

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ANA PAULA MACIEL ORNAGHI

**ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS E TRANSCRICIONAIS EM
LINFÓCITOS T DE UMA POPULAÇÃO IDOSA EM RISCO IMUNE
NO SUL DO BRASIL**

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. CRISTINA BONORINO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MOISÉS BAUER

Porto Alegre
2013

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS E TRANSCRICIONAIS EM
LINFÓCITOS T DE UMA POPULAÇÃO IDOSA EM RISCO IMUNE
NO SUL DO BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Autora

Ana Paula Maciel Ornaghi

Orientadora: **Prof^ª. Dr^ª. Cristina Bonorino**

Co-orientador: **Prof. Dr. Moisés Bauer**

Porto Alegre
2013

AGRADECIMENTOS

À Deus por seu meu guia em todos os percursos da minha vida.

À minha família por todo apoio, carinho, amor e suporte imprescindíveis para a conquista dos meus objetivos. Em especial aos meus pais: Jandira e Paulo, às minhas sobrinhas: Giovana e Melissa, e às minhas filhinhas: Natália e Mosi, que fizeram os meus dias serem mais alegres e mais leves de se levar.

Ao meu namorado Denis Kroeff por todo seu amor, amizade, paciência, ajudas com problemas de informática, sem ele ao meu lado seria muito mais difícil seguir em frente.

À prof^a Dr^a Cristina Bonorino pela oportunidade de ser orientada por ela e fazer parte do seu grupo de pesquisa, acreditando em mim, mesmo que eu não tenha tido a dedicação exclusiva que eu gostaria de ter tido por causa do meu trabalho.

Ao prof. Dr. Moisés Bauer que me acolheu como co-orientador, me incentivou e me ajudou muito para a realização desse mestrado.

Aos colegas dos laboratórios 6, 8 e 14 pelas ajudas e pelos conhecimentos compartilhados. E em especial às amigas Laura Petersen, Bruna Luz e Patrícia Araújo por todo companheirismo durante esse período de dois anos.

Aos queridos ICs pela grande ajuda: Andrea, Talita, Thiago, Rafael e Nathana.

Ao pessoal do laboratório de hemostasia que me recebeu de braços abertos e em especial à minha chefe prof^a Dr^a Eliane Bandinelli que entendeu meus horários reduzidos no trabalho e me apoiou o tempo todo.

Às minhas amigas do quinteto, que mesmo nos vendo pouco por causa da falta de tempo que trabalho associado com mestrado causa, foram essenciais para momentos de desabafos, conselhos e distrações.

RESUMO

A população de idosos, caracterizada como pessoas com mais de 60 anos, vem aumentando muito nos últimos anos no Brasil, e com esse aumento da expectativa de vida surgem alterações relacionadas com a idade, por exemplo, a imunossenescência. Alguns estudos têm demonstrado que existem diferenças no perfil imunológico dos idosos, frequentemente relacionadas ao número de células T. O perfil de risco imune (IRP) tem sido definido como taxa de células T $CD4/CD8 < 1$ e soro positividade para citomegalovírus (CMV). Neste estudo, nós investigamos padrões de ativação e diferenciação de linfócitos T, por citometria de fluxo, em uma população idosa IRP, comparando com a população idosa sem perfil de risco (não-IRP), buscando identificar marcadores adicionais para esse perfil de risco imune. Foram recrutados para esse estudo 60 idosos da rede SUS (sistema único de saúde) de Porto Alegre, com idade superior a 60 anos, sendo 30 IRP e 30 não-IRP. Linfócitos foram isolados e estimulados *in vitro* para avaliar a produção de citocinas e a expressão de fatores de transcrição. As subpopulações de linfócitos T encontradas foram condizentes com estudos anteriores em que os pacientes IRP possuíam menos células T *naive* e de memória central, assim como foi observado um aumento nas porcentagens das células T $CD8+CD28^-$ e das células T $CD8+PD-1^+$. Além disso, foi observada uma redução na média de intensidade de fluorescência (MFI) dos fatores de transcrição canônicos para subtipos de células T de ajuda ($CD4^+$) em pacientes IRP quando comparados com pacientes não-IRP. As porcentagens dos diferentes subtipos (TH1; TH2; TH17; Treg) dessas células não foram diferentes entre os dois grupos. Após estimulação com anticorpos anti-CD3/anti-CD28 em cultura por 24h, a concentração de citocinas no sobrenadante das culturas aumentou, mas não houve diferença significativa entre os dois grupos em relação à concentração das citocinas em geral, exceto na IL-10 antes da estimulação, que foi maior em pacientes IRP. Esses resultados sugerem que mecanismos transcricionais importantes para a diferenciação de células T de ajuda estão alterados em pacientes IRP, o que pode afetar a resposta imune desses indivíduos.

Palavras-chave: Envelhecimento; perfil de risco imune; células T; fatores de transcrição.

ABSTRACT

The elderly population, characterized as people over 60 years old, has grown rapidly in recent years in Brazil, and with this increase in life expectancy, age-related changes appear, for example, immunosenescence. Some studies have shown that there are differences in the immunological profile of the elderly, often related to the numbers of T cells. The immune risk profile (IRP) has been defined as CD4/CD8 T-cell ratio <1 and positivity for serum anti-cytomegalovirus (CMV) antibodies. In this study, we investigated patterns of activation and differentiation of T lymphocytes by flow cytometry in an elderly population in IRP, compared with elderly people without risk profile (non-IRP), seeking to identify additional markers for this risk profile immune. For this study we recruited 60 elderly SUS patients in Porto Alegre, aged 60 years, 30 IRP and 30 non-IRP. Lymphocytes were isolated and stimulated *in vitro* to evaluate the production of cytokines and the expression of transcription factors. The subpopulations of T lymphocytes found were consistent with previous studies in which IRP patients had fewer naive and central memory T cells, as well as an increase was observed in the percentage of T cells CD8 + CD28-T cells and CD8 + PD-1 + in the IRP individuals. Furthermore, there was a reduction in mean fluorescence intensity (MFI) of transcription factors to canonical subtypes of T cell help (CD4 +) in IRP patients when compared to patients without IRP. The percentages of the different subtypes (TH1, TH2, TH17; Treg) of these cells were not different between the two groups. After stimulation with anti-CD3/anti-CD28 antibodies in culture for 24 hours, the concentration of cytokines in culture supernatants increased, but no significant differences between the two groups were found, except for IL-10, which was higher in IRP patients before stimulation. These results suggested that transcriptional mechanisms important in the differentiation of helper T cells are altered in IRP patients, which may affect the immune response of these individuals.

Keywords: Aging; risk profile; T cells; transcription factors.

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1	7
1.1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1.1. Imunossenescência	8
1.1.2. Imunidade inata e envelhecimento	9
1.1.3. Imunidade adaptativa e envelhecimento	11
1.1.3.1. Imunidade humoral	11
1.1.3.2. Imunidade celular	12
1.1.4. Perfil de risco imunológico	16
1.1.5. Importância e justificativa	18
1.2. OBJETIVOS	19
1.2.1. Objetivo geral	19
1.2.2. Objetivos específicos	19
2. CAPÍTULO 2	20
2.1. ARTIGO CIENTÍFICO.....	21
3. CAPÍTULO 3	46
3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
REFERÊNCIAS	49

1.CAPÍTULO 1

1.1.INTRODUÇÃO

1.1.1.Imunossenescência

A população de idosos vem crescendo rapidamente no mundo. No entanto, a longevidade não está necessariamente associada a um envelhecimento saudável. O envelhecimento é um fenômeno biológico e psicológico que gera influências em nível familiar e social. O processo de envelhecimento, chamado de senescência, é caracterizado pela perda gradual das funções orgânicas, onde o idoso retém sua capacidade intelectual e física em níveis aceitáveis. O envelhecimento patológico, em que há sinais de degeneração muito intensos, é chamado de senilidade (PERES, A. *et al.*, 2003).

No início do século XX, no Brasil, 96,7% da população tinha menos de 59 anos de idade. Os idosos correspondiam, nessa época, a apenas 3,3% dos habitantes do país. Atualmente, já são 21,7 milhões os brasileiros cuja idade é igual ou superior a 60 anos, o que corresponde a 11,3% da população do país, gráfico 1 (IBGE, 2010).

Proporção de idosos de 60 anos ou mais e de 65 anos ou mais, no Brasil (1999-2009)

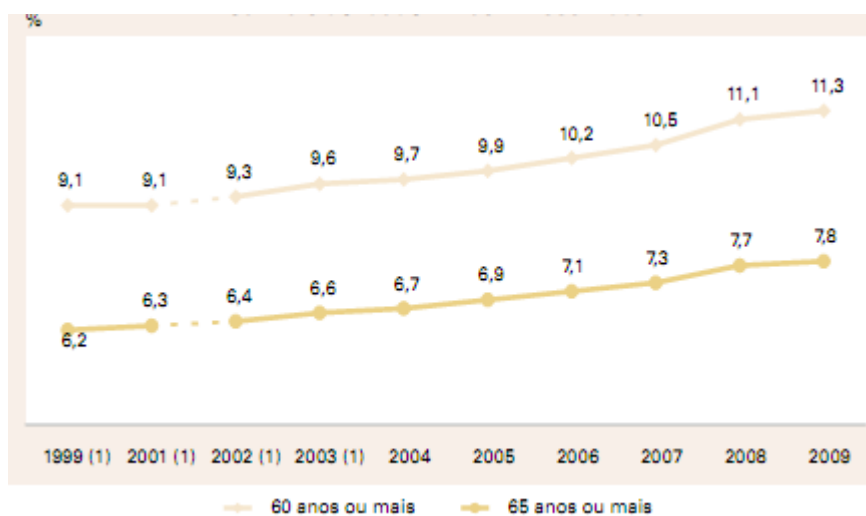


Gráfico 1: Fonte: IBGE, Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 1999/2009.

(1) Exclui a população rural de Rondônia, Acre, Amazonas, Roraima, Pará e Amapá.

À medida que envelhecemos, modificações ocorrem em nossa complexa estrutura biológica. Cada organismo sofre específicas alterações morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e psicológicas, com influências genéticas e ambientais.

Com o crescimento dramático do número de idosos em um período relativamente curto, aumentam as dificuldades para o governo brasileiro em desenvolver estratégias efetivas para a prevenção e o tratamento das doenças associadas ao envelhecimento.

A compreensão das alterações imunológicas no idoso (imunossenescência) e suas consequências são essenciais para a prevenção, o diagnóstico e o tratamento das doenças mais frequentes nessa faixa etária (AW, D. *et al.*, 2007).

O envelhecimento é muitas vezes acompanhado pelo aumento na ocorrência e gravidade de muitas doenças, incluindo infecções, câncer e algumas doenças autoimunes (SUN, L. *et al.*, 2012). Em países em desenvolvimento, enfermidades diretamente relacionadas ao sistema imune, como infecções por influenza e pneumococos, são as principais causas de morte em idosos (PERES, A. *et al.*, 2003). O aprofundamento do conhecimento sobre a imunossenescência se torna essencial para entender melhor o perfil imunitário do idoso, suas alterações e consequências. Intervindo assim de forma mais eficiente na saúde desses indivíduos, visando à prevenção de doenças e, conseqüentemente, uma melhora na qualidade de vida dos idosos (MOTA, S. *et al.*, 2009). Atualmente, muitos pesquisadores passaram a avaliar o perfil imunológico de indivíduos idosos através da análise de células e moléculas envolvidas na resposta imune. Porém, até o presente momento não se conseguiu estabelecer um padrão imunológico que indique se o idoso é saudável ou não (PERES, A. *et al.*, 2003).

Diversas alterações relacionadas à imunossenescência podem ser observadas na hematopoiese do indivíduo idoso. Dentre estas modificações estão uma diminuição na capacidade de auto-renovação das células-tronco, e uma conseqüente redução na geração de leucócitos com diminuição do processo de linfopoiese. Parece que a redução na produção tanto de fatores estimulatórios de colônia quanto de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, na medula, contribuem para estas mudanças, mas ainda não se tem certeza (LIGTHART *et al.*, 1990).

1.1.2. Imunidade inata e envelhecimento

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa do hospedeiro e fornece a base para uma adequada resposta a patógenos. O envelhecimento é frequentemente associado com uma diminuição na função de barreiras epiteliais da pele, do pulmão ou trato

gastrointestinal, que capacita organismos patogênicos a invadir os tecidos das mucosas, resultando em um aumento do desafio para o sistema imune inato de idosos (WEISKOPF, D. *et al.*, 2009).

Recentemente se tornou evidente que as funções imunes inatas são afetadas pelo menos até certo ponto pelo processo do envelhecimento (PANDA, A. *et al.*, 2009).

Neutrófilos são normalmente as primeiras células a chegar ao local danificado, mas em idosos essas células têm uma diminuição no potencial de quimiotaxia e nas atividades fagocíticas, bem como uma capacidade mais baixa de produção de radicais livres, principalmente devido a alterações de sinalização celular (FORTIN, C.F. *et al.*, 2008).

As células Natural Killer (NK), representam 10-15% dos linfócitos do sangue periférico, e são caracterizadas pela expressão da molécula CD56 e/ou CD16. As células NK humanas são divididas em dois subgrupos funcionais com base na densidade da molécula CD56 na superfície celular, CD56^{bright} que são células imunorregulatórias, e CD56^{dim} que são células citotóxicas. Há evidências de que as células NK CD56^{bright} representem um estágio mais imaturo no desenvolvimento do que as células NK CD56^{dim}, e os últimos estudos têm sugerido que o número de células NK é mantido por um processo de diferenciação contínuo associado com a expressão da molécula CD57. As células NK CD57+ são um fenótipo altamente maduro no qual é observado uma capacidade citotóxica aumentada, uma redução na capacidade de resposta a citocinas, e uma diminuição da capacidade proliferativa quando comparada com a das células NK CD57-, corroborando com a troca gradual de funcionalidade que ocorre durante a diferenciação das células NK CD56^{bright} via CD56^{dim} CD57- para as células NK CD56^{dim} CD57+ (SOLANA, R. *et al.*, 2012).

Durante o envelhecimento ocorre uma diminuição das células NK CD56^{bright} e um aumento das células NK CD56^{dim} CD57+ sugerindo a diminuição da produção das células mais imaturas NK CD56^{bright} e acumulação das células altamente diferenciadas NK CD56^{dim} CD57+. Essa mudança de perfil de expressão das moléculas na superfície das células NK pode contribuir para a desregulação da imunidade inata e adaptativa, uma vez que as citocinas produzidas pelas células NK CD56^{bright} são não apenas essenciais para ativação das células dendríticas (DCs), mas também interagem com monócitos para promover a inflamação (SOLANA, R. *et al.*, 2012).

As DCs também parecem estar alteradas, não somente nas funções de fagocitose, quimiotaxia e produção de IL-12, mas também na capacidade de ativar células T CD4+ naive via apresentação de antígeno (PAULA, C. *et al.* 2009) (AGRAWAL, A. & GUPTA, S., 2010), enquanto a quantidade e o fenótipo não se alteram (JING, Y. *et al.*, 2009). Estudos

em nosso laboratório mostraram que DCs têm uma redução na capacidade de processar antígenos junto com uma alteração na expressão e função das suas moléculas co-estimulatórias (PEREIRA, L. F. *et al.*, 2011), embora elas pareçam continuar com a capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias e ativar células T CD8+ (AGRAWAL, A. *et al.*, 2008).

Monócitos ou macrófagos, que são importantes no reconhecimento e remoção de invasores através de seus “toll like receptors” (TLRs), são também debilitados com o envelhecimento (GOMEZ, C. R. *et al.*, 2008) levando a alteração da secreção de citocinas e funções efetoras (van DUIN, D. *et al.*, 2007).

1.1.3.Imunidade adaptativa e envelhecimento

A memória imunológica é uma importante característica do sistema imune adaptativo e é baseada na seleção clonal, expansão, diferenciação, e persistência de células B e T antígeno específicas. Isso confere habilidade para responder mais rápido ao reencontrar com um mesmo antígeno e conseqüentemente poderá proteger o hospedeiro de reinfecção (ZIELINSKI, C. *et al.*, 2011).

A imunidade adaptativa envolve interações entre receptores celulares de linfócitos T, B com estruturas antigênicas presentes em patógenos e células (JANEWAY, C.A., *et al.* 2005).

1.1.3.1.Imunidade humoral

O envelhecimento é acompanhado por mudanças nos compartimentos de células B. Estas mudanças afetam a função do sistema imune humoral. Entretanto o número de células B periféricas não diminui com a idade (WEISKOPF, D. *et al.*, 2009).

Embora os níveis de imunoglobulina no plasma sejam estáveis durante o envelhecimento (KOGUT, I. *et al.*, 2012) a porcentagem de células B *naive* (definidas pela ausência de CD27 na membrana), é significativamente reduzida no envelhecimento. Essa redução de células B *naive* ocorre devido a várias razões incluindo uma redução na frequência de progenitores, redução do potencial proliferativo, e diminuição da produção de IL-7, entre outros fatores (MEHR, R. e MELAMED, D., 2011). Em contraste, células B de memória, que mostram uma diminuição na suscetibilidade à apoptose (CHONG, Y. *et al.*, 2005) se acumulam em idosos levando a expansão clonal de certas células B específicas para

alguns antígenos específicos (WEKSLER, M. E. *et al.*, 2000). Essa expansão pode limitar a diversidade do repertório e influenciar na resposta a vacinação. (WEISKOPF, D. *et al.*, 2009).

Interações com outras células do sistema imune são essenciais para a ativação de células B e produção de anticorpos. Entretanto, diferenças relacionadas com o envelhecimento nos compartimentos das células B são provavelmente resultado de uma combinação de defeitos intrínsecos, relacionados com a idade, na geração e maturação de células B, e desregulações das interações com outros tipos de células do sistema imune (WEISKOPF, D. *et al.*, 2009). Distúrbios na comunicação de células B com células T são provavelmente uma das causas de redução da expansão e diferenciação na resposta a antígenos. (LAZUARDI, L. *et al.*, 2005).

1.1.3.2. Imunidade celular

A imunidade celular é mediada, principalmente, por linfócitos T. Estes estão divididos em duas subpopulações: as que apresentam o marcador CD4 e possuem a função de auxiliar nas respostas imunes e as que expressam o marcador CD8, com função citotóxica.

Uma das principais alterações que ocorrem no envelhecimento do sistema imune é uma diminuição no número de células T *naive*. E esse declínio tem duas razões principais: com a idade a função das células tronco hematopoiéticas (HSCs) reduz devido a deficiências no reparo do DNA e ao encurtamento dos telômeros, levando a redução da capacidade de gerar progenitores linfóides. Também foi sugerido que outras mudanças, como por exemplo a diminuição do tecido hematopoiético, no decorrer da idade no nicho das células tronco, pode contribuir para o declínio da função das HSCs em idosos (ARNOLD, C., 2011).

Além disso, o timo é afetado, e é nesse órgão que ocorre a maturação das células T. Uma das mudanças que ocorre no sistema imune ao longo do envelhecimento é a involução do timo, caracterizada pela redução no tamanho total desse órgão e a substituição da função do córtex e do tecido da medula por gordura (ZIELINSKI, C. *et al.*, 2011). Essas mudanças começam a ocorrer no início da vida e continuam ao longo dela. Como consequência, em pessoas de 40 a 50 anos, o número de células T *naive* que saem do timo reduz drasticamente (WEISKOPF, D. *et al.*, 2009).

O envelhecimento influencia diferentemente as subpopulações de células T *naive* CD4+ e T CD8+. Embora uma diversidade de células T CD4+ (PEREIRA, L. F. *et al.*, 2011)

seja mantida por décadas mesmo com a involução do timo, um dramático declínio da diversidade ocorre depois de 70 anos de idade, que resulta em um repertório reduzido e leva a uma diminuição da capacidade do hospedeiro a responder a novos antígenos (GORONZY, J. J. & WEYAND, C.M., 2005). Mudanças na subpopulação de células T CD8⁺ ocorrem ainda mais cedo durante a vida e de forma mais gradual. As células T CD8⁺ parecem ser mais suscetíveis à apoptose mediada pelo receptor de morte celular, desencadeada por TNF- α ou FAS. A redução da produção de células T *naive* geradas no timo é compensada por alguns mecanismos. Proliferação homeostática tem mostrado desempenhar um papel importante para a manutenção da população de células T *naive*. Dessa forma tem sido demonstrado que IL-7 desempenha um papel crucial no controle da proliferação homeostática de células T CD4⁺ e T CD8⁺ *naive* (SCHLUNS, K.S. *et al.*, 2000). Durante o envelhecimento também é observado um aumento no número de células T de memória que diferentemente das células T *naive*, dependem tanto de IL-7 quanto de IL-15 (ARNOLD, C., *et al.*, 2010).

Algumas populações de células T são definidas de acordo com a expressão na sua superfície das moléculas CD45RA, CCR7, CD28 (PITA-LOPEZ, M. L. *et al.*, 2009).

A molécula CD45 é uma glicoproteína que constitui grande parte da superfície celular dos linfócitos. Múltiplas isoformas destas moléculas têm sido identificadas e essas formas são diferentemente expressas dependendo do tipo de célula e do estado de ativação. As células T *naive* expressam a isoforma de alto peso molecular (CD45RA) e essa isoforma é perdida e substituída após a ativação pela isoforma de baixo peso molecular (CD45RO). As células T altamente diferenciadas podem voltar a expressar a molécula CD45RA, tanto nas células CD4 quanto nas células CD8, durante o envelhecimento e após infecção por CMV. Tem sido relatado que essas células CD45RO têm estágio final de diferenciação, entretanto estudos mais recentes têm mostrado que elas podem ser reativadas e proliferar quando submetidas a sinais co-estimulatórios adequados (HENSON, S. M. *et al.*, 2012).

A molécula CCR7 é um receptor das quimiocinas CCL19 e CCL21, que facilitam a interação entre os leucócitos, tais como apresentação de antígeno e entrada nos linfonodos (AKUTHOTA, P. *et al.*, 2013). A expressão de CCR7 divide as células T de memória humanas em grupos funcionais distintos quanto à capacidade e função efetora: aquelas que expressam CCR7 são ditas de memória central (CM), enquanto células de memória efetora (EM) são aquelas em que está ausente o CCR7, perdendo a capacidade de voltar aos órgãos linfóides secundários e ficando restritas aos tecidos (PITA-LOPES, M. *et al.*, 2009). As células T CD8⁺ de CM possuem um fenótipo homogêneo, enquanto subpopulações de EM

tem sido definidas dentro do conjunto de CCR7^{null} de acordo com a expressão de diferentes marcadores incluindo o nível de expressão de CD45RA ou a expressão de moléculas co-estimulatórias CD27 e CD28. Quando as células EM expressam CD45RA⁺ são chamadas EMRA e expressam alta quantidade de perforina enquanto as CD45RA⁻ expressam baixas quantidades de perforina (GEGINAT, J. *et al.*, 2003). Nas células T CD8⁺, a expressão de CCR7 diminui com a idade (CASADO, J.G. *et al.*, 2009).

As células T apresentam um papel importante na defesa do organismo contra agentes infecciosos e tumores. Após o contato e reconhecimento do antígeno, as células *naive* se tornam ativadas e se diferenciam em células T efetoras. Essa ativação resulta em mudanças funcionais e fenotípicas que determinam o destino das células T efetoras e a eficácia das repostas imunes (VIGANO, S. *et al.*, 2012).

Em comparação com as células T *naive*, as células T de memória têm uma maior capacidade de agir na presença de um antígeno conhecido, devido em parte à sua capacidade de re-expressar citocinas e rápida expansão de células T antígeno específicas. Porém muitas infecções humanas não são resolvidas de forma eficiente. À medida que infecções virais persistem as células T CD8⁺ antígeno específicas perdem a capacidade de expressar citocinas, junto com a capacidade proliferativa, devido à perda progressiva de componentes essenciais para a função efetora (YOUNBLOOD, B. *et al.*, 2012).

Estudos recentes têm mostrado que o receptor “programmed death-1” (PD-1), um inibidor membro da família B7-CD28 é um forte regulador da exaustão. Uma observação inicial levou a hipótese de que PD-1 (CD279) tinha como principal função induzir a morte celular, mas a sua expressão parece estar mais relacionada a células ativadas. O mecanismo de regulação da expressão de PD-1 ainda não está bem claro, mas dois fatores de transcrição têm sido implicados na regulação positiva e negativa, são eles respectivamente: NFATc1 e T-bet. A expressão de PD-1 tem sido relacionada com o comprometimento funcional visto em células exaustas. Estimulação persistente de antígenos em infecções virais crônicas tem um efeito sobre a perda progressiva da função CTL e está correlacionado com o aumento da expressão de PD-1 (HOFMEYER, K. A. *et al.*, 2011). A ligação PD-1 por PDL-1 leva a inibição da co-estimulação mediada por CD28 e, portanto, a inibição da proliferação de linfócitos mediada por TCR e secreção de citocinas (VIGANO, S. *et al.*, 2012).

A capacidade das células T CD4⁺ em ajudar na proliferação de células B e na produção de anticorpos é reduzida com o envelhecimento. Funcionalmente, as células T auxiliares (TH) de memória podem ser distinguidas de acordo com sua capacidade de

produzir citocinas, com a expressão de determinados fatores de transcrição e com seus receptores (ZHU, J. *et al.*, 2010).

As células CD4+ *naive*, após estimulação antigênica, diferenciam-se em células efetoras com secreção especializada de citocinas. Dependendo da natureza e da intensidade dos estímulos os precursores de células TH, estas podem se diferenciar em células T regulatórias (Treg), que medeiam proteção contra imunopatologias ou em células efetoras, TH1, TH2, ou TH17, que oferecem proteção contra uma vasta quantidade de patógenos.

O processo de diferenciação das células TH acontece em três fases: iniciação, comprometimento e estabilização. A fase de iniciação envolve a sinalização dos receptores de citocinas através das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT), que influenciam na diferenciação. A fase de comprometimento depende da linhagem do fator de transcrição, isto é, T-bet para TH1, GATA-3 para TH2, ROR γ t para TH17, e forkhead Box Protein 3 (FOXP3) para Treg. Finalmente o processo de estabilização envolve mudanças nas células a longo prazo, que incluem modificações epigenéticas e remodelação da cromatina, que permitem a manutenção dos padrões de expressão dos genes (HENDRICKS, D. W. e FINK, P. J., 2011).

As respostas TH1 e TH2 são adaptadas para eliminar diferentes patógenos microbianos. As células TH1 agem contra patógenos intracelulares e vírus; e TH2 age contra patógenos extracelulares (ZIELINSKI, C. *et al.*, 2011).

Outros subconjuntos de células T auxiliares têm sido identificados ao longo dos últimos anos. As células TH17 produzem IL-17, IL-22 e GM-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos). Elas expressam o fator de transcrição ROR γ t, e são requeridas para eliminação de fungos e bactérias extracelulares. Uma desregulação na resposta das células TH17 pode induzir severa inflamação tecidual e autoimunidade (AWASTHI, A. & KUCHROO, V. K., 2009).

Células Treg (T regulatórias) são derivadas do timo, compreendem aproximadamente 1-5% dos linfócitos CD4+ do sangue periférico e expressam o fator de transcrição forkhead Box protein3 (Foxp3). As células Treg são conhecidas por exercer efeito supressivo em outras células do sistema imune, e medeiam a supressão principalmente através de contato celular (RUDENSKY, A. Y., 2011). Células Treg podem suprimir funções efetoras dos conjuntos de células T, incluindo TH1, TH2 e TH17. A involução do timo também causa uma diminuição na produção de células Treg. Supressão mediada pelas células Treg parece diminuir em adultos com mais de 50 anos, o que pode contribuir para fenômenos

relacionados com a idade tais como aumento da inflamação e autoimunidade (TSAKNARIDIS, L. *et al.*, 2003).

Muitos estudos mostram que a ausência de células Treg causa uma autoimunidade fatal, decorrente da deficiência de FOXP3. A molécula FOXP3 pode controlar a função e diferenciação das células Treg direta ou indiretamente pela alteração na expressão de alguns reguladores da expressão de genes. A manutenção de FOXP3 é essencial para a manutenção da estabilidade das células Treg (JOSEFOWICZ, S. Z. *et al.*, 2012).

1.1.4. Perfil de risco imunológico

O sistema imunológico também sofre um envelhecimento com o decorrer dos anos e podemos verificar vários fatores que diminuem a capacidade do sistema imune em gerar uma resposta eficiente. É característica do envelhecimento uma diminuição da diversidade de linfócitos T, com expansão de alguns clones com especificidade restrita (PAWELEC, G. *et al.* 2010).

Contudo, entre os idosos existe uma sub-população com uma alteração mais pronunciada no perfil imunológico. O risco imunológico foi definido a partir de estudos longitudinais com idosos suecos com uma razão de células T CD4/CD8 < 1 e associado com uma persistente infecção por CMV e aumento no número de células TCD8+CD28- (STRINDHALL, J. *et al.*, 2007). Essas diferenças podem ser significativas na resposta imune, então têm se sugerido a avaliação do perfil de risco imunológico como uma das melhores formas de distinguir o envelhecimento saudável do patológico.

A taxa aumentada de células T CD8+ em relação às células T CD4+ (normalmente mais frequentes no sangue) vem sendo associada com risco imunológico em idosos, podendo contribuir para um aumento de internações, incidência de tumores, e infecções (WEISKOPF, D. *et al.*, 2009). Mas não somente isso pode estar alterado no sistema imune dos idosos, como também, uma maior atividade inflamatória (aumento de IL-6 sérica), aumento do número de células T CD8+ efectoras/memória, expansão de células CD8+ contra o citomegalovírus (CMV) e a presença de anticorpos anti-CMV (FULOP, T. *et al.*, 2011).

Infecções e re-infecções com os vírus da família herpesvírus, como o CMV e o Epstein-Barr (EBV) podem ocorrer ao longo da vida e serem assintomáticas. Em idosos é encontrada uma expansão de clones de células T CD8+ específicas para CMV e, através de estudos longitudinais tem sido encontrado soropositividade para CMV associada a essa expansão (AW, D. *et al.*, 2007).

A expansão clonal com especificidade restrita leva a uma diminuição do repertório de células T que também está associada ao perfil de risco imunológico (KHAN, N. *et al.*, 2002). Essa restrição de especificidades do repertório T influencia a capacidade do indivíduo de responder a novas e variadas infecções. A expansão clonal observada no envelhecimento é principalmente de células T CD8+, envolvidas nas respostas a infecções virais e tumores.

Há evidências de que os desgastes dos telômeros dos cromossomos durante o processo de envelhecimento leva à parada do ciclo celular nas células T, e isso também está associado com disfunção imune nos idosos. Telômeros são complexos de nucleoproteínas de DNA que formam um final físico e linear em cromossomos eucarióticos. Eles desgastam progressivamente com cada ciclo durante a divisão celular, por exemplo, durante a expansão clonal das células T em resposta a persistentes infecções virais (SIMPSON, R. e GUY, K., 2010). Quando os telômeros chegam a um tamanho crítico muito pequeno é transmitido um sinal de dano no DNA levando a uma irreversível parada no ciclo celular (EFFROS, R., 2009). O comprimento do telômero dos leucócitos pode prever a morbidade e a mortalidade em humanos (COHEN, S. *et al.*, 2013). Idosos normalmente possuem telômeros dos leucócitos menores do que os de jovens, supostamente devido à exposição a patógenos durante toda a vida e junto com uma redução da população de linfócitos T *naive* como consequência da involução do timo (AKBAR, A. N. *et al.*, 2004).

O aumento da prevalência de células T CD8+CD28- em idosos também tem sido associado ao chamado “fenótipo de risco imunológico” (CHEN, W.H. *et al.*, 2009). Uma das funções das células T é o reconhecimento de antígenos específicos, seguidas por proliferação e secreção de citocinas. O envelhecimento das células T em humanos, tipicamente, corresponde à perda da expressão da molécula CD28, uma molécula acessória para a sinalização de TCR, que interage com as moléculas CD80 e/ou CD86 expressas nas células apresentadoras de antígenos ativadas. Junto com a ligação apropriada TCR/MHC, a molécula CD28 fornece o segundo sinal obrigatório para alcançar a ativação e a diferenciação completa das células T. Um dos marcadores de células T exaustas é a falta dessa molécula co-estimulatória CD28, e a perda de expressão dessa molécula é associada com mudanças na função celular das células T incluindo a diminuição da ativação e proliferação bem como a diminuição da capacidade para secretar IL-2 (ARNOLD, C. *et al.*, 2011).

A eficácia de reforços de vacinas é severamente diminuída em idosos (CHEN, W.H. *et al.*, 2009) e uma resposta baixa de anticorpos após a vacinação para influenza em idosos tem sido correlacionada à alta frequência de células T CD8+CD28- (SAURWEIN-TEISSL,

M. *et al.*,2002) e consequente diminuição de células T CD4+. Da mesma forma, doenças associadas com idade estão correlacionada com o acúmulo dessas células T CD28- e/ou persistentes infecções por CMV (ARNOLD, C. *et al.*, 2011).

1.1.5. Importância e justificativa

Com o aumento na expectativa média de vida, se torna de extrema importância se conhecer mais sobre o sistema imune, a fim de se identificar um perfil imunológico, para que se possam estabelecer bases de uma atenção especial para os idosos que estão com um perfil de risco. Para isso, é preciso elucidar os possíveis fatores implicados no envelhecimento patológico e desenvolver práticas de identificação e cuidado dessa população em risco, aumentando assim a qualidade de vida dos idosos.

Neste estudo foram investigados marcadores de células TCD8+ e TCD4+ , tanto novos quanto já descritos, que poderiam servir para identificar o perfil imunológico de risco nos idosos, na tentativa de contribuir para elucidar os mecanismos responsáveis por essas alterações.

1.2.OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

Investigar padrões de ativação e diferenciação de linfócitos T em uma população idosa com perfil de risco, comparando com uma população idosa sem perfil de risco, buscando aprofundar o entendimento do perfil de risco imune.

1.2.2. Objetivos específicos

- Investigar se as frequências de células T com fenótipo *naive* e de memória estão alteradas em idosos com perfil de risco em comparação com idosos sem perfil de risco;
- Investigar fenótipos efetores nas células T auxiliares (TH1, TH2, Treg, TH17) circulantes desses pacientes idosos, sem estímulo e em resposta a ativação *in vitro*;
- Determinar nesses grupos o perfil de citocinas produzidas em resposta a estímulos *in vitro*;
- Investigar a frequência de fenótipos intermediários de expressão de fatores de transcrição nas células T CD4+ nesses dois grupos.

2. CAPÍTULO 2

2.1.ARTIGO CIENTÍFICO

**TRANSCRIPTIONAL ALTERATIONS IN HELPER T CELLS SUBSETS OF
ELDERLY INDIVIDUALS IN IMMUNE RISK PROFILE**

Ana Paula Ornaghi¹, Bruna Luz Correa², Talita Siara², Thiago Willers¹, Ângelo José Bós³,
Guilherme Cerutti Muller², Moisés Evandro Bauer² and Cristina Bonorino¹.

¹Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Institute of Biomedical Research, PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

²Laboratory of Immunosenescence, Institute of Biomedical Research, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

³Institute of Geriatrics and Gerontology, PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Cristina Bonorino, Ph.D. Faculty of Biosciences, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6690, 2º andar. Porto Alegre, RS 90.610-000, Brazil.

cbonorino@pucrs.br

Abstract

The elderly population has grown rapidly in recent years, and the increase in life expectancy brings age-related changes such as immunosenescence. Differences between the immunological characteristics of elderly individuals have been reported, often related to the numbers of T cells. Immune risk profile (IRP) has been defined as CD4⁺ T cells/CD8⁺ T cells <1 and positivity for CMV antibodies. This study compared patterns of activation and differentiation of T lymphocytes between IRP and non-IRP populations in order to identify additional markers of IRP. Sixty individuals, 30 IRP and 30 non-IRP, were recruited. Blood lymphocytes were isolated and stimulated *in vitro* to assess cytokines production and the expression of transcription factors. A large panel of lymphocyte subsets and cytokines was assessed by multi-color flow cytometry. IRP patients had less naive and central memory T cells as well as an increased percentage of CD8⁺CD28⁻ cells and CD8⁺PD-1⁺ T cells. Furthermore, there was a reduction in mean fluorescence intensity (MFI) of T helper canonical transcription factors, T-bet, GATA-3 and ROR γ t, in IRP patients as compared non-IRP ones, but the percentage of each T helper subtype did not differ between groups. After stimulation with anti-CD3/CD28 antibody for 24h in culture, the mean cytokine concentration in supernatants increased in both groups, but there were no significant differences between the two groups in relation to the mean concentration of each cytokine, except for IL-10 before stimulation, which was higher in the IRP group. Our results indicate a previously unknown feature of transcriptional activity in CD4⁺T cells of IRP individuals, which could be an underlying cause of the impaired immune response observed in this group.

Keywords: Aging; risk profile; T cells; transcription factors, CMV.

Introduction

Ageing is often accompanied by the increased occurrence of many infections, cancers, and some autoimmune diseases, leading to a decrease in quality of life (Dorshkind *et al.* 2009). Ageing is definitely one of the factors can decrease the immune system's ability to generate an effective response (Busse *et al.* 2010). A decrease in T lymphocytes diversity and increase of some clones restricted specificity is observed in aged individuals (Arnold *et al.* 2011). However, among the elderly distinct populations can be identified based on their immunological profiles, which can impact the immune response. The immune risk profile (IRP) was defined from longitudinal studies with elderly Swedes with a ratio CD4/CD8 T cells <1 and associated with a persistent CMV infection (Ferguson *et al.* 1995) and increased numbers of CD8 + CD28-cells (Aw *et al.* 2007). The IRP had been associated with increased mortality rates in old individuals.

IRP is often associated with a higher basal inflammatory activity (eg, increase of IL-6), low B cells (CD19+), increased CD8 effector/memory cells, with interestingly expansion of CD8+ cells against cytomegalovirus (CMV) as well as increased CMV seropositivity (Pawelec *et al.* 2010). The latter has been thought to be associated with the accumulation of senescent cells in the body (eg, CD8+PD-1+ cells), a central feature of T-cell senescence (Fulop *et al.* 2011).

CD4+ T cells are the crucial component of an adaptive immune response. Upon antigenic stimulation and cytokine signaling, naive CD4+ T cells activate and differentiate into various TH subsets (Awasthi *et al.* 2009). Traditionally, effector CD4+ T cells have been classified into TH1 and TH2 subsets, based on their cytokine production profile. Recently, TH1 and TH2 have had to make room for a third subset, TH17. TH subsets are under the regulation of canonical transcription factors that coordinate the expression of the major cytokines that define each particular subset. The transcription factor T-box-containing protein expressed in T cells (T-bet) is the master regulator of the T helper1 (TH1) differentiation program associated with the production of interferon- γ (IFN- γ) required for efficient immune responses against intracellular pathogens (Szabo *et al.* 2000). GATA binding protein 3 (GATA-3) controls the development of the TH2 cell lineage that is characterized by the secretion of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and IL-13 critical for immunity against helminths and other extracellular pathogens (Löhning *et al.* 2008). The nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation of TH17 cells (Ivanov *et al.* 2006) coordinating the expression of IL-17 in T cells.

Finally, Treg (regulatory T) cells are derived from the thymus and express the transcription factor forkhead box protein3 (Foxp3) (Sakaguchi *et al.* 2011). Treg cells are known to exert a suppressive effect on other immune system cells, and mediate the suppression mainly through cell contact (Rudensky *et al.* 2011). Treg cells can suppress effector functions of T cells subsets, including TH1, TH2 and TH17 (Arruvito *et al.* 2012).

In this study, we asked, if the expression of these canonical transcription factors that control development of each T helper subset was altered in elderly individuals in IRP. Our results indicate that such alterations are present in IRP patients, as well as if they could be related to other phenotypical alterations observed in T cells, impacting the immune response in these individuals.

Materials and Methods

Study Subjects

We screened 500 elderly by random home visits in different districts of Porto Alegre, Brazil. From these, 60 individuals older than 60 years old were recruited for this study, all non-institutionalized, with cognitive ability performed by the Instrument of Brief Neuropsychological Assessment (NEUROPSILIN) (Fonseca *et al.* 2008) and Mini Mental Status Examination (MMSE) (Folstein *et al.* 1975). The recruitment was performed by the Institute of Geriatrics and Gerontology (Hospital São Lucas) of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS) with the assistance of teams from the Family Health Strategy of the National Healthcare System. All subjects signed a consent form, free and informed which was approved by the ethics committee of PUCRS. All patients underwent peripheral blood collection by venipuncture between 8-10 a.m. and were interviewed to obtain demographics, socio-economic and cognitive assessment.

Definition of IRP

A standard test employed in monitoring CD4/CD8 counts in Brazilian HIV+ subjects has been employed here to define IRP. To determine percentages and absolute counts of T helper (CD4+) and T cytotoxic (CD8+) cells, a stain/erythrocyte-lyse/no-wash procedure was used. 50 µL of anticoagulated whole blood were added in 12x75 mm tubes containing absolute counting beads (TruCOUNT tubes, from BD Biosciences, San Jose, Ca, USA). 20 µL of the BD MultiTEST CD3 FITC (clone SK7)/CD8 PE (clone SK1)/CD45 PerCP (clone 2D1)/CD4 APC (clone SK3) of cocktail reagent was added (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and incubated for 15 min in the dark and at room temperature (R.T.). A

freshly prepared erythrocyte lysing solution (450 μ L of a 1X BD FACS Lysing Solution, from BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was then added to the tube and after another 15 min of incubation (in the dark, at R.T.), samples were immediately acquired in a multi-color flow cytometer (BD FACSCanto II, from BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Semi-automatic acquisition and analysis were performed with the BD FACSCanto Clinical Software v2.4 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and collection criteria included 30,000 total events composed of at least 3,000 lymphocytes identified through gating on the CD45 high/SSC low events as recommended by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) guidelines. A CD4/CD8 ratio below 1 was used to define the IRP in this study (Wikby et al. 1994).

CMV serology

Aliquots of peripheral blood were collected without anticoagulant in order to assess serum CMV-IgM (active disease or recent infection) as well as CMV-IgG by ELISAs using IBL reagents (International, Hamburg, Germany) by the Basic Radim Immunoassay Operator automated equipment (BRIO, from Radim Diagnostics, Pomezia, RM, Italy). The optical density 570 nm was estimated in an ELISA plate reader. The sensitivity and specificity of these assays was estimated in >95%. Samples were considered positive (reactive) for CMV when the values were above cut off values: CMV-IgG or CMV-IgM (> 0.4 UI/mL).

Immunophenotyping

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density centrifugation using Ficoll-Histopaque (Sigma). Cells were counted by means of microscopy (100 x) and viability always exceeded 95%, as judged from their ability to exclude Trypan Blue (Sigma). Cells were cryopreserved in FBS + 10% DMSO. Cells were thawed in warm media (RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin e 10 mM HEPES), washed once.

A large panel of lymphocyte subpopulations was identified by multi-color flow cytometry. Briefly, PBMCs were washed in flow cytometry buffer (PBS containing 1% FCS and 0.01% sodium azide) and treated with Fc Block solution for 20 min. In order to evaluate specific lymphocyte subsets, cells were stained for 30 min with combinations of the following monoclonal antibodies: anti-CD4 APC H7, anti-CD8 FITC, anti-CD279 (PD-1) PECy7, anti-CCR7 PE, anti-CD45RA PECy5, anti-CD28 APC, anti-CD57 PE (all from BD Biosciences, San José, CA, USA). Immediately after staining, cells were washed,

resuspended and analyzed by flow cytometry. A minimum of 20,000 lymphocytes were identified by size (FSC) and granularity (SSC) and acquired with a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). The instrument has been checked for sensitivity and overall acquisition. Data were analyzed using the Flowjo 7.2.5 software (Tree Star Inc., Ashland, Or, USA).

Cell culture

The PBMCs were cultured (4×10^5 cells) in RPMI medium with 10% FCS (Sigma-Aldrich) and anti-CD3/anti-CD28 antibodies (1 μ g each/ml; BD Biosciences), for 24h at 37°C and in a 5% CO₂ atmosphere. The supernatants were collected and stored at -20°C for later cytokine production analysis. The samples were thawed and stained for 30 min with anti-CD4 PE-Cy7 and anti-CD25 APC H7. Added Human FoxP3 Buffer and then stained for 30 min with intracellular antibodies: anti-Tbet PerCP-Cy5.5, anti-FoxP3 AlexaFluor 488, anti-GATA3 AlexaFluor 647, anti-ROR γ T PE. Immediately after staining, cells were washed, resuspended and analyzed by flow cytometry. A minimum of 20,000 lymphocytes were identified by size (FSC) and granularity (SSC) and acquired with a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). The instrument has been checked for sensitivity and overall acquisition. Data were analyzed using the Flowjo 7.2.5 software (Tree Star Inc., Ashland, Or, USA).

Quantification of cytokines

For these experiments, to minimize variability, samples were thawed in the same day and processed together. Multiple soluble cytokines (IL-2, IL-10, IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF- α) were simultaneously measured by flow cytometry using the Cytometric Bead Array (CBA) Human TH1/TH2 Kit (BD Biosciences). Acquisition was performed with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). The instrument has been checked for sensitivity and overall performance with Cytometer Setup & Tracking beads (BD Biosciences) prior to data acquisition. Quantitative results were generated using FCAP Array v3.0.1 software (Soft Flow Inc., Pecs, Hungary).

Statistical analysis

All variables were tested for homogeneity of variances and normality of distribution by means of the Levene and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. Continuous variables differences between groups were analyzed by Student t-test, Mann-Whitney U test or ANOVA when appropriate. Statistical interactions between categorical variables and group were compared by means of the chi-square (χ^2) test. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences, SPSS Statistics 17.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The significance level was set at $\alpha = 0.05$ (two-tailed).

Results

Characteristics of the studied populations

The IRP in this study was defined by the inverted CD4/CD8 ratio and positive IgG serologic titers to CMV. Individuals over 60 years old were considered elderly. From the 60 individuals included in the study, 30 individuals were defined as IRP (17 women and 13 men) with mean age of 68.8 ± 6.16 years (60-83 years) and with mean BMI 29.04 ± 6.74 . The other 30 individuals were defined as non-IRP (18 women and 12 men) with mean age of 69.37 ± 5.98 years (62-82 years) and with mean BMI 28.7 ± 4.42 . Both groups were homogenous regarding age, gender and BMI. All $p=NS$.

Immunophenotyping

We screened a large panel of circulating lymphocyte subpopulations by multicolor flow cytometry, including activated, regulatory and immunosenescence markers (Table 1). The percentage of peripheral lymphocytes (CD3+) did not vary between non-IRP or IRP elders. In addition to expected changes in CD4 and CD8 cells, significant differences were observed between IRP and non-IRP groups in most lymphocyte markers. The proportions of activated T helper cells, immature NKT helper cells, naive T cells (three fold reduced) and central memory T cells were significantly reduced in IRP patients. Furthermore, the proportions of cells linked with immune risk profile, regulatory T cytotoxic cells, exhausted T cells, mature NKT cytotoxic cells and effector memory T cells (two fold increased) were significantly increased in IRP patients. Relative to other lymphocyte markers, no significant differences were observed between IRP and non-IRP groups (all $p = N.S.$).

Cytokine production

Multiple TH1/TH2 cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α) were assessed in PBMCs culture supernatants by CBAs. Figure 1 shows the cytokine profiles following T-cell stimulation by anti-CD3/CD28. Almost all cytokines were found to not significantly differ between the groups (p =N.S.). However, IL-10 ($F(1; 231,848)= 5.19$; $p= 0.024$) cytokine concentration was lower in IRP patients (Fig. 1d), and IL-6 ($F(1; 2.13)= 8.52$; $p=0.04$) concentrations were increased in IRP patients (Fig. 1a) than in non-IRP patients. IL-2 ($F(1; 347,745)= 10.28$; $p= 0.002$) Fig.1b, IL-4 ($F(1; 74,809)= 4.13$; $p= 0.044$) Fig. 1c, IFN- γ ($F(1; 1941,217)= 8.091$; $p= 0.005$) Fig. 1f, concentrations were increased, after stimulation, in both IRP and non-IRP patients.

Percentages of TH cell expressing the canonical transcription factors

The expression of transcription factors T-bet, GATA-3, ROR γ t and FOXP3 was analysed in the groups. Both MFI (Mean Fluorescence Intensity) and percentages of positive cells numbers were recorded. The percentages of cells expressing each canonical transcription factor are presented in Figure 2. There were no differences in the percentages of CD4+T-bet+ (Fig. 2b), CD4+GATA-3+ (Fig. 2c) and CD4+ROR γ t+ (Fig. 2d) between the groups, all $p= NS$. The percentages of CD4+CD25+FoxP3+ (Fig. 2e) were increased in IRP than in non-IRP patients, ($F(1; 1,617) = 4.1$; $p= 0.046$).

In particular, there were differences in the levels of expression of T-bet+ ($F(1; 6.01)= 20.02$; $p<0.001$) Fig 3a, GATA-3+ ($F(1; 2.02)= 80.7$; $p<0.001$) Fig. 3b, and ROR γ t+ ($F(1; 4.7)= 101.8$; $p<0.001$) Fig. 3c, between the two groups, both in unstimulated as well as stimulated conditions, MFI levels were significantly decreased in IRP patients for these transcription factors. However, there were no significant differences in the MFI of FOXP3+ (Fig. 3d) between the IRP and non-IRP groups, $p=N.S.$

The balance between the expression of transcription factors T-bet and GATA-3 was analyzed and it was seen that IRP patients had a higher imbalance than non-IRP patients, showing a significantly higher Th1 than Th2 response, Fig 3e ($F(1;171.6)= 28.4$; $p<0.001$).

Discussion

Helper T cell subsets are known to have different functions and influence different responses. To our knowledge, this is the first study in which the subtypes of CD4+ helper T cells are studied comparatively between IRP and non-IRP elderly. Particularly in the case of

CD4 + T cells of aged individuals, most studies have focused on the decreased amount of cells, or in low capacity for proliferation or cytokine production in response to challenges, which are evoked as main causes of the decreased immune responses observed with ageing (Hadrup *et al.* 2006; Wikby *et al.* 2008). In this study, we asked if transcriptional alterations could be correlated with IRP in aged individuals, specifically, in the canonical transcription factors that coordinate CD4+ T cell differentiation.

Data presented here, between IRP and non-IRP group, are in accordance with previous studies, when young and elderly people are compared, suggesting a difference in general percentages of T cells (Moro-García *et al.* 2012). IRP patients presented fewer naïve and central memory (CM); and more effector memory (EM) and effector memory RA (EMRA) T cells. So, in our IRP patients, differentiated cells (EM and EMRA) were more accumulated in the immune system and less differentiated immune cells (Naïve and CM) were more declining in frequency when compared with non-IRP patients.

Naïve T cells are needed to protect against new pathogens, but these cells are reduced in the elderly due to several interrelated events: involution of the thymus, reduction in T-cell repertoire diversity, and accumulation of memory T cells that are specific for persisting pathogens (Nikolich-Zugich 2008). Some believe the CM T cells found in aged individuals could be a consequence of compensatory homeostatic proliferation in response to the decreased number of naive T cells with aging (Kang *et al.*, 2004). This possibility is supported by the finding that a decreased production of naive T cells occurs upon thymus involution in the elderly (Linton and Dorshkind, 2004). It has been seen in our study that IRP patients have even less naive cells and less memory cell than non-IRP patients, numbers of naïve cells suggests the peripheral blood of IRP patients to contain appreciably lower levels of recent thymic emigrants, and the decrease in the number of naive T cells are not compensated for memory cells as occurs in non-IRP patients.

EM and EMRA T cells are highly differentiated populations and have been shown to accumulate in older human with persistent viral infections; a factor with more influence is CMV infection (Moro-García *et al.* 2012). The persistent infection with this virus is associated with accumulation of late-stage differentiated CD8+ T cells leading to overpopulation of the memory T cell pool (Derhovanessian *et al.* 2010). This persistent infection mediated by these viruses have a host-parasite relationship in which the virus keeps high frequency, but at the same time establishes immune evasion programs that prevent these responses from either clearing infection or interfering with viral transmission (Hansen *et al.* 2010).

In our IRP patients, we observed an increase in the percentage of CD8⁺CD28⁻ and CD8⁺PD-1⁺ T cells. This observation is often associated with diminished T function, and linked to CMV-driven expansion of this population (Weiskopf *et al.* 2009). Engagement of PD-1 by PDL1 leads to the inhibition of CD28-mediated co stimulation and thus of TCR-mediated lymphocyte proliferation and cytokines secretion (Vigano *et al.* 2012). Expression of PD-1 was previously found to correlate with the functional impairment seen in exhausted T cells (Hofmeyer *et al.*, 2011).

In this study, we focused on investigating possible differences in helper T cells (TH cells) subtypes in IRP and non-IRP individuals. TH cells play critical roles in orchestrating adaptive immune responses to pathogens, mainly through cytokine production (Hendricks *et al.* 2011), regulating the function of many other cells of the immune system to mount an effective response (Lazuardi *et al.* 2005). They are also involved in pathological responses to self-antigens and to non harmful allergens, resulting in autoimmune and allergic diseases, respectively (Martin *et al.* 2012).

The aging process differentially affects the TH1 and TH2 subsets, although available information can be once again contradictory in the literature. It has been suggested that a shift towards an increased role of TH2 cytokines and a diminished role of TH1 cytokines emerges with aging (Alberti *et al.* 2006). Other authors have suggested that the microenvironment in which CD4 T cells develop in older people may cause the production of more cells committed to TH1 than in younger subjects (Uciechowski *et al.* 2008). TH1 cells are involved in the generation of autoimmunity and inflammatory disorders mediated by cellular immune responses such as the clearance of pathogens (Saurwein-Teissl *et al.* 2002). The effector subset TH2 is essential for the development of inflammatory conditions mediated by antibodies (Higuchi *et al.* 2012).

Our main finding was that the intensity of expression of transcription factors T-bet, GATA-3 and ROR γ t was greatly decreased in IRP patients, although no difference was found in the percentages of cells of each corresponding subtype (TH1, TH2, and TH17). The precise impact of these transcriptional changes in CD4⁺ T cells is still unknown, but such alterations in expression ratios of these genes have been used to determine the nature of immune response engaged in protection against different pathogens (Aune *et al.* 2009).

T-bet contains a highly conserved DNA binding domain, the T-box (Finotto and Glimcher, 2004). T-box binds to a specific sequence in the promoter of different genes (Solomou *et al.* 2006). Mice lacking T-bet fails to develop Th1 cells and are driven toward Th2-mediated disease (Finotto *et al.* 2002). Overexpression of T-bet in Th2 cells results in

loss of the Th2 phenotype and increased production of IFN- γ (Szabo *et al.* 2000). Activated T cells result in increased T-bet expression, which induces IL-12R β 2 expression (Afkarian *et al.* 2002). T-bet also positively regulates its own expression through an autoregulator loop involving *Hlx*, a homeobox gene (Mullen *et al.* 2002). Patients with asthma have a decreased numbers of T-bet⁺ airway T cells, and mice with targeted T-bet gene deletion spontaneously develop features of asthma, including spontaneous airway hyperresponsiveness, airway inflammation, and remodeling, suggesting that decreased T-bet expression might be a major factor in the development of inflammatory airway disease (Finotto *et al.* 2002). In lupus patients T-bet expression is predictive of all disease flares and severe flares (Chan *et al.* 2007). In a systemic lupus erythematosus murine model, the absence of T-bet led to decreased autoantibody production and decreased immune-mediated renal disease (Peng *et al.* 2002). Patients with type 1 diabetes, a Th1-mediated disease, have polymorphisms in the T-bet gene (Sasaki *et al.* 2004). These findings suggest that T-bet has a central role in the development of autoimmune diseases; the absence of T-bet is protective in a mouse inflammatory bowel disease model, and overexpression of T-bet promotes Th1-mediated colitis (Neurath *et al.* 2002).

In contrast with the prolonged Th1 cytokine signaling pathways, the Th2 derived cytokine IL-4 has the ability to up-regulate a number of genes within a few hours of exposure (Lund *et al.* 2005). Signalling through the IL-4R and/or TCR engagement activates STAT-6 expression which in turn up-regulates GATA-3 (Eifan *et al.* 2012). GATA-3 is a highly conserved protein that plays a critical role in development and cellular differentiation (Usary *et al.* 2004). In allergic conditions there is a predominant Th2 cell-mediated response, and elevated IL-4, IL-5 and IL-13 production (Eifan *et al.* 2012).

Alterations in the correct balance of TH1/TH2 cells are associated with a series of immune and inflammatory diseases (Cheng *et al.* 2005). It can be speculated that decreased expression of transcription factors contributes to an imbalance in TH1 and TH2 cells (Gu *et al.* 2012). Protective immunity is dependent on a proper balance of TH1 and TH2 cells (Zhang *et al.* 1997). This balance is important in regulating immune function and the inflammatory response. In our study the IRP patients showed higher imbalance, between the expression of T-bet and GATA-3, than non-IRP patients. Alterations in the correct balance of TH1/TH2 cells are associated with a series of immune and inflammatory diseases (Cheng *et al.* 2005).

The function of effector TH1, TH2 and TH17 cells is regulated by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T (Treg) cells. The only factor that suffered alteration in percentage

of CD4⁺ T cells in elderly patients was the canonical factor for T reg cells, which was increased in IRP patients. CD4⁺ CD25⁺ Treg cells are important cells for the maintenance of peripheral tolerance (Weaver *et al.* 2006). The Treg cells are defined by their ability to produce high levels of IL-10 (Levings *et al.* 2001). IL-10 is a suppressor cytokine of T-cell proliferation in both Th1 and Th2 cells (Taylor *et al.* 2006), and high levels of this cytokine in IRP patients can be partly explained by the higher number of Treg cells in these patients when compared with non-IRP.

Cytokine concentration in culture supernatants was increased in both groups, after stimulation with anti-CD3 and anti-CD28. Nevertheless, the IRP group showed an increased mean basal production of IL-6 and IL-10 even before stimulation. Some studies have focused on the IL-6 and suggest that ageing is accompanied by increases in plasma levels of this inflammatory mediator (Krabbe *et al.* 2004). It has been suggested that IL-6 is a characteristic of diverse age-associated pathological processes such as cardiovascular disease, Alzheimer's disease, type-2 diabetes and osteoporosis (Ershler and Keller, 2000). However, it was seen that IRP and IL-6 were predictive of mortality in a manner not significantly affected by prevalent diseases (Wikby *et al.* 2006). IL-10 is known to down-regulate the production of proinflammatory cytokines (Messingham *et al.* 2002). Given that aging is accompanied by an elevation of proinflammatory cytokines (Kovacs *et al.* 2002), the age-dependent rise in production of anti-inflammatory cytokines may occur in an attempt to return the body to a lower inflammatory cytokine profile (Plackett *et al.* 2003). Therefore we believe that our IRP patients have a higher inflammatory profile, observed with the IL-6 increased, and the IL-10 increased may be required to restore a balance between pro and anti-inflammatory cytokines.

Previous studies that compared the transcriptional factors expression between young and elderly population, showed a decrease of these transcription factors in the elderly, suggesting that this alteration causes impaired in immune system (Hasegawa *et al.* 2006), these alterations are similar to changes found among IRP and non-IRP patients in our studies.

Our findings suggest that the mechanisms of differentiation of CD4⁺ helper T cells can be affected in elderly individuals should be further investigated, and their functional significance determined in immune responses in following immunizations. These future studies will help to develop more adequate diagnostics and care for this segment of the population.

Acknowledgments

We are very grateful to the patients of SUS of Porto Alegre city and the IGG (Institute of Geriatrics and Gerontology), PUCRS. This work was supported by grants from FAPERGS (Foundation for research support in the Rio Grande do Sul state).

References

- Afkarian, M.; Sedy, J. R.; Yang, J. *et al.* (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4₊ T cells. *Nat Immunol.* 3:549-557.
- Alberti, S.; Cevenini, E.; Ostan, R.; Capri, M.; Salvioli, S.; Bucci, L. *et al.* (2006). Age dependent modifications of type 1 and type 2 cytokines within virgin and memory CD4⁺ T cells in humans, *Mech. Ageing Dev.* 127:560–566.
- Álvarez-Rodríguez, L.; López-Hoyos, M.; Muñoz-Cacho, P.; Martínez-Taboada, V. M. (2012). Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cellular Immunology* 273:124–132.
- Arnold, C.; Wolf, J. *et al.* (2011). Gain and Loss of T Cell Subsets in Old Age—Age-Related Reshaping of the T Cell Repertoire. *J. Clin. Immunol.* 31:137-146.
- Arruvito, L.; Sabatté, J. *et al.* (2012). Analysis of suppressor and non-suppressor FOXP3⁺ T cells in HIV-1-infected patients. *Plos one.*
- Aune, T. M.; Collins, P. L. and Chang, S. (2009). Epigenetics and T helper 1 differentiation. *Immunology.* 3:299–305.
- Aw, D.; Silva, A.B. and Palmer, D.B. (2007). Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology.* 120:435-446.
- Awasthi, A. and Kuchroo, V. K. (2009). Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol.* 21(5):489-498.
- Busse, P. J. and Mathur, S. K. (2010). Age-related changes in immune function: Effect on airway Inflammation *J Allergy Clin Immunol.* 126: 690-699.
- Chan, R. W.; Lai, F. M.; Li, E. K. *et al.* (2007). Expression of T-bet, a type 1 T-helper cell transcription factor, in the urinary sediment of lupus patients predicts disease flare. *Rheumatology (Oxford).* 46:44–48.
- Cheng, X.; Liao, Y. H.; Ge H. *et al.* (2005). TH1/TH2 functional imbalance after acute myocardial infarction: coronary arterial inflammation or myocardial inflammation. *J Clin Immunol,* 25: 246–253.
- Derhovanessian, E.; Maier, A.B.; Beck, R. *et al.* (2010) Hallmark features of immunosenescence are absent in familial longevity. *J Immunol.* 185:4618–4624.
- Dorshkind, K.; Montecino-Rodriguez, E.; Signer, R.A. (2009). The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat. Rev. Immunol.* 9, 57–62.

- Eifan, A. O.; Furukido, K. Dimitru, A. et al. (2012). Reduced T-bet in addition to enhanced STAT6 and GATA3 expressing T cells contribute to human allergen-induced late responses. *Clinical & Experimental Allergy*, 42: 891-900.
- Ershler, W.B. and Keller, E.T., 2000. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu. Rev. Med.* 51, 245–270.
- Ferguson, F.G.; Wikby, A. *et al.* (1995). Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 50(6):B378-382.
- Ferrucci, L.; Corsi, A.; Lauretani, F. *et al.* (2005). The origins of age-related proinflammatory state, *Blood* 105: 2294–2299.
- Finotto, S. and Glimcher, L. (2004). T cell directives for transcriptional regulation in asthma. *Springer Semin Immunopathol.* 25:281-294.
- Finotto, S.; Neurath M. F.; Glickman, J.N. *et al.* (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science.* 295:336-338.
- Folstein MF, Folstein SE and McHugh PR (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12: 189-198.
- Fonseca RP, Salles JF and Parente MAMP (2008). Development and content validity of the Brazilian Brief Neuropsychological Assessment Battery NEUPSILIN. *Psychology & Neuroscience* 1: 55-62.
- Fulop, T.; Larbi, A. *et al.* (2011). Aging, Immunity, and Cancer. *Discovery Medicine.* 11(61): 537-550.
- Gu, W.; Li, C. S.; Yin, W. P. *et al.* (2012). Expression imbalance of transcription factors GATA-3 and T-bet in post-resuscitation myocardial immune dysfunction in a porcine model of cardiac arrest. *Resuscitation.*
- Hadrup, S. R.; Strindhall, J.; Kollgaard, T. *et al.* (2006). Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly. *J Immunol.* 176:2645-2653.
- Hansen, S. G.; Powers, C. J.; Richards, R. *et al.* (2010). Evasion of CD8+ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science.* 328(5974):102-6.

- Hasegawa, A.; Miki, T.; Hosokawa, H. *et al.* (2006). Impaired GATA3-dependent chromatin remodeling and Th2 cell differentiation leading to attenuated allergic airway inflammation in aging mice. *J Immunol.* 15;176(4):2546-2554.
- Hendricks, D. W. and Fink, P. J. (2011). Recent thymic emigrants are biased against the T-helper type 1 and toward the T-helper type 2 effector lineage. *Blood.* 117: 1239-1249.
- Higuchi, S.; Kobayashi, M.; Yano, A.; Tsuneyama, K. *et al.* (2012). Involvement of Th2 cytokines in the mouse model of flutamide-induced acute liver injury. *J Appl Toxicol.* 32(10):815-822.
- Hofmeyer, K. A.; Jeon, H. e Zang, X. (2011). The PD-1/PD-L1 (B7-H1) Pathway in Chronic Infection-Induced Cytotoxic T Lymphocyte Exhaustion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.*
- Ivanov, I. I.; McKenzie, B. S.; Tadokoro, C. E. *et al.* (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 126(6):1121-1133.
- Jing, Y.; Shaheen, E. *et al.* (2009). Aging is associated with a numerical and functional decline in plasmacytoid dendritic cells, whereas myeloid dendritic cells are relatively unaltered in human peripheral blood. *Hum Immunol.* 70(10):777-784.
- Kang, I.; Hong, M. S.; Nolasco, H. Park, S. H. *et al.* (2004). Age-associated change in the frequency of memory CD4+ T cells impairs long term CD4+ T cell responses to influenza vaccine. *J Immunol.* 1;173(1):673-681.
- Krabbe, K.S., Pedersen, M., Bruunsgaard, H., 2004. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp. Gerontol.* 39, 687–699.
- Kovacs, E. J.; Duffner, L. A.; Plackett, T. P.; *et al.* (2002). Survival and cell mediated immunity after burn injury in aged mice. *J. Am. Aging Assoc.* 25: 3-10.
- Lazuardi, L.; Jenewein, B. *et al.* (2005). Age-related loss of naive T cells and dysregulation of T-cell/B-cell interactions in human lymph nodes. *Immunology* 114: 137.
- Levings, M. K.; Sangregorio, R.; Galbiati, F. *et al.* (2001). IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J. Immunol.* 166: 5530-5539.
- Linton, P. J. and Dorshkind, K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* 5:133.
- Löhning, M.; Hegazy, A. N. *et al.* (2008). Long-lived virus-reactive memory T cells generated from purified cytokine-secreting T helper type 1 and type 2 effectors. *J Exp Med.* 205(1):53-61.

- Lund, R.; Ahlfors, H.; Kainonen, E. *et al.* (2005). Identification of genes involved in the initiation of human Th1 or Th2 cell commitment. *Eur J Immunol.* 35:3307–19.
- O'Mahony, L.; Holland, J.; Jackson, J. *et al.* (1998). Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production, *Clin. Exp. Immunol.* 113: 213–219.
- Martin, P. and Moscar J. (2012). Th1/Th2 Differentiation and B Cell Function by the Atypical PKCs and Their Regulators. *Immunol.* 3: 241.
- Messingham, K. A. N.; Heinrich, S. A.; *et al.* (2002). Interleukin-4 treatment restores cellular immunity after ethanol exposure and burn injury. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26: 519-525.
- Moro-García, M. A.; Alonso-Arias, R.; Lopéz-Vázquez, A. *et al.* (2012). Relationship between functional ability in older people, immune system status, and intensity of response to CMV. *Age.* 34: 479-495.
- Mullen, A. C.; Hutchins, A. S.; High, F. A. *et al.* (2002). Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nat Immunol.* 3:652-658.
- Neurath, M. F.; Weigmann, B.; Finotto, S. *et al.* (2002). The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med.* 195:1129-1143.
- Nikolich-Zugich. (2008). Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol.* 8(7):512-522.
- Pawelec, G.; Derhovanesian, E. and Larbi, A. (2010). Immunosenescence and Cancer. *Oncology/ Hematology.*
- Pawelec, G.; Akbar, A.; Beverley, P. *et al.* (2010). Immunosenescence and Cytomegalovirus: where do we stand after a decade? *Immunity & Ageing.* 7:13.
- Peng, S. L.; Szabo, S. J. and Glimcher, L. H. (2002). T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:5545–5550.
- Pita-Lopes, M.; Gayoso, I. *et al.* (2009). Effect of ageing on CMV-specific CD8 T cells from CMV seropositive healthy donors. *Imunuty & Ageing.*
- Plackett, T. P.; Schilling, E. M.; Faunce, D. E. *et al.* (2003). Aging enhances lymphocyte cytokine defects after injury. *FASEB J.* 17: 688-690.
- Rudensky, A. Y. (2011). Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev* 241(1):260-268.
- Sakaguchi, S. (2011). Regulatory T Cells: History and Perspective. *Methods in Molecular Biology.* 707: 3-17.

- Sasaki, Y.; Ihara, K.; Matsuura, N. *et al.* (2004). Identification of a novel type 1 diabetes susceptibility gene, Tbet. *Hum Genet.* 115:177-184.
- Saurwein-Teissl, M.; Lung, T.L. *et al.* (2002). Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol.* 168(11):5893–5899.
- Solomou, E. E.; Keyvanfar, K. and Young, N. S. (2006). T-bet, a Th1 transcription factor, is up-regulated in T cells from patients with aplastic anemia. *Blood:* 107.
- Strindhall, J.; Nilsson, B. *et al.* (2007). No Immune Risk Profile among individuals who reach 100 years of age: Findings from the Swedish NONA immune longitudinal study. *ScienceDirect.* 42:753-761.
- Szabo, S.J.; Kim, S.T.; Costa, G.L.; Zhang, X.; Fathman, C.G. and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655–669.
- Taylor, A.; Verhagen, J.; Blaser, K. (2006). Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- β : the role of T regulatory cells.
- Uciechowski, P.; Kahmann, L.; Plümäkers, B.; Malavolta, M. *et al.* (2008). TH1 and TH2 cell polarization increases with aging and is modulated by zinc supplementation, *Exp. Gerontol.* 43:493–498.
- Usary, J.; Llaca, V.; Karaca, G. *et al.* (2004). Mutation of GATA3 in human breast tumors. *Oncogene.* 23:7669 – 78.
- Vigano, S.; Perreau, M. *et al.* (2012). Positive and Negative Regulation of Cellular Immune Responses in Physiologic Conditions and Diseases. *Clinical and Developmental Immunology.*
- Weaver, C. T.; Harrington, L. E.; Mangan, P. R. *et al.* (2006). Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity.* 24: 677-688.
- Weiskopf, D. Weinberger, B. and Grubeck-Loebenstien, B. (2009). The Aging of the immune system. *Transplante Internacional. Review.*
- Wikby, A.; Mansson, I. A.; Johansson, B. *et al.* (2008). The immune risk profile is associated with age and gender: findings from three Swedish population studies of individuals 20–100 years of age. *Biogerontology.* 9:299–308.
- Wikby, A.; Nilsson, B.; Forsey, R. *et al.* (2006). The immune risk phenotype is associated with IL-6 in the terminal decline stage: Findings from the Swedish NONA immune

longitudinal study of very late life functioning. *Mechanisms of Ageing and Development* 127: 695–704.

Zhang, D. H.; Cohn, L.; Ray P. *et al.* (1997). Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem.* 272.

LEGENDS FOR TABLES AND FIGURES

Table 1. Characteristics of the studied populations.

Table 2. Immunophenotyping of lymphocyte subsets. Statistical significant differences are indicated: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.



Figure 1. Th1 and Th2 cytokines in IRP compared with non-IRP. PBMCs were stimulated for 24 h with anti-CD3/anti-CD28 antibodies and supernatant was collected for cytokine analysis by CBA. Mean values of cytokine production are represented in the bar graphs, in pg/mL. Statistical significant differences are indicated: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Legend:  Non-stimulated and  Stimulated.



Figure 2. Percentages of Th cells numbers. Gating strategy of lymphocytes and CD4+ T cells in 2A. Graphs represent mean percentages of CD4+T-bet+ cells (2B), CD4+GATA-3+ cells (3C), CD4+ROR γ t+ (4D) and CD4+CD25+FoxP3+ (2E). All $p = NS$. Legend:  Non-stimulated and  Stimulated. N=60



Figure 3. MFI of transcription factors. Representative analysis of expression of each transcription factor analysed in CD4+ T cells is seen in histograms on the left, and mean values of fluorescence T-bet (3A), GATA-3 (3B), ROR γ t (3C), FOXP3 (3D). Th1/Th2 ratio is seen in 3E. Statistical significant differences are indicated: * $p < 0.05$, $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Legend:  Non-stimulated;  Stimulated; - IRP and - Non-IRP. N=60

Table 1

Markers	Cell Type	IRP (%)	non-IRP (%)	P-value
CD3+	Lymphocytes	75.66 ± 9.8	72.07 ± 11.4	NS
CD3+CD4+	T helper	32.65 ± 6.9	50.21 ± 8.4	< 0.001 ***
CD3+CD8+	T cytotoxic	43.1 ± 6.9	22.5 ± 5.9	< 0.001 ***
CD3+CD4+CD8+	Naive	3.33 ± 10.07	1.6 ± 1.7	NS
CD4/CD8		0.77 ± 0.17	2.35 ± 0.58	< 0.001 ***
CD4+CD28+	Activated T cell	24.91 ± 5.5	40.15 ± 13	< 0.001 ***
CD4+CD28-	Regulatory T cell	14.74 ± 4.8	15.15 ± 12.4	NS
CD8+CD28+	Activated T cell	13.2 ± 5.3	12.97 ± 5.7	NS
CD8+CD28-	Regulatory T cell	20.66 ± 8.9	10.32 ± 7.2	0.001 **
CD4+PD1+	Exhausted T cell	18.97 ± 12.8	35.86 ± 14	NS
CD8+PD1+	Exhausted T cell	22.58 ± 8.66	15.17 ± 7.2	0.011 *
CD4+CD28-PD1+	Immune Risk Profile	12.09 ± 9.4	9.63 ± 7.6	NS
CD8+CD28-PD1+	Immune Risk Profile	14.03 ± 6.4	8.15 ± 5.6	0.001
CD4+CD57+	Senescent cell	11.31 ± 5.4	8.28 ± 6.5	NS
CD8+CD57+	Senescent cell	27.05 ± 9.58	11.14 ± 7.1	< 0.001 ***
CD4+CD45RA+CCR7+	Naive	7.85 ± 5.45	34.18 ± 12.8	< 0.001 ***
CD4+CD45RA+CCR7-	EMRA	15.01 ± 11,6	4.83 ± 3.9	0.009 **
CD4+CD45RA-CCR7+	Central memory	9.71 ± 6	43.82 ± 13.5	< 0.001 ***
CD4+CD45RA-CCR7-	Effector memory	67.49 ± 16	12.88 ± 6.1	< 0.001 ***
CD8+CD45RA+CCR7+	Naive	9.42 ± 12.3	30.73 ± 14.8	< 0.001 ***
CD8+CD45RA+CCR7-	EMRA	39 ± 22.7	15.93 ± 20.1	< 0.001 ***
CD8+CD45RA-CCR7+	Central memory	12.99 ± 22.7	38.66 ± 20.9	< 0.001 ***
CD8+CD45RA-CCR7-	Effector memory	38.67 ± 19.8	14.68 ± 6.6	< 0.001 ***

Data shown as mean (M) ± standard deviation (SD). Statistical significant differences are indicated:

* p < 0.05, **p < 0.01, ***p<0.001. Abbreviations: NS, not significant; EMRA, effector memory RA+ cells.

Figure 1

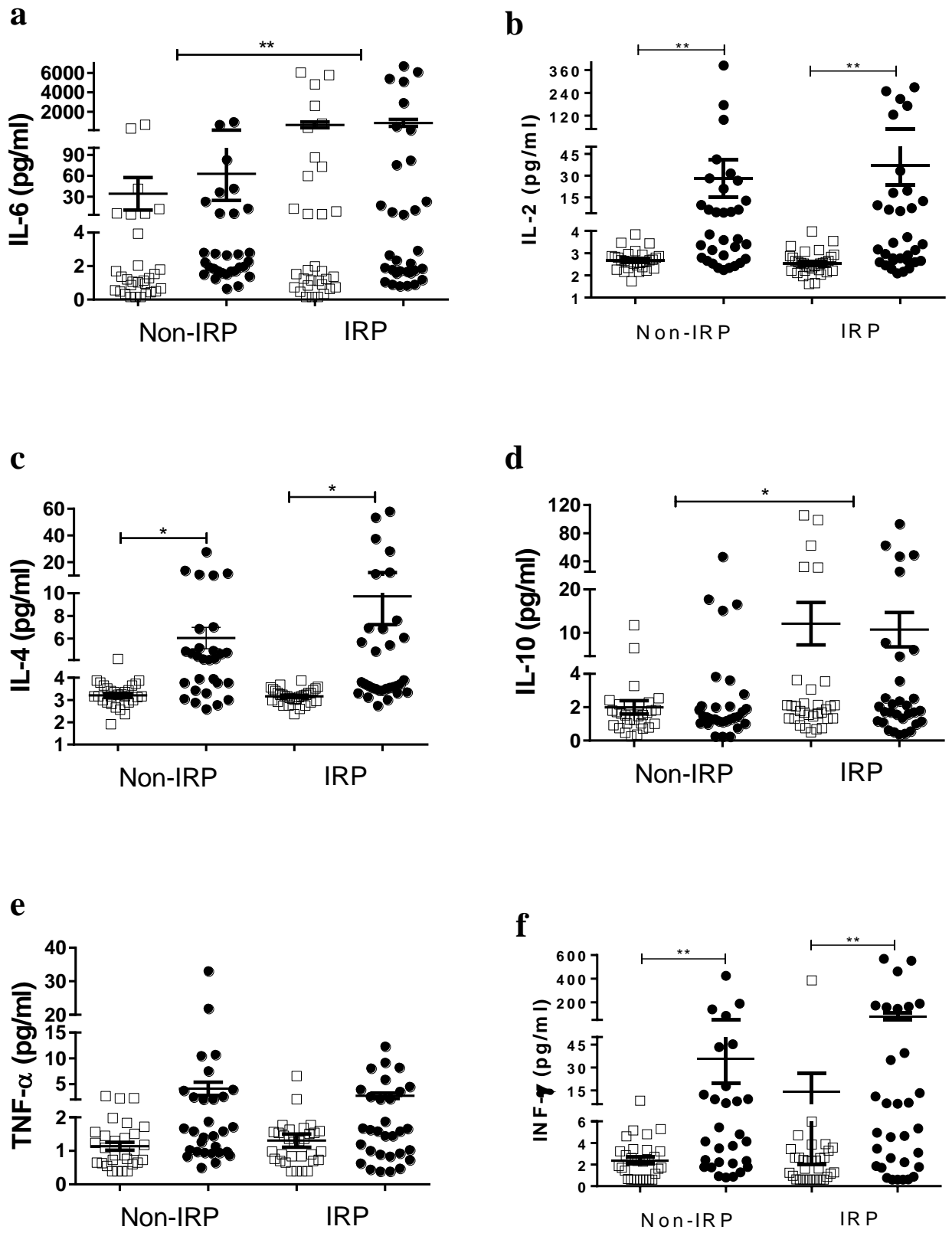


Figure 2

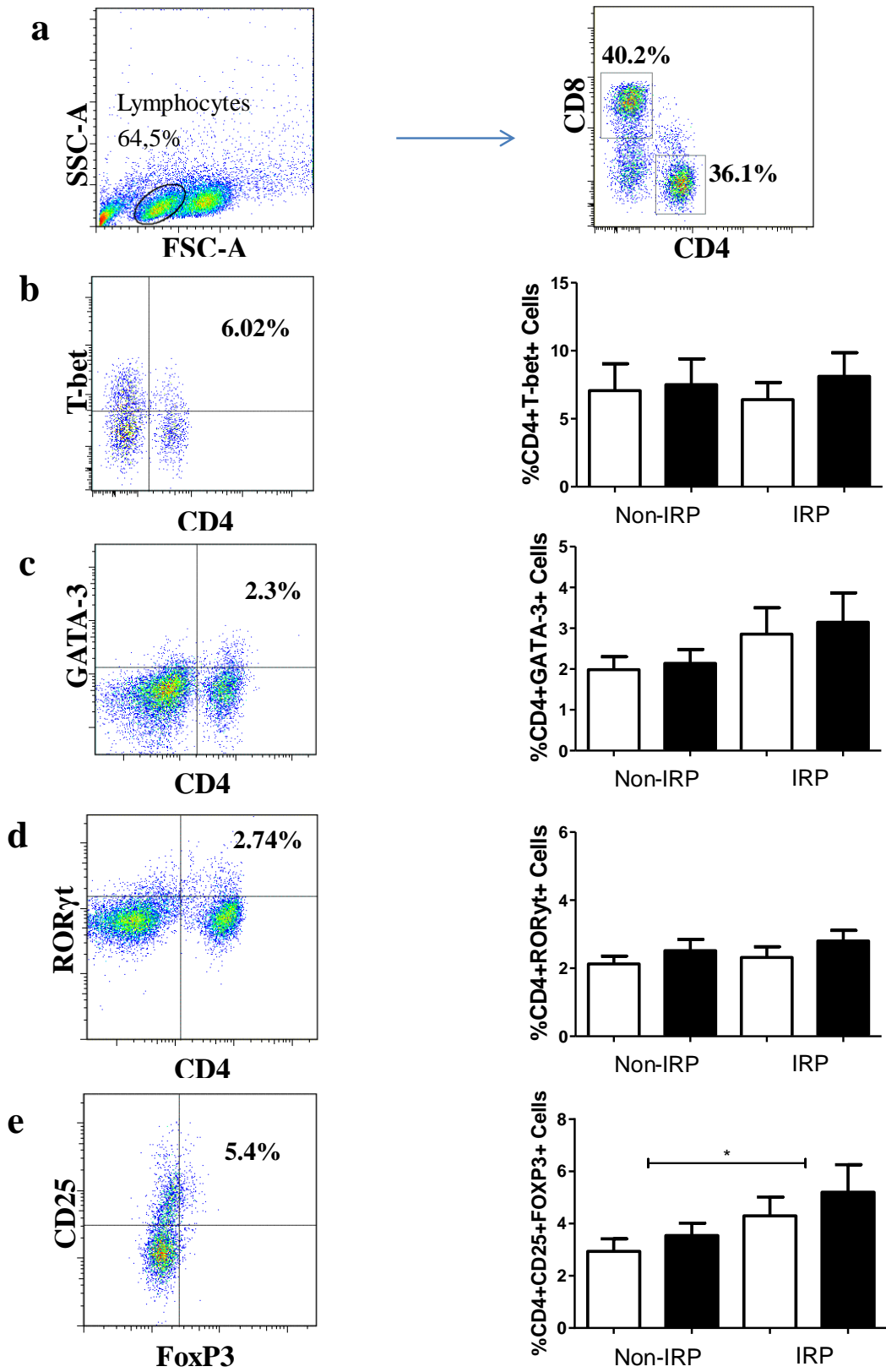
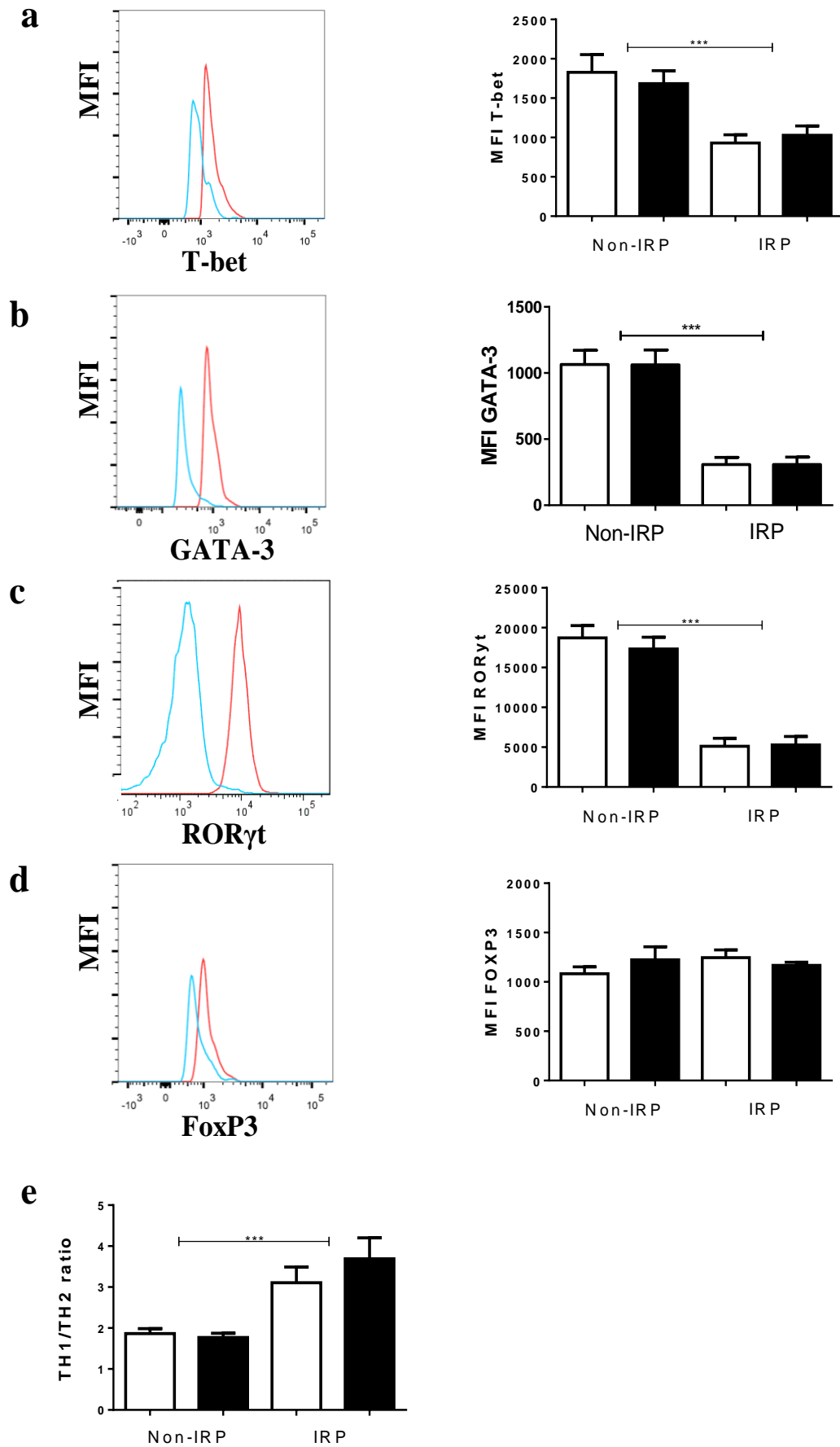


Figure 3



3.CAPÍTULO 3

3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo analisamos populações de linfócitos T circulantes no sangue periférico, expressão de fatores de transcrição e concentração de citocinas após estimulação *in vitro* com os anticorpos anti-CD3/CD28 por 24h, em pacientes com mais de 60 anos divididos em 2 grupos de acordo com sua razão de células CD4/CD8 e soropositividade para CMV - IRP.

Este trabalho foi o primeiro a comparar fenótipos transcricionais em células T CD4+ entre idosos com e sem perfil de risco. Nossa idéia para este trabalho foi contribuir para elucidar os mecanismos que levam à imunosenescência. Particularmente no caso das células T CD4+, os estudos até esta data focaram na quantidade diminuída das células, ou na baixa capacidade de proliferação em resposta a desafios.

Os resultados apresentados aqui representam apenas uma fração dos obtidos durante a execução do projeto financiado pelo Edital FAPERGS-SUS de 2010. Nesse projeto, sangue de mais de 500 idosos foi coletado, as células mononucleares isoladas e criopreservadas, criando um acervo de material biológico de valor inestimável para o estudo dos processos afetados na resposta imune durante o envelhecimento. O objetivo do grande projeto foi identificar a população idosa em risco imunológico no sul do Brasil, e desenvolver um teste para o Sistema Único de Saúde. Este projeto ainda está em andamento, pois uma parcela desses 500 indivíduos foi acompanhada pelo nosso grupo após a vacinação para gripe sazonal, e estaremos agora analisando a eficácia da vacina nesse grupo, desafiando as células *in vitro* com a vacina, analisando a resposta T, e correlacionando os achados com outros parâmetros transcricionais e de sinalização intracelular, tentando montar um panorama mais completo das alterações funcionais nos linfócitos T dos pacientes em risco e seu impacto na resposta à imunização. Os resultados do estudo são importantes para fornecer ao Governo Federal ferramentas para o planejamento de políticas públicas de amparo à população idosa no Brasil.

Em nosso estudo, inicialmente analisamos subpopulações de células já descritas em estudos de idosos de outros países que se mostraram relacionadas com perfil de risco. Perguntamos se a população do Brasil, um país em desenvolvimento, também se comportaria da mesma forma. Um achado interessante foi que a média de idade dos nossos idosos do SUS participantes do estudo em perfil de risco ficou mais baixa do que a descrita pela literatura para perfil de risco. Mas as mesmas subpopulações celulares *naive* e de memória descritas nos estudos em idosos de países desenvolvidos foram encontradas aqui. Na nossa população com perfil de risco foi observado um aumento na porcentagem das

células T CD8+CD28- e de células CD8+PD-1+, associadas com exaustão de função T, mais uma vez confirmando a associação de infecção pelo citomegalovírus e a expansão dessa população.

Quando as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) dos pacientes foram posteriormente estimuladas em cultura e foram analisados os fatores de transcrição presentes nas células e as concentrações de citocinas presentes no sobrenadante da cultura, foi constatado que a população com perfil de risco não diferiu da população sem perfil de risco quanto à porcentagem de células T auxiliar (TH). Entretanto, os fatores canônicos de transcrição associados com os principais fenótipos de células TH (T-bet, GATA-3 e ROR γ t) apresentaram expressão diminuída nas células T CD4+ dos pacientes com perfil de risco. Apenas a expressão de FoxP3 apresentou um padrão inverso, estando aumentada nos pacientes com perfil de risco. Embora ainda não se conheça o real impacto que essas alterações transcricionais tenham sobre a função das células T CD4+ nesses pacientes, pode-se especular que a diminuição da expressão dos fatores canônicos de diferenciação acarrete prejuízo da capacidade de ação das células TH. Alternativamente, isso pode refletir problemas na sinalização decorrente do engajamento do receptor de célula T (TCR) nessas células. Pretendemos investigar futuramente essas duas hipóteses, mas de qualquer modo podemos prever que tais alterações tenham impacto e sobre diferentes compartimentos do sistema imune dos pacientes em perfil de risco, uma vez que as células TH regulam a função de diversas outras células do sistema imune para montar uma resposta eficaz.

Curiosamente, não detectamos impacto dessas alterações sobre a produção de IL-2, IL-4, IL-6, INF- γ e TNF- α nos pacientes com risco imune, a não ser um aumento na produção de IL-10 nessa população. O estímulo utilizado aqui (anticorpos anti-CD3 e anti-CD28) é extremamente potente. Contudo, essa amostra de PBMCs inclui também outros tipos celulares, como linfócitos B e monócitos. Estudos futuros necessitam correlacionar as alterações transcricionais com a produção das citocinas nas células T isoladas.

Esses pacientes idosos serão acompanhados até o término do projeto para avaliação de morbidade e de mortalidade. E esses resultados também serão correlacionados com os perfis imunológicos encontrados. Dessa forma pretendemos interligar nossos achados para que possamos auxiliar de uma maneira mais efetiva nossos idosos e auxiliar também o SUS na detecção dos pacientes com sistema imune mais vulnerável.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, A.; AGRAWAL, S. *et al.* **Biology of dendritic cells in aging.** J Clin Immunol. 28(1):14-20. 2008.

AGRAWAL, A. & GUPTA, S. **Impact of aging on dendritic cell functions in humans.** Ageing Res Rev. 10(3):336-345. 2011.

AKBAR, A. N.; BEVERLEY, P.C. e SALMON, M. **Will telomere erosion lead to a loss of T-cell memory?** Nat Rev Immunol. 4:737-743. 2004.

AKUTHOTA, P., UEKI, S. *et al.* **Human Eosinophils Express Functional CCR7.** AJRCMB. 2013.

ARNOLD, C.; WOLF, J. *et al.* **Gain and Loss of T Cell Subsets in Old Age—Age-Related Reshaping of the T Cell Repertoire.** J. Clin. Immunol. 31:137-146. 2011.

AW, D.; SILVA, A.B. e PALMER, D.B. **Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population.** Immunology. 120:435-46. 2007.

AWASTHI, A. e KUCHROO, V. K. **Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection.** Int Immunol. 21(5):489-98. 2009.

CASADO, J.G.; DELAROSA, O. *et al.* **Correlation of effector function with phenotype and cell division after in vitro differentiation of naïve MART-I-specific CD8+ T cells.** Int Immunol. 21:53-62. 2009.

CHEN, W.H.; KOZLOVSKY, B.F. *et al.* **Vaccination in the elderly: an immunological perspective.** Trends Immunol. 30(7):351-9. 2009.

CHONG, Y.; IKEMATSU, H. *et al.* **CD27(+) (memory)B cell decrease and apoptosis-resistant CD27(-) (naive) B cell increase in aged humans: implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances.** Int Immunol. 17: 383. 2005.

COHEN, S.; JANICKI-DEVERTS, D. *et al.* **Association between telomere length and experimentally induced upper respiratory viral infection in healthy adults.** JAMA.309(7):699-705. 2013.

DETANICO, T., RODRIGUES, L. *et al.* **Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation.** Clin Exp Immunol. 135(2):336-342. 2004.

EFFROS, R. **Kleemeier Award Lecture 2008 — The Canary in the Coal Mine: Telomeres and Human Healthspan.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 64(5):A 511–515. 2009.

FERGUSON, F.G.; WIKBY, A. *et al.* **Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 50(6):B378-382. 1995.

FORTIN, C.F.; McDONALD, P.P. *et al.* **Aging and neutrophils: there is still much to do.** Rejuvenation Res. 11(5):873-882. 2008.

FRANCESCHI, C.; BONAFE, M. *et al.* **Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence.** Ann NY Acad Sci. 908:244–54. 2000.

FULOP, T., KOTB, R. *et al.* **Potential role of immunosenescence in cancer Development.** Annals of the New York Academy of Sciences. 2010.

FULOP, T.; LARBI, A. *et al.* **Aging, Immunity, and Cancer.** Discovery Medicine. 11(61): 537-550. 2011.

FULOP, T. *et al.* **T cell response in aging: influence of cellular cholesterol modulation.** Adv. Exp. Med. Biol. 584:157-169. 2006.

EGINAT, J.; SALLUSTO, F. e LANZAVECCHIA, A. **Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory and effector memory CD4+ T cells.** Pathologie Biologie 51: 64–66. 2003.

GOMEZ, C.R.; NOMELLINI, V. *et al.* **Innate immunity and aging.** *Exp Gerontol.* 43(8):718-728. 2008.

GORONZY, J. J. e WEYAND, C.M. **Tcell development and receptor diversity during aging.** *Curr Opin Immunol.* 17:468. 2005.

HENDRICKS, D. W. e FINK, P. J. **Recent thymic emigrants are biased against the T-helper type 1 and toward the T-helper type 2 effector lineage.** *Blood.* 117: 1239-1249. 2011.

HENSON, S. M.; RIDDELL, N. E. e AKBAR, A. N. **Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression.** *Curr Opin Immunol.* 24:476–481. 2012.

HOFMEYER, K. A.; JEON, H. e ZANG, X. **The PD-1/PD-L1 (B7-H1) Pathway in Chronic Infection-Induced Cytotoxic T Lymphocyte Exhaustion.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2011.

IBGE. **Síntese de Indicadores Sociais: Uma Análise das Condições de Vida da População Brasileira.** Estudos e Pesquisas Informação Demográfica e Socioeconômica 27. Rio de Janeiro. 2010.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS,P. *et al.* **Immunobiology: the immune system in health and disease.** 6th ed. Garland Science Publishing. 2005.

JING, Y.; SHAHEEN, E. *et al.* **Aging is associated with a numerical and functional decline in plasmacytoid dendritic cells, whereas myeloid dendritic cells are relatively unaltered in human peripheral blood.** *Hum Immunol.* 70(10):777-784. 2009.

KHAN, N.; SHARIFF, N. *et al.* **Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals.** *J Immunol.* 169(4):1984-92. 2002.

KOGUT, I.; SCHOLZ, J. L. *et al.* **B cell maintenance and function in aging.** *Seminars in Immunology.* 24:342–349. 2012.

KRISHNARAJ, R. **Senescence and cytokines modulate the NK cell expression.** *Mech Age Dev.* 96:89-101. 1997.

LARBI, A.; DUPUIS, G. *et al.* **Differential role of lipid rafts in the functions of CD4+ and CD8+ human T lymphocytes with aging.** *Cell Signal.* 18(7):1017-1030. 2006.

LAZUARDI, L.; JENEWEIN, B. *et al.* **Age-related loss of naive T cells and dysregulation of T-cell/B-cell interactions in human lymph nodes.** *Immunology* 114: 137. 2005.

LIGTHART, G.J. *et al.* **Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol.** *Mechanisms of Ageing and Development.* v. 28: 47-55. 1984.

LIGTHART, G.J. *et al.* **Necessity of the assessment of health status in human immunogerontological studies: evaluation of the SENIEUR protocol.** *Mechanisms of Ageing and Development.* v. 55:89-98, 1990.

MEHR, R. e MELAMED, D. **Reversing B cell aging.** *Aging.* V. 3:438-443. 2011.

MOCCHIGIANI, E.; GIACCONI, R. *et al.* **NK and NKT cells in aging and longevity: role of zinc and metallothioneins.** *J Clin Immunol.* 29(4):416-425. 2009.

MOCCHIGIANI, E. e MALAVOLTA, M. **NK and NKT cell functions in immunosenescence.** *Aging Cell.* 3(4):177-184. 2004.

MOTA, S.; PORTO, D. e NOGUEIRA, M. **Immunosenescence: imunological changes in the elderly.** Editora Moreira Jr. 2009.

NOVAES, M. R.; ITO, M.K. *et al.* **Micronutrients supplementation during the senescence.** *Rev Nutr.* 18(3):367-76. 2005.

- PANDA, A.; ARJONA, A. *et al.* **Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age.** Trends Immunol. 30(7):325-333. 2009.
- PAWELEC, G.; DERHOVANESSIAN, E. e LARBI, A. **Immunosenescence and Cancer.** Oncology/ Hematology. 2010.
- PEAKMAN, M. e VERGANI, D. **Basic and clinical immunology.** London: Churchill Livingstone. 1997.
- PERES, A.; NARDI, N. e CHIES, J. B. **Imunossenescência – O Envolvimento das células T no Envelhecimento.** BIOCIENTÍCIAS, Porto Alegre, v. 11:187-194. 2003.
- PITA-LOPES, M.; GAYOSO, I. *et al.* **Effect of ageing on CMV-specific CD8 T cells from CMV seropositive healthy donors.** Imunity & Ageing. 2009.
- RUDENSKY, A. Y. **Regulatory T cells and Foxp3.** Immunol Rev 241(1):260-268. 2011.
- SAURWEIN-TEISSL, M.; LUNG, T.L. *et al.* **Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines.** J Immunol. 168(11):5893–5899. 2002.
- SCHLUNS, K.S.; KIEPER, W.C. *et al.* **Interleukin- 7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo.** Nat Immunol.1(5):426–432. 2000.
- SCHWAIGER, S.; WOLF, A.M. *et al.* **IL-4-producing CD8+ T cells with a CD62L++(bright) phenotype accumulate in a subgroup of older adults and are associated with the maintenance of intact humoral immunity in old age.** J Immunol 170:613. 2003.
- SIMPSON, R. e GUY, K. **Coupling Aging Immunity with a Sedentary Lifestyle: Has the Damage Already Been Done? – A Mini-Review.** Gerontology. 56:449–458. 2010.

SOLANA, R.; TARAZONA, R. *et al.* **Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans.** *Seminars in Immunology* 24: 331– 341. 2012.

STRINDHALL, J.; NILSSON, B. *et al.* **No Immune Risk Profile among individuals who reach 100 years of age: Findings from the Swedish NONA immune longitudinal study.** *ScienceDirect*. 42:753-761. 2007.

SUN, L. HUREZ, V.J. *et al.* **Aged regulatory T cells protect from autoimmune inflammation despite reduced STAT3 activation and decreased constraint of IL-17 producing T cells.** *Aging Cell*. 11,509–519. 2012.

TSAKNARIDIS, L.; SPENCER, L. *et al.* **Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity.** *J. Neurosci Res*. 74:296. 2003.

van DUIN, D.; MOHANTY, S. *et al.* **Age-associated defect in human TLR-1/2 function.** *J Immunol* 178(2):970-975, 2007.

VASTO, S.; MALAVOLTA, M. & PAWELEC, G. **Age and immunity.** *Immun Ageing* 3(2):1-6. 2006.

VIGANO, S.; PERREAU, M. *et al.* **Positive and Negative Regulation of Cellular Immune Responses in Physiologic Conditions and Diseases.** *Clinical and Developmental Immunology*. 2012.

WEISKOPF, D. WEINBERGUER, B. & GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. **The Aging of the immune system.** *Transplante Internacional. Review*. 2009.

WEKSLER, M.E. & SZABO, P. **The effect of age on the B-cell repertoire.** *J Clin Immunol* 20: 240. 2000.

YOUNGBLOOD, B.; WHERRY, E. J. e AHMED, R. **Acquired Transcriptional Programming in Functional and Exhausted Virus-specific CD8 T Cells.** *Curr Opin HIV*. 7(1): 50–57. 2012.

ZHU, J. and Paul, W. E. **CD4 T cells: fates, functions, and faults.** *Blood.* 112(5):1557-1569 2008.

ZHU, J.; YAMANE, H. e PAUL, W.E. **Differentiation of effector CD4 T cell populations.** *Annu Rev Immunol* 28:445–489. 2010.

ZIELINSKI, C.; CORTI, D. *et al.* **Dissecting the human immunologic memory for pathogens.** *Immunological Reviews.* 2011.