio e adquiridos no citômetro de fluxo (BD - LRS Fortessa X-20) em até 24 horas.

| Alvo do anticorpo                          | Fluorocromo     | Não marcado | Paciente | FMO CD27 | FMO IgM |
|--|-----------------|-------------|----------|----------|---------|
| LIVE/DEAD™ Fixable Red Dead Cell Stain Kit | -               | -           | 0,4 µL   | 0,4 µL   | 0,4 µL  |
| CD19                                       | Ficoeritrina    | -           | 5 µL     | 5 µL     | 5 µL    |
| CD27                                       | Pacific blue    | -           | 2 µL     | -        | 2 µL    |
| IgD  | Alocianina      | -           | 5 µL     | 5 µL     | 5 µL    |
| IgM  | Alexa flúor 700 | -           | 20 µL    | 20 µL    | -       |

### 3.6.3 Aquisição e Análise por Citometria de Fluxo

A aquisição das amostras de pacientes e controles foi feita no citômetro de fluxo BD LSRFortessa™ X-20 e os dados obtidos foram analisados no programa FlowJo™ versão 9.9.6.

### 3.6.2.1 Estratégia de análise

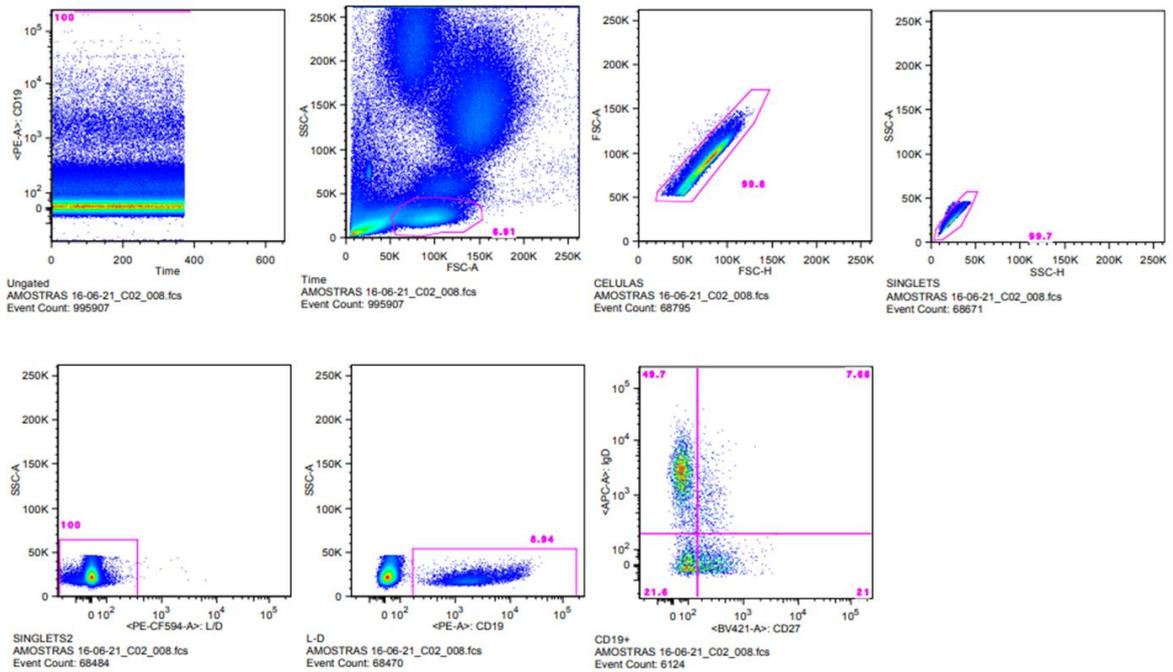
A voltagem do equipamento foi ajustada utilizando-se BD™ CompBeads Set Anti-Mouse Ig,  $\kappa$ /Negative control (BD, Bioscience) marcadas individualmente para cada fluorescência. Após a compensação foram adquiridas as amostras.

A análise dos dados foi feita no software FlowJo™. Após a aplicação da compensação nos dados, iniciamos a estratégia de análise com um gráfico cruzando PE (CD19) com *Time* para selecionarmos apenas os eventos adquiridos enquanto o feixe do laser estava estável e chamamos de “*Time*”. A partir do “*Time*”, cruzamos SSC-A com FSC-A e selecionamos a região que abrange os linfócitos e chamamos de “Células” por ser uma região que pode conter outras células. Tomando como partida “Células”, fazemos duas seleções para garantirmos que estamos analisando um evento por vez. A primeira, chamada “Singlets”, é dada a partir do gráfico FSC-H x FSC-A e a segunda, “Singlets2”, é dada a partir dos dados da seleção anterior em um gráfico SSC-H x SSC-A. Finalizando a etapa de refinamento dos dados, cruzamos os dados do marcador de viabilidade com SSC-A e delimitamos a área negativa para o primeiro parâmetro (Figura 1).

Iniciamos então nossa análise dos marcadores encontrados em células B. Primeiro cruzamos SSC-A com PE e selecionamos a população positiva para PE – CD19 e chamamos “CD19+”. Dentro dela, utilizando um controle FMO (*Fluorescence Minus One*) para CD27+, cruzamos APC - IgD com Pacific Blue - CD27 e separamos em quadrantes as populações (Figura 1).

A partir das populações dos quadrantes realizamos o gráfico SSC-A x Alexa flúor 700 – IgM. Utilizando um controle FMO para IgM, definimos os linfócitos B imaturos

(CD27-IgM+IgD+), as células de memória com troca de isótipo (CD27+IgM-IgD-) e sem troca de isótipo (CD27+IgM+IgD-) (Figura 2).



**Figura 1 – estratégia de análise: pré-seleção e população CD19+**

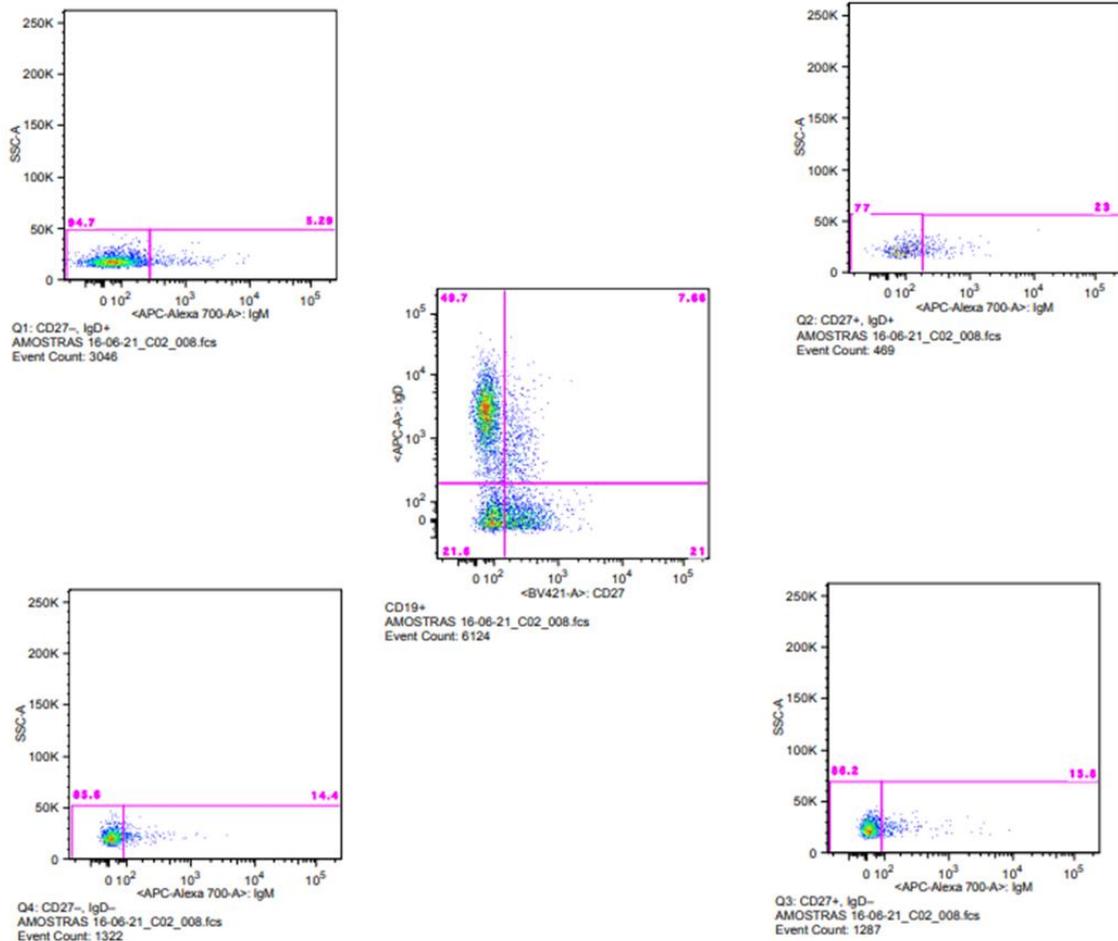


Figura 2 – estratégia de análise: subpopulações CD19+

## 3.7 Genotipagem do polimorfismo L55M da PON 1

### 3.7.1 Obtenção das amostras

Após aplicação e aceitação do termo de consentimento livre e esclarecido, foi realizada uma coleta de sangue periférico em tubos a vácuo de 5 mL contendo EDTA.

Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas (3.000 rpm por 5 minutos a 8°C). A seguir, foram obtidas alíquotas do *buff coat* das amostras (armazenadas a -20°C até o uso) para a obtenção e purificação do DNA genômico.

### 3.7.2 Obtenção do DNA genômico a partir de células do sangue periférico

O DNA genômico foi obtido por método de *salting out* conforme descrito por Miller e colaboradores (1998). Neste método, há a remoção de proteínas celulares pela desidratação e precipitação com solução saturada de NaCl.

Utilizando-se uma pipeta de transferência, 500 µL da camada de leucócitos foram colocados em tubo de 1,5 mL. A amostra foi congelada a -20°C para posterior extração de DNA genômico.

Descongelou-se a amostra em temperatura ambiente, acrescentou-se, a seguir, 750 µL de tampão de lise de sacarose (Tris-HCl 10mM, pH 7,5, sacarose 34mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, Triton X-100 1%). Após, o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 segundos. Através de sucção por vácuo, o sobrenadante foi removido, restando no fundo do tubo apenas o *pellet*. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão de lise e realizada uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos, com novo descarte de sobrenadante. Esse processo foi repetido mais uma vez.

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

A seguir, adicionou-se ao *pellet* 500µL de solução TEN (Tris-HCl 10mM, pH 8,2, EDTA 2 mM e NaCl 400 mM), 5 µL de SDS 10% e 3 µL de Proteinase K. Os tubos foram homogeneizados brevemente por inversão até que o *pellet* se despreendeu do fundo. A seguir, os tubos foram incubados por uma hora a 56°C, em termobloco.

Após o período de incubação, adicionou-se 150  $\mu$ L de NaCl (5 M). Após agitação vigorosa, a amostra foi centrifugada a 5.000 rpm durante 10 minutos.

O sobrenadante contendo o DNA será transferido para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600  $\mu$ L de isopropanol. A amostra, então, foi homogeneizada por inversão.

Sequencialmente, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4°C para a formação de um *pellet* de DNA. O sobrenadante foi desprezado por inversão e então adicionou-se 1 mL de etanol 70%. Após nova centrifugação a 5.000 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado. Este processo foi repetido mais três vezes.

Ao final da quarta repetição, o tubo contendo o *pellet* de DNA foi submetido à secagem do DNA em SpeedVac, durante 20 minutos. Ao final do processo de secagem do DNA, o mesmo foi reidratado em 100  $\mu$ L de solução TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM).

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

### **3.7.3 Genotipagem para o polimorfismo L55M do gene PON1**

A genotipagem foi realizada utilizando a técnica de análise de polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP). São amplificados fragmentos específicos para cada região pesquisada e subsequentemente são digeridos por enzimas de restrição em sítios específicos. A análise dos fragmentos resultantes permite a diferenciação dos genótipos associados ao polimorfismo estudado.

As análises foram realizadas conforme descritas por Motti e colaboradores (2001). Para a digestão dos produtos da PCR, foi utilizada a enzima de restrição Hinf-I, originando assim fragmentos capazes de caracterizar o polimorfismo PON1-L55M.

O processo de PCR seguiu as seguintes relações: em uma reação de 25  $\mu$ L de volume utiliza-se Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, 600 mM de

cada nucleotídeo trifosfato, 0,16 mM de primers *forward* e *reverse* PON1-55, 1 µg de DNA genômico e 1U de Taq-polimerase. A reação segue da seguinte maneira: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 61°C por 45 segundos (anelamento) e 72°C por 45 segundos (extensão), seguidos de 1 ciclo final de 72°C por 5 minutos.

As sequências de primers utilizadas:

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

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

O produto amplificado possui 144pb. Foi realizada a digestão de tal produto, seguindo uma reação com 2 horas de duração, a uma temperatura constante de 37°C, com 2U de enzima Hinf-I, preparada em tampão contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM e β-Mercaptoetanol 1 mM.

Ao final da digestão, o produto final se apresenta da seguinte forma: caso houver um fragmento de tamanho 144pb que não foi digerido pela enzima, este foi determinado como o alelo PON1-55M. Se a amostra possuir o alelo PON1-55L, o resultado foi o de uma banda de 122pb, resultante da digestão do DNA pela enzima de restrição.

As amostras amplificadas e posteriormente digeridas foram colocadas em gel de agarose a 3% com GelRed™ (3,6 µg), para corrida eletroforética (para o polimorfismo L55M da PON1) e foram visualizadas no programa ImageQuant LAS 4000. Para tanto, as amostras foram diluídas a 1:5 em tampão contendo 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e glicerol 30%. Aplicou-se 20 µL do produto final da reação PCR-RFLP diluídos em 4 µL do tampão anteriormente descrito, 5 µL de marcador de peso molecular de 50 pb.

### 3.8 Desenho do estudo

Após o estabelecimento do diagnóstico de deficiência de IgA (DSIgA) os pacientes serão submetidos a: 1) anamnese completa para investigação da presença de infecções de repetição, doenças alérgicas, autoimunes /inflamatórias e neoplasias; 2) histórico familiar para imunodeficiências primárias, doenças autoimunes/inflamatórias e neoplasias; 3) serão excluídos do estudo pacientes com neoplasias em tratamento, sob corticoterapia sistêmica prolongada, em uso de drogas citotóxicas, sulfassalazina, antidepressivos, anticonvulsivantes e gestantes; 4) aplicação e aceitação do termo de consentimento livre e esclarecido para participação no protocolo de pesquisa; 5) coleta de amostra de sangue periférico para realização de exames específicos do estudo:

a) imunofenotipagem por citometria de fluxo das populações de linfócitos B, linfócitos B imaturos (CD19+CD27-IgD+IgM+) e de memória com troca de isótipo (CD19+CD27+IgD-IgM-) e sem troca de isótipo (CD19+CD27+IgD+IgM+);

b) dosagem sérica de IgA, IgG, IgM e IgE total;

c) genotipagem PON1 - L55M

O processamento das amostras obtidas será realizado nos laboratórios envolvidos na pesquisa.

### **3.9 Estatística**

Variáveis quantitativas com distribuição normal foram analisadas utilizando-se o teste t de student, em casos específicos, quando as variâncias não eram iguais foi utilizado teste t de Welch. Os dados que não se enquadravam na distribuição normal, foram analisados utilizando teste U de Mann-Whitney. Para variáveis categóricas foi realizado o teste de Qui-quadrado tanto para a observação de associação de variável com grupo, quanto de associação de variável e genótipo. Para analisar a

diferença entre genótipos do polimorfismo da PON1 por variável foi realizada ANOVA ou Kruskal-Wallis.

As diferenças observadas durante a análise foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$

## 4 Resultados

### 4.1 Dados demográficos

Na tabela 2 estão demonstrados os dados demográficos de 34 pacientes com deficiência seletiva de IgA (DSIgA) e de 14 pacientes que progrediram de deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência comum variável (ICV). Entre os pacientes com deficiência seletiva de IgA foi observado amplo predomínio de mulheres (64,7%) em relação a homens (35,3%). A maioria dos indivíduos se autodeclarou de cor branca (79,4%), ao lado de 6 pacientes (17,6%) autodeclarados como não brancos (sendo apenas um de cor amarela).

A média de idade à época do estudo foi  $43,2 \pm 16,1$  anos e as médias correspondentes ao início dos sintomas e à idade ao diagnóstico de deficiência de IgA foram  $17,9 \pm 16,1$  anos e  $29,1 \pm 16,2$  anos, respectivamente. A média do retardo diagnóstico, caracterizado como o espaço de tempo entre o início dos sintomas e o estabelecimento diagnóstico foi  $12,8 \pm 13$  e o tempo de doença, definido como o período decorrido entre o início dos sintomas até a idade do paciente à época do estudo foi  $25,4 \pm 15,0$  anos (tabela 2).

Entre os pacientes com ICV, também houve predomínio do gênero feminino (64,3%) sobre o masculino (35,7%). Quanto à autodeclaração da cor, 13 entre 14 pacientes se identificaram como de cor branca (92,9%) e apenas um deles como de cor negra. A média de idade à época do estudo foi  $48,3 \pm 16,2$  anos, a correspondente ao início dos sintomas  $23,4 \pm 15,2$  e a média da idade do estabelecimento do diagnóstico de ICV após progressão da DSIgA foi  $33,4 \pm 13,1$  anos. A média do retardo diagnóstico foi  $8,2 \pm 7,7$  e o tempo de doença, definido como o período decorrido entre o início dos sintomas até a idade do paciente com ICV à época do estudo foi  $25,1 \pm 18,3$  anos (tabela 2).

Na tabela 2 pode ser observado que não houve diferença estatística entre pacientes com DSIGa e pacientes com ICV em relação a todos os dados demográficos analisados.

**Tabela 2 – Características demográficas de pacientes com deficiência seletiva de IgA (DSIGa) e de pacientes que progrediram de deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência comum variável (ICV)**

| Dados gerais                | DSIGa           |                | ICV             |                | Valor de p <sup>1</sup> |
|-----------------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-------------------------|
| <b>Sexo feminino</b>        | 64,7% (22/34)   |                | 64,3% (9/14)    |                | 1                       |
| <b>Sexo masculino</b>       | 35,3% (12/34)   |                | 35,7% (5/14)    |                | 1                       |
| <b>Cor autodeclarada</b>    |                 |                |                 |                |                         |
| <b>Branco</b>               | 79,4% (27/34)   |                | 92,9% (13/14)   |                | NR                      |
| <b>Pardo</b>                | 17,6% (6/34)    |                | -               |                |                         |
| <b>Negro</b>                | -               |                | 7,1% (1/14)     |                |                         |
| <b>Amarelo</b>              | 2,9% (1/34)     |                | -               |                |                         |
|                             | <b>Média±dp</b> | <b>Mediana</b> | <b>Média±dp</b> | <b>Mediana</b> | <b>p</b>                |
| <b>Idade</b>                | 43,2±16,1       | 43,5           | 48,3±16,2       | 48             | 0,37                    |
| <b>Início dos sintomas</b>  | 17,9±16,1       | 29,5           | 23,4±15,2       | 33             | 0,18                    |
| <b>Idade ao diagnóstico</b> | 29,1±16,2       | 10             | 33,4±13,1       | 24,5           | 0,38                    |
| <b>Tempo de doença</b>      | 25,4±15,0       | 21,5           | 25,1±18,3       | 20,5           | 0,75                    |
| <b>Retardo diagnóstico</b>  | 12,8±13,1       | 7              | 8,2±7,7         | 6              | 0,44                    |

<sup>1</sup>teste t de student e teste U de Mann-Whitney

## 4.2 Histórico familiar de deficiências predominantemente de anticorpos e de consanguinidade.

Não houve diferença estatística quanto à presença de histórico familiar de deficiências predominantemente de anticorpos em pacientes com deficiência seletiva de IgA (47,1%) ou com ICV (28,6%), assim como em relação à consanguinidade (14,7% e 7,1%, respectivamente), conforme demonstrado na tabela 3.

**Tabela 3 – Histórico familiar de imunodeficiências predominantemente de anticorpos e de consanguinidade em pacientes com deficiência seletiva de IgA (DSIGa) e em pacientes que progrediram de deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência comum variável (ICV)**

|  | <b>DSIgA</b>  | <b>ICV</b>   | <b>Valor de p<sup>1</sup></b> |
|--|---------------|--------------|-------------------------------|
| <b>Histórico familiar de imunodeficiências de anticorpos</b> | 47,1% (16/34) | 28,6% (4/14) | 0,39                          |
| <b>Consanguinidade</b>                                       | 14,7% (5/34)  | 7,1% (1/14)  | 0,81                          |

<sup>1</sup>O valor de p foi encontrado a partir do teste Qui-quadrado.

### 4.3 Manifestações clínicas

Na tabela 4 estão listadas as frequências das principais manifestações clínicas avaliadas em pacientes com DSIgA e ICV. Conforme pode ser observado, não houve diferença quanto às frequências de IVAS, pneumonias, diarreia infecciosa, manifestações de atopia e autoimunidade, cabendo ressaltar que ficaram acima de 45% em ambos os grupos.

Por outro lado, houve predomínio de diarreia não-infecciosa ( $p=0,030$ ), neoplasias ( $p=0,043$ ) e esplenomegalia ( $p=0,007$ ) em pacientes com DSIgA que evoluíram para ICV em relação aos pacientes que persistiram com DSIgA.

**Tabela 4 – Manifestações clínicas em pacientes com deficiência seletiva de IgA (DSIgA) e em pacientes que progrediram de deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência comum variável (ICV)**

|                                | <b>DSIgA</b>  | <b>ICV</b>    | <b>Valor de p<sup>3</sup></b> |
|--------------------------------|---------------|---------------|-------------------------------|
| <b>IVAS<sup>1</sup></b>        | 50% (17/34)   | 78,6% (11/14) | 0,13                          |
| <b>Pneumonias</b>              | 47,1% (16/34) | 78,6% (11/14) | 0,09                          |
| <b>Furunculose</b>             | 11,8% (4/34)  | 21,4% (3/14)  | 0,68                          |
| <b>Diarreia infecciosa</b>     | 58,8% (20/34) | 64,3% (12/14) | 0,98                          |
| <b>Diarreia não-infecciosa</b> | 32,4% (9/34)  | 71,4% (10/14) | <b>0,030</b>                  |
| <b>ITU<sup>2</sup></b>         | 23,5% (8/34)  | 28,6% (4/14)  | 1                             |
| <b>Oportunistas</b>            | 26,5% (9/34)  | 28,6% (4/14)  | 1                             |

|                                 |               |               |              |
|---------------------------------|---------------|---------------|--------------|
| <b>Manifestações de atopia</b>  | 76,5% (26/34) | 50% (7/14)    | 0,14         |
| <b>Doenças alérgicas</b>        | 44,1% (15/34) | 35,7% (5/14)  | 0,83         |
| <b>Manifestações autoimunes</b> | 76,5% (26/34) | 78,6% (11/14) | 1            |
| <b>Neoplasias</b>               | 11,8% (4/34)  | 42,9% (6/14)  | <b>0,043</b> |
| <b>Linfonodomegalia</b>         | 11,8% (4/34)  | 21,4% (3/14)  | 0,68         |
| <b>Esplenomegalia</b>           | 5,9% (2/34)   | 42,9% (6/14)  | <b>0,007</b> |
| <b>Hepatomegalia</b>            | 14,5% (5/34)  | 35,7% (5/14)  | 0,21         |

<sup>1</sup>IVAS: Infecções de vias aéreas superiores

<sup>2</sup>ITU: Infecções do trato urinário

<sup>3</sup>O valor de p foi encontrado a partir do teste Qui-quadrado.

#### **4.4 Frequência dos genótipos e dos alelos do polimorfismo PON1-L55M**

Na tabela 5 estão demonstradas as frequências dos genótipos 55LL, 55LM e 55MM e as frequências alélicas 55L e 55M da PON1-L55M nos dois grupos de pacientes e em controles saudáveis.

Em pacientes com ICV que progrediram de DSIGa houve um predomínio do genótipo MM (64,3%) e menor frequência dos genótipos LM (21,4%) e LL (14,3%) em comparação aos pacientes com DSIGa e controles sãos. No grupo com DSIGa a distribuição dos genótipos foi homogênea entre homocigotos (LL e MM) e heterocigotos (LM). Não houve diferença estatística entre os grupos na análise de genótipos ( $p=0,12$ ).

As frequências alélicas de cada grupo foram determinadas contando-se o número de vezes que o alelo L ou o alelo M foram detectados, dividido pelo número total de cópias do gene. Nossos resultados demonstraram maior prevalência do alelo 55M (75%) no grupo de pacientes com ICV do que o alelo LMM (25%), enquanto que no

grupo de DSIGa a distribuição desses alelos foi similar (50%). Também foi observada maior prevalência do alelo 55M em pacientes com ICV (75%) em relação aos pacientes com DSIGa (50%) e controles sãos (33,43%).

**Tabela 5 – Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo PON1-L55M em pacientes com deficiência seletiva de IgA (DSIGa) e em pacientes que progrediram de deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência comum variável (ICV)**

| PON1-L55M        | DSIGa (n=34)  | ICV (n=14)   | Controles (n=163) | p DSIGa x ICV |
|------------------|---------------|--------------|-------------------|---------------|
| <b>Genótipos</b> |               |              |                   |               |
| <b>55MM</b>      | 32,4% (11/34) | 64,3% (9/14) | 14,11% (23/163)   | 0,12          |
| <b>55LM</b>      | 35,3% (12/34) | 21,4% (3/14) | 38,65% (63/163)   |               |
| <b>55LL</b>      | 32,4% (11/34) | 14,3% (2/14) | 47,23% (77/163)   |               |
| <b>Alelos</b>    |               |              |                   |               |
| <b>55L</b>       | 50% (34)      | 25% (7)      | 66,56% (217)      |               |
| <b>55M</b>       | 50% (34)      | 75% (21)     | 33,43% (109)      |               |

#### **4.5 Relação entre os genótipos do polimorfismo PON1- L55M e parâmetros clínicos**

Vários parâmetros clínicos caracteristicamente associados às imunodeficiências predominantemente de anticorpos foram identificados nos dois grupos de pacientes e analisados quanto a uma possível associação com os diferentes genótipos do polimorfismo PON1-L55M (Anexo A).

#### 4.6 Níveis séricos de imunoglobulinas.

Na tabela 5 pode ser observado que os níveis séricos de IgA estavam igualmente diminuídos nos dois grupos estudados, conforme esperado. Os níveis de IgM estavam mais elevados em pacientes com DSIGa, embora em valores próximos ao limite inferior do valor de referência. Também conforme esperado, os níveis séricos de IgG foram mais altos no grupo DSIGa; os valores de IgG no grupo ICV estão mais elevados do que o esperado, uma vez que alguns pacientes incluídos neste grupo já estavam sendo submetidos ao tratamento de reposição mensal de imunoglobulina humana.

**Tabela 5 – Imunoglobulinas em pacientes com deficiência seletiva de IgA (DSIGa) e que evoluíram para imunodeficiência comum variável (ICV)**

|                               | IgA (mg/dL)  | IgM (mg/dL)                 | IgG (mg/dL)                  |
|-------------------------------|--------------|-----------------------------|------------------------------|
| <b>DSIGa (n=34)</b>           | 0,4 (0,1-14) | 85 (5,6-428,6)              | 1695 (807-2730)              |
| <b>ICV (n=14)</b>             | 4 (0,1-31)   | 10,5 (1-238)                | 617 (385-1205)               |
| <b>Valor de p<sup>1</sup></b> | <b>0,034</b> | <b>1,36e10<sup>-5</sup></b> | <b>5,28e10<sup>-13</sup></b> |

Valores de referência: IgG 700 a 1.600 mg/dL; IgA 69 a 382 mg/dL; IgM 73 a 171 mg/dL.

<sup>1</sup>teste U de Mann-Whitney e teste t de Welch (IgM)

#### 4.7 Avaliação dos valores das várias populações linfocitárias no sangue periférico.

Os valores absolutos e percentuais de leucócitos, linfócitos totais e populações linfocitárias CD3+, CD4+ nos dois grupos de estudo constam na tabela 6.

Todos os parâmetros analisados estavam dentro dos valores normais de referência utilizados pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP, exceto os

valores absolutos de linfócitos B e CD4 nos pacientes com ICV, ambos no limite inferior da normalidade.

No entanto, foram observadas diferenças entre os dois grupos quanto aos diversos parâmetros laboratoriais analisados: os pacientes com ICV apresentaram valores mais baixos de linfócitos totais, células CD3 e CD19 totais e percentuais, CD4 totais e linfócitos NK totais e células CD8 percentuais. A relação CD4+/CD8+ mostrou uma tendência a estar mais baixa.

**Tabela 6 – Leucócitos totais, linfócitos totais e populações linfocitárias em pacientes com deficiência seletiva de IgA (DSIgA) e em pacientes que progrediram de deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência comum variável (ICV)**

|                          | <b>DSIgA (n=34)</b> | <b>ICV (n=14)</b> | <b>p<sup>1</sup></b> |
|--------------------------|---------------------|-------------------|----------------------|
| <b>Leucócitos totais</b> | 7071                | 5911              | 0,09                 |
| <b>Linfócitos totais</b> | 2004                | 1430              | <b>0,002</b>         |
| <b>CD3</b>               | 1583                | 1058              | <b>0,007</b>         |
| <b>CD3%</b>              | 74,9%               | 80,3%             | <b>0,048</b>         |
| <b>CD4</b>               | 947                 | 556               | <b>0,006</b>         |
| <b>CD4%</b>              | 43%                 | 41,8%             | 0,52                 |
| <b>CD8</b>               | 645                 | <b>414</b>        | 0,12                 |
| <b>CD8%</b>              | 29,4%               | 35,4%             | <b>0,032</b>         |
| <b>CD4/CD8</b>           | 1,52                | 1,31              | 0,06                 |
| <b>CD19</b>              | 227                 | <b>67</b>         | <b>0,002</b>         |
| <b>CD19%</b>             | 10,3%               | 7,4%              | <b>0,001</b>         |
| <b>NK</b>                | 230                 | 145               | <b>0,019</b>         |
| <b>NK%</b>               | 11,4%               | 10,7%             | 0,66                 |

<sup>1</sup>Para as variáveis leucócitos totais, CD3%, CD8%, NK e NK% foi utilizado o teste t de student, portanto os dados estão representados pela média. Para as demais variáveis foi realizado o teste U de Mann-Whitney e seus dados representados pela mediana.

Valores de referência: Leucócitos 4.000a 11.000 cel/mm<sup>3</sup>; linfócitos 900 a 3.400 cel/mm<sup>3</sup>; CD3+: 605 a 2.460 cel/mm<sup>3</sup> (60% a 87%); CD4+: 493 a 1.666 cel/mm<sup>3</sup> (32% a 61%); CD8+: 224 a 1.112 (14% a 43%); Relação CD4+/CD8+: 0,9 a 2,5; CD19+: 72 a 520 (5% a 20%); CD3-CD16+ CD56+ (NK): 73 a 654 cel/mm<sup>3</sup> (4% a 28%).

#### 4.8 Avaliação de subpopulações de linfócitos B no sangue periférico.

Na Tabela 7 temos os resultados da imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos B em pacientes com DSIGa e controles sem imunodeficiência. Não há diferenças estatísticas entre os dois grupos na maioria das variáveis, exceto os linfócitos CD19+CD27+IgD+IgM+, onde a porcentagem é maior no grupo DSIGa ( $p=0,014$ ).

**Tabela 7 – Subpopulações de linfócitos B em pacientes com deficiência seletiva de IgA (DSIGa) e controles sãos**

|               | DSIGa (n=15)             | Controle (n=4)            | p                        |
|---------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| CD19+         | 10,9% (0,078-22,8)       | 10,8% (9,99-11,8)         | 0,98 <sup>1</sup>        |
| CD27+IgD-IgM- | 10,0% (2,87-20)          | 13,2% (4,75-21,9)         | 0,53 <sup>3</sup>        |
| CD27+IgD+IgM- | 6,1% (0-16,9)            | 3,4% (1,84-4,29)          | 0,33 <sup>1</sup>        |
| CD27+IgD+IgM+ | <b>2,1% (0,312-23,9)</b> | <b>0,4% (0,149-0,707)</b> | <b>0,014<sup>2</sup></b> |
| CD27+IgD-IgM+ | 3,7% (1,19-2,08)         | 1,8% (0,58-31,9)          | 0,47 <sup>2</sup>        |
| CD27-IgD-IgM- | 4,0% (1,96-13)           | 3,4% (2,27-24)            | 0,40 <sup>2</sup>        |
| CD27-IgD+IgM- | 56,8% (1,45-86,4)        | 69,7% (46-79,4)           | 0,52 <sup>2</sup>        |
| CD27-IgD+IgM+ | 1,3% (0,75-27,3)         | 1,2% (0,422-5,49)         | 0,41 <sup>2</sup>        |
| CD27-IgD-IgM+ | 4,2% (0,201-15,9)        | 8,0% (0,954-2,29)         | 0,69 <sup>2</sup>        |

<sup>1</sup>Teste t de student

<sup>2</sup>Teste U de Mann-Whitney

<sup>3</sup>Teste t de Welch

## 5 Discussão

Os erros inatos da imunidade (EII), até recentemente denominados imunodeficiências primárias (IDPs), constituem um grupo de doenças heterogêneas com mais de 430 anormalidades genéticas distintas que apresentam vários níveis de complexidade e gravidade (Notarangelo et al., 2020). Entre eles, destacam-se por suas frequências as deficiências predominantemente de anticorpos incluindo a deficiência seletiva de IgA (DSIgA) e a imunodeficiência comum variável (ICV).

Em ambas doenças podem ser detectados quadros clínicos diversos, incluindo infecções recorrentes ou crônicas, doenças alérgicas mediadas ou não por IgE, doenças autoimunes/inflamatórias, linfoproliferações benignas e malignas (Barros et al., 2007; Cunningham-Rundles, 2004; Carneiro-Sampaio & Coutinho, 2007; Notarangelo et al., 2020; Tangye et al., 2020; Tangye et al., 2020 Erratum; Abolhassani et al., 2020).

Pacientes com DSIgA e ICV apresentam o mesmo perfil de manifestações clínicas embora com grandes diferenças quanto à sua idade de início, prevalência e gravidade (Carneiro-Sampaio & Coutinho, 2007). Há poucos estudos na literatura de pacientes com DSIgA que progrediram para ICV (Carvalho Neves Forte et al., 2000; Aghamohammadi et al., 2008; Smith & Cunningham-Rundles, 2019; Gutierrez & Kirkpatrick, 1997), mas esses indicam uma provável existência de imunodesregulação. Deste modo, há necessidade de um monitoramento até a normalização dos níveis de IgA em crianças e adolescentes ou monitoramento de adultos ao longo da vida.

Neste estudo, o objetivo primário foi avaliar parâmetros clínicos e laboratoriais em pacientes com deficiência seletiva de IgA (DSIgA) em busca de marcadores prognósticos de progressão para imunodeficiência comum variável (ICV). E foram estudados dois grupos: Grupo DSIgA, formado por 34 pacientes com diagnóstico

inicial de deficiência de seletiva de IgA e grupo ICV, formado por 14 pacientes que progrediram de DSIGa para imunodeficiência comum variável.

Os dois grupos de pacientes foram homogêneos em relação a todos os parâmetros demográficos analisados com amplo predomínio não intencional do gênero feminino (Tabela 1). É aceito pela maioria dos pesquisadores que as duas doenças incidem igualmente entre os sexos (Abolhassani et al., 2020; Notarangelo et al., 2020; Tangye et al., 2020), sendo que nesta casuística o predomínio de mulheres foi atribuído ao fato dos homens terem demonstrado menor predisposição para participação no projeto, assim como menor disponibilidade para coleta de exames laboratoriais e menor aderência a todas as etapas do trabalho.

A maioria dos participantes se autodeclarou de cor branca, o que está de acordo com os estudos que têm demonstrado predomínio de caucasianos em ambas doenças, sendo menos comuns em asiáticos (Abolhassani et al., 2020; Notarangelo et al., 2020; Tangye et al., 2020). Neste trabalho, apenas um paciente com ICV tinha pele de cor negra e no grupo de DSIGa um paciente era de etnia oriental. Durante estudo realizado em banco de sangue, Carneiro-Sampaio e colaboradores (1989) encontraram prevalência de 1:965, enquanto que no Japão é de aproximadamente 1:18.000 (Notarangelo et al., 2020).

A média de idade à época da participação no estudo foi igual para os pacientes com DSIGa ou ICV. Neste estudo, a similaridade entre as médias de idade de início dos sintomas pode ser explicada pelo fato de que os pacientes do grupo ICV tiveram apresentação inicial da doença ainda como possíveis portadores apenas de deficiência seletiva de IgA. No entanto, chama a atenção o achado de que o início dos sintomas dos pacientes com DSIGa ter sido mais tardio do que os relatos de literatura (Grecco, 1996; Guerra, 2002; Carneiro-Sampaio & Coutinho, 2010).

Em relação ao retardo diagnóstico, não houve diferença estatística entre os dois grupos, embora aparentemente tenha sido mais elevado em pacientes com DSIGa. Em nosso estudo, esse retardo diagnóstico foi mais elevado do que o esperado e

pode ser explicado pelo fato de muitos pacientes apresentarem sintomas iniciais leves de atopia e não terem sido investigados para imunodeficiências na ocasião.

No caso de associação com doenças autoimunes, o retardo diagnóstico pode ser explicado pelo início mais tardio das manifestações desse grupo de doenças, assim como pelo desconhecimento da associação entre DSIGa e doenças autoimunes por médicos de outras especialidades ou pelo conceito errôneo de que as manifestações clínicas iniciais das imunodeficiências primárias ocorrem quase que exclusivamente em crianças (Cunningham-Rundles, 2016) não havendo necessidade de sua investigação na vida adulta.

A média do tempo de doença também foi similar e bastante longa nos dois grupos analisados. Somando-se este dado à homogeneidade dos demais parâmetros demográficos, especula-se se os pacientes com DSIGa avaliados em nosso estudo teriam potencial para progressão para ICV.

Embora a progressão de DSIGa para ICV venha sendo historicamente relacionada aos antecedentes familiares de imunodeficiências (Hammarström et al., 2000) em nossa casuística somente 28.7% dos pacientes com ICV apresentavam histórico familiar positivo, em contraste com a porcentagem mais elevada (47.1%) entre aqueles que se mantiveram como deficientes de IgA. No entanto, apesar dessa aparente diferença, a análise de comparação não demonstrou diferença entre os dois grupos ( $p=0,39$ ). Apesar do histórico familiar ter sua relevância, em um estudo anterior sobre a progressão de DSIGa para ICV, a frequência de histórico familiar foi de apenas 50%, não estando presente de forma majoritária nestes pacientes (Aghamohammadi et al., 2008).

Também a consanguinidade tem sido implicada como fator de progressão de DSIGa para ICV (Carvalho Neves Forte et al., 2000; Aghamohammadi et al., 2008; Smith & Cunningham-Rundles, 2019; Gutierrez & Kirkpatrick, 1997). Embora neste estudo apenas 5 pacientes com DSIGa (14,7%) tenham relatado histórico positivo, apenas um caso de consanguinidade (7,1%) foi detectado naqueles com ICV, não havendo diferença significativa entre os grupos ( $p=0,81$ ). Essa tendência de um número maior

de casos de consanguinidade na DSIGa pode ser explicada pelo fato de muitos desses pacientes terem sido investigados e diagnosticados durante investigação familiar de imunodeficiências.

A similaridade de positividade para histórico familiar de imunodeficiências e para consanguinidade observadas nos dois grupos analisados não nos permite aventar a hipótese de que estes parâmetros possam constituir fatores prognósticos da progressão de DSIGa para ICV em nossa coorte de estudo, mas indica um sinal de alerta.

Nesta investigação, a prevalência da maioria das doenças avaliadas, ou seja, IVAS, pneumonias, diarreia infecciosa, manifestações de atopia e doenças autoimunes, foi similar nos dois grupos de pacientes e acima de 45%.

As infecções recorrentes ou crônicas de vias respiratórias têm sido implicadas como fatores para a progressão da DSIGa para ICV. Embora essas infecções sejam frequentes em pacientes com DSIGa, são predominantes em pacientes com ICV (Fried & Bonilla, 2009). Neste estudo, não observamos diferença estatística quanto às frequências de infecções recorrentes ou crônicas de vias respiratórias entre os dois grupos, ao contrário de estudos anteriores que observaram alta prevalência de doenças respiratórias em pacientes com ICV (Aghamohammadi et al., 2008; Fried & Bonilla, 2009).

Neste contexto, cabe ressaltar que a DSIGa pode ocorrer associadamente a outras deficiências predominantemente de anticorpos como a deficiência de subclasses de IgG e deficiência de anticorpos anti-pneumococo (Carvalho Neves Forte et al., 2000). Estes parâmetros não foram avaliados neste estudo, o que poderia explicar a prevalência mais alta de infecções das vias aéreas do que as relatadas na literatura (Aghamohammadi et al., 2008; Fried & Bonilla, 2009).

Também a prevalência das manifestações alérgicas compatíveis com atopia pareceu ser mais elevada na DSIGa (76,5%) do que na ICV (50%), embora sem significância estatística. A atopia engloba a rinite, asma e dermatite atópica caracterizadas pela

detecção de níveis elevados de IgE total e presença de IgE específica para alérgenos ambientais como ácaros da poeira domiciliar, epitélios de animais e alérgenos alimentares. É amplamente conhecida a alta associação entre DSIgA e atopia, sendo que Aghamohammad et al. (2008) e Lozano (2015) relataram doenças atópicas em 48% e 51,85% de suas casuísticas, respectivamente.

Neste trabalho, a frequência de atopia na DSIgA mais elevada do que a relatada na literatura por Aghamohammad et al. (2008) e Lozano (2015) pode ser devido ao fato de que grande parte dos pacientes foram encaminhados ao nosso serviço por ambulatórios de atendimento a pacientes alérgicos constituindo, assim, um viés de triagem.

Embora o número de pacientes com DSIgA que progrediram para ICV tenha sido pequeno, chama a atenção a frequência de apenas 50% de manifestações compatíveis com atopia. É possível que estes pacientes já não consigam produzir IgE específica para alérgenos ambientais, condição indispensável para o diagnóstico de doença atópica e que ocorra a produção local de IgE, conforme relatado por Agondi et al. (2010).

Deste modo, também a similaridade das frequências das manifestações compatíveis com atopia nos dois grupos de estudo não foi capaz de diferenciar os pacientes que progrediram de DSIgA para ICV, ao contrário do que foi sugerido em relatos anteriores (Abolhassani et al., 2015; Aghamohammadi et al., 2008)

Também a prevalência das manifestações de autoimunidade foram iguais nos dois grupos de estudo, não diferenciando os pacientes que progrediram de DSIgA para ICV, ao contrário do que foi sugerido em trabalhos anteriores (Abolhassani et al., 2015; Aghamohammadi et al., 2008)

A prevalência das doenças autoimunes na DSIgA varia de 7 a 36% na literatura mundial (Etzioni, 2003). As mais comumente encontradas são a tireoidite, o lúpus eritematoso sistêmico, a artrite reumatoide, a anemia hemolítica, a anemia perniciosa, a púrpura trombocitopênica idiopática, o vitiligo, a doença de Still, a

dermatopolimiosite, a síndrome de Sjögren, o diabetes tipo 1 e várias doenças neurológicas (Kokron et al., 2004; Cunningham-Rundles, 2004; Carneiro-Sampaio & Coutinho, 2007; Barros et al., 2007).

A grande variedade de defeitos genéticos que interferem na predisposição à imunodeficiência e autoimunidade demonstram que a manifestação clínica envolve causas multifatoriais. À primeira vista a associação de imunodeficiência e autoimunidade não parece fazer sentido, mas acredita-se que em grande parte dos pacientes com DSIGa há dificuldade de eliminar agentes virais e bacterianos, que podem gerar uma resposta inflamatória exacerbada, levando ao dano tecidual e à autoimunidade em indivíduos geneticamente predispostos (Etzioni, 2003; Jacob et al., 2008).

Também pode haver falha na eliminação de macromoléculas, como o leite e o glúten, que podem desencadear uma produção de anticorpos IgG e gerar intolerância a certos alimentos. Como exemplo, a presença de anticorpos IgG anti-gliadina pode desencadear doença de padrão celíaco em pacientes com DSIGa. Também pode ocorrer má absorção isoladamente ou associada à hiperplasia nodular primária à semelhança do que ocorre na ICV.

As doenças de origem autoimunes e/ou inflamatórias, incluindo as enteropatias, também são frequentes na ICV ocorrendo em aproximadamente 25% a 50% dos pacientes (Abolhassani et al., 2020; Chapel et al., 2008, Smith & Cunningham-Rundles, 2019; Resnick et al., 2012).

Por outro lado, em nossa coorte de estudo houve predomínio de diarreia não-infecciosa ( $p=0,030$ ), neoplasias ( $p=0,043$ ) e esplenomegalia ( $p=0,007$ ) em pacientes com DSIGa que progrediram para ICV em relação aos pacientes que persistiram com DSIGa.

A diarreia não-infecciosa foi associada ao grupo ICV ( $p=0,03$ ), incluindo tanto doença celíaca-símile ou padrão celíaco como doenças inflamatórias intestinais, embora não tenha havido diferença significativa quando analisamos separadamente

as duas doenças (tabela 4). Há relatos de diarreia na literatura em pacientes que evoluíram de DSIgA para ICV, mas sem distinção clara entre patologias infecciosas e não infecciosas.

Embora a doença celíaca ou padrão celíaco estejam presentes em torno de 1% a 4.5% em pacientes com imunodeficiências (Carneiro-Sampaio, 2007), neste estudo, a causa da diarreia pode não ter sido definida no momento da nossa pesquisa, haja vista que até os dias atuais existe dificuldade da confirmação diagnóstica de doença celíaca em indivíduos com níveis séricos baixos de IgA (McGowan et al., 2008).

Os anticorpos IgA anti-endomísio e anti-transglutaminase ainda constituem marcadores sorológicos diagnósticos para essa doença e, evidentemente, estão indetectáveis na maioria dos pacientes com distúrbios da produção de IgA. Nesses pacientes o exame padrão-ouro continua sendo a biópsia de mucosa da 2ª porção do duodeno (McGowan et al., 2008).

Outra diferença encontrada nesta análise comparativa entre os grupos foi a maior frequência de esplenomegalia em pacientes no grupo ICV (42,9%) do que no grupo de DSIgA (5,9%). Esta diferença também está de acordo com os relatos de literatura uma vez que a linfoproliferação benigna faz parte do quadro da ICV (Bonilla et al., 2016; Abolhassani et al., 2020).

Por outro lado, aproximadamente 25% dos pacientes com ICV apresentam esplenomegalia e/ou linfadenopatia generalizada que podem levar a doenças malignas, particularmente linfoma não Hodgkin, e têm um risco estimado de 1,8 a 5 vezes maior de desenvolver câncer de todos os tipos (Abolhassani et al., 2020; Abolhassani H, Hammarstrom L, Cunningham-Rundles C., 2020)

O mesmo não acontece em relação à DSIgA na qual a esplenomegalia está associada na maioria dos casos à presença de anemia hemolítica autoimune ou de plaquetopenia autoimune (Abolhassani et al., 2020; Grecco, 1996; Guerra, 2020)

Há um consenso na literatura de que pacientes com DSIgA ou ICV cursam com prevalência aumentada de infecções de vias aéreas e do trato gastrointestinal,

doenças autoimunes e inflamatórias e, em menor proporção, de malignidades (Bonilla et al., 2016; Abolhassani et al., 2020).

Tem sido relatado risco aumentado de neoplasias em pacientes com DSIgA (Ludvigsson et al., 2015), embora ainda não haja dados concretos sobre a prevalência geral de câncer nessa imunodeficiência. Segundo Ludvigsson et al. (2015) em pacientes com DSIgA ocorre maior risco de linfomas, especialmente da linhagem B, e de câncer gástrico.

Neste estudo observamos maior associação de neoplasias no grupo que progrediu de DSIgA para ICV (0,043) do que no grupo de deficientes de IgA, o que pode ser um indicativo da presença de uma imunodesregulação naqueles pacientes, mesmo quando ainda eram diagnosticados como deficientes de IgA. Que seja de nosso conhecimento, não há relatos na literatura com os quais possamos comparar esses achados.

Em nossa coorte, entre os pacientes que persistem como deficientes de IgA, quatro (11,8%) apresentam neoplasias (Anexo E). Especula-se se a presença de malignidades em pacientes com DSIgA poderia ser considerado fator prognóstico da progressão para ICV.

É de consenso que numerosas doenças decorrem parcialmente do aumento do estresse oxidativo, que por sua vez altera a resposta imunológica determinando modificações celulares e comprometimento tecidual (Rahal et al., 2014). Ao lado de vários mecanismos implicados no controle do estresse oxidativo (Cantorna, 2015), incluem-se as enzimas da família das paraoxonases PON1, PON2 e PON3 (Mackness et al., 2011).

A PON1 constitui uma glicoproteína que exerce papel biológico anti-aterogênico e anti-oxidativo principalmente através das atividades de lactonase e arilesterase. Sua principal molécula carreadora é o HDL, à qual se liga fortemente e à atividade arilesterase encontra-se associada à hidrólise de lipídios oxidados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Hussein et al., 2011; Aviram, 1999).

Soran e colaboradores (2015) relataram redução da expressão do mRNA da PON1 em tecido hepático durante infecções agudas e alterações estruturais nas moléculas de HDL nas inflamações crônicas ou recorrentes aumentando o estresse oxidativo (Soran et al., 2015). Essa redução da atividade enzimática da PON-1 tem sido implicada na patogênese de diversas outras doenças como malignidades e doenças autoimunes e inflamatórias (Camps et al., 2009).

Neste estudo, durante a análise dos genótipos do polimorfismo L55M da PON-1, observamos um aparente predomínio do genótipo 55MM (64,3%) em pacientes com ICV que progrediram de DSIGa, enquanto que em pacientes com DSIGa a distribuição dos três genótipos 55MM, 55LL e 55LM foi similar.

Há relatos na literatura de associação entre os polimorfismos L55M da PON-1 e inúmeras condições patológicas (Goswami et al., 2009; Hussein et al., 2011; Rajković et al., 2011). A relevância desses polimorfismos foi estudada em doenças autoimunes e malignidades (De Roos et al., 2006, Hussein et al., 2011; Mackness e Mackness, 2015; Tanhapour, 2019; Saadat, 2012), sendo relatada associação positiva do genótipo 55MM principalmente com doença celíaca, câncer gástrico, linfomas, câncer de mama e de rim (De Roos et al., 2006, Hussein et al., 2011; Mackness e Mackness, 2015; Tanhapour, 2019; Saadat, 2012).

Précourt 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 à 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).

Menos comumente, os polimorfismos L55M da PON-1 foram analisados em pacientes com imunodeficiência comum variável (Aukrust et al., 1997; Aukrust et al., 1994; Sini et al., 2017; Sini, 2017) mas, até o presente momento, não encontramos

na literatura estudos em pacientes com DSIgA ou em pacientes que progrediram de DSIgA para ICV com os quais pudéssemos comparar nossos resultados.

Neste estudo não encontramos diferenças entre pacientes com DSIgA ou com ICV quanto à distribuição dos vários parâmetros clínicos avaliados e os genótipos do polimorfismo L55M da PON-1, exceto com hepatomegalia (Anexo A). A significância desse achado deverá ser investigada futuramente.

Nesta coorte observamos uma prevalência alta de malignidades em pacientes com ICV (42,85%), o que corresponde a seis pacientes (6/14), dois entre os quais apresentaram dois tipos de câncer.

Interessantemente, o genótipo 55MM foi detectado em 9 entre os 14 pacientes que progrediram de DSIgA para ICV, sendo que quatro deles apresentaram neoplasias: 1 paciente com câncer gástrico e carcinoma espinocelular invasivo; um paciente com câncer de intestino e carcinoma basocelular; um paciente com melanoma; um paciente com linfoma pulmonar. Quanto aos demais pacientes com ICV, três deles apresentavam diarreia-não infecciosa com padrão celíaco, um paciente vasculite pulmonar e um paciente hiperplasia nodular regenerativa.

Ainda nesta mesma casuística, dois pacientes com o genótipo 55LL apresentaram neoplasias sendo um deles adenocarcoma papilífero de tireoide e outro adenocarcinoma gástrico.

Permanecem raros os relatos na literatura relacionando ICV ao estresse oxidativo e paraoxonases (Aukrust et al., 1997; Aukrust et al., 1994; Sini et al., 2017; Sini, 2017). Aukrust e colaboradores observaram correlação entre níveis séricos elevados da homocisteína reduzida e o aumento do stress oxidativo em pacientes com ICV (Aukrust et al. 1997).

Durante trabalho anterior desenvolvido em nosso laboratório em pacientes com ICV, encontramos dados sugestivos de associação entre o genótipo 55MM e linfomas (Sini et al., 2014). Também observamos aumento da sobrevida de aproximadamente três vezes dos portadores do alelo 55L da PON1 em relação aos portadores do alelo

55M, aventando a hipótese de que o alelo 55L possa desempenhar um papel protetor (Sini et al., 2017).

Essa hipótese tem respaldo no presente estudo, onde a frequência do alelo 55M no grupo ICV foi de 75% contra 25% do alelo 55L. Cabe aqui ressaltar que nesta casuística, entre os 9 pacientes no grupo ICV identificados com o genótipo 55MM, 6 dos quais já foram a óbito sendo quatro portadores de neoplasias, um com vasculite pulmonar e um deles com doença celíaca com graves distúrbios metabólicos (Anexo E).

Baseados na hipótese de que um dos possíveis fatores envolvidos na progressão da DSIGa para ICV seja a presença de imunodesregulação, analisamos comparativamente algumas populações linfocitárias do sangue periférico em pacientes que persistiam com deficiência de IgA e naqueles que progrediram para ICV.

Todos os parâmetros analisados estavam dentro dos valores normais de referência exceto o valor absoluto de linfócitos B e de linfócitos CD4 nos pacientes com ICV, ambos no limite inferior da normalidade, o que está de acordo com os dados de literatura (Bonilla et al., 2016; Abolhassani et al., 2020; Smith & Cunningham-Rundles, 2019).

No entanto, a análise comparativa entre os dois grupos mostrou diferenças quanto a diversos parâmetros laboratoriais avaliados: os pacientes com ICV apresentaram valores mais baixos de linfócitos totais, de células CD3, CD4, CD19 e NK e menor percentual de CD19; no entanto, houve maiores porcentagens de linfócitos CD3 e CD8. Também a relação CD4+/CD8+ mostrou uma tendência a estar mais baixa nesse grupo. Essas alterações em pacientes com ICV, principalmente números baixos a normais de células B circulantes, linfopenia T, aumento de CD8 e inversão de CD4/CD8 têm sido descritas na literatura.

O papel das células B na imunorregulação vem sendo amplamente investigado nos últimos anos. À semelhança do que está descrito em doenças autoimunes (Hansen

et al., 2002; Richards et al., 2000), alterações do compartimento de células B e, em especial de células de memória, têm sido relatadas em pacientes com ICV, associadas ou não a doenças autoimunes (Haymore et al., 2008; Piqueras et al., 2003; Warnatz et al., 2002; Wehr et al., 2007). Por outro lado, embora as doenças autoimunes ocorram frequentemente associadas à DSIGa, a avaliação de células B de memória raramente são encontradas na literatura (Gathings et al., 1977; Bukowska-Straková et al., 2009; Litzman et al., 2007; Conley et al., 1981; Rivas et al., 2010).

Neste estudo, também quantificamos subpopulações de linfócitos B de memória em pacientes que persistiram com DSIGa em relação a controles sãos. Foi observado aumento apenas da população CD27+IgD+IgM+ (células B da zona marginal) nos pacientes com DSIGa (2,1% vs 0,4%;  $p=0,014$ ). Os pacientes com ICV não foram analisados pela alta prevalência de malignidades e de óbitos nesse grupo de estudo.

Nossos dados confirmam parcialmente aqueles relatados em adultos com DSIGa nos quais foi detectada uma tendência de diminuição de células de memória e um aumento de células B imaturas, resultados semelhantes aos relatados na ICV (Litzman et al., 2007). Bukowska-Straková et al. (2009) analisaram crianças com DSIGa e observaram que diferentemente dos controles saudáveis, não apresentavam aumento da porcentagem de células B de memória com troca de classe ao longo do tempo, o que foi observado também em crianças com ICV. Cabe ressaltar que durante estudos prévios, foi demonstrada redução da população de células B de memória que sofreram troca de isótipo (CD27+IgM-IgD-) em cerca de 50-75% dos casos de pacientes com ICV analisados (Agematsu et al., 2002; Ko et al., 2005; Salzer & Grimbacher, 2006; Warnatz et al., 2002).

Por outro lado, nossos achados podem estar relacionados a relatos antigos na literatura que detectaram em alguns pacientes com DSIGa linfócitos B coexpressando IgA, IgM e IgD, que são similares àqueles observados no sangue do cordão umbilical (Gathings et al., 1977). Estas alterações são compatíveis com uma interrupção da maturação dos linfócitos e, interessantemente, alguns dos pacientes

nos quais foram descritas evoluíram posteriormente para ICV (Gathings et al., 1977); no entanto, não foi esclarecida a natureza desses linfócitos, se seriam células B imaturas ou uma população linfocitária de células de memória imaturas (CD27+IgM+IgD+).

Entretanto, nossos achados confirmam parcialmente aqueles encontrados pelo nosso grupo em outra coorte de pacientes com DS IgA e com ICV que apresentavam ou não associação com doenças autoimunes (Rivas et al., 2010); nesse estudo, foram observados valores médios percentuais maiores de células B de memória imaturas CD27+IgM+ e CD27+IgD+ nos pacientes que apresentavam associação com doenças autoimunes independentemente da imunodeficiência presente.

As células B CD27+IgM+ e CD27+IgD+ assim como as células CD27+IgD+IgM+ de memória são consideradas imaturas uma vez que surgem no início do processo de maturação, constituindo células B de transição incapazes de fazer a troca para outras classes de anticorpos podendo estar envolvidas na imunodesregulação que pode levar à progressão de pacientes com DS IgA para ICV.

## 6 Conclusão

1. A prevalência mais elevada de diarreia não-infecciosa, esplenomegalia e malignidades em pacientes com ICV do que em pacientes com DSIGa podem constituir isoladamente fatores prognósticos de evolução da DSIGa para ICV e deve ser avaliada em uma casuística maior;

2. Os pacientes que progrediram de DSIGa para ICV apresentaram menores contagens de células CD4, NK e B do que pacientes com DSIGa sugerindo a presença de imunodesregulação;

3. Em pacientes adultos com DSIGa, a persistência de células de memória imaturas CD27+IgD+IgM+ pode estar envolvida na imunodesregulação capaz de levar à progressão de DSIGa para ICV;

4. Não houve associação de nenhum genótipo do polimorfismo L55M da PON-1 a nenhum dos grupos estudados;

5. A similaridade de positividade para histórico familiar de imunodeficiências e para consanguinidade observadas nos dois grupos analisados não nos permite afirmar categoricamente que estes parâmetros possam constituir fatores prognósticos da progressão de DSIGa para ICV em nossa coorte de estudo, embora possam ser considerados fatores de alerta de progressão;

6. Não houve evidências de que os seguintes parâmetros constituam fatores prognósticos da evolução da DSIGa para ICV: infecções recorrentes ou crônicas das vias aéreas e diarreia infecciosa; presença de doenças atópicas, autoimunes e inflamatórias;

A análise comparativa dos parâmetros clínicos e laboratoriais investigados em nossa coorte sugere que a presença de neoplasias, diarreia não-infecciosa, esplenomegalia, baixa contagem de CD4, NK e CD19 e aumento de células B CD19+CD27+IgM+IgD+ constituam fatores prognósticos da progressão da deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência comum variável.

## ANEXOS

**ANEXO A - Manifestações clínicas por genótipo em pacientes com deficiência seletiva de IgA (DSIgA) e em pacientes que progrediram de deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência comum variável (ICV)**

|                                | DSIgA           |                 |                 | ICV            |                |                | X <sup>2</sup> |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                | LL              | LM              | MM              | LL             | LM             | MM             | Valor de p     |
| <b>IVAS</b>                    | 54,5%<br>(6/11) | 50,0%<br>(6/12) | 45,5%<br>(5/11) | 100%<br>(2/2)  | 100%<br>(3/3)  | 66,7%<br>(6/9) | 0,92           |
| <b>Sinusite</b>                | 45,5%<br>(5/11) | 41,7%<br>(5/12) | 36,4%<br>(4/11) | 100%<br>(2/2)  | 100%<br>(3/3)  | 55,6%<br>(5/9) | 0,84           |
| <b>Tonsilite</b>               | 9,1%<br>(1/11)  | 16,7%<br>(2/12) | 0               | 0              | 33,3%<br>(1/3) | 44,4%<br>(4/9) | 0,60           |
| <b>Otite</b>                   | 9,1%<br>(1/11)  | 16,7%<br>(2/12) | 0               | 0              | 0              | 44,4%<br>(4/9) | 0,61           |
| <b>Pneumonias</b>              | 63,6%<br>(7/11) | 25,0%<br>(3/12) | 54,5%<br>(6/11) | 50,0%<br>(1/2) | 66,6%<br>(2/3) | 88,9%<br>(8/9) | 0,09           |
| <b>Furunculose</b>             | 18,2%<br>(2/11) | 16,7%<br>(2/12) | 0               | 0              | 33,3%<br>(1/3) | 22,2%<br>(2/9) | 0,71           |
| <b>Diarreia</b>                | 63,6%<br>(7/11) | 66,7%<br>(8/12) | 72,7%<br>(8/11) | 50,0%<br>(1/2) | 100%<br>(3/3)  | 88,9%<br>(8/9) | 0,51           |
| <b>Diarreia infecciosa</b>     | 63,6%<br>(7/11) | 50,0%<br>(6/12) | 63,6%<br>(7/11) | 50,0%<br>(1/2) | 100%<br>(3/3)  | 55,6%<br>(5/9) | 0,99           |
| <b>Diarreia não-infecciosa</b> | 36,4%<br>(4/11) | 33,3%<br>(4/12) | 27,3%<br>(3/11) | 50,0%<br>(1/2) | 66,6%<br>(2/3) | 77,8%<br>(7/9) | 0,76           |
| <b>ITU</b>                     | 9,1%<br>(1/11)  | 41,7%<br>(5/12) | 18,2%<br>(2/11) | 50,0%<br>(1/2) | 0              | 33,3%<br>(3/9) | 0,55           |
| <b>Oportunistas</b>            | 27,3%<br>(3/11) | 25,0%<br>(3/12) | 27,3%<br>(3/11) | 0              | 0              | 44,4%<br>(4/9) | 0,57           |
| <b>Atopia</b>                  | 63,6%<br>(7/11) | 66,7%<br>(8/12) | 100%<br>(11/11) | 100%<br>(2/2)  | 66,6%<br>(2/3) | 33,3%<br>(3/9) | 0,98           |
| <b>Rinite</b>                  | 63,6%<br>(7/11) | 66,7%<br>(8/12) | 100%<br>(11/11) | 100%<br>(2/2)  | 66,6%<br>(2/3) | 33,3%<br>(3/9) | 0,98           |
| <b>Asma</b>                    | 36,4%<br>(4/11) | 41,7%<br>(5/12) | 54,5%<br>(6/11) | 0              | 33,3%<br>(1/3) | 11,1%<br>(1/9) | 0,88           |

Continua.

**Conclusão:**

|                                      |                 |                  |                 |                |                |                |             |
|--------------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-------------|
| <b>Dermatite atópica</b>             | 18,2%<br>(2/11) | 0                | 0               | 0              | 33,3%<br>(1/3) | 0              | 0,20        |
| <b>Doenças alérgicas</b>             | 36,4%<br>(4/11) | 41,7%<br>(5/12)  | 54,5%<br>(6/11) | 50,0%<br>(1/2) | 66,6%<br>(2/3) | 22,2%<br>(2/9) | 0,89        |
| <b>Dermatite de contato</b>          | 18,2%<br>(2/11) | 25,0%<br>(3/12)  | 45,5%<br>(5/11) | 50,0%<br>(1/2) | 0              | 0              | 0,94        |
| <b>Urticária/<br/>angioedema</b>     | 9,1%<br>(1/11)  | 33,3%<br>(4/12)  | 27,3%<br>(3/11) | 50,0%<br>(1/2) | 33,3%<br>(1/3) | 22,2%<br>(2/9) | 0,55        |
| <b>RAM<sup>1</sup></b>               | 18,2%<br>(2/11) | 33,3%<br>(4/12)  | 27,3%<br>(3/11) | 50,0%<br>(1/2) | 66,6%<br>(2/3) | 22,2%<br>(2/9) | 0,53        |
| <b>Manifestações autoimunes</b>      | 72,7%<br>(8/11) | 83,3%<br>(10/12) | 72,7%<br>(8/11) | 100%<br>(2/2)  | 66,6%<br>(2/3) | 88,9%<br>(8/9) | 0,73        |
| <b>Vitiligo</b>                      | 18,2%<br>(2/11) | 25,0%<br>(3/12)  | 9,1%<br>(1/11)  | 0              | 0              | 0              | 0,39        |
| <b>Tireoidite</b>                    | 27,3%<br>(3/11) | 41,7%<br>(5/12)  | 9,1%<br>(1/11)  | 50,0%<br>(1/2) | 0              | 22,2%<br>(2/9) | 0,40        |
| <b>Colagenoses/<br/>Vasculites</b>   | 18,2%<br>(2/11) | 8,3%<br>(1/12)   | 36,4%<br>(4/11) | 0              | 33,3%<br>(1/3) | 0              | 0,86        |
| <b>Doença celíaca<br/>símile</b>     | 0               | 25,0%<br>(3/12)  | 9,1%<br>(1/11)  | 50,0%<br>(1/2) | 33,3%<br>(1/3) | 33,3%<br>(3/9) | 0,43        |
| <b>Gastrite atrófica</b>             | 54,5%<br>(6/11) | 58,3 %<br>(7/12) | 36,4%<br>(4/11) | 50,0%<br>(1/2) | 33,3%<br>(1/3) | 33,3%<br>(3/9) | 0,44        |
| <b>DIIs<sup>2</sup></b>              | 0               | 0                | 0               | 0              | 0              | 11,1%<br>(1/9) | 0,65        |
| <b>Neoplasias</b>                    | 18,2%<br>(2/11) | 8,3%<br>(1/12)   | 9,1%<br>(1/11)  | 100%<br>(2/2)  | 0              | 44,4%<br>(4/9) | 0,24        |
| <b>Linfonomegalia</b>                | 9,1%<br>(1/11)  | 0                | 27,3%<br>(3/11) | 50,0%<br>(1/2) | 0              | 22,2%<br>(2/9) | 0,12        |
| <b>Esplenomegalia</b>                | 9,1%<br>(1/11)  | 8,3%<br>(1/12)   | 0               | 0              | 33,3%<br>(1/3) | 55,6%<br>(5/9) | 0,39        |
| <b>Hepatomegalia</b>                 | 0               | 41,7%<br>(5/12)  | 0               | 0              | 33,3%<br>(1/3) | 44,4%<br>(4/9) | <b>0,03</b> |
| <b>Histórico familiar<br/>de IDP</b> | 27,3%<br>(3/11) | 66,7%<br>(8/12)  | 45,5%<br>(5/11) | 0              | 0              | 44,4%<br>(4/9) | 0,25        |
| <b>Consanguinidade</b>               | 18,2%<br>(2/11) | 16,7%<br>(2/12)  | 9,1%<br>(1/11)  | 0              | 33,3%<br>(1/3) | 0              | 0,39        |

---

**ANEXO B - Leucócitos totais, linfócitos totais e populações linfocitárias, de acordo com genótipo, em pacientes com deficiência seletiva de IgA (DSIgA) e que evoluíram para imunodeficiência comum variável (ICV)**

| N                   | DSIgA (n=34) |      |      | Valor de p | ICV (n=14) |      |      | Valor de p |
|---------------------|--------------|------|------|------------|------------|------|------|------------|
|                     | LL           | LM   | MM   |            | LL         | LM   | MM   |            |
|                     | 11           | 12   | 11   |            | 2          | 3    | 9    |            |
| <b>Leucócitos t</b> | 7225         | 6786 | 7226 | 0,84       | 5800       | 7127 | 5530 | 0,62       |
| <b>Linfócitos t</b> | 2074         | 2096 | 2201 | 0,86       | 1140       | 1943 | 1457 | 0,54       |
| <b>CD3</b>          | 1561         | 1495 | 1806 | 0,42       | 809        | 1677 | 1118 | 0,38       |
| <b>CD3%</b>         | 75,1         | 70,7 | 79,8 | 0,026      | 70,0       | 84,3 | 81,2 | 0,15       |
| <b>CD4</b>          | 895          | 890  | 1010 | 0,70       | 420        | 1006 | 568  | 0,18       |
| <b>CD4%</b>         | 43,1         | 41,9 | 45,1 | 0,60       | 37,4       | 54,8 | 41,4 | 0,07       |
| <b>CD8</b>          | 593          | 574  | 746  | 0,30       | 331        | 695  | 506  | 0,54       |
| <b>CD8%</b>         | 29,1         | 27,2 | 32,4 | 0,34       | 27,7       | 33,9 | 37,7 | 0,39       |
| <b>CD4/CD8</b>      | 1,7          | 1,6  | 1,5  | 0,75       | 1,4        | 1,7  | 1,2  | 0,40       |
| <b>CD19</b>         | 256          | 314  | 241  | 0,89       | 147        | 142  | 96   | 0,76       |
| <b>CD19%</b>        | 22,6         | 14,8 | 10,5 | 0,25       | 11,8       | 6,4  | 6,2  | 0,54       |
| <b>NK</b>           | 226          | 253  | 207  | 0,66       | 138        | 111  | 158  | 0,76       |
| <b>NK%</b>          | 11,3         | 13,0 | 9,4  | 0,22       | 13,7       | 8,3  | 10,7 | 0,62       |

**ANEXO C - Leucócitos totais, linfócitos totais e populações linfocitárias, de acordo com genótipo, em pacientes com deficiência seletiva de IgA (DSIgA) e que evoluíram para imunodeficiência comum variável (ICV)**

|                     | Total (n=48) |      |        | p <sup>1</sup> |
|---------------------|--------------|------|--------|----------------|
|                     | LL           | LM   | MM     |                |
| <b>N</b>            | 13           | 15   | 19     |                |
| <b>Leucócitos</b>   | 6960         | 6420 | 6575   | 0,76           |
| <b>Linfócitos t</b> | 1999         | 1800 | 1615,5 | 0,83           |
| <b>CD3</b>          | 1470         | 1402 | 1263   | 0,94           |
| <b>CD3%</b>         | 75           | 73   | 79     | <b>0,027</b>   |
| <b>CD4</b>          | 855          | 1018 | 706    | 0,70           |
| <b>CD4%</b>         | 42           | 40,8 | 44     | 0,99           |
| <b>CD8</b>          | 555          | 535  | 476    | 0,86           |
| <b>CD8%</b>         | 29           | 29,6 | 33     | <b>0,037</b>   |
| <b>CD4/CD8</b>      | 1,54         | 1,45 | 1,36   | 0,22           |
| <b>CD19</b>         | 225          | 232  | 191    | 0,22           |
| <b>CD19%</b>        | 11,5         | 12,9 | 9      | 0,06           |
| <b>NK</b>           | 183          | 194  | 172    | 0,58           |
| <b>NK%</b>          | 11,3         | 12   | 10,7   | 0,46           |

<sup>1</sup>Foram realizados ANOVA e Kruskal-Wallis

**ANEXO D - Sexo, óbitos, características temporais, história familiar, consanguinidade em pacientes que evoluíram de deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência comum variável**

|      | Sexo | Idade atual ou óbito | Idade início sintomas | DSIgA idade diagnóstico | DSIgA Retardo Diagnóstico | ICV idade ao diagnóstico | Intervalo diagnóstico DSIgA para ICV | ICV Tempo de doença | Tempo total de doença: DSIgA + ICV | História familiar | Consanguinidade |
|------|------|----------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------------|------------------------------------|-------------------|-----------------|
| PC1  | F    | 56                   | 31                    | 31                      | 0                         | 45                       | 14                                   | 11                  | 25                                 | não               | não             |
| PC2  | F    | 66 <sup>1</sup>      | 1                     | 20                      | 19                        | 28                       | 8                                    | 38                  | 65                                 | sim               | não             |
| PC3  | F    | 31                   | 15                    | 15                      | 0                         | 21                       | 6                                    | 10                  | 16                                 | não               | sim             |
| PC4  | F    | 31                   | 21                    | 21                      | 0                         | 26                       | 5                                    | 5                   | 10                                 | não               | não             |
| PC5  | F    | 76 <sup>1</sup>      | 15                    | 25                      | 10                        | 36                       | 11                                   | 40                  | 61                                 | sim               | não             |
| PC6  | M    | 55 <sup>1</sup>      | 44                    | 45                      | 1                         | 50                       | 5                                    | 5                   | 11                                 | não               | não             |
| PC7  | M    | 35 <sup>1</sup>      | 12                    | 15                      | 3                         | 16                       | 1                                    | 19                  | 23                                 | não               | não             |
| PC8  | M    | 26                   | 6                     | 6                       | 0                         | 13                       | 7                                    | 13                  | 20                                 | não               | não             |
| PC9  | F    | 42                   | 5                     | 25                      | 20                        | 32                       | 7                                    | 10                  | 37                                 | sim               | não             |
| PC10 | M    | 65 <sup>1</sup>      | 52                    | 52                      | 0                         | 61                       | 9                                    | 4                   | 13                                 | não               | não             |
| PC11 | F    | 46 <sup>1</sup>      | 31                    | 31                      | 0                         | 33                       | 1                                    | 10                  | 13                                 | não               | não             |
| PC12 | F    | 64                   | 33                    | 33                      | 0                         | 45                       | 12                                   | 19                  | 31                                 | sim               | não             |
| PC13 | F    | 42                   | 28                    | 28                      | 0                         | 34                       | 6                                    | 8                   | 18                                 | não               | Não             |
| PC14 | M    | 54                   | 33                    | 33                      | 0                         | 35                       | 2                                    | 19                  | 21                                 | não               | Não             |

**ANEXO E** - Histórico antes da evolução, genótipos do polimorfismo L55M, características clínicas e óbitos dos pacientes que evoluíram de deficiência de IgA para imunodeficiência comum variável, apresentados individualmente.

|     |                                      |     |  |         |  |  |   |   |  |  |
|-----|--------------------------------------|-----|--|---------|--|--|---|---|--|--|
|     | Antes da ICV                         | PON | Infecções  | Alergia | Autoimunidade                                | Outros   | Citopenias  | Neoplasias  | Evolução   | Óbito                                    |
| PC1 | Diga + IGM                           | LM  | Sinusites, pneumonia, diarreia (Blastocystis)                                    | Não     | Não  | Diarreia não-intoxicosa (HLR)  | Deficiência de CD19   | Não   | -  | Não                                      |
| PC2 | Diga                                 | MM  | Sinusites, tonsilites, otites pneumonia, diarreia infecciosa (Giardia), HPV, HZV | Rinite  | Doença celíaca semelhante                    | Metaplasia intestinal, esplenomegalia, hepatomegalia, hepatopatia                | Leucopenia, deficiência de CD19, CD4  | CA gástrico, Ca espirocilar invasivo (dorso de mão direita) | Ca espiro após 23 anos de ICV e Ca gástrico após 33 anos.            | Óbito aos 66 anos                        |
| PC3 | Diga parcial + IGM baixa + IGE baixa | LM  | Sinusite, diarreia (Giardia)   | Rinite  | Doença celíaca semelhante                    | Esplenomegalia, hepatomegalia  | Linfopenia, deficiência de CD19, CD3 e CD4                                  | Não   | -  | -  |
| PC4 | Diga parcial para ICV                | LL  | Sinusite, pneumonia, diarreia (Giardia)  | Rinite  | Tireoidite                                   | Diarreia (Padrão celíaco), HNR, HNL, intolerância à lactose, linfonomegalia      | Não   | Ca papilífero de tireoide                                   | Ca de tireoide antecedeu em 3 anos a progressão para ICV             | -  |
| PC5 | Diga para ICV                        | MM  | Sinusite, pneumonia, diarreia (Giardia), tuberculose renal                       | Rinite  | Gastrite atrófica, doença celíaca semelhante | Diarreia (Padrão celíaco), intolerância à lactose                                | Deficiência de CD19   | Adenocarcinoma de intestino e CA basocelular                | Ca basocelular antecedeu ICV em 32 anos e Ca de intestino em 33 anos | Óbito aos 76 anos (COVID)                |
| PC6 | Diga + IGM para ICV                  | MM  | Sinusite, otite, pneumonia, HSV genital de repetição, candidíase oral            | Não     | RCU, tireoidite                              | Esplenomegalia, Diarreia, RCU e pseudo pócpico                                   | Linfopenia e plaquetopenia secundárias ao hiperesplenismo, ausência de CD19 | Não   | -  | Óbito aos 55 anos por vasculite pulmonar |
| PC7 | Diga e IGM para ICV                  | MM  | Pneumonia, diarreia (Giardia), furunculose                                       | Não     | Doença celíaca semelhante                    | Diarreia (padrão celíaco), HLR, intolerância à lactose secundária, Hepatomegalia | Deficiência de CD19, CD4 e NK   | Não   | -  | Óbito aos 35 anos (morte súbita)         |

Continua.

## Conclusão:

|      |              |     |   |                                 |                                  |   |                              |                  |   |                                       |
|------|--------------|-----|---|---------------------------------|----------------------------------|---|------------------------------|------------------|---|---------------------------------------|
|      | Antes da ICV | PON | Infecções   | Alergia                         | Autoimunidade                    | Outros  | Citopenias                   | Neoplasias       | Evolução  | Óbito                                 |
| PC8  | Diga         | LM  | Sinusite, tonsilite, pneumonia, diarreia (Giardia)                            | Rinite, asma, dermatite atópica | Psoríase                         | -   | Não                          | Não              | -   | -                                     |
| PC9  | Diga         | MM  | Sinusite, tonsilite, otite, pneumonia, diarreia (Giardia), ITUS, toxoplasmose | Rinite, Asma                    | Não                              | HLR   | Não                          | Não              | -   | -                                     |
| PC10 | Diga + Igm   | MM  | Pneumonia, diarreia (Giardia, estrogiloides), furunculose                     | Não                             | Anemia hemolítica autoimune      | Linfonodomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, hepatopatia      | Deficiência de CD19, CD4, NK | Melanoma         | Melanoma antecedendo progressão para ICV (9 anos) | Óbito aos 65 anos (pneumonia + sepse) |
| PC11 | Diga         | MM  | Sinusite, tonsilite, otite, pneumonia   | Não                             | PTI                              | Linfonodomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia                   | Leucopenia                   | Linfoma pulmonar | Linfoma pulmonar aos 41 anos, após 5 anos de ICV  | Óbito aos 42 anos (COVID)             |
| PC12 | Diga         | MM  | Pneumonia   | Não                             | Gastrite atrófica em evolução    | -   | Não                          | Não              | -   | -                                     |
| PC13 | Diga + IGM   | MM  | Tonsilite   | Não                             | Doença Celíaca símil, tireoidite | Padrão celíaco, intolerância à lactose secundária, esplenomegalia | Anemia ferropriva            | Não              | -   | -                                     |
| PC14 | Diga + IGM   | LL  | Sinusite, ITUS  | Rinite                          | Gastrite atrófica                | HLR   | Leucopenia                   | CA gástrico      | CA gástrico após 15 anos de ICV                   | -                                     |

**ANEXO F – Termo de consentimento livre e esclarecido****HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DA PESQUISA**

**Título da pesquisa** - Análise de fatores prognósticos da evolução da deficiência seletiva de IgA para imunodeficiência comum variável

**Pesquisador principal** – Esper Georges Kallas

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 o convidamos 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** - Como é de seu conhecimento, existem algumas doenças que afetam a imunidade e que têm como consequência infecções de repetição. Em uma destas doenças, a deficiência seletiva de IgA, ocorre a diminuição da produção de um tipo de anticorpo, denominado IgA. Já em outra dessas doenças, denominada imunodeficiência comum variável, ocorre a diminuição de todos os tipos de anticorpos (IgG, IgA, IgM e IgE). Os anticorpos são proteínas presentes no sangue e na superfície interna (mucosa) de alguns órgãos como pulmão e intestino. Os anticorpos defendem contra microrganismos como bactérias e vírus, contra a entrada de substâncias do meio ambiente que podem causar alergias e contra a entrada de parasitas intestinais.

A maioria das pessoas com deficiência de anticorpos IgA são saudáveis mas algumas podem ter alguma doença associada como sinusite e otite, pneumonias ou diarreia crônica ou de repetição. Outras pessoas podem também ter doenças inflamatórias como doenças alérgicas (asma ou rinite), doenças da tireoide, artrite, intolerância a glúten (doença celíaca). Uma minoria dos pacientes com deficiência de IgA pode evoluir para outra deficiência mais grave que é a imunodeficiência comum variável na qual ocorre diminuição de todos os tipos de anticorpos e as mesmas manifestações da deficiência de IgA como infecções de repetição e doenças inflamatórias. Não há como saber se o paciente vai evoluir para esta doença mais grave.

O objetivo de nosso trabalho é comparar pacientes com deficiência de IgA ou com imunodeficiência comum variável estudando se existem alterações no sangue dos pacientes com deficiência de IgA a serem detectadas através de exames de laboratório que possam mostrar se o paciente tem um risco maior de evoluir para imunodeficiência comum variável.

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

Serão colhidas três amostras de sangue pela veia do antebraço, sendo um tubo com 20 mL e dois tubos com 5 mL. A seguir, serão realizados no sangue coletado alguns testes em nosso laboratório de pesquisa como: 1) exames de subtipos (subclasses) dos anticorpos IgG, que podem estar diminuídos; 2) a tipagem das populações de linfócitos que produzem anticorpos (linfócitos B) e de linfócitos que auxiliam a produção de anticorpos (linfócitos T); 3) estudo genético para a caracterização do gene da paraoxonase 1.

Os exames de rotina (hemograma, função hepática, função renal, marcadores de inflamação, sorologias para infecções virais e autoanticorpos) que o senhor(a) colhe também serão analisados sem necessidade de nova coleta.

**Possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa –** Somente os da punção venosa (picada da agulha) para a coleta do sangue na veia do antebraço.

**Benefícios esperados para o participante –** Trata-se de estudo inicial para detecção de alterações laboratoriais que possam significar risco aumentado da evolução de deficiência de IgA para imunodeficiência comum variável e não trará benefícios imediatos para o tratamento ou cura de sua doença atual. No entanto, você estará contribuindo para uma pesquisa científica.

**Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os 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 Renata Moreno Lima de Oliveira** 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.

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](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br)

Fui suficientemente informado a respeito do estudo **“Avaliação clínica e laboratorial em pacientes com deficiência seletiva de IgA”**.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (**Esper Georges Kallas**) ou pessoa (s) por ele delegada (s) (**Renata Moreno Lima de Oliveira; Dra. Myrthes Toledo Barros**) 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 menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

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

-----

Assinatura do responsável pelo estudo      Data      /      /     

**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(.....).....

## REFERÊNCIAS

Abolhassani H, Azizi G, Sharifi L, Yazdani R, Mohsenzadegan M, Delavari S, Sohani M, Shirmast P, Chavoshzadeh Z, Mahdavian SA, Kalantari A, Tavakol M, Jabbari-Azad F, Ahanchian H, Momen T, Sherkat R, Sadeghi-Shabestari M, Aleyasin S, Esmaeilzadeh H, Al-Herz W, Bousfiha AA, Condino-Neto A, Seppänen M, Sullivan KE, Hammarström L, Modell V, Modell F, Quinn J, Orange JS, Aghamohammadi A. Global systematic review of primary immunodeficiency registries. *Expert Rev Clin Immunol*. 2020 Jul;16(7):717-732.

Abolhassani H, Gharib B, Shahinpour S, Masoom SN, Havaei A, Mirminachi B, Arandi N, Torabi-Sagvand B, Khazaei HA, Mohammadi J, Rezaei N, Aghamohammadi A. Autoimmunity in patients with selective IgA deficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(2):112-9.

Abolhassani H, Hammarstrom L, Cunningham-Rundles C. Current genetic landscape in common variable immune deficiency. *Blood*. 2020;135:656-67.

Agematsu K, Futatani T, Hokibara S, Kobayashi N, Takamoto M, Tsukada S, Suzuki H, Koyasu S, Miyawaki T, Sugane K, Komiyama A, Ochs HD. Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol*. 2002 Apr;103(1):34-42.

Aghamohammadi A, Abolhassani H, Biglari M, Abolmaali S, Moazzami K, Tabatabaeiyan M, Asgarian-Omran H, Parvaneh N, Mirahmadian M, Rezaei N, Analysis of Switched Memory B Cells in Patients with IgA Deficiency. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;156:462-468.

Aghamohammadi A, Mohammadi J, Parvaneh N, Rezaei N, Moin M, Espanol T, Hammarstrom L. Progression of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;147(2):87-92.

Agondi RC, Barros MT, Rizzo LV, Kalil J, Giavina-Bianchi P. Allergic asthma in patients with common variable immunodeficiency. *Allergy* 2010; 65: 510–515.

Aldridge WN. Serum esterases 2- An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenylphosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem. J.* 1953; 53:117–124.

Aukrust P, Müller F, Froland SS. Elevated serum levels of interleukin-4 and interleukin-6 in patients with common variable immunodeficiency (CVI) are associated with chronic immune activation and low numbers of CD4+ lymphocytes. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1994; 70:217-224. 73

Aukrust P, Berge RK, Müller F, Ueland PM, Svardal AM, Frøland SS. Elevated plasma levels of reduced homocysteine in common variable immunodeficiency--a marker of enhanced oxidative stress. *Eur J Clin Invest.* 1997 Sep;27(9):723-30.

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

Ballow M. Primary immunodeficiency disorders: Antibody deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2002; 109(4):581-91.

Barros MT, Rivas JJ, Rizzo LV, Kalil Filho JE, Kokron CM. Autoimmunity in IgA deficient patients. *Clinics*, 2007. v. 62. p. S66

Biram A, Strömberg A, Winter E, Stoler-Barak L, Salomon R, Addadi Y, Dahan R, Yaari G, Bemark M, Shulman Z. BCR affinity differentially regulates colonization of the subepithelial dome and infiltration into germinal centers within Peyer's patches. *Nat Immunol.* 2019 Apr;20(4):482-492.

Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, Espinosa-Rosales FJ, Hammarström L, Nonoyama S, Quinti I, Routes JM, Tang ML, Warnatz K. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016 Jan-Feb;4(1):38-59.

Breedveld A, van Egmond M. IgA and FcαRI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. *Front Immunol.* 2019 Mar 22;10:553.

Bukowska-Straková K, Kowalczyk D, Baran J, Siedlar M, Kobylarz K, Zembala M. The B-cell compartment in the peripheral blood of children with different types of primary humoral immunodeficiency. *Pediatric Research Articles*. Ahead of Print, april. 2009.

Campo S, Sardo AM, Campo GM, Avenoso A, Castaldo M, D'Ascola A, Giunta E, Calatroni A, Saitta A. Identification of paraoxonase 3 gene (PON3) missense mutations in a population of southern Italy. *Mutat Res*. 2004 Feb 26;546(1-2):75-80.

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 B. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Bio Med (Maywood)* 2004; 229(11):1136-42.

Carneiro-Sampaio MM. Frequency of selective IgA deficiency among Brazilian blood donors and healthy pregnant women. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1989 Jul-Aug;17(4):213-6.

Carneiro-Sampaio MM, Coutinho A. Tolerance and autoimmunity: lessons at the bedside of primary immunodeficiencies. *Adv Immunol*. 2007;95:51-82.

Carvalho Neves Forte W, Ferreira De Carvalho Junior F, Damaceno N, Vidal Perez F, Gonzales Lopes C, Mastroi RA. Evolution of IgA deficiency to IgG subclass deficiency and common variable immunodeficiency. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2000 28: 18–20.

Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, Geha RS. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet*. 2005 Aug;37(8):829-34.

Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam K, Bram R, Jabara H, Geha R. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005;201(1):35-39.

Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol*. 2008;8.

Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, Fieschi C, Thon V, Abedi MR, Hammarstrom L. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. 2008;112:277-286.

Cinicola BL, Pulvirenti F, Capponi M, Bonetti M, Brindisi G, Gori A, De Castro G, Anania C, Duse M, Zicari AM. Selective IgA Deficiency and Allergy: A Fresh Look to an Old Story. *Medicina (Kaunas)*. 2022 Jan 15;58(1):129.

Conley ME and Cooper MD. Immature IgA B cells in IgA-deficient patients. *The New England Journal of Medicine*. 1981; 305:495-497.

Conley ME, Notarangelo LD & Etzioni A: Diagnostic Criteria for Primary Immunodeficiencies. *Clin Immunol* 1999, 93:190-7.

Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol*. 2005 Feb 15;69(4):541-50.

Cunningham-Rundles C. Physiology of IgA and IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2001; 21:303–9.

Cunningham-Rundles C. Primary Immunodeficiency: New Insights and Practical Clinical Approaches. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016 Nov - Dec;4(6):1109-1110

Dardiotis E, Aloizou AM, Siokas V, Tsouris Z, Rikos D, Marogianni C, Aschner M, Kovatsi L, Bogdanos DP, Tsatsakis A. Paraoxonase-1 genetic polymorphisms in organophosphate metabolism. *Toxicology*. 2019 Jan 1;411:24-31.

Davidson WS, Silva RAGD, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters- Relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29:870–876.

Davis SK, Selva KJ, Kent SJ, Chung AW. Serum IgA Fc effector functions in infectious disease and cancer. *Immunol Cell Biol.* 2020 Apr;98(4):276-286.

De Roos AJ, Gold LS, Wang S, Hartge P, Cerhan JR, Cozen W, Yeager M, Charnock S, Rothman N, Severson RK. Metabolic Gene Variants and Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1647-1653.

de Sousa-Pereira P, Woof JM. IgA: Structure, Function, and Developability. *Antibodies (Basel).* 2019 Dec 5;8(4):57.

Deakin S, Leviev I, Gomaschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem.* 2002; 277:4301–4308.

Delacroix DL, Dive C, Rambaud JC, Vaerman JP. IgA subclasses in various secretions and in serum. *Immunology.* 1982;47(2):383-385.

Espanol T, Catala M, Hernandez M, Caragol I, Bertran JM. Development of a common variable immunodeficiency in IgA-deficient patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80: 333–335.

Erkoçoğlu M, Metin A, Kaya A, Özcan C, Akan A, Civelek E, Çapanoğlu M, Giniş T, Kocabaş CN. Allergic and autoimmune disorders in families with selective IgA deficiency. *Turk J Med Sci.* 2017 Apr 18;47(2):592-598.

Etzioni A. Immune deficiency and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2003; 364–369.

Feng ML, Zhao YL, Shen T, Huang H, Yin B, Liu RZ, Qian KC, Liu DZ. Prevalence of immunoglobulin A deficiency in Chinese blood donors and evaluation of anaphylactic transfusion reaction risk. *Transfus Med.* 2011 Oct;21(5):338-43.

Fried AJ, Bonilla FA. Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:396-414.

Fuchs HB, Slater L, Novey H, Ong K, Gupta S. Immunological analysis in familial common variable immunodeficiency. *Clin exp. Immunol.* (1984) 56, 29-33.

Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest.* 1997;99(1):62-6.

Gathings WE, Lawton AR, Cooper MD. Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans. *Eur J Immunol.* 1977;7(11):804-10.

Goswami B, Tayal D, Gupta N, Mallika V. Paraoxonase: A multifaceted biomolecule. *Clin Chim Acta.* 2009; 410:1–12

Grecco O. Manifestações clínicas de atopia na deficiência de IgA. São Paulo, 1996. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Guerra CV. Dosagem de IL-5, IL-6, IL-10 e TGF-beta na Deficiência de IgA. São Paulo, 2002. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Gupta S, Pattanaik D, Krishnaswamy G. Common Variable Immune Deficiency and Associated Complications. *Chest.* 2019 Sep;156(3):579-593.

Gutierrez MG, Kirkpatrick CH. Progressive immunodeficiency in a patient with IgA deficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 79: 297–301.

Hägström P, Björkstén B, Jenmalm MC. Total and Allergen-Specific Immunoglobulin A Levels in Saliva in Relation to the Development of Allergy in Infants Up to 2 Years of Age. *Clin Exp Allergy* (2002) 32(9):1293–8.

Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 May;11(5):412-9. Erratum in: *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Dec;11(12):1253.

Hammarström L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 2000 May;120(2):225-31

Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi AM, Feist E, Scholze J, Burmester GR, Lipsky PE, Dörner T. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(8):2160-2171

Haymore BR, Mikita CP, Tsokos GC. Common variable immune deficiency (CVID) presenting as an autoimmune disease: role of memory B cells. *Autoimmunity Reviews* 2008; 7: 309–312.

Heremans JF, Heremans M-Th, Schultze HE. Isolation and description of a few properties of the  $\beta$ 2A-globulin of human serum. *Clinica Chimica Acta* 1959; 4(1):96-102.

Hussein Y, Gharib A, Etewa R, Elsayy 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.

Jacob CM, Pastorino AC, Fahl K, Carneiro-Sampaio M, Monteiro RC. Autoimmunity in IgA deficiency: revisiting the role of IgA as a silent housekeeper. *J Clin Immunol* 2008; 28:56–61

Kanoh T, Mizumoto T, Yasuda N, Koya M, Ohno Y, Uchino H, Yoshimura K, Ohkubo Y, Yamaguchi H. Selective IgA Deficiency in Japanese Blood Donors: Frequency and Statistical Analysis. *Vox Sang.* 1986;50(2):81-6.

Karaca NE, Severcan EU, Bilgin BG, Azarsiz E, Akarcan S, Gunaydin NC, Gulez N, Genel F, Aksu G, Kutukculer N. Familial inheritance and screening of first-degree relatives in common variable immunodeficiency and immunoglobulin A deficiency patients. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2018 Jan-Dec;32:2058738418779458.

Ko J, Radigan L, Cunningham-Rundles C. Immune competence and switched memory B cells in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2005; 116: 37 - 41.

Leiva LE, Zelazco M, Oleastro M, Carneiro-Sampaio M, Condino-Neto A, Costa-Carvalho BT, Grumach AS, Quezada A, Patiño P, Franco JL, Porras O, Rodríguez FJ, Espinosa-Rosales FJ, Espinosa-Padilla SE, Almillategui D, Martínez C, Tafur JR, Valentín M, Benarroch L, Barroso R, Sorensen RU; Latin American Group for Primary Immunodeficiency Diseases. Primary immunodeficiency diseases in Latin America: the second report of the LAGID registry. *J Clin Immunol*. 2007 Jan;27(1):101-8.

Litzman J, Vlková M, Pikulová Z, Stikarovská D, Lokaj J. T and B lymphocyte subpopulations and activation/differentiation markers in patients with selective IgA deficiency. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(2):249-54.

Lougaris V, Sorlini A, Monfredini C, Ingrasciotta G, Caravaggio A, Lorenzini T, Baronio M, Cattalini M, Meini A, Ruggeri L, Salpietro A, Pilotta A, Grazzani L, Prandi E, Felappi B, Gualdi G, Fabiano A, Fuoti M, Ravelli A, Villanacci V, Soresina A, Badolato R, Plebani A. Clinical and Laboratory Features of 184 Italian Pediatric Patients Affected with Selective IgA Deficiency (SIgAD): a Longitudinal Single-Center Study. *J Clin Immunol*. 2019 Jul;39(5):470-475.

Lozano NA, Lozano A, Sasia LV, Saranz RJ, Agresta MF, del Pilar Bovina Martijena M, Ianiero L, Grenat AR. Clinical comparison between patients with selective immunoglobulin A deficiency and other primary immunodeficiencies. *Arch Argent Pediatr*. 2015 Apr;113(2):141-5.

Ludvigsson JF, Neovius M, Ye W, Hammarström L. IgA deficiency and risk of cancer: a population-based matched cohort study. *J Clin Immunol*. 2015 Feb;35(2):182-8.

Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen. Pharmac*. 1998; 31:329–336.

Mackness B, Mackness MI, Durrington PN, Arrol S, Evans AE, McMaster D, Ferrières J, Ruidavets JB, Williams NR, Howard AN. Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest.* 2000 Jan;30(1):4-10.

Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation.* 2003 Jun 10;107(22):2775-9.

Mackness M, Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene.* 2015;567(1):12–21.

Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Homeland Security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends in Immunology.* 2012.

Maeda S, Ohno K, Fujiwara-Igarashi A, Tomiyasu H, Fujino Y, Tsujimoto H. Methylation of TNFRSF13B and TNFRSF13C in duodenal mucosa in canine inflammatory bowel disease and its association with decreased mucosal IgA expression. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014 Jul 15;160(1-2):97-106.

Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltran R, Joven J, Camps J. Immunohistochemical analysis of paraoxonases 1, 2 and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Rad Biol Med.* 2008; 45:146–157.

Mazur A. An enzyme in the animal organism capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem.* 1946; 164:271–289.

Meisinger C, Freuer D, Bub A, Linseisen J. Association between inflammatory markers and serum paraoxonase and arylesterase activities in the general population: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis.* 2021 Jul 31;20(1):81.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.

Motti C, Dessì M, Gnasso A, Irace C, Indigeno P, Angelucci CB, Bernardini S, Fucci G, Federici G, Cortese C. A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis*. 2001 Sep;158(1):35-40.

Notarangelo LD, Bacchetta R, Casanova JL, Su HC. Human inborn errors of immunity: an expanding universe. *Sci Immunol*. 2020;10;5:1662.

Olerup O, Smith CI, Hammarström L. Different amino acids at position 57 of the HLA-DQ beta chain associated with susceptibility and resistance to IgA deficiency. *Nature*. 1990 Sep 20;347(6290):289-90.

Odineal DD, Gershwin ME. The Epidemiology and Clinical Manifestations of Autoimmunity in Selective IgA Deficiency. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020 Feb;58(1):107-133.

Pabst O, Slack E. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. *Mucosal Immunol*. 2020 Jan;13(1):12-21.

Pan-Hammarström Q, Salzer U, Du L, Björkander J, Cunningham-Rundles C, Nelson DL, Bacchelli C, Gaspar HB, Offer S, Behrens TW, Grimbacher B, Hammarström L. Reexamining the role of TAC1 coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet*. 2007 Apr;39(4):429-30.

Pereira LF, Sapiña AM, Arroyo J, Viñuelas J, Bardají RM, Prieto L. Prevalence of selective IgA deficiency in Spain: more than we thought. *Blood*. 1997 Jul 15;90(2):893.

Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhendler E, Puck JM, Sullivan KE, Tang ML, Franco JL, Gaspar HB. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol*. 2015 Nov;35(8):696-726.

Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Crow YJ, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Ochs HD, Oksenhendler E, Puck J, Tang MLK, Tangye SG, Torgerson TR, Sullivan KE. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol*. 2018 Jan;38(1):96-128..

Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, Debré P, Schmitt C, Oksenhendler E. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol*. 2003 Sep;23(5):385-400.

Précourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, Levy E. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis*. 2011 Jan;214(1):20-36.

Preud'homme JL, Hanson LA: IgG subclass deficiency. *Immune Defic Rev* 1990; 2: 129– 149.

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 May 1;33(3):498-507.

Rachid R, Castigli E, Geha RS, Bonilla FA. Taci Mutation in Common Variable Immunodeficiency and IgA Deficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2006 6:357–62.

Rajkovic MG, Rumora L, Barisic K. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. *Biochemia Medica*. 2011; 21:122–130.

Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. 2012;119:1650-7.

Rezvan H, Ahmadi D, Esmailzadeh S, Dayhimi I. Selective deficiency of immunoglobulin A among healthy voluntary blood donors in Iran. *Blood Transfusion*. 2009;7(2):152-154.

Richards S, Morgan G, Hillmen P. Immunophenotypic analysis of B cells in PNH: insights into the generation of circulating naive and memory B cells. *Blood*, 2000; 96: 3522-3528.

Rivas JJ, Brocardo GA, Kokron C, Rizzo LV, Kalil J, Barros MT. Caracterização imunofenotípica de linfócitos B de memória na deficiência de IgA e imunodeficiência comum variável. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* – Vol. 33, Nº 1, 2010.

Rodrigo L, Hernandez A, Lopez-Caballero JJ, Gil F, Pla A. Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role. *Chem Biol Interact*. 2001; 137:123–137.

Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol*. 2001 Sep 1;167(5):2861-8.

Salek Farrokhi A, Aghamohammadi A, Pourhamdi S, Mohammadinejad P, Abolhassani H, Moazzeni SM. Evaluation of class switch recombination in B lymphocytes of patients with common variable immunodeficiency. *Journal of Immunological Methods* 2013; 394, 94–99.

Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, Peter HH, Rockstroh JK, Schneider P, Schäffer AA, Hammarström L, Grimbacher B. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet*. 2005 Aug;37(8):820-8. Epub 2005 Jul 10.

Salzer U, Grimbacher B. Common variable immunodeficiency: The power of costimulation. *Semin Immunol* 2006; 18:337-346.

Sánchez-Ramón S, Radigan L, Yu JE, Bard S, Cunningham-Rundles C. Memory B cells in common variable immunodeficiency: Clinical associations and sex differences. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2008;128(3):314-321.

Schaffer FM, Palermos J, Zhu ZB, Barger BO, Cooper MD, Volanakis JE. Individuals with IgA deficiency and common variable immunodeficiency share polymorphisms of major histocompatibility complex class III genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Oct;86(20):8015-9.

Schrader C, Rimbach G. Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. *Curr Med Chem*. 2011;18(36):5624-43.

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

Sini BC, Bydlowski S; Levy D; Kokron C; Maselli LMF; Cohon A; Oliveira AC; Kalil J; Toledo Barros M. Estaria o polimorfismo 55MM da PON1 associado à maior gravidade da doença em pacientes com imunodeficiência comum variável? *Arquivos de asma, alergia e Imunologia Janeiro-Fevereiro 2014 - Volume 2 - Número 1*.

Smith T, Cunningham-Rundles C. Primary B-cell immunodeficiencies *Hum Immunol*. 2019;80:351-62

Soran H, Schofield JD, Durrington PN. Antioxidant properties of HDL. *Front Pharmacol*. 2015 Oct 16;6:222.

Swain S, Selmi C, Gershwin ME, Teuber SS. The clinical implications of selective IgA deficiency. *J Transl Autoimmun*. 2019 Nov 23;2:100025. Erratum in: *J Transl Autoimmun*. 2020 Feb 25;3:100041.

Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Ochs HD, Oksenhendler E, Picard C, Puck J, Torgerson TR, Casanova JL, Sullivan KE. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies

Expert Committee. *J Clin Immunol*. 2020 Jan;40(1):24-64. Erratum in: *J Clin Immunol*. 2020 Feb 22.

Taler-Verčič A, Goličnik M, Bavec A. The Structure and Function of Paraoxonase-1 and Its Comparison to Paraoxonase-2 and -3. *Molecules*. 2020 Dec 17;25(24):5980.

Urbonas V, Sadauskaite J, Cerkauskienė R, Kaminskas A, Mäki M, Kurppa K. Population-Based Screening for Selective Immunoglobulin A (IgA) Deficiency in Lithuanian Children Using a Rapid Antibody-Based Fingertip Test. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2016;22:4773-4778.

Volanakis JE, Zhu ZB, Schaffer FM, Macon KJ, Palermos J, Barger BO, Go R, Campbell RD, Schroeder HW, Jr, Cooper MD. Major histocompatibility complex class III genes and susceptibility to immunoglobulin A deficiency and common variable immunodeficiency. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;89(6):1914-1922.

Vorechovský I, Webster AD, Plebani A, Hammarström L. Genetic Linkage of IgA Deficiency to the Major Histocompatibility Complex: Evidence for Allele Segregation Distortion, Parent- of-Origin Penetrance Differences, and the Role of anti-IgA Antibodies in Disease Predisposition. *Am J Hum Genet* (1999) 64:1096–109.

Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, Eibel H, Schlesier M and Peter HH. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002 99:1544-1551.

Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):77-85.

Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014 Jan 7;2(1):1

Yazdani R, Latif A, Tabassomi F, Abolhassani H, Azizi G, Rezaei N, Aghamohammadi A. Clinical phenotype classification for selective immunoglobulin A deficiency. *Expert Rev Clin Immunol.* 2015;11(11):1245-54.

Yazdani R, Azizi G, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Selective IgA Deficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Phenotype, Diagnosis, Prognosis and Management. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2017, 85, 3–12.

Yel L. Selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2010. 30; 10-16.

Zhang J, van Oostrom D, Li J, Savelkoul HFJ. Innate Mechanisms in Selective IgA Deficiency. *Front Immunol.* 2021 Apr 26;12:649112.