

**ANÁLISE DE LINFOCITOS T E B CIRCULANTES COM EXPRESSÃO DE
OX40 NA POPULAÇÃO IDOSA**

**ANALYSIS OF CIRCULATING T AND B LYMPHOCYTES WITH OX40
EXPRESSION IN THE ELDERLY POPULATION**

Vitória Lima Beltrão Vieira de Melo^{1,2,3}; Marcela Souza Santoianni^{1,2,3}; Camila Batista Mascena^{1,2,3}; Eduardo Jorge Abrantes da Fonte, MD^{1,2,3,5}; Marina Cadena da Matta, PhD^{1,2}; Leuridan Cavalcante Torres, PhD^{1,2,4}.

¹ Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brasil

² Laboratório de pesquisa translacional Prof CA Hart, IMIP, Recife, Brasil

³ Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS), Recife, Brasil

⁴ Hospital de Câncer de Pernambuco, Recife, Brasil

⁵ Serviço de Oncogeriatrics do IMIP, Recife, Brasil

Reconhecimento de apoio ao estudo: Declaramos que recebemos auxílio financeiro pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), durante o período de 12 meses.

Conflito de interesse: Declaramos que não houve nenhum conflito de interesse em nosso estudo.

RESUMO

Objetivo: Avaliar os níveis de linfócitos T e B circulantes com expressão de OX40 nos idosos de diferentes faixas etárias. Um dos membros da família dos receptores de TNFR, a molécula coestimuladora OX-40 está localizada na superfície de células TCD4+ ativadas e o seu ligante (OX40L) na superfície das APCs. A sinalização via OX40-OX40L intensifica proliferação das células T de memória efetoras, produção de citocinas, e prolonga a sobrevivência dessas células¹¹**Métodos:** Foi realizado um estudo de corte transversal, exploratório e translacional no Serviço de Geriatria do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e Laboratório Multiusuário de Pesquisa Translacional do IMIP no período de agosto de 2018 a julho de 2019. Foram incluídos 168 idosos saudáveis, sendo 52 do sexo masculino e 116 do sexo feminino. Foram distribuídos em 3 três grupos de acordo com a faixa etária: 73 idosos ≥ 60 e < 69 anos, 63 idosos com idade ≥ 70 e < 79 , 32 com idade ≥ 80 anos. As análises dos níveis de linfócitos com expressão de OX40 foram realizadas por citometria de fluxo. Nas análises estatísticas, foi realizado o teste Kruskal-Wallis para comparação entre três grupos com correção de Dunn's. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. **Resultados:** Os níveis de linfócitos T foram elevados nos idosos com idade ≥ 60 e < 69 anos quando comparados aos idosos com idade ≥ 70 e < 79 ($p=0,009$) e ≥ 80 anos ($p=0,02$). No entanto, quando comparados os níveis de linfócitos T OX40, não houve diferença significativa nos 3 grupos avaliados. Os níveis de linfócitos B foram elevados nos idosos com idade entre ≥ 60 e < 69 anos quando comparados aos grupos de idosos com idade ≥ 70 e < 79 ($p=,007$) e ≥ 80 anos ($p < 0,0001$). Os níveis de linfócitos B OX40+ foram elevados em idosos com idade ≥ 70 e < 79 e ≥ 80 anos quando comparados aos grupos com idade ≥ 60 e < 69 ($p=0,03$ E $p=0,005$, respectivamente). Entre os grupos de idosos com idade ≥ 70 e < 79 e ≥ 80 anos, não houve diferença significativa nos percentuais de linfócitos B OX40+. **Conclusão:** Conclui-se que as alterações encontradas nos níveis de linfócitos T e B, da expressão de moléculas OX40 nos linfócitos B podem estar associadas ao processo de envelhecimento, sendo o avançar da idade determinante para as alterações da resposta imune celular e humoral. Os resultados desse estudo servem como referência para análises comparativas dos níveis encontrados de linfócitos T e B com expressão de OX40 na população idosa.

Palavras-chave: envelhecimento, imunossenescência, linfócitos, OX40.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the levels of circulating T and B lymphocytes with OX40 expression in the elderly of different age groups. **Methods:** A cross-sectional, exploratory and translational study was carried out at the Geriatric Service of the Professor Fernando Figueira Institute of Integral Medicine (IMIP) and the IMIP Multilingual Translational Research Laboratory from August 2018 to July 2019. A total of 168 patients were included. healthy elderly, 52 males and 116 females. They were divided into 3 groups according to age group: 73 elderly ≥ 60 and <69 years, 63 elderly aged ≥ 70 and <79 , 32 aged ≥ 80 years. Analysis of lymphocyte levels with OX40 expression was performed by flow cytometry. In the statistical analyzes, the Kruskal-Wallis test was performed to compare three groups with Dunn`s correction. Values of $p < 0.05$ were considered significant. **Results:** T lymphocyte levels were elevated in the elderly ≥ 60 and <69 years compared to the elderly ≥ 70 and <79 ($p = 0.009$) and ≥ 80 years ($p = 0.02$). However, when comparing OX40 T lymphocyte levels, there was no significant difference in the 3 groups evaluated. B-lymphocyte levels were elevated in the elderly aged ≥ 60 and <69 years compared to the elderly aged ≥ 70 and <79 ($p = .007$) and ≥ 80 years ($p < 0.0001$). OX40 + B lymphocyte levels were elevated in the elderly aged ≥ 70 and <79 and ≥ 80 years when compared to the groups aged ≥ 60 and <69 ($p = 0.03$ E $p = 0.005$, respectively). Among the elderly groups aged ≥ 70 and <79 and ≥ 80 years, there was no significant difference in the percentage of OX40 + B lymphocytes. **Conclusion:** It is concluded that the alterations found in T and B lymphocyte levels, the expression of OX40 molecules in B lymphocytes may be associated with the aging process, and the advancing age for changes in cellular immune response. and humoral. The results of this study serve as a reference for comparative analyzes of the levels of T and B lymphocytes with OX40 expression in the elderly population.

Keywords: aging, immunosenescence, lymphocytes, OX40.

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno mundial, no qual o número de pessoas com 60 anos ou mais passará de 900 milhões em 2015 para 2 bilhões em 2050. Esse processo tem sido influenciado pela melhora na expectativa de vida global. Entre o ano 2000 e o ano 2015, houve ganho de cinco anos na média mundial da expectativa de vida ao nascer, chegando a 71.4 anos. Esse valor varia, desde a região Africana, com 60 anos, até a região Europeia, com 76.8 anos. No Brasil, essa expectativa é de 75 anos¹.

Além de maior prevalência de doenças crônicas, um outro parâmetro associado ao envelhecimento é alteração do sistema imunológico. Portanto, o envelhecimento promove alterações dos mecanismos da resposta imune inata e adaptativa, sendo denominada de "imunossenescência"². As principais mudanças resultantes desse processo são o aumento de processos inflamatórios crônicos não específicos, a diminuição na defesa contra novas infecções e contra o surgimento de neoplasias malignas, a redução no mecanismo de tolerância imunológica gerando maior autoimunidade e a diminuição da resposta vacinal^{3,4}. As células fagocíticas, por exemplo, diminuem sua capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias e sua eficiência na divisão celular, durante a resposta aguda a uma infecção. Entretanto, há aumento na liberação basal de mediadores pró-inflamatórios quando essas células não estão combatendo uma infecção, o que caracteriza um perfil secretório das células fagocíticas associado ao envelhecimento^{5,6}.

O sistema imune é responsável pela defesa frente a diversos microorganismos, como bactérias, vírus e fungos, e estas infecções são mais frequentes nos idosos que nos adultos e a sua desregulação pode levar à autoimunidade e ao surgimento de neoplasias, ambas mais prevalentes em idosos³. Na imunidade adaptativa, as células B tem importante papel na imunidade humoral, devido sua produção de anticorpos. Com o envelhecimento ocorre redução em sua formação e em sua diferenciação, resultando em uma diminuição de suas células maduras circulantes⁷.

Os linfócitos T, por sua vez, também se encontram com alterações funcionais, inicialmente devido à involução tímica marcante durante o envelhecimento. O timo é responsável pela maturação dessas células, na qual ocorre em etapas sequenciais que envolvem a expressão dos receptores de células T (TCR), a expansão clonal, a expressão dos receptores CD4 e CD8 e a seleção positiva e negativa induzida pela apresentação de antígenos próprios das células no estroma tímico⁸.

As células T quando ativadas, diferenciam-se em células T de memória e efetoras. Essas, por sua vez, produzem mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que é uma citocina tóxica em altas doses para células tumorais, com evidência de ter função de promover a progressão tumoral⁸. Por sua vez, existe um grupo receptores pertencentes à superfamília dos receptores de TNF (TNFR), caracterizados por proteínas expressas na superfície celular e na forma solúvel e são predominantemente expressos em células da linhagem hematopoiética. Quando essas proteínas são ativadas por seu ligante específico, uma ampla variedade de eventos celulares acontece, como a diferenciação, proliferação, apoptose, sobrevivência celular e aumento da produção de citocinas e quimiocinas^{9,10}.

Um dos membros da família dos receptores de TNFR, a molécula coestimuladora OX-40 está localizada na superfície de células TCD4+ ativadas e o seu ligante (OX40L) na superfície das APCs. A sinalização via OX40-OX40L intensifica proliferação das células T de memória efetoras, produção de citocinas, e prolonga a sobrevivência dessas células¹¹. OX40 está presente nos linfócitos T e B, plaquetas, neutrófilos e monócitos, entre outras¹⁰. Apesar da importância da OX40 para ativação e regulação da resposta imune, o conhecimento sobre o perfil dessa molécula durante o processo de envelhecimento é escasso. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar os níveis de linfócitos T e B com expressão de OX40 no sangue de idosos em diferentes faixas etárias.

2 MÉTODOS

2.1 Desenho do estudo e participantes

Foi realizado um estudo de corte transversal, exploratório e translacional no Serviço de Geriatria do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e Laboratório Multiusuário de Pesquisa Translacional do IMIP no período de agosto de 2018 a julho de 2019.

Esta pesquisa atende aos requisitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde do Brasil referente a pesquisas em seres humanos. Os pacientes incluídos no estudo foram esclarecidos quanto aos objetivos, protocolo de tra-

tamento, efeitos adversos e a não obrigatoriedade da participação, mediante consentimento informado. Após essa etapa, foram aplicados os protocolos clínicos e realizada a coleta de sangue periférico. As análises do sangue foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP.

Foram incluídos 168 idosos saudáveis, sendo 52 do sexo masculino e 116 do sexo feminino. Foram distribuídos em 3 três grupos de acordo com a faixa etária: 73 idosos ≥ 60 e < 69 anos, 63 idosos com idade ≥ 70 e < 79 , 32 com idade ≥ 80 anos. A população estudada foi selecionada a partir de critérios de elegibilidade. Foram critérios de exclusão da pesquisa, indivíduos em uso de hemoderivados há um mês ou menos; doenças reumatológicas com descompensação aguda; história clínica de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana 1 e 2 (HIV 1 e 2), e vírus linfotrópico humano 1 e 2 (HTLV 1 e 2).

2.2 Análise dos percentuais de linfócitos T e B e de OX40 no sangue venoso por citometria de fluxo

O volume de 4 mL de amostra de sangue venoso foi coletado em tubos com EDTA e mantidas a temperatura ambiente (24 °C). O tempo entre a coleta e o processamento foi de até 60 minutos. Antes do processamento, o tubo com amostra de sangue foi colocado no equipamento homogenizador (BD Bioscience) e em seguida, foram analisadas por citometria de fluxo.

A alíquota de 50 μ L de sangue periférico foi adicionada em tubo de poliestireno de citometria com 2 μ L de soro humano AB+, e 2 mL de tampão de lise de hemácias (FACS[®] Lysing Buffer, Becton Dickinson, Mountain View, CA) e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas 2 lavagens consecutivas, adicionando 2 mL de phosphate buffered saline (PBS) 1x concentrado (pH 7,4) e centrifugando a 300 x g por 5 min a 22°C. Após a segunda lavagem, foi descartado o sobrenadante e as células foram marcadas com 5 μ L de anticorpos monoclonais (BD Biosciences, CA) anti-CD45, anti-CD3 (células T), e anti-CD20 (células B) conjugados a fluorocromos diferentes. Para marcação de OX40 em linfócitos, foram adicionados anti-CD134 (OX40) conjugado ao fluorocromo. Após a incubação, foi realizada uma última etapa de lavagem, em seguida foi realizada a aquisição no citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences, CA) (Figura 14). Foram adquiridos 20.000 eventos celulares na região dos

linfócitos. Os dados obtidos analisados com o programa BD FACSuite™ (BD Biosciences, CA) e os resultados percentuais foram comparados entre os idosos com diferentes faixas etárias. Linfócitos T totais, TCD4, TCD8 e linfócitos B foram expressos em valores percentuais

2.3 Análises estatísticas

Para as variáveis quantitativas, foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. As variáveis quantitativas com distribuição não normal foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR: 25%-75%). Teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* foram utilizados para comparação entre os três grupos. Para evitar erro estatístico tipo I, as análises pelo teste *Kruskal-Wallis* foram seguidas pela correção de Dunn para testagem múltipla. Foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada através do programa *graphpad prism v8.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

3 RESULTADOS

3.1 Análise dos linfócitos T e TOX40+ no sangue de idosos

Os níveis de linfócitos T foram elevados nos idosos com idade ≥ 60 e < 69 anos quando comparados aos idosos com idade ≥ 70 e < 79 ($p=0,009$) e ≥ 80 anos ($p=0,02$). No entanto, quando comparados os níveis de linfócitos T OX40, não houve diferença significativa nos 3 grupos avaliados (Figura 1).

3.2 Análise dos linfócitos B totais e de linfócitos B OX40+ no sangue de idosos

Os níveis de linfócitos B foram elevados nos idosos com idade entre ≥ 60 e < 69 anos quando comparados aos grupos de idosos com idade ≥ 70 e < 79 ($p=,007$) e ≥ 80 anos ($p < 0,0001$). Os níveis de linfócitos B OX40+ foram elevados em idosos com idade ≥ 70 e < 79 e ≥ 80 anos quando comparados aos grupos com idade ≥ 60 e < 69 ($p=0,03$;

$p=0,005$, respectivamente). Entre os grupos de idosos com idade ≥ 70 e < 79 e ≥ 80 anos, não houve diferença significativa nos percentuais de linfócitos B OX40+.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados os percentuais de linfócitos T e B; e da expressão de OX40 na membrana desses linfócitos em idosos saudáveis, com a finalidade de verificar a associação dessas moléculas com as mudanças que ocorrem no sistema imune durante a senescência. As células linfocitárias são mediadoras da resposta inflamatória específica. Elas advêm das células progenitoras da medula óssea, processo esse iniciado desde a vida intrauterina¹⁹.

Os linfócitos B, com o aumento da idade, sofrem alterações tanto em número de células circulantes quanto queda na sua funcionalidade. O primeiro processo é justificado por uma redução da produção de novas células B pela medula óssea já mencionada, além de mudanças em seu microambiente que diminuem sua sobrevivência. As células T, por sua vez, ao serem liberadas da medula óssea, seguem para seu amadurecimento no timo. Com a imunossenescência, há uma tendência de queda de seus níveis, fato influenciado principalmente pela involução desse órgão com o avançar da idade. Diante desse cenário, o presente estudo corroborou tais ideias, a partir dos resultados encontrados que mostram diminuição dos linfócitos T e B nos idosos com idade acima dos 70 anos quando comparado aos idosos jovens, aqueles com idade entre 60 e 69 anos.

Quando analisamos os níveis de linfócitos B com expressão de OX40, foi evidenciado níveis elevados de linfócitos B OX40+ nos idosos acima de 70 anos, enquanto não houve diferença significativa nos níveis de linfócitos TOX40+ entre os grupos de idosos avaliados. Em modelos animais, deficiência de OX40 está associada à diminuição da função efetora de células T causada pela deficiência na migração aos locais de inflamação¹⁷. Esta característica pode ser utilizada em terapias contra doenças auto-imunes através do bloqueio da ligação OX40-OX40L, dessa forma, reduzindo a capacidade de migração para o infiltrado inflamatório¹⁷. O aumento da migração das células endoteliais é também estimulado pela interação OX40-OX40L, além do aumento da produção de IL-2, IL-6 e TNF α ¹⁸. A expressão de OX40 e seu ligante, também é um marcador importante na mensuração da cascata de reações que envolvem os processos inflamatórios e infecciosos, podendo auxiliar na compreensão desses eventos no idoso.

Dessa maneira, vale salientar que apesar da OX40 ser um coestimulador importante na vida adulta, pode ser um fator que induz a autoimunidade nos idosos, pois o processo de envelhecimento compromete a qualidade dessas células e perpetua a sobrevivência e proliferação de células com alterações funcionais²⁰. As vias de sinalização do OX40 são de natureza estimulatória e permitem respostas de células T memória e de longa duração, levando a diferenciação em células T efetoras, à sua sobrevivência e à produção de citocinas^{12,13,14}. A participação da co-estimulação por OX40 está envolvida na doença aterosclerótica, resposta aloenxerto, respostas antivirais, processos auto-imunes, câncer e reações alérgicas¹⁵. Além de seu papel estimulatório de células TCD4+, já foi descrita estimulação de linfócitos B e produção de anticorpos¹⁶.

5 CONCLUSÕES

Conclui-se que as alterações encontradas nos níveis de linfócitos T e B, da expressão de moléculas OX40 nos linfócitos B podem estar associadas ao processo de envelhecimento, sendo o avançar da idade determinante para as alterações da resposta imune celular e humoral. Os resultados desse estudo servem como referência para análises comparativas dos níveis encontrados de linfócitos T e B com expressão de OX40 na população idosa.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS, Relatório Mundial de Envelhecimento e Saúde, 2015.
2. Fulop T, Dupuis G, Witkowski JM, et al. The Role of Immunosenescence in the Development of Age-Related Diseases. *Rev Inves Clin* 2016; 68:84-91.
3. Goronzy J, Cornelia MW. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nature Immunology* 2013; 14:428-436.
4. Miller RA. The Aging immune system: primer and prospectus. *Science* 1996; 273(5271):70-4.

5. Agius E, Lacy KE, Vukmanovic-Stejic M, et al. Decreased TNF- α synthesis by macrophages restricts cutaneous immunosurveillance by memory CD4⁺ T cells during aging. *J Exp Med* 2009; 206(9):1929-40.
6. Linton PJ, Thoman ML. Immunosenescence in monocytes, macrophages, and dendritic cells: lessons from the lung and heart. *Immunol* 2014; 162:290-7.
7. The ageing human B cell repertoire: a failure of selection?
8. Candido JHagemann T. Cancer-Related Inflammation. *Journal of Clinical Immunology*. 2012;33(S1):79-84.
9. Bremer E. Targeting of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily for Cancer Immunotherapy. *ISRN Oncology*. 2013;2013:1-25.
10. Weinberg AD, Evans DE, Thahofer C, et al. The generation of T cell memory: a review describing the molecular and cellular events following OX40 (CD134) engagement. *J Leukoc Biol*. 2004;75:962–972.
11. Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nature Immunology*. 2016;17(3):230-240.
12. Nolan A, Weiden M, Kelly A, et al. CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2008;177: 301–30.
13. Ohshima Y, Tanaka Y, Tozawa HG, et al. Expression and function of Ox-40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol*. 1997;189:3838–3848.
14. Webb GJ, Hirschfield GM, Lane PJJ. OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2016;50:312–332.
15. Vinay DS, Kwon B. The superfamily: costimulation and clinical applications. *Cell Biol Int*. 2009; 33(4):435-465.
16. Walker LS, Gulbranson-Judge A, Flynn S, et al. Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC Chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers. *J Exp Med*. 1999;190(8):1115–1122.
17. Kopf M, Ruedl C, Schmitz , et al. Ox-40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL responses after virus infection. *Immunity* 1999;11:699–708.
18. Jensen SM, Maston LD, Gough MJ, et al. Signaling through OX40 Enhances Anti-tumor Immunity. *Semin Oncol*. 2010; 37(5):524–532.

19. Trivendra Tripathi, Wenjie Yin, Yaming Xue, et al. Central Roles of OX40L-OX40 Interaction in the Induction and Progression of Human T Cell-Driven Acute Graft-versus-Host Disease. *Immunohorizons*. 2019 Mar; 3(3): 110–120.
20. Sitrin J, Suto E, Wuster A, et al. The Ox40/Ox40 Ligand Pathway Promotes Pathogenic Th Cell Responses, Plasmablast Accumulation, and Lupus Nephritis in NZB/W F1 Mice. *J Immunol*. 2017 Aug 15;199(4):1238-1249

FIGURAS

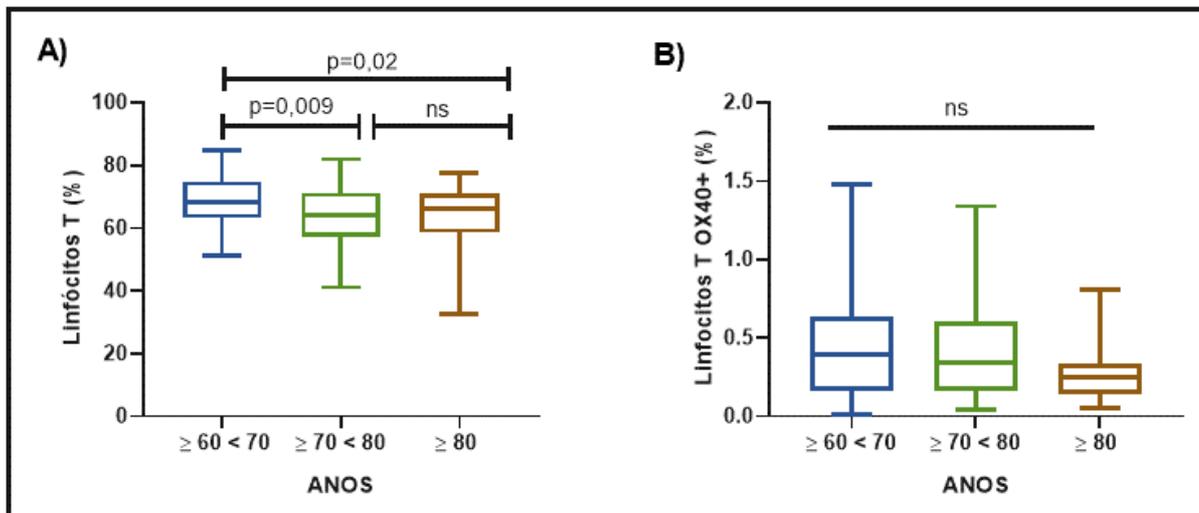


Figura 1: Análise dos valores percentuais de linfócitos T totais e linfócitos T OX40+ em idosos com diferentes faixas etárias. Os gráficos foram representados em mediana e interquartil 25-75. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.

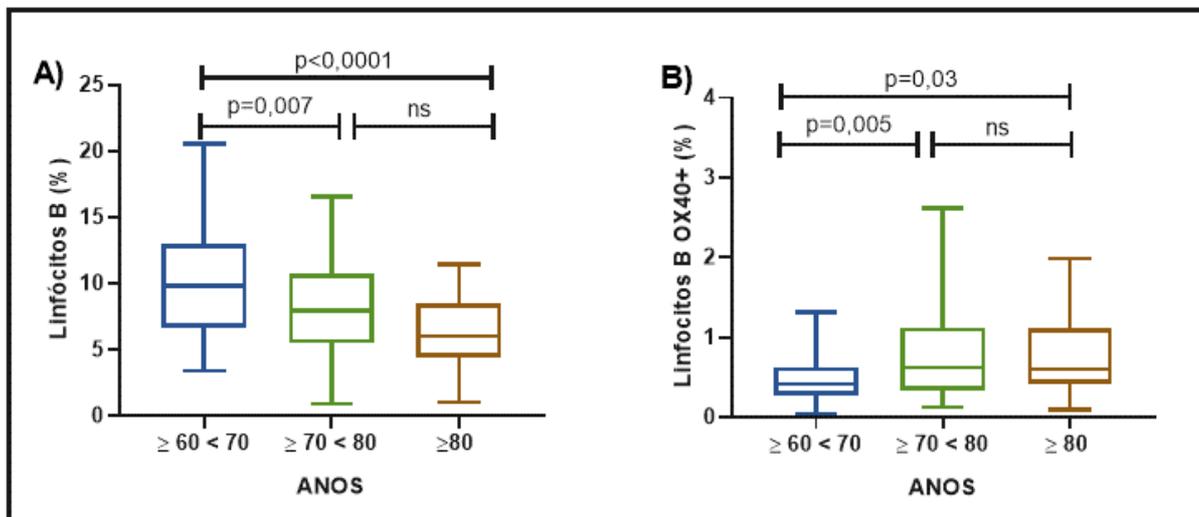


Figura 2: Análise da concentração sérica (%) de linfócitos B totais e linfócitos BOX40 entre idosos de diferentes faixas etárias. Os gráficos foram representados em mediana e interquartil 25-75. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.