

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Diego Del Duca Lima

**ANÁLISE DA RELAÇÃO DE
SOROPOSITIVIDADE PARA
CITOMEGALOVÍRUS E O PERFIL DE
LINFÓCITOS T EM INDIVÍDUOS COM
SOBREPESO OU OBESIDADE**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2023

Diego Del Duca Lima

ANÁLISE DA RELAÇÃO DE SOROPOSITIVIDADE PARA CITOMEGALOVÍRUS E O PERFIL DE LINFÓCITOS T EM INDIVÍDUOS COM SOBREPESO OU OBESIDADE

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do grau
de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Rodrigues Júnior
Co-orientador: Profa. Dra. Alessandra Peres

**Porto Alegre
2023**

Catálogo na Publicação

Lima, Diego Del Duca

ANÁLISE DA RELAÇÃO DE SOROPOSITIVIDADE PARA
CITOMEGALOVÍRUS E O PERFIL DE LINFÓCITOS T EM INDIVÍDUOS
COM SOBREPESO OU OBESIDADE / Diego Del Duca Lima. --
2023.

54 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de
Pós-Graduação em BioCiências, 2023.

Orientador(a): Luiz Carlos Rodrigues Junior ;
coorientador(a): Alessandra Peres.

1. obesidade. 2. infecção. 3. HCMV. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

**ANÁLISE DA RELAÇÃO DE SOROPOSITIVIDADE PARA CITOMEGALOVÍRUS E O
PERFIL DE LINFÓCITOS T EM INDIVÍDUOS COM SOBREPESO OU OBESIDADE**

Diego Del Duca Lima
Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Rodrigues Júnior
Co-orientador: Profa. Dra. Alessandra Peres

RESUMO

O citomegalovírus humano (HCMV) ou herpes vírus humano tipo 5 (HHV-5) é um vírus altamente prevalente na espécie humana, sendo endêmico em todo o mundo, estando envolvido em inúmeras doenças leves ou severas. Após a primeira infecção, o HCMV permanece em estado de latência no hospedeiro, a partir do qual pode ser reativado quando ocorre uma baixa na resposta imunológica ou em situações de estresse. Estudos recentes indicam que o processo inflamatório pode estar associado a reativação do HCMV no hospedeiro. A obesidade é um problema mundial relacionado a um quadro inflamatório crônico e subclínico, devido a produção de citocinas e células com perfil inflamatório, predispondo pacientes obesos ao desenvolvimento de uma série de doenças crônicas. Um indivíduo obeso, e no curso de uma reativação de HCMV pode apresentar características diferenciadas no processo inflamatório, caracterizadas por um sinergismo da resposta antiviral e inflamação. Assim, nesse estudo foi realizada uma análise da soropositividade para HCMV em indivíduos com diferentes níveis de sobrepeso, e sua relação com parâmetros bioquímicos, inflamatórios e os marcadores fenotípicos de ativação linfocitária. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da UFCSPA com o número 63282416.6.0000.5345. Os dados foram obtidos a partir de um banco de dados com 113 indivíduos que foram classificados em eutróficos, sobrepeso e obesos de acordo com o IMC. Todos os participantes eram do sexo masculino com média de idade de 34,72 anos. Foram avaliados dados relacionados ao perfil bioquímico como glicose, triglicerídeos, colesterol, HDL e LDL ao perfil fenotípico de células T de acordo com os marcadores+, CD4, CD8, CD4+CD25+CD39+, CD4+CD25-CD39+, CD8+CD27+CD28+, CD8+CD27-CD28-Os resultados indicam que a presença do HCMV contribui para um aumento na frequência das células T de memória altamente diferenciadas, com fenótipo senescente, os indivíduos com sobrepeso e obesidade.

ABSTRACT

The human cytomegalovirus (HCMV) or human herpes virus type 5 (HHV-5) is a highly prevalent virus in humans and is endemic worldwide, involved in numerous mild or severe diseases. After the first infection, HCMV remains in a state of latency in the host, which can be reactivated when there is a drop in the immune response or stressful situations. Recent studies indicate that the inflammatory process may be associated with HCMV reactivation in the host. Obesity is a worldwide problem related to a chronic and subclinical inflammatory condition due to the production of molecules and cells with an inflammatory profile, predisposing obese patients to develop a series of chronic diseases. An obese individual during HCMV reactivation may present different characteristics in the inflammatory process, characterized by synergism of antiviral response and inflammation. Therefore, this study analyzed HCMV seropositivity in individuals with varying levels of overweight and its relationship with biochemical and inflammatory parameters and phenotypic markers of lymphocyte activation. UFCSPA Ethics Council approved the project under the number 63282416.6.0000.5345. The data was obtained from a database of 113 individuals classified as eutrophic, overweight, and obese according to BMI. All participants were male, with a mean age of 34.72 years. Data related to the biochemical profile such as glucose, triglycerides, cholesterol, HDL, and LDL and the phenotypic profile of T cells according to markers+, CD4, CD8, CD4+CD25+CD39+, CD4+CD25-CD39+, CD8+CD27+CD28+, CD8+CD27-CD28- were evaluated. The results indicate that the presence of HCMV contributes to the increasing in the frequency of highly differentiated memory T cells with senescent phenotype, in overweight and obese individuals.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMV - Citomegalovírus
CRP - Proteína C reativa
DAMP – Danger associated molecular pattern (padrão molecular associado **DCs** - Células dendríticas
dCTLs - Células T citotóxicas diferenciadas
DNA - Ácido desoxirribonucleico
dsRNAs - Ácido ribonucleico de fita dupla (duble strain RNA- RiboNucleic Acid)
FR - Fatores de restrição antivirais
HCMV - Citomegalovírus humano
HHV - Herpesvírus humano
ICAM - Moléculas de adesão intercelular
IE1 - Proteína imediata 1 (Immediate early protein)
IL-1 - Interleucina 1
IL-12 - Interleucina 12
IL-15 - Interleucina 15
IL-18 - Interleucina 18
IL-6 - Interleucina 6
IMC - Índice de massa corporal
IRF3 - Fator regulatório de interferon 3
IRI - Lesão de isquemia-reperfusão
MIP 1 - Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 α
NF κ B - Fator nuclear kappa B (Nuclear factor kappa B)
NK - Células Natural killer
NLRs - nucleotide like receptors
NOD - nucleotide binding oligomerization-domain protein
ORFs - Fase de leitura aberta
PAMP – Pathogen associated molecular pattern (padrão molecular associado a patógenos)
RI - Resistência à insulina
RIPK2 - Serina/proteína treonina quinase 2
ROS - Espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species)
SASP - Fenótipos associados a senescência (Senescence Associated Secretory Phenotype)
SCT - Transplante de células tronco hematopoiéticas
SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida
SM - Síndrome metabólica
SOT - Transplante de órgãos sólidos
SREBP - Sterol Regulatory Element Binding Protein
Tcm - Células T de memória central
Tem - Células T de memória efetora
TLR2 - Receptor do tipo Toll 2
TLR9 - Receptor do tipo Toll 9
TLRs - Receptor do tipo Toll (Toll like receptors)
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
Tregs - Células T residentes de memória
UTI - Unidade de terapia intensiva

Sumário

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 Obesidade: epidemiologia etiologia.....	6
1.2 Inflamação.....	7
1.3 Obesidade e inflamação.....	10
1.4 Citomegalovírus	12
1.5 Imunidade ao HCMV	14
1.6 Expressão das moléculas co-estimulatórias CD27 e CD28 em linfócitos T na resposta imune ao HCMV	18
1.7 Alterações imunológicas em indivíduos com sobrepeso/obeso relacionadas a infecção por HCMV	19
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ARTIGO CIENTÍFICO	32

Prezado leitor,

Essa dissertação será apresentada no formato de artigo científico. A primeira parte é constituída por uma revisão bibliográfica dos aspectos epidemiológicos e fisiopatológicos da obesidade, com ênfase no processo inflamatório e . Na segunda parte foi adicionado o manuscrito Anti-herpetic activity evaluation of Salvia uliginosa exudate and Icetexone diterpene, conforme normas estruturais da revista científica Phytomedicine (normas no link abaixo). A terceira parte é constituída pela discussão com informações adicionais, não apresentadas no artigo, e conclusão final.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade: epidemiologia etiologia

Nos anos 80, a obesidade começou a tomar relevância e destaque como um importante problema de saúde pública, no que diz respeito aos aspectos sócio culturais, demográficos e epidemiológicos (1). Desde então, a América Latina vem passando por transformações epidemiológicas e nutricionais, demonstrando um aumento na população de indivíduos com sobrepeso e obesidade. Acredita-se que esta mudança no índice de massa corporal (IMC) esteja relacionada a mudanças sócio culturais, como industrialização, sedentarismo e hábitos alimentares (2).

A medida de massa corporal, juntamente com a distribuição de gordura, tem-se demonstrado como um forte preditivo de saúde. O IMC é calculado pela divisão do peso (em kg) pela altura (em metros) elevada ao quadrado, kg/m^2 , sendo o cálculo mais usado para avaliação da adiposidade corporal. Convenciona-se chamar como excesso de peso o IMC maior ou igual a 25 kg/m^2 e este excesso de peso pode ser dividido em sobrepeso, quando o IMC está entre 25 a $29,9 \text{ kg/m}^2$ e obesidade quando o IMC é maior ou igual a 30 kg/m^2 (3).

A obesidade é definida como uma condição em que a massa corporal encontra-se desproporcional para a altura, com acúmulo excessivo de tecido adiposo associado a um estilo de vida sedentário e consumo energético excessivo. No entanto, a etiologia da obesidade é complexa e multifatorial, resultando da interação de genes, ambiente, estilos de vida e fatores emocionais (4).

No Brasil, a obesidade aumentou 72% nos últimos anos. Dados de 2006 estimaram que em torno de 11,8% da população era obesa, já em 2019 esse percentual foi para 20,3%. A frequência entre os gêneros é semelhante (homens 57,1% e mulheres 53,9 para excesso de peso e 18,7% e 20,7% para obesidade respectivamente). De acordo com o estudo publicado por Vigitel, as maiores frequências de excesso de peso são observadas entre homens, na cidade de Campo Grande (63,7%) e Porto Alegre (63%), enquanto as menores frequências de excesso de peso, entre homens, ocorrem em Salvador (47,2%) e Vitória (50,6%). A frequência dessa condição aumenta com a idade até os 44 anos e apresenta relação com menor nível de escolaridade. Entre as mulheres, a frequência do excesso de peso aumenta com a idade até os 64 anos e diminui notavelmente com o aumento da escolaridade (5).

Por fim, quando se considera aspectos específicos da saúde do indivíduo, a obesidade está relacionada com diversas alterações celulares, hormonais e fisiológicas. Entre as alterações a manutenção de um estado inflamatório crônico de baixo grau se destaca quando se relaciona com as comorbidades associadas como doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (6). Assim, existe uma correlação forte entre o acúmulo e gordura e o estado inflamatório do indivíduo.

1.2 Inflamação

A resposta inflamatória é um processo fisiológico de proteção ao organismo frente a uma infecção, injúria tecidual ou mau funcionamento de um órgão ou tecido. Caracteriza-se por um processo complexo de adaptação e recuperação frente às agressões que podem variar de agentes biológicos a traumas mecânicos. O objetivo do processo inflamatório é o de eliminar o agente patogênico, ou sinalizar um dano asséptico, reparar o dano tecidual ou uma adaptação ao estresse gerado para o reestabelecimento da homeostase (7). A inflamação, de acordo com o seu tempo de resolução é classificada em aguda ou crônica, sendo que elas também se diferenciam-se quanto aos seus aspectos de sinalização e mediadores (8).

A inflamação é caracterizada pelo acúmulo de leucócitos, proteínas plasmáticas e fluidos derivados do sangue na região extravascular, após um estímulo. O processo inflamatório inicia após o reconhecimento da infecção ou dano por células residentes como macrófagos e mastócitos, os quais liberam citocinas que conduzem a dinâmica da inflamação. Os indutores do processo inflamatório podem ser exógenos ou endógenos. Os exógenos são microrganismos, produtos de origem microbiana – padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ou alérgenos (9). Por outro lado, os endógenos podem ser produtos resultantes do dano e estresse celular, assim como mal funcionamento de órgãos ou tecidos. Já os DAMPs (Padrão Molecular Associado ao Dano) pode ter origem a partir de sinais liberados pelo estresse, células mortas, proteínas intracelulares como a *high mobility group box-1* (HMGB-1), ácido úrico, ATP e K⁺ extracelular, são todos exemplos de indutores endógenos (10).

Sequencialmente, após a ativação por um indutor exógeno ou endógeno são liberados os mediadores da resposta inflamatória. Esses mediadores sinalizam e orquestram o sistema de forma a promover alterações celulares funcionais e a migração de elementos para a resposta. Eles podem ser classificados em sete grupos, de acordo com suas propriedades bioquímicas: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos,

fragmentos do sistema complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas. Como exemplo de aminas vasoativas pode-se citar a histamina e a serotonina, como mediadores lipídicos são encontrados os eicosanóides, o fator ativador de plaquetas e os derivados do ácido araquidônico, no grupo de citocinas com ação na inflamação encontram-se a IL-1 β , o TNF- α e IL-6, principalmente, e como quimiocinas pode-se destacar a CXCL-8 e o RANTES, já dentre as enzimas proteolíticas destacam-se as metaloproteinases, catepsinas e elastinas (7).

Sequencialmente, após a liberação dos primeiros mediadores inflamatórios produzidos ocorre o recrutamento e ativação de células do sistema imunológico. Na infamação, os neutrófilos são as primeiras células a cruzarem o vaso por migração endotelial. Eles fazem fagocitose e produzem espécies reativas de oxigênio, que servem como agentes de combate ao agressor, entretanto também são deletérios para o indivíduo (11). Se os neutrófilos não conseguirem resolver o processo eles morrem por apoptose. Neste momento, entram em ação os macrófagos, que são células que fazem fagocitose, produzem mais citocinas inflamatórias e têm a capacidade de apresentar antígenos para os linfócitos T. Os macrófagos que são inicialmente induzidos nesse processo são denominados de clássicos ou M1, essas células produzem citocinas inflamatórias, e passam a expressar moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86. Eles têm um papel resolutivo ao ataque ou injúria tecidual. Uma vez que o agente agressor é removido ou resolvido, a sinalização local modifica o padrão das citocinas passando para um perfil anti-inflamatório como IL-4 e IL-10. O macrófago aumenta a produção de arginase-1 e receptor de manose (CD206), assumindo um fenótipo alternativo, denominado M2. Os macrófagos M2 têm uma função de reconstituir os danos locais causados pela ação de neutrófilos, macrófagos e o agente agressor, caracterizando o fim do processo inflamatório (12,13). Na figura 1 é apresentada uma representação esquemática dos eventos envolvidos no processo inflamatório.

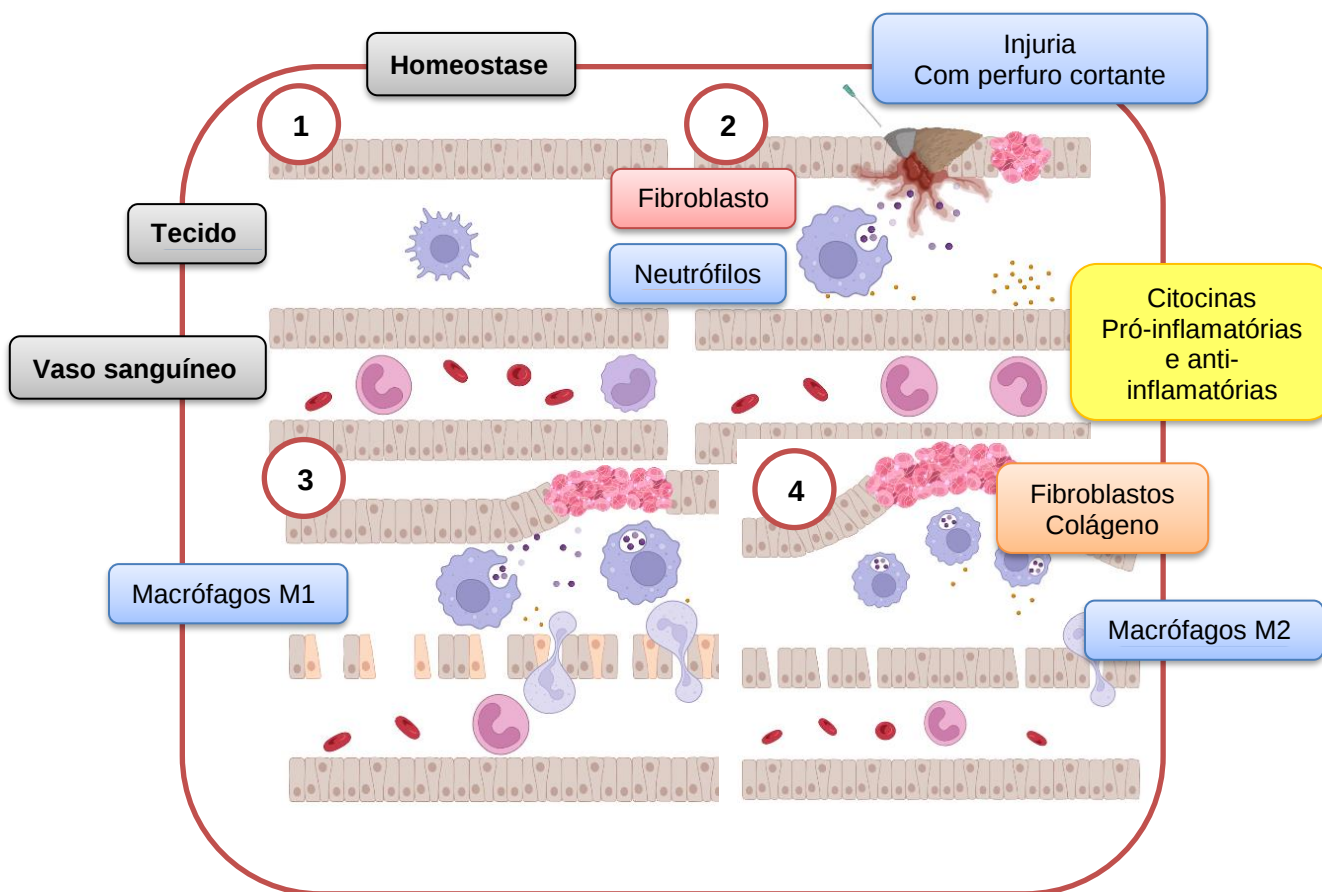


Figura 1: Sequência de eventos do processo inflamatório. O reparo de um dano à barreira epitelial é um processo complexo e organizado por células residentes, o recrutamento de células imunes, que juntamente contribuem para a defesa do tecido, ligado intimamente com a homeostase e restauração de uma injúria. O momento 1 da figura representa uma situação de homeostase, com fluxo regular de células. No momento 2 é dada a injúria, representada pelo bisel de uma agulha, acúmulo de elementos externos como bactérias e outros microrganismos. Os neutrófilos são os primeiros a responderem ao dano na pele. Eliminam as bactérias presentes no sítio da injúria limitando a infecção, secretam $\text{TNF-}\alpha$, estimulando a proliferação de fibroblastos e angiogênese. No momento 3 tem-se um feedback positivo, sinalizado por citocinas inflamatórias, resultando em moléculas para reparo tecidual obtido através do resultado da ativação de linfócitos, associados a macrófagos e neutrófilos, acelerando a resolução da inflamação no sítio da injúria. No momento 4 estão presentes os sinais pró-reparo, sinalizam para os macrófagos assumirem uma polarização para fenótipo M2, limpando neutrófilos apoptóticos e partículas utilizadas como feedback, na intenção de suprimir o recrutamento de outros neutrófilos. Ocorre a secreção de $\text{TGF-}\beta$, estimulando a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, responsáveis pela produção de colágeno, sendo assim capaz de dar suporte estrutural para a cura e reconstrução do epitélio. Fonte: imagem do próprio autor montada no Biorender.

1.3 Obesidade e inflamação

Até a década de 60, o tecido adiposo era considerado meramente um depósito de energia no organismo. A descoberta de que vias metabólicas do tecido adiposo eram muito ativas e que poderiam ser estimuladas/inibidas no estado alimentado e jejum, por alterações hormonais e neurais, modificou este conceito. Em 1990, Friedman e colaboradores descobriram a primeira citocina derivada dos adipócitos, a leptina, que atua em resposta às mudanças no estado nutricional do indivíduo. Atualmente, é bem descrito o papel do tecido adiposo como secretor de hormônios e citocinas além de metabólitos que controlam o equilíbrio energético sistêmico (14,15). Como citado anteriormente, a obesidade é acompanhada de um estado inflamatório sistêmico de baixo grau leve ou crônico (4), isso se deve à capacidade do tecido adiposo em secretar substâncias que contribuem para o estado inflamatório. De maneira natural, os adipócitos expandem em tamanho e número para armazenar lipídios. No entanto, na ocorrência de balanço energético positivo sustentado a longo prazo, essas células atingem um limite de expansão. Esta situação cria estresse sobre os adipócitos, e em resposta a esta condição, inicia-se a inflamação. Os iniciadores desta inflamação ainda são pouco compreendidos, no entanto estudos revelam potenciais mecanismos que explicam este cenário (16,17). A liberação de citocinas e interleucinas pró-inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina 1 beta (IL-1 β) já foi descrita no tecido adiposo (16,18). O tecido adiposo magro é caracterizado pela presença de componentes imunes como as células T auxiliares 2 (Th2) e macrófagos M2, de fenótipo anti-inflamatório. Já no tecido adiposo obeso, ocorre presença predominante de células T auxiliares 1 (Th1) e macrófagos M1. A presença de macrófagos M1 é característica do tecido adiposo, e se comportam de maneira diferente que macrófagos M2, pois apresentam a expressão amplificada de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo dos lipídios, além disso essas células estão fortemente envolvidas com o desenvolvimento de resistência à insulina (RI) e síndrome metabólica (SM) (19,20). Situações como a hipóxia e a necrose tecidual, originadas na obesidade, devido ao aumento dos adipócitos, contribuem para o processo de sinalização e recrutamento dos macrófagos e sua polarização para M1, tornando um estímulo constante de ativação, fazendo com que citocinas inflamatórias sejam secretadas continuamente (21). Um esquema de como estes fatores se relacionam para o desenvolvimento da resistência à insulina está apresentado na Figura 2.

Na obesidade, ocorre a presença de componentes inflamatórios, que são compartilhados com maioria das doenças crônicas, sendo a ligação do tecido adiposo e o sistema imune a chave para a inflamação crônica (22). A presença TNF- α , IL-6, ou proteína C reativa (PCR), em níveis alterados, são caracterizados como marcadores de inflamação presentes na obesidade, bem como em sobrepeso (23). Estes marcadores inflamatórios também estão correlacionados a RI, síndrome metabólica e chances aumentadas de eventos cardiovasculares (24). Os adipócitos dividem a origem embrionária com células imunológicas(22). Recentemente, células imaturas hematopoiéticas foram encontradas no tecido adiposo, sugerindo um local comum para amadurecimento e especialização desses precursores celulares(25). Essas características indicam uma estreita relação entre os adipócitos e o sistema hematopoiético, o que indica que essas células podem ter funções e sinalizações complementares ou semelhantes(26). Os adipócitos têm protagonismo no processo de RI, uma vez que a hipertrofia dessas células, ou aumento de sua quantidade, resulta em mais ácidos graxos locais, aumentando o dano tecidual, bem como condições desfavoráveis, como a hipóxia. Esses, eventos podem resultar em processo inflamatório crônico, que por sua vez estimula a ação coadjuvante dos macrófagos M1, proporcionando a produção de mais citocinas pró-inflamatórias, dando feedback positivo para produção de mais inflamação e RI (27,28).

Além de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), como DM2, RI e doenças cardiovasculares (DCV), o tecido adiposo inflamado contribui para uma maior susceptibilidade a infecções virais e bacterianas, como por exemplo, o HCMV (29). Adipócitos infectados *in vitro* com CMV aumentam a produção de IL-6, o que contribui para o estado inflamatório de baixo grau (30). Nesse contexto, a migração de células para o sítio da inflamação, aumento da expressão de alguns receptores celulares e entrada de células em ciclo celular, também proposta pela inflamação, pode facilitar a entrada e a reprodução viral.

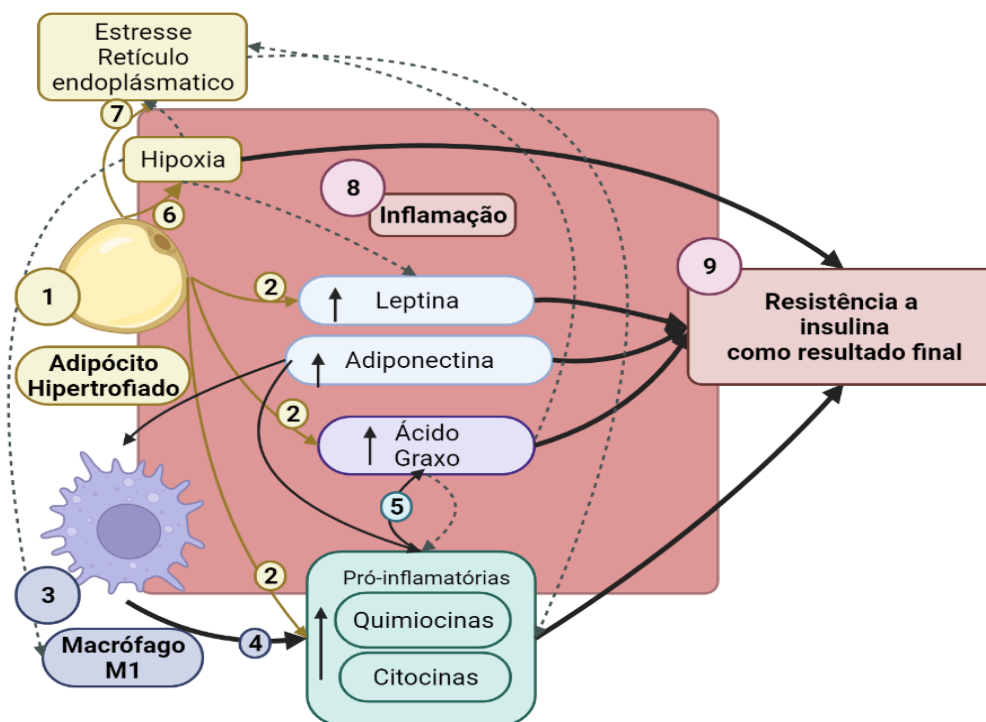


Figura 2: Resistência à insulina mediada por adipócitos: Em uma situação de hipertrofia do adipócito (1), há um aumento de secreção de adipocinas, citocinas e ácidos graxos (2), o que afeta a atividade dos macrófagos (3), neste contexto, isso proporciona o aumento de citocinas pró-inflamatórias (4) que estimulam a lipólise dos adipócitos (5). Os adipócitos são desafiados à hipóxia (6) e estresse celular (7), aumentando a resposta inflamatória no local (8) com isso gerando uma disfunção do adipócito, bem como alterações metabólicas, especialmente RI (9). Fonte: imagem do próprio autor montada no Biorender.

1.4 Citomegalovírus

O HCMV, também denominado herpesvírus humano tipo 5 (HHV-5) (31), utiliza o ser humano como hospedeiro natural, ele se apresenta de forma crônica/latente em indivíduos imunocompetentes, e de forma aguda nos imunodeprimidos (32). Esse vírus possui afinidade especial pelas glândulas salivares e endócrinas, e pode infectar diversos órgãos (pulmões, fígado, pâncreas, rins e cérebro), resultando no desenvolvimento de inclusões nucleares características (inclusões citomegálicas). Estima-se que 83% da população mundial seja soropositiva para HCMV, sendo que a taxa mais alta de prevalência ocorre na região do mediterrâneo oriental, 90%, e a mais baixa na região europeia, de aproximadamente 66% (33). Uma revisão mais completa, realizada por Cannon, Schimidit e Hyde mostrou que mulheres, principalmente as não brancas, e pessoas com baixo nível econômico, apresentam maior probabilidade de soropositividade

para HCMV(34). Recentemente um estudo avaliou a soroprevalência de HCMV no Brasil a partir de diferentes grupos de indivíduos (gestantes, neonatos, pacientes pediátricos, transplantados, e doadores de órgãos), mostrando que a menor soroprevalência encontrada é de 70,4% e a maior de 96,4% nos diferentes grupos avaliados. Entretanto, muitas pessoas desconhecem o seu estado sorológico para HCMV, estando incluídos grupos que em a infecção por esse vírus pode ser prejudicial (35,36).

Os HCMVs pertencem à família Herpesviridae, subfamília Betaherpesvirinae, gênero citomegalovírus. Seu genoma é constituído por DNA, inserido em um capsídeo icosaédrico. A partícula viral completa tem um diâmetro que varia de 120 a 250nm. O material genético consiste em uma molécula de DNA de fita dupla linear, não segmentado, medindo entre 196 e 241 kpb, com conteúdo G/C em torno de 57% e número estimado de 252 sequências de leitura aberta (*open reading frame* - ORFs) (37). Ele utiliza as glicoproteínas de envelope gH/gL, que se ligam a integrinas nas células, e gB, que se liga no receptor EGFP (38). Esses vírus podem infectar fibroblastos, monócitos, macrófagos e células endoteliais, tendo preferência por células de órgãos endócrinos. Após a infecção, o hospedeiro pode apresentar sintomas leves como dor de cabeça e febre, as vezes faringite e linfadenopatia, caracterizando um quadro de mononucleose *like*. Na maioria das infecções por HCMV em indivíduos imunocompetentes o quadro é assintomático. A patogênese do vírus é mais severa em indivíduos imunocomprometidos, aumentando a mortalidade e morbidade da doença. As complicações podem ser severas como, pneumonia, hepatite, retinite e encefalite (39). Dentro deste quadro de imunossupressão os indivíduos que utilizam medicamentos imunossupressores, como o caso de transplantados, pacientes com câncer ou indivíduos com SIDA, podem apresentar mais recidivas virais (40). Esse vírus também é capaz de infectar o neonatos, resultado da infecção intrauterina ou no momento do parto (41).

A relevância da patogenia do HCMV é dada pelo espectro de susceptibilidade dos diferentes tipos celulares (42). Do ponto de vista da biologia, o tropismo pelo tipo celular pode definir, quais células alvo em que os vírus irão ter êxito na reprodução. A disseminação do HCMV é dada por meio da via hematogênica, quando esse vírus infecta leucócitos, principalmente os granulócitos. Uma das formas de prevenção para disseminação de infecções por meio de transfusões sanguíneas é a realização da desleucocitação (43). As células endoteliais vasculares funcionam como principais hospedeiras desse vírus, sendo que a partir delas ocorre a disseminação para outros órgãos. O HCMV pode infectar fibroblastos por meio da fusão de suas glicoproteínas com

membrana plasmática em pH neutro, por meio dos trímeros gH/gL/gO com o receptor do fator de crescimento alfa derivado de plaquetas (PDGFR α). A partir desse mecanismo, existe a possibilidade de replicação viral em inúmeros órgãos do corpo, como as glândulas suprarrenais, medula óssea, coração, rins, pâncreas e outros(44). A infecção de células endoteliais e epiteliais pelo HCMV ocorre pela ligação do pentâmero gH/gL na proteína de superfície neuropilin-2 (Nrp2), ativando o processo de endocitose pH dependente, em ambos processos a glicoproteína B funciona como auxiliar para a liberação do capsídeo e proteínas do tegumento no citoplasma (45,46). Em células mieloides, a entrada do HCMV envolve processo de macropinocitose na qual ele também pode estabelecer latência [42]. O sucesso no estabelecimento da latência nessas células é dependente da efetividade de silenciar a expressão dos genes imediatos do vírus.

As células dendríticas (DCs) apresentam uma biologia complexa, e podem desempenhar atividades que proporcionam tanto a patogênese viral como ação antiviral. DCs imaturas residentes na mucosa e na superfície da epiderme, quando infectadas pelo HCMV, podem permitir a evasão do vírus, servindo como reservatórios temporários (48). Por outro lado, após a endocitose e processamento viral por DCs maduras, elas podem processar proteínas virais e apresentar os epitopos para os MHC de classe I e II, orquestrando o início de uma resposta imunológica adaptativa resolutive ou protetora (49).

1.5 Imunidade ao HCMV

A primeira linha de defesa contra uma infecção é a pele, uma vez rompida essa barreira, as células de langherans e macrófagos presentes na derme podem capturar o agente invasor, dando início à resposta imune (50). Sequencialmente, inúmeros receptores ancorados na membrana das células ou localizados no interior do citoplasma são acionados por estruturas específicas dos patógenos, entre eles, os vírus. Os Receptores do tipo Toll (TLRs) têm sido caracterizados como importantes elementos na resposta imune contra o HCMV, particularmente os receptores TLR2, TLR4 e TLR9 (51,52). O TLR 2 pode funcionar como um sensor direto da presença do HCMV durante a resposta imune inata. Mecanicamente, as glicoproteínas gB e gH do vírus ligam-se no TLR2 ou no heterodímero TLR2/TLR1 ativam uma via de indução do fator de transcrição κ B (NF κ B) e como consequência da ativação deste fator de transcrição ocorre a produção de citocinas inflamatórias, especialmente IL-6 e CXCL-8 (53). Adicionalmente, alguns estudos indicam que a ativação dos TLRs, especialmente TLR4 e TLR9, podem inibir a

replicação do HCMV ainda na infecção primária. Essa inibição está relacionada com a produção de IFN- β e CXCL-8, em um contexto de associação com a flora microbiana local (54). Como receptores citoplasmáticos nas infecções virais podem funcionar os receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLRs). Durante a infecção por HCMV, o ligante tipo NOD 2 (NOD2) ativa as vias de NF- $\kappa\beta$ e IFN do tipo I, levando a produção de CXCL-8 e IFN- β , respectivamente, funcionando também como uma forma de inibição da replicação viral (55). Por outro lado, o HCMV produz uma série de proteínas, que inibem a ação do IFN- β como a pp65, pUL31 e IE86, caracterizando mecanismos sofisticados de escape viral (56). Nessa etapa, além das citocinas antivirais, recentemente, foram identificados os fatores de restrição antivirais (FR), induzidos no curso da infecção viral, e contra os quais o HCMV também já desenvolveu formas de escape. Os FR identificados na infecção por HCMV são o IFI16 que inibe a replicação dele na fase inicial, o complexo ND10 que silencia genes iniciais, a viperina que atua em fases tardias do ciclo viral, APOBEC3 que inibe a replicação viral e Galactina-9, que inibe a entrada do vírus na célula (57–59).

Mesmo diante da resposta inata inicial mediada por receptores e FR, o HCMV estabelece a sua infecção nas células susceptíveis, que incluem as apresentadoras de antígeno DC, macrófagos e monócitos. Essas células tornam-se locais de replicação viral, funcionando como um mecanismo de distribuição do HCMV (48,60). Além disso, o HCMV também pode bloquear a expressão das moléculas de MHC I e MHC II, importantes para a ativação de linfócitos T, e produzir proteínas virais análogas de IL-10, com a função de enfraquecer esta etapa da imunidade (61,62). Similar ao que ocorre com as DCs, os monócitos e macrófagos se tornam infectados pelo HCMV e também têm seus mecanismos de defesa suprimidos pelo vírus (63). Ainda na imunidade inata ocorre a ação das células NK contra o HCMV, as quais eficientemente promovem a citotoxicidade de células infectadas e a produção de IFN- γ , levando ao estado antiviral. No curso da infecção por HCMV as células NK são induzidas a expressarem os receptores de ativação CD94/NKG2C e/ou NKG2D, diretamente envolvidos na resolução e proteção contra esse vírus (64,65).

A evolução da infecção por HCMV é complexa, apresentando três diferentes subtipos de infecção. Primeiramente, a infecção se estabelece em um indivíduo que não possui imunidade contra o vírus. Após esse movimento, o vírus estabelece latência, com capacidade de reativação, o que caracteriza o segundo tipo de infecção. Por último o terceiro tipo, é chamado de reinfecção, no momento de que ocorre um segundo contato

como HCMV resultando em uma superinfecção, apesar de já apresentar anticorpos virais específicos. Qualquer um destes subtipos de infecção pode levar a complicações relacionadas ao HCMV (66).

A ativação da resposta imunológica inata é crucial para a formação de uma resposta adaptativa mais apropriada e de melhor qualidade, a qual inclui a indução de interferons, NFkB, fator regulatório de interferon 3 (IRF3), ativação dos apresentadores de antígenos e recrutamento de células citotóxicas, (53). A resposta humoral também tem um papel importante na proteção contra a ativação e disseminação do HCMV, a partir das proteínas estruturais tegumentares do vírus, glicoproteínas e proteínas não estruturais, como *Immediate Early Protein* (IE1), são processadas e produzidas como imunoglobulinas (67). Entretanto, após a resposta primária da infecção por HCMV, o controle da recidiva e resposta é orquestrado pelos linfócitos T, principalmente o T CD8+. Estudos com a utilização de tetrâmeros virais demonstraram que em indivíduos HCMV positivos existe uma alta frequência de linfócitos T CD8+ de memória específicos para peptídeos deste vírus, que quando comparada com a média da frequência de células para outros vírus, como Dengue, EBV, e Hepatite, é significativamente maior (68,69). Análises mais robustas mostraram que em alguns indivíduos a resposta T CD8+HCMV- específica chega a representar 30% dos linfócitos T CD8+ totais (70). A frequência destes linfócitos aumenta com a idade, sendo que indivíduos mais velhos apresentam um número significativamente maior que os mais jovens, o que se relaciona também com o grau de diferenciação destas células (71).

Esse fenômeno característico da resposta imune de memória na infecção por HCMV, relacionada ao aumento dos linfócitos T CD8+ é *denominado memory inflation* (72). Nesse mecanismo o antígeno viral em latência é apresentado por células infectadas nos linfonodos ou no leito vascular (células estromais ou células endoteliais). Tais antígenos podem conduzir à diferenciação de células T de memória central (Tcm) em células T de memória efetora (Tem), que recirculam nos tecidos e mantém o controle viral. A continuidade e persistência desse processo leva ao aumento excessivo de células e ao fenômeno de *memory inflation*.(73).

Do ponto de vista de marcadores fenotípicos as células T CD8+ HCMV específicas que entram em *memory inflation* dependem, além da ligação TCR: MHC I peptídeo, da expressão dos marcadores de superfície celular CD27, OX-40 e 4-1BB, para acoplamento em CD70, OX-40L e 4-1BBL, respectivamente. Nessa dinâmica de ativação, a molécula CD28 não é necessária (74,75). Linfócitos T CD8+ de memória HCMV específicos

apresentam, principalmente, o fenótipo CD8+CD27- CD28- sem dependência de sinais co-estimulatórios para sua ativação (76), entretanto, variações desta população podem ser observadas em diferentes indivíduos com HCMV, e se relacionam com a ativação dessas células e progressão da doença. Os linfócitos T CD8+ gerados na condição de *memory inflation*, e com a ausência do marcador CD28 são denominados de linfócitos peri-senescentes em razão de sua semelhança fenotípica e funcional de linfócitos senis (77). Altas frequências de células T CD8+ específicas para HCMV peri-senescentes constituem uma fonte potencial de mediadores inflamatórios que contribuem para a inflamação. Indivíduos soropositivos para HCMV, e “saudáveis”, tendem a ter inflamação crônica de baixo grau caracterizada por aumentos sutis nos níveis de linfócitos Th1, fatores de crescimento, IL-6 e proteína C reativa (PCR) (78).

Já foi esclarecido em modelos com LCMV (*lymphocytic choriomeningitis virus*) que a reativação total desse vírus não é necessária para o *memory inflation*, apenas a apresentação do antígeno por células não-hematopoiéticas latentemente infectadas (79). Também a extensão desse fenômeno no organismo depende da intensidade (carga vírus de inóculo) na infecção primária, quanto mais vírus, mais *memory inflation* (80). Embora tanto linfócitos T CD4+ quanto T CD8+ possam apresentar o fenômeno de *memory inflation* na infecção com *Murine cytomegalovirus* (MCMV), a proporção de T CD8+ é significativamente mais expressiva. Isso ocorre porque a latência viral ocorre preferencialmente em células não-hematopoiéticas, as quais não expressam MHC de classe II, apenas MHC de classe I (81).

Embora a maioria dos estudos que caracterizam a imunidade contra HCMV sejam extrapolações com o modelo murino de LCMV, observa-se uma grande semelhança entre esses dois vírus, no seu comportamento patogênico e experimentos que foram testados em ambas as espécies (82,83).

1.6 Expressão das moléculas co-estimulatórias CD27 e CD28 em linfócitos T na resposta imune ao HCMV

Os linfócitos T CD8⁺ apresentam um papel praticamente decisivo na resposta imune contra vírus, e a expressão das moléculas co-estimulatórias CD27 e CD28 estão envolvidas nos processos de ativação, formação de memória ou manutenção do estado de repouso dessas células. Durante a apresentação de antígenos de uma APC para um linfócito T, a co-estimulação por meio da ligação de CD28 a um membro da família de receptores B7 contribui para a ativação do linfócito, produção de IL-2 e proliferação (84). Paralelamente, a molécula co-estimulatória CD27, membro da família TNF, também está envolvida na regulação da ativação e proliferação dos linfócitos T CD8⁺, tendo como ligante o CD70, e, diferente do CD28, ela induz uma baixa produção de IL-2 (85).

Curiosamente, observou-se em modelos animais que a expressão e sinalização do CD28 em linfócitos T CD8⁺ na resposta contra vírus influenza, vírus da estomatite vesicular e vaccínia vírus é importante para a formação da resposta citotóxica antiviral, entretanto, na infecção por LCMV a presença dessa molécula não se mostrou relevante para a atividade antiviral do linfócito T CD8⁺ (86). Essa observação foi investigada em outros estudos com herpesvirus, sendo que a principal hipótese é que nesse modelo de infecção outras moléculas co-estimulatórias assumam esse papel (87). Uma explicação para isso é que como LCMV infecta órgãos linfoides secundários, e causa inflamação inespecífica, com ativação de linfócitos, com formação de um potente ambiente inflamatório, podendo estar associado a um aumento de sinais e diminuição da competição por recursos co-estimulatórios e citocinas. Em outras infecções, onde a co-estimulação é escassa, as respostas de linfócitos T CD8⁺ podem ser mais dependentes da presença de CD28. Aliás, já foi demonstrado que outras moléculas co-estimuladoras, como CD27 e 4-1BB, podem substituir a necessidade de CD28 em respostas de linfócitos T CD8⁺ (88–90).

Considerando os sinais de ativação necessários também para a diferenciação celular, a expressão das moléculas co-estimulatórias CD27 e CD28 em linfócitos pode ser utilizada para a determinação do estágio da diferenciação. Linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ recentemente ativados estão em estágios iniciais de diferenciação, podendo ser caracterizados pela expressão conjunta de CD27 e CD28, nomeados CD27⁺CD28⁺, já linfócitos em estágio intermediário de diferenciação perdem a expressão do marcador CD27, sendo nomeados CD27⁻CD28⁺, e por fim aqueles em estágio terminais da

diferenciação são nomeados CD27-CD28- (91,92).

Em seres humanos a presença de percentagens elevadas de linfócitos T CD4+ ou T CD8+ terminalmente diferenciados (CD27-CD28-) são relacionados à senescência imunológica (90,93). A condição de imunosenescência apresenta uma baixa relação CD4/CD8, uma maior predisposição a infecções e menor resposta imunológica(94). É bem caracterizado que a soropositividade para HCMV em pessoas mais idosas é um fator que se relaciona com uma menor quantidade de linfócitos T CD8+ virgens, e com maior predisposição a ativação e diferenciação, e maior quantidade de linfócitos T CD8+ terminantemente diferenciados, senescentes (95,96). A redução da expressão dos marcadores CD27 e CD28 em linfócitos T, associada à senescência na infecção por HCMV foi comprovada pela associação destes com outros marcadores clássicos de linfócitos senescentes como o CD57 e KLRG1. Esse fenômeno é específico do HCMV, e não de outros herpesvirus humano de alta prevalência, como o HSV (97).

1.7 Alterações imunológicas em indivíduos com sobrepeso/obeso relacionadas a infecção por HCMV

A infecção pelo HCMV no indivíduo na situação de sobrepeso/obesidade pode influenciar negativamente a resposta imunológica do hospedeiro por duas razões principais: alterações metabólicas associadas à glicose e à lipogênese ou imunossenescência de células do sistema imune, caracterizada, principalmente, pela expressão de marcadores senescentes.

No curso de uma infecção primária ou reativação de HCMV, no que tange a síntese de novas partículas virais, o vírus induz a síntese de lipídeos dentro do citoplasma, que serão utilizados na produção de envelopes. Ocorre um aumento da entrada de glicose para dentro da célula, que é inicialmente induzido pelo próprio vírus, e posteriormente amplificado pela expressão de receptores do tipo GLUT 4 (transportador de glicose específico do adipócito -4), para aumentar a captação de glicose (98). O excesso de influxo de glicose não entra no ciclo de Krebs, mas é desviado para a biossíntese de ácidos graxos, e usado pela maquinaria viral para promover a produção das membranas dos envelopes que constituirão novas partículas virais, e consequente aumentar a infecção (99). Indiretamente, a glicose elevada pode promover espécies reativas de oxigênio (ROS), responsáveis por estimular a região promotora do HCMV e fornecer mais um reforço para a formação de novas replicações virais (100). Esse processo ativa

sistema imunológico e aumenta a inflamação associada à infecção viral.

Para a manutenção dos níveis de lipídeos intracelulares uma proteína denominada Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP), é clivada e o seu produto serve como fator de transcrição para a síntese de lipídeos, um mecanismo regulado pela quantidade de insulina na célula (101). Foi demonstrado que o HCMV induz a clivagem da proteína SREBP1, levando a um aumento significativo da quantidade de lipídeos intracelulares. Esse aumento de lipídeos se relaciona com o aumento da expressão de genes imediatos do HCMV na célula hospedeira, acompanhado pelo aumento de em média cinco vezes a expressão de genes da ácido graxo sintetase e acetil-CoA carboxilase, relacionados ao metabolismo de lipídeos. Desta forma, na obesidade, pode-se observar um acúmulo de lipídeos intracelular ainda maior na presença de HCMV ativo. Análises em humanos indicam que existe uma forte associação entre o aumento da hemoglobina glicada e níveis de colesterol com a soropositividade para HCMV, especialmente em não obesos com o mesmo status sorológico. Os autores do estudo sugerem que embora a associação entre HCMV e função metabólica (aumento da hemoglobina glicada e colesterol) seja fraca a relação pode estar mascarada pela sobreposição dos efeitos bioquímicos da obesidade (102). Essas características da infecção por HCMV, representadas pela soropositividade para esse vírus, contribuem para a relação observada entre sorologia positiva para HCMV, maior propensão a apresentar síndrome metabólica e obesidade, que impacta na imunidade e aumento da resposta inflamatória (103). A representação dos fatores associados entre a infecção pelo HCMV, sobrepeso e obesidade e o processo de imunossenescência estão apresentados na Figura 3.

Outra forma pela qual infecção por HCMV, associada ao sobrepeso/obesidade, pode causar alterações deletérias na resposta imunológica do indivíduo é por meio da promoção da senescência de linfócitos T de memória. A senescência celular é um processo integrado ao envelhecimento celular e tecidual, sendo inverso a homeostase (104). A senescência celular pode ser classificada em aguda, quando a célula senil é removida por células do sistema imune e logo substituída por outra nova, ou crônica, quando ocorre evasão do sistema imune e acúmulo de células senis (105). Na senescência celular crônica, as células secretam mediadores denominados de fenótipos associados à senescência (*senescence associated secretory phenotype* – SASP), representados por IL-1 β , IL-6 e TNF, todas proteínas inflamatórias, produzidas principalmente por células endoteliais senis. O quadro inflamatório associado ao

envelhecimento não saudável é denominado *inflammaging*, situação na qual o acúmulo de células senescentes é agravado com a idade, estando associado a processos de inflamação crônica e contribuição para função imunológica não apropriada (106,107). Conceitualmente, imunossenescência se refere ao declínio gradual de linfócitos T virgens, aumento de linfócitos T terminalmente diferenciados, redução da diversidade e repertório de linfócitos T, aumento da inflamação, queda da resistência a infecções e piora na resposta vacinal (108).

Em infecções crônicas, como a causada por HCMV, existe uma grande expansão de linfócitos T CD8+ terminalmente diferenciados, característicos da imunossenescência. Tais células se caracterizam por apresentar uma baixa capacidade proliferativa, ausência de enzima telomerase e encurtamento de telômeros, que compromete a divisão celular (105). Basicamente, as recorrências subclínicas do HCMV reforçam o aumento da multiclonalidade e funcionalidade intensa de linfócitos TCD8+ efetores específicos para esse vírus. Essas células produzem IFN- γ e TNF- α em tempos menores e quantidade maiores do que se observa em infecções por outros vírus. Nesse panorama de uma intensa resposta, o vírus é controlado e retorna para o seu estado de latência. Esse processo contínuo ao longo da vida induz o acúmulo de linfócitos (*memory inflation*), devido à intensa proliferação observa-se o encurtamento de telômeros e senescência celular associada a produção de SASP (*inflammaging*). O conjunto destas alterações leva à disfunção imunológica e imunossenescência no hospedeiro (109). A relação da infecção pelo HCMV e a contribuição para o processo de envelhecimento do sistema imune está apresentada na Figura 4.

Por fim, a obesidade, quando caracterizada como um estado inflamatório permanente, modulado pelo tecido adiposo inflamado, e associação ao acúmulo de dano celular resultantes da inflamação e oxidação, caracteriza-se como um estado de imunossenescência precoce. Em indivíduos obesos, tanto na presença ou ausência de diabetes tipo II, doença comum nesse grupo, observa-se um aumento sérico significativo na expressão dos genes que codificam IL-2, IL-4, TNF- α , IL-10, IL-6, CCR7, CD27 e PD-1 e redução de CD28, o que caracteriza um quadro clássico de imunossenescência (110). Nesse panorama, a soropositividade para HCMV pode ser um fator importante no fenótipo dos linfócitos desses indivíduos.

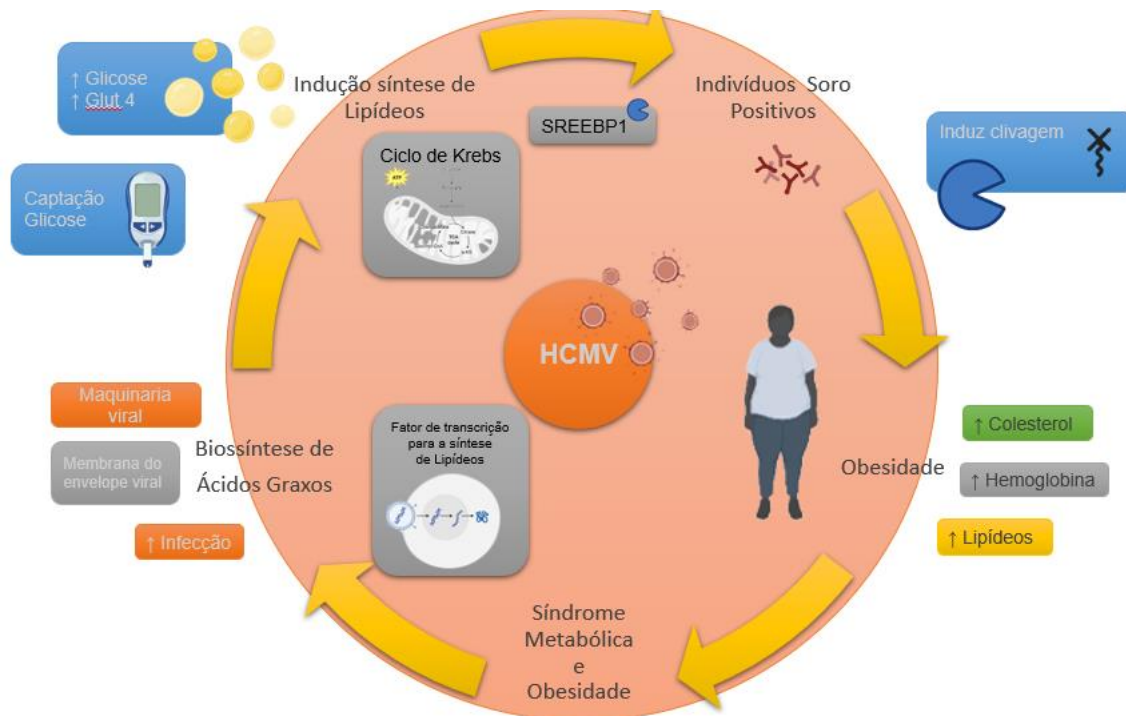


Figura 3: A complexa interação entre a infecção pelo HCMV, sobrepeso, obesidade e imunossenescência. O HCMV desencadeia alterações metabólicas, aumentando a captação de glicose e a síntese de lipídeos através da Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP). Essa resposta metabólica impulsiona a replicação viral. Ao mesmo tempo, a infecção é associada ao aumento da hemoglobina glicada, níveis elevados de colesterol e acúmulo de lipídeos, fatores que contribuem para acentuar a inflamação podendo desencadear a síndrome metabólica. O HCMV desencadeia um desequilíbrio metabólico que aumenta a entrada de glicose nas células, proporcionando a produção elevada de ácidos graxos, utilizados para a replicação viral, bem como a produção membranas virais. A infecção persistente do HCMV proporciona uma constante proliferação celular, impulsionada pelo vírus. Os níveis de lipídeos intracelulares e da expressão de genes relacionados aumentam. E o processo contínuo de biossíntese de ácidos graxos mantém a infecção viral, perpetuando o ciclo. Fonte: imagem do próprio autor montada no Biorender.

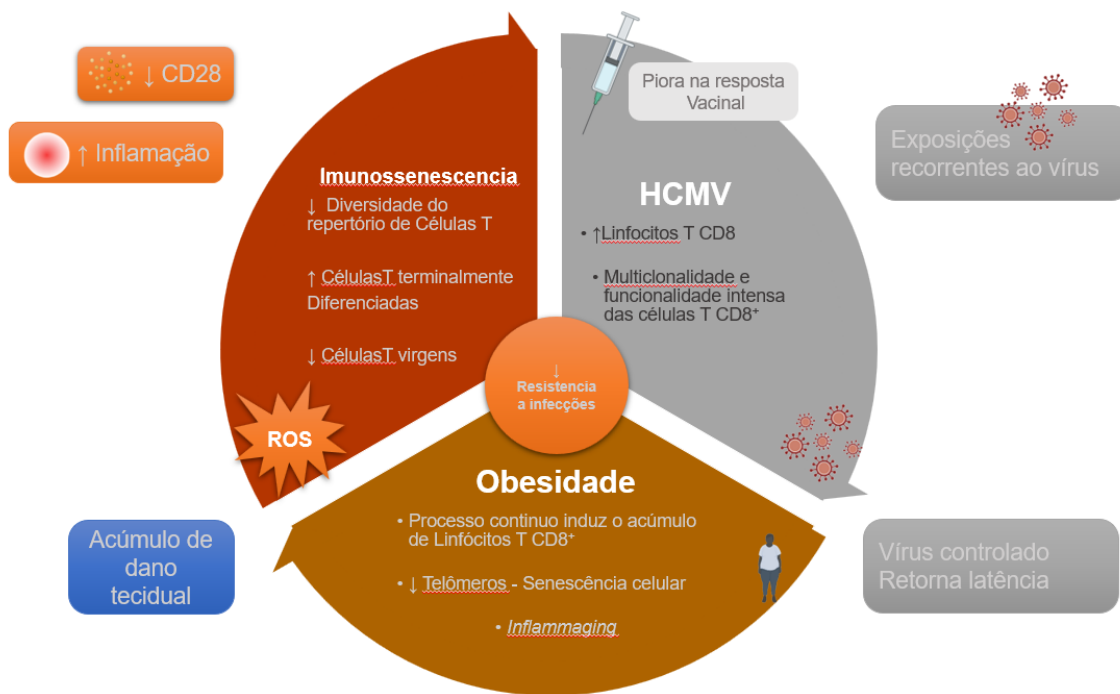


Figura 4: A infecção por HCMV contribuindo para um quadro de imunossenescência. Esta imagem destaca o aumento de linfócitos T CD8+ em resposta à infecção. Esse cenário promove multiclonalidade e uma intensa ativação de células T CD8+, levando a uma resposta viral vigorosa. Entretanto, essa resposta tem efeitos colaterais. Observa-se uma piora na resposta vacinal e uma redução na resistência a infecções, resultando em menor eficácia vacinal. Essa complexa dinâmica ilustra como o aumento dos linfócitos T CD8+ na presença do HCMV pode ter implicações significativas na resposta imunológica. A obesidade contribui para o processo contínuo de ativação de células T CD8+. Esse aumento está relacionado à diminuição dos telômeros, desencadeando senescência celular, fenômeno conhecido como *inflammaging*. Essa dinâmica assume um papel principal quando o vírus controlado, retoma a latência. O acúmulo de células T senescentes é acompanhado pelo dano tecidual, gerado pelas espécies reativas de oxigênio. Simultaneamente a infecção promove a senescência de linfócitos T de memória, acelerando o envelhecimento celular e promovendo a liberação de citocinas inflamatórias. Em indivíduos com HCMV, esse cenário é mais pronunciado, levando a uma resposta imunológica comprometida, caracterizada por menor capacidade de defesa e maior suscetibilidade a infecções. Fonte: imagem do próprio autor montada no Biorender.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a associação entre a soropositividade para HCMV sobre o perfil fenotípico de linfócitos T e parâmetros bioquímicos em indivíduos com sobrepeso e obesidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os níveis circulantes de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e glicose em indivíduos com sobrepeso e obesidade e sua associação com a soropositividade para HCMV.

Avaliar a relação de subpopulação de linfócitos T CD4 e TCD8 em diferentes estados de diferenciação presente no sangue periférico de indivíduos com sobrepeso e obesidade com a soropositividade para HCMV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oliveira DC de. Sociologia da obesidade. *Cien Saude Colet*. 2017;22(2):661–2.
2. Silva BL, Cantisani JR. Interfaces Entre a Gordofobia E a Formação Acadêmica Em Nutrição: Um Debate Necessário. *DEMETRA Aliment Nutr Saúde*. 2018;13(2):363–80.
3. ABESO - Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica. Diretrizes brasileiras de obesidade 2016. VI Diretrizes Bras Obesidade. 2016;7–186.
4. González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3.
5. Brasil. Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão. *Vigitel*. 2016;
6. Villarroya F, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Villarroya J, Giralt M. Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *J Intern Med*. 2018;
7. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008.
8. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 1997.
9. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997.
10. Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2008.
11. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's role during health and disease. *Physiol Rev*. 2019;
12. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*. 2020.
13. Watanabe S, Alexander M, Misharin A V., Budinger GRS. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2019.
14. Wang C, He L. Paraneoplastic pemphigus in children: Case report. *Chinese J Med Imaging Technol*. 2010;26(5):924.
15. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7(APR):1–16.
16. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(11):633–43.
17. Fang X, Henao-Mejia J, Henrickson SE. Obesity and immune status in children. *Curr Opin Pediatr*. 2020;32(6):805–15.
18. Statovci D, Aguilera M, MacSharry J, Melgar S. The impact of western diet and nutrients on the microbiota and immune response at mucosal interfaces. *Front Immunol*. 2017;8(JUL).
19. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1701–11.
20. Kratz M, Coats BR, Hisert KB, Hagman D, Peris E, Schoenfeld KQ, et al. NIH Public Access. 2015;20(4):614–25.

21. da Silveira MR, Frollini AB, Verlengia R, Cavaglieri CR. Correlação entre obesidade, adipocinas e sistema imunológico. *Rev Bras Cineantropometria e Desempenho Hum*. 2009;11(4):466–72.
22. De Heredia FP, Gómez-Martínez S, Marcos A. Chronic and degenerative diseases: Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc*. 2012;71(2):332–8.
23. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;69(1):29–35.
24. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860–7.
25. Poglio S, De Toni-Costes F, Arnaud E, Laharrague P, Espinosa E, Casteilla L, et al. Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem Cells*. 2010;28(11):2065–72.
26. Mattiucci D, Maurizi G, Izzi V, Cenci L, Ciarlantini M, Mancini S, et al. Bone marrow adipocytes support hematopoietic stem cell survival. *J Cell Physiol*. 2018;
27. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175–84.
28. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*. 2007;447(7148):1116–20.
29. Hegde V, Dhurandhar N V. Microbes and obesity-interrelationship between infection, adipose tissue and the immune system. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013.
30. Bouwman JJM, Visseren FLJ, Bouter KP, Diepersloot RJA. Infection-induced inflammatory response of adipocytes in vitro. *Int J Obes*. 2008;
31. Adler B, Sinzger C. Endothelial cells in human cytomegalovirus infection: One host cell out of many or a crucial target for virus spread? *Thromb Haemost*. 2009;102(6):1057–63.
32. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol*. 2015;235(2):288–97.
33. Schleiss MR. Cytomegalovirus Vaccine Development and Target Population
Congenital HCMV Infection : A Major Public Health Problem The problem of congenital HCMV infection is unquestionably the major driving. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;
34. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology*. 2010.
35. Jeon J, Victor M, Adler SP, Arwady A, Demmler G, Fowler K, et al. Knowledge and awareness of congenital cytomegalovirus among women. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006;
36. Murph JR, Baron JC, Brown CK, Ebelhack CL, Bale JF. The Occupational Risk of Cytomegalovirus Infection Among Day-care Providers. *JAMA J Am Med Assoc*. 1991;
37. Tandon R, Mocarski ES. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends in Microbiology*. 2012.
38. Smith NA, Chan GC, O'Connor CM. Modulation of host cell signaling during cytomegalovirus latency and reactivation. *Virology Journal*. 2021.
39. Nogalski MT, Collins-McMillen D, Yurochko AD. Overview of human

- cytomegalovirus pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2014;1119:15–28.
40. Ishii T, Sasaki Y, Maeda T, Komatsu F, Suzuki T, Urita Y. Clinical differentiation of infectious mononucleosis that is caused by Epstein-Barr virus or cytomegalovirus: A single-center case-control study in Japan. *J Infect Chemother.* 2019;25(6):431–6.
 41. Marsico C, Kimberlin DW. Congenital Cytomegalovirus infection: Advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Ital J Pediatr.* 2017;43(1):1–8.
 42. Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;325:63–83.
 43. Gilbert GL, Hayes K, Hudson IL, James J. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection in infants by blood filtration to remove leucocytes. Neonatal Cytomegalovirus Infection Study Group. *Lancet (London, England).* 1989;
 44. Bissinger AL, Oettle H, Jahn G, Neuhaus P, Sinzger C. Cytomegalovirus Infection after Orthotopic Liver Transplantation Is Restricted by A Pre-Existing Antiviral Immune Response of the Recipient. *J Med Virol.* 2004;73(1):45–53.
 45. Gerna G, Kabanova A, Lilleri D. Human cytomegalovirus cell tropism and host cell receptors. *Vaccines.* 2019.
 46. Kabanova A, Marcandalli J, Zhou T, Bianchi S, Baxa U, Tsybovsky Y, et al. Platelet-derived growth factor- α receptor is the cellular receptor for human cytomegalovirus gHgLgO trimer. *Nat Microbiol.* 2016;
 47. Martinez-Martin N, Marcandalli J, Huang CS, Arthur CP, Perotti M, Foglierini M, et al. An Unbiased Screen for Human Cytomegalovirus Identifies Neuropilin-2 as a Central Viral Receptor. *Cell.* 2018;
 48. Riegler S, Hebart H, Einsele H, Brossart P, Jahn G, Sinzger C. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* 2000;
 49. Hertel L, Lacaille VG, Strobl H, Mellins ED, Mocarski ES. Susceptibility of Immature and Mature Langerhans Cell-Type Dendritic Cells to Infection and Immunomodulation by Human Cytomegalovirus. *J Virol.* 2003;77(13):7563–74.
 50. Sugita K, Kabashima K, Atarashi K, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol.* 2007;
 51. Wujcicka W, Wilczyński J, Nowakowska D. Alterations in TLRs as new molecular markers of congenital infections with Human cytomegalovirus? *Pathogens and Disease.* 2014.
 52. Jabłońska A, Paradowska E, Studzińska M, Suski P, Nowakowska D, Wiśniewska-Ligier M, et al. Relationship between toll-like receptor 2 Arg677Trp and Arg753Gln and toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphisms and cytomegalovirus infection. *Int J Infect Dis.* 2014;
 53. Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human Cytomegalovirus Envelope Glycoproteins B and H Are Necessary for TLR2 Activation in Permissive Cells. *J Immunol.* 2006;177(10):7094–102.
 54. Harwani SC, Lurain NS, Zariffard MR, Spear GT. Differential inhibition of human cytomegalovirus (HCMV) by toll-like receptor ligands mediated by interferon-beta in human foreskin fibroblasts and cervical tissue. *Virol J.* 2007;
 55. Kapoor A, Fan YH, Arav-Boger R. Bacterial Muramyl Dipeptide (MDP) Restricts Human Cytomegalovirus Replication via an IFN- β -Dependent Pathway. *Sci Rep.* 2016;6(August 2015):1–15.

56. Dell'Oste V, Biolatti M, Galitska G, Griffante G, Gugliesi F, Pasquero S, et al. Tuning the Orchestra: HCMV vs. Innate Immunity. *Frontiers in Microbiology*. 2020.
57. Gariano GR, Dell'Oste V, Bronzini M, Gatti D, Luganini A, de Andrea M, et al. The intracellular DNA sensor IFI16 gene acts as restriction factor for human Cytomegalovirus replication. *PLoS Pathog*. 2012;
58. Chin KC, Cresswell P. Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;
59. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning “sweet” on immunity: Galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2009.
60. Schneider K, Meyer-Koenig U, Hufert FT. Human cytomegalovirus impairs the function of the plasmacytoid dendritic cells in lymphoid organs. *PLoS One*. 2008;
61. Loureiro J, Ploegh HL. Antigen Presentation and the Ubiquitin-Proteasome System in Host-Pathogen Interactions. *Advances in Immunology*. 2006.
62. Avdic S, McSharry BP, Slobedman B. Modulation of dendritic cell functions by viral IL-10 encoded by human cytomegalovirus. *Frontiers in Microbiology*. 2014.
63. Smith MS, Bentz GL, Alexander JS, Yurochko AD. Human Cytomegalovirus Induces Monocyte Differentiation and Migration as a Strategy for Dissemination and Persistence. *J Virol*. 2004;
64. Rölle A, Brodin P. Immune Adaptation to Environmental Influence: The Case of NK Cells and HCMV. *Trends in Immunology*. 2016.
65. Rölle A, Mousavi-Jazi M, Eriksson M, Odeberg J, Söderberg-Nauclér C, Cosman D, et al. Effects of Human Cytomegalovirus Infection on Ligands for the Activating NKG2D Receptor of NK Cells: Up-Regulation of UL16-Binding Protein (ULBP)1 and ULBP2 Is Counteracted by the Viral UL16 Protein. *J Immunol*. 2003;
66. Griffiths P, Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(12):759–73.
67. Hahn G, Revello MG, Patrone M, Percivalle E, Campanini G, Sarasini A, et al. Human Cytomegalovirus UL131-128 Genes Are Indispensable for Virus Growth in Endothelial Cells and Virus Transfer to Leukocytes. *J Virol*. 2004;78(18):10023–33.
68. Borysiewicz LK, Hickling JK, Graham S, Sinclair J, Cranage MP, Smith GL, et al. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-KD immediate early protein and glycoprotein b expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Exp Med*. 1988;
69. Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol*. 1996;
70. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med*. 2005;
71. Komatsu H, Sierro S, Cuero A V., Klenerman P. Population analysis of antiviral T cell responses using MHC class I-peptide tetramers. *Clin Exp Immunol*. 2003;
72. Klenerman P, Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(6):367–77.
73. Waller ECP, Day E, Sissons JGP, Wills MR. Dynamics of T cell memory in human cytomegalovirus infection. *Medical Microbiology and Immunology*. 2008.
74. Humphreys IR, Lee SW, Jones M, Loewendorf A, Gostick E, Price DA, et al.

- Biphasic role of 4-1BB in the regulation of mouse cytomegalovirus-specific CD8+ T cells. *Eur J Immunol*. 2010;
75. Welten SPM, Redeker A, Franken KL, Benedict CA, Yagita H, Wensveen FM, et al. CD27-CD70 Costimulation Controls T Cell Immunity during Acute and Persistent Cytomegalovirus Infection. *J Virol*. 2013;
 76. van Leeuwen EM, Gamadia LE, Baars PA, Remmerswaal EB, ten Berge IJ, van Lier RA. Proliferation Requirements of Cytomegalovirus-Specific, Effector-Type Human CD8 + T Cells . *J Immunol*. 2002;
 77. Arens R, Loewendorf A, Redeker A, Sierro S, Boon L, Klenerman P, et al. Differential B7–CD28 Costimulatory Requirements for Stable and Inflammatory Mouse Cytomegalovirus-Specific Memory CD8 T Cell Populations. *J Immunol*. 2011;
 78. Van De Berg PJ, Heutinck KM, Raabe R, Minnee RC, Young S La, Van Donselaar-Van Der Pant KA, et al. Human cytomegalovirus induces systemic immune activation characterized by a type 1 cytokine signature. *J Infect Dis*. 2010;
 79. Snyder CM, Cho KS, Bonnett EL, Allan JE, Hill AB. Sustained CD8+ T cell memory inflation after infection with a single-cycle Cytomegalovirus. *PLoS Pathog*. 2011;
 80. Redeker A, Welten SPM, Arens R. Viral inoculum dose impacts memory T-cell inflation. *Eur J Immunol*. 2014;
 81. Torti N, Walton SM, Brocker T, Rülcke T, Oxenius A. Non-hematopoietic cells in lymph nodes drive memory CD8 t cell inflation during murine cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog*. 2011;
 82. Ornaghi S, Bai J-P, Navaratnam D, Santos-Sacchi J, Vergani P, van den Pol A, et al. 5: Valnoctamide rescues CMV-induced deafness in a murine model. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;
 83. Roback JD, Su L, Newman JL, Saakadze N, Lezhava LJ, Hillyer CD. Transfusion-transmitted cytomegalovirus (CMV) infections in a murine model: Characterization of CMV-infected donor mice. *Transfusion*. 2006;
 84. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*. 1992;
 85. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: Keys to effective T-cell immunity? *Nature Reviews Immunology*. 2003.
 86. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, et al. Differential T Cell Costimulatory Requirements in CD28-Deficient Mice The B7 molecule, constitutively ex-pressed on dendritic cells (12), is also ex-pressed on other APCs and B cells and is. *Science* (80-). 1993;
 87. Lyon AB, Sarawar SR. Differential requirement for CD28 and CD80/86 pathways of costimulation in the long-term control of murine gammaherpesvirus-68. *Virology*. 2006;
 88. Hendriks J, Xiao Y, Borst J. CD27 Promotes Survival of Activated T Cells and Complements CD28 in Generation and Establishment of the Effector T Cell Pool. *J Exp Med*. 2003;
 89. Yamada A, Salama AD, Sho M, Najafian N, Ito T, Forman JP, et al. CD70 Signaling Is Critical for CD28-Independent CD8+ T Cell-Mediated Alloimmune Responses In Vivo. *J Immunol*. 2005;
 90. Dolfi D V., Katsikis PD. CD28 and Cd27 costimulation of Cd8+ T cells: A story of survival. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2007.

91. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GMA, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med.* 2002;8(4):379–85.
92. Trintinaglia L, Bandinelli LP, Grassi-Oliveira R, Petersen LE, Anzolin M, Correa BL, et al. Features of immunosenescence in women newly diagnosed with breast cancer. *Front Immunol.* 2018;
93. Petersen LE, Schuch JB, de Azeredo LA, Baptista TSA, Motta JG, do Prado AD, et al. Characterization of senescence biomarkers in rheumatoid arthritis: relevance to disease progression. *Clin Rheumatol.* 2019;
94. Pera A, Campos C, López N, Hassouneh F, Alonso C, Tarazona R, et al. Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas.* 2015.
95. Derhovanessian E, Larbi A, Pawelec G. Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. *Current Opinion in Immunology.* 2009.
96. Pawelec G. Immunosenescence: Role of cytomegalovirus. *Experimental Gerontology.* 2014.
97. Derhovanessian E, Maier AB, Hähnel KH, Beck R, de Craen AJM, Slagboom EP, et al. Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of latendifferentiated CD4 + and CD8 + T-cells in humans. *J Gen Virol.* 2011;
98. Spencer CM, Schafer XL, Moorman NJ, Munger J. Human Cytomegalovirus Induces the Activity and Expression of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase, a Fatty Acid Biosynthetic Enzyme Whose Inhibition Attenuates Viral Replication. *J Virol.* 2011;85(12):5814–24.
99. Yu Y, Maguire TG, Alwine JC. Human Cytomegalovirus Activates Glucose Transporter 4 Expression To Increase Glucose Uptake during Infection. *J Virol.* 2011;85(4):1573–80.
100. Jaganjac M, Matijevic T, Cindric M, Cipak A, Mrakovcic L, Gubisch W, et al. Induction of CMV-1 promoter by 4-hydroxy-2-nonenal in human embryonic kidney cells. *Acta Biochim Pol.* 2010;57(2):179–83.
101. Espenshade PJ, Hughes AL. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annual Review of Genetics.* 2007.
102. Hamer M, Batty GD, Kivimäki M. Obesity, metabolic health, and history of cytomegalovirus infection in the general population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;
103. Fleck-Derderian S, McClellan W, Wojcicki JM. The association between cytomegalovirus infection, obesity, and metabolic syndrome in U.S. adult females. *Obesity.* 2017;
104. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2010.
105. J Heath J, D Grant M. The Immune Response Against Human Cytomegalovirus Links Cellular to Systemic Senescence. *Cells.* 2020.
106. Kevin Howcroft T, Campisi J, Louis GB, Smith MT, Wise B, Wyss-Coray T, et al. The role of inflammation in age-related disease. *Aging (Albany NY).* 2013;
107. Ovadya Y, Landsberger T, Leins H, Vadai E, Gal H, Biran A, et al. Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nat Commun.* 2018;
108. Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, Barbi C, Bonafè M. Biomarkers of

- immunosenescence within an evolutionary perspective: The challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Experimental Gerontology*. 1999.
109. Weltevrede M, Eilers R, de Melker HE, van Baarle D. Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: A systematic review. *Experimental Gerontology*. 2016.
 110. Brunelli DT, Boldrini VO, Bonfante ILP, Duft RG, Mateus K, Costa L, et al. Obesity Increases Gene Expression of Markers Associated With Immunosenescence in Obese Middle-Aged Individuals. *Front Immunol*. 2022;

ARTIGO CIENTÍFICO

Manuscrito científico intitulado “*The effects of HCMV seropositivity and BMI degree on T cell immunophenotype in adults*”, com os dados da pesquisa, aceito para ser publicado na revista Obesity Medicine em 2024.

Track Your Accepted Article

The easiest way to check the publication status of your accepted article

[The effects of HCMV seropositivity and BMI degree on T cell immunophenotype in adults](#)

Article reference	OBMED_100531
Journal	Obesity Medicine
Corresponding author	Luiz Carlos Rodrigues Junior
First author	Luiz Carlos Rodrigues Junior
Received at Editorial Office	7 Oct 2023
Article revised	13 Dec 2023
Article accepted for publication	2 Jan 2024



ISSN 2451-8476 ↗

Last update: 3 Jan 2024

[✉ Share via email](#)

Status comment

- Your article has been received for production.

Bibliographic information

Volume/Issue
Will appear soon

TITLE PAGE

Title: The effects of HCMV seropositivity and BMI degree on T cell immunophenotype in adults

Short title: Short title: Obesity and HCMV seropositivity

Authors:

Diego Del Duca Lima: Immunovirology Laboratory. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Zip Code: 90050-170. e-mail: tresdlima@hotmail.com. ORCID: 0000-0002-9138-3697

Gilson Pires Dorneles: Project office. Social Responsibility . Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil. ZIP Code: 90035-004. e-mail: gilsondorneles@gmail.com. ORCID: 0000-0001-6524-3204

Joane Severo Ribeiro: Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Zip Code: 90050-170. e-mail: joaneribeiro@gmail.com. ORCID: 0000-0001-6096-5427

Alisson Felipe Haubert: Immunovirology Laboratory. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Zip Code: 90050-170. e-mail: alisson.haubert@hotmail.com. ORCID: 0009-0009-2734-4616

Pedro Roosevelt Torres Romão: Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Zip code: 90050-170. e-mail: pedror@ufcspa.edu.br. ORCID: 0000-0002-1039-2509

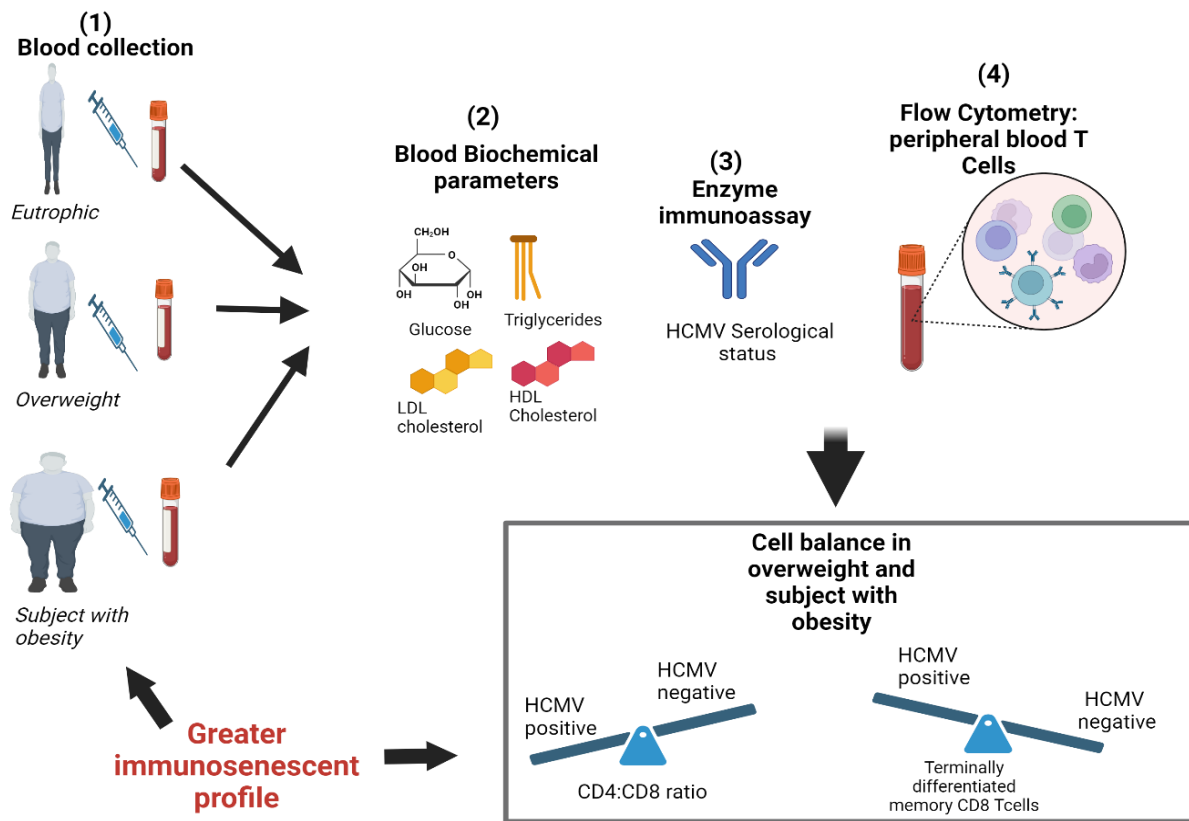
Alessandra Peres: Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Zip Code: 90050-170. e-mail: peres@ufcspa.edu.br. ORCID: 0000-0002-3587-2832

Luiz Carlos Rodrigues Junior (corresponding author): Immunovirology laboratory, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Zip Code: 90050-170 e-mail: luizcrlj@ufcspa.edu.br. ORCID: 0000-0002-5380-8930

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

Graphical Abstract



MAIN TEXT

The effects of HCMV seropositivity and BMI degree on T cell immunophenotype in adults

Abstract

Aim: Human Cytomegalovirus (HCMV) is a latent virus widely widespread in the human population. Obesity and HCMV infection are associated with immunological changes in T lymphocytes. This study aimed to evaluate if the association between overweight/obesity and HCMV infection would influence populations of peripheral blood T lymphocytes. **Methods:** Plasma and peripheral mononuclear cells were isolated from 111 individuals. The biochemical markers and anti-HCMV IgG were quantified in the plasma. The individuals were classified as eutrophic, overweight, or obese based on their body mass index. The lymphocyte populations helper T cells, cytotoxic T cells, memory T regulatory cells, memory effector T cells, early differentiated effector memory cytotoxic T cells, and terminally differentiated effector memory cytotoxic cells were quantified by flow cytometry. **Results:** Approximately half of the individuals studied (46.5%) were seropositive for HCMV, of which 14.1% were eutrophic, 8.1% overweight, and 24.32% were obese. There is a substantial reduction in the CD4:CD8 ratio in patients with overweight or obesity and increases in the circulating terminally differentiated effector memory cytotoxic T cells associated with HCMV positive serology. **Conclusions:** HCMV infection associated with weight gain contributes to the profile of immunological senescence mediated by an increase in the number of circulating terminally differentiated T lymphocytes.

Keywords: Obesity, Overweigh, HCMV, T lymphocytes.

Introduction

Obesity is a global health problem that predisposes the individual to the onset or worsening of other chronic diseases, increasing the risk of morbimortality directly associated with their weight gain degree (Tremmel et al., 2018, Afolabi et al., 2019). In 2019, the prevalence of obesity in Brazil was around 30%, being 46.8% male and 53.2% female, most of them in urban areas and with low education levels (Ferreira et al., 2021). A mild or chronic low-grade systemic inflammatory state is related to obesity due to the adipose tissue's ability to secrete substances that contribute to the inflammatory state and changes in the phenotype and function of both innate and adaptive immune cells (Choe et al., 2016; Reilly and Saltiel, 2017). In addition, the obesity induces a pro-inflammatory status mediated by the production of TNF- α , IL-6 and reactive C protein, which are serum component also present in several chronic diseases, such as Alzheimer and cardiovascular conditions (De Heredia et al., 2012). It's well established that senescent cells accumulate during obesity and that T lymphocytes associated to the fat tissue present reduction in telomeres length (Mundstock et al., 2015). Telomeres length is inversely associated to the BMI (Kim et al., 2009). This phenomenon contributes to obesity being characterized as a model of premature immunosenescence characterized by increases in the late-differentiated T cells, low numbers of regulatory T cells, and changes in CD4:CD8 ratio (Shirakawa and Sano, 2021).

HCMV is a betaherpesvirus with worldwide distribution, and it is estimated that approximately 70% of the entire population is seropositive for this virus (Bate et al., 2010; Lan and Luo, 2017). After the first infection, the virus goes to the latency phase in the host's organism, becoming symptomatic only in situations of immunosuppression (Nogalski et al., 2014). However, when sporadic expression of viral genes occurs it can induce frequent stimulation of the immune response to HCMV (J Heath and D Grant, 2020; Weltevrede et al., 2016; Wills et al., 2015). The control of the HCMV's expression is orchestrated mainly by CD8 T-lymphocytes. Studies using viral tetramers have shown that in HCMV-positive individuals, there is a high frequency of memory CD8 T lymphocytes specific for this virus' peptides (Borysiewicz et al., 1988; Wills et al., 1996). The frequency of these lymphocytes increases with age and, therefore, older individuals have a significantly higher number than younger ones, which is also related to the degree of cell maturation and senescence (Komatsu et al., 2003; Lang et al., 2009). This phenomenon is also related to the memory immune response during HCMV infection, being characterized

by the increases in CD8 T lymphocytes and is called memory inflation (Kim et al., 2015). High frequencies of peri-senescent HCMV-specific CD8⁺ T cells constitute a potential source of inflammatory mediators that contribute to inflammation (Van De Berg et al., 2010; Weitz et al., 2011).

Considering the activation signals necessary for the cell differentiation process, the expression of the co-stimulatory molecules CD27 and CD28 in lymphocytes is used to determine the stage of differentiation. Recently activated CD4 T or CD8 T lymphocytes are characterized by the joint expression of CD27 and CD28, named CD27⁺CD28⁺, whereas lymphocytes in an intermediate stage of differentiation lose expression of the CD27 marker, being named CD27⁻CD28⁺, and those in terminal stages of differentiation are named CD27⁻CD28⁻ (Appay et al., 2002; Dolfi and Katsikis, 2007). In humans, the presence of high percentages of terminally differentiated CD4 T or CD8 T lymphocytes is related to immunological senescence (Petersen et al., 2019). It is well known that seropositivity for HCMV in older people is a factor related to a lower amount of naive CD8 T lymphocytes with a greater predisposition to activation and differentiation. Also, a higher amount of terminally differentiated senescent CD8 T lymphocytes (Derhovanessian et al., 2009; Pawelec, 2014).

HCMV infection in overweight/obese subjects can negatively influence the host's immune response for a few reasons, such as metabolic changes associated with glucose and lipogenesis and the presence of immunosenescence of the immune system cells, demonstrated by the expression of the senescence markers. When obesity is associated with HCMV infection, it contributes to the increase in the number of the circulating terminally differentiated CD8 T lymphocytes (CD8⁺ CD27⁻CD28⁻). This may result in senescence, inflammation, decreased resistance to infections and worsening vaccine response (Franceschi et al., 1999). The impact of the association between HCMV infection and obesity in the T cell compartment is not currently well understood. To contribute to the understanding of this process, in this study we evaluated and related serum biochemical parameters, percentages of CD4 T and CD8 T lymphocytes subpopulations in peripheral blood, and anthropometric parameters with the HCMV serum status of overweight and subject with obesity. The main objective of this study was to evaluate whether cytomegalovirus infection in overweight and obese subjects impact the frequency of circulating memory T lymphocyte subpopulations.

Materials and Methods

Study design and population characteristics

This is a cross-sectional study and data presentation following the STROBE guidelines. The participants were from Porto Alegre, RS, Brazil. Collection and analysis was conducted between January 2017 and January 2018. One hundred eleven (111) men were enrolled in this study, aged between 20 and 40 years and no chronic illness apart from being overweight. All participants were non-smokers, reported weight stability (< 2 kg for > 3 months), had a normocaloric diet, and did not take medications or food supplements that could affect the immune system and metabolism for at least six months. The normocaloric diet was defined as an intake of 90% to 100% of the energy expended by each participant (data not shown). Exclusion criteria included ingestion greater than or equal to 10 alcoholic drinks per week, heart diseases, immune diseases, chronic or acute infections, and type 1 and 2 diabetes mellitus. The participants completed a medical questionnaire. Firstly, participants were assigned to one of three groups based on BMI: eutrophic (34 individuals), overweight (26 individuals), and obese (51 individuals) groups. Then, groups were characterized according to their HCMV serology determined by enzyme immunoassay (ELISA).

Ethics

The UFCSPA Research Ethics Committee approved this study with protocol number 63282416.6.0000.5345. All experiments followed the guidelines of the Declaration of Helsinki. All participants were informed about the study and signed the informed consent form. The privacy rights of human subjects were always carefully observed during this study.

Blood collection and classification criteria

Blood samples (8 mL) were collected in tubes with k3 EDTA or tubes without anticoagulants (BD, USA). Tubes without anticoagulants were centrifuged at 1500 RPM. After that, the serum was collected, separated in freezing tubes, and stored at -20°C . Body mass (kg) and height (meters) were determined by a semi-analytical scale with a stadiometer attached (Welmy, Brazil). Body fat was determined by the Jackson & Pollock formula and converted to fat percentage.

Quantification of biochemical parameters in the blood and enzyme immunoassay for HCMV serology

The concentration of glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), and triglycerides were detected through the serum using commercial kits in an automated biochemical analyzer Bioclin BS120 (Bioclin, BR) following the manufacturer's recommendations. The presence of anti-HCMV IgG in the serum was evaluated using the ELISA kit (Uniscience, BR), and the procedure was executed following the manufacturer's instructions. The individuals were classified as HCMV positive if they present IgG titles beyond the cut-off or HCMV negative if not.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells, staining and flow cytometry

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were then isolated by centrifugation over a 4mL Ficoll-Histopaque gradient ($900 \times g$, 30 min). Trypan blue exclusion assay analysis was used to determine the cell viability. PBMCs were then resuspended in complete cell culture medium [RPMI-1640, supplemented with 2g/L of sodium bicarbonate, 2% glutamine, and 10% fetal bovine serum (FBS), to prevent contamination 100U/mL of penicillin and 0,1 mg/mL of streptomycin]. Isolated PBMCs (4×10^5 cell/tube) were washed, and the cell's surface Fc receptors were blocked with Fc blocking buffer for 20 minutes. Then, the cells were stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD39, anti-CD25, anti-CD27, and anti-CD28, for 30 minutes in the dark and on ice. The stained cells were rewashed, and cell populations were acquired using the flow cytometry FACSCalibur (BD bioscience). The data were analyzed using Cell Quest Software.

Statistical analyses

The data was analyzed using the SPSS 22.0 statistical program. The normality test was verified using the Kolmogorov-Smirnov test, and the characteristics of the individuals and the variables studied were submitted to descriptive statistics. The t variables mass, percentage of fat, triglycerides, cholesterol, HDL, LDL, CD4, CD8, and the CD4/CD8 ratio showed normal distribution. ANOVA test compared the biochemical markers' values between the different groups. The correlation among the groups was made using the Pearson's Correlation test. The parameters BMI variables, glucose, CD3+CD4+CD25+CD39+, CD3+CD4+CD25-CD39+, CD3+CD8+CD27+CD28+, and

CD3+CD8+CD27-CD28- showed a non-parametric distribution. To perform the comparisons, the Kruskal-Wallis test was used, and to verify the values, the Mann-Whitney U test was used. The correlation was made using the Spearman Correlation test. The significance level adopted for all tests was 5%.

Results

Of the 111 individuals participating in the study, all were male, and the mean age was 34.72 ± 3.55 , of which 34 were characterized as eutrophic, 26 as overweight and 51 as obese. As shown in Table 1, it was found that 14.41%, 8.10%, and 24.32% of eutrophic, overweight, and obese subjects, respectively, presented positive serology to HCMV. This represents 46.83% of the individuals with positive IgG serology to HCMV. No significant correlation was observed when comparing the HCMV seropositivity to age, BMI, mass, and fat percentage. It is assumed that all analyses were performed using the variable HCMV seropositivity.

During the HCMV replication cycle, this virus interferes in the cell's glucose and lipid metabolism, which can alter its serological biochemical parameters. Thus, we quantified the biochemical markers glucose, triglycerides, and cholesterol (total, HDL, and LDL) in eutrophic, overweight, and obese groups and correlated them with seropositivity for HCMV. No statistically significant differences were observed between the groups, considering the HCMV seropositivity as a variable (table 2). These data suggest that HCMV infection does not directly influence the biochemical markers concentrations in the serum even when the individual is overweight or obese.

Several previous studies have shown that HCMV infection influences the CD4 T and CD8 T lymphocytes numbers and functions when associated with specific conditions such as immunosuppression and elderly age (Apoil et al., 2017; Gerna et al., 2006; Jackson et al., 2017; Vieira Braga et al., 2015). We assessed whether, in overweight or obese subjects conditions, the HCMV seropositivity also alters the peripheral blood lymphocyte percentage. We did not observe any significant alterations in the percentage of peripheral blood CD3+ CD4+ cells (T helpers) and CD3+CD8+ cells (T cytotoxic) among eutrophic, overweight, and obese subjects, independently of the HCMV serological status (Figure 1A and B). As the CD4:CD8 ratio is an essential marker for immunosenescence and a slight increase in CD3+CD8+ cells were observed in HCMV-positive groups, when comparing the CD4:CD8 ratio. In overweight and obese groups, there is a significant reduction in the CD4:CD8 ratio (Figure 1C). These data indicate that HCMV seropositivity in individuals

with weight gain influences the percentage of circulating CD8 T lymphocytes and the CD4:CD8 ratio.

Some previous studies have shown that there are changes in the frequency of effector and regulatory CD4 T lymphocytes in HCMV infection (Elsaghir et al., 2023; Sester et al., 2002; Tovar-Salazar et al., 2010). Thus, we evaluated the frequency of memory regulatory T cells (CD3+CD4+CD25+CD39+) and memory effector cells (CD3+CD4+CD25-CD39+) in peripheral blood cells from eutrophic, overweight, and obese subjects with HCMV seropositive or seronegative (figures 2 A and B). No significant difference was observed between the eutrophic, overweight, and obese groups, regardless of HCMV serological status. There is a tendency towards a reduction in memory and regulatory T cells and an increase in memory effector T cells in the obese subjects group.

The co-stimulant mediates the primary CD8 T cell response against viruses via CD27 and CD28. Analyses in murine infection models by LCMV and humans with HCMV showed that these markers are reduced or absent on CD8 T cells. Considering that characteristic of the HCMV immunological profile, we quantified the total cell populations CD8+CD27+CD28+ (early-differentiated memory) and CD8+CD27-CD28- (late differentiated memory) in peripheral blood of eutrophic, overweight, and obese subjects. As shown in figure 2C, there is no significant difference in CD8+CD27+CD28+ frequency between HCMV seronegative and seropositive groups. On the other hand, when we quantified the frequency of CD8+CD27-CD28- cells, there was a significant increase in these cells in overweight and obese subjects who are HCMV seropositive (figure 2D). The increase in circulating late memory CD8 T cells in overweight and obese subjects is potentiated by a HCMV infection. Table 3 presents the distribution and percentage of peripheral blood T cell populations of all the groups analyzed, based on the HCMV seropositivity.

Discussion

Cytomegalovirus is a highly distributed virus worldwide . It infects men and women of every age bracket. We found that 46.3% of the individuals in the studied groups, stratified according to the body index, had serum IgG antibodies against HCMV. However, we did not find significant differences in the proportions of CMV seropositivity between the different BMI groups. The average found is comparable with other epidemiological evaluation studies. A recent systematic review conducted by Fowler k., et al (2022) described the most recent epidemiologic burden of CMV globally. They demonstrated

that seropositivity for HCMV corresponds to 39.3% of the population in France, 48% in the US, and 58 to 94% in Latin American countries, including Brazil (Fowler et al., 2022). As the present study was conducted in the southern region of Brazil, which has a better economic status than most regions of the country, the similarity in seropositivity with more developed countries is acceptable.

We did not observe any direct correlation between obesity and HCMV seropositivity (table 1). This observation has also been seen in other studies of obese subjects. Indeed, the weak association between biochemical parameters and seropositivity for HCMV is interesting. During the HCMV replication cycle, regarding the synthesis of new viral particles, the virus induces the synthesis of lipids within the cytoplasm, which will be used to produce envelopes. There is an increase in the entry of glucose into the cell, which is initially induced by the virus itself and later amplified by the expression of receptors of the type GLUT 4 (adipocyte-specific glucose transporter -4) to increase glucose uptake (Spencer et al., 2011). Excess glucose influx does not enter the Krebs cycle but is diverted to fatty acid biosynthesis and used by the viral machinery to promote the production of envelope membranes (Yu et al., 2011). Based on that mechanism, cholesterol, lipids, and glucose are expected to increase. It is likely related to the frequency of recurrent viral activation and other metabolic parameter interference that we did not analyze.

It is well established that the persistence of HCMV infection and frequent reactivations induces alterations in T cell populations is related to immunosenescence (Alonso Arias et al., 2013; Nikolich-Žugich and van Lier, 2017). However, the impact of the association between HCMV infection and obesity in the T cell compartment is not yet well understood. The increase in the peripheral CD8 T cells associated with the HCMV infection was observed by several groups and is related to memory inflation (Karrer et al., 2003; Snyder et al., 2011; Yeh et al., 2021). It was recently discovered that even the latent virus can induce memory inflation. Our results show a tendency towards an increase in peripheral CD8 T lymphocytes in overweight and obese subjects, which significantly reduced the CD4:CD8 ratio. Studies comparing the CD4:CD8 ratio between HCMV negative and positive individuals indicate CD4:CD8 ratio reductions in the 0.5-fold range (Joisten et al., 2023). We observed a reduction in the CD4:CD8 ratio in the 1.5 fold range. Our hypothesis is that this more significant reduction results from the association between increased body fat and HCMV infection. It is acceptable that there is an inversion in the CD4/CD8 ratio when the individuals are elderly or when there is a persistent viral infection; our findings corroborate these results

For the analysis of subpopulations of effector and memory regulator CD4 T lymphocytes, we used the combination of markers previously described by our group (Dorneles et al., 2020). As we previously observed an increase in populations of effector CD4 lymphocytes in obese subjects, potentiated during physical exercise, we hypothesized that there could be an impact when the individual has a HCMV infection. However, we found an increase in these cells in the obese subject group but no correlation, either of effector T CD4 or memory regulator, with HCMV infection. To characterize the populations of newly differentiated and highly differentiated CD8 T lymphocytes, we used the combination of cell markers proposed by Bigley, A.B. et al. (2016) (Bigley et al., 2016). Latent HCMV infection alters the immune profile, as observed by the expansion of populations of high-differentiated T-cells, even in young adults (Ouyang et al., 2003) (van de Berg et al., 2010). Turner and coworkers (2014) previously reported the impact of HCMV latent infection on premature signs of immunosenescence in young adults, mainly by increases in late differentiated/effector CD8+ T cells and plasma IL-6 levels (Turner et al., 2014). Furthermore, positive correlations between HCMV IgG titers and late-differentiated T cells in both rheumatoid patients and healthy controls indicate that latent infection may contribute to premature T-cell senescence independently of chronic diseases (Petersen et al., 2019). The hallmarks of T cell senescence-associated alterations to immune signatures are indeed observed in the general population in people infected with HCMV and not those infected with a different persistent herpesvirus (Derhovanessian et al., 2011). In this sense, the increased risk for severe pathogen infection observed in obese subjects may be linked to an immune surveillance dysfunction due to latent HCMV infection inducing T cell senescence. Obese individuals with or without type 2 diabetes presented increased gene expression of inflammatory markers, programmed cell death protein 1 (PD-1), and CD27 associated with a higher prevalence of HCMV latent infection (Brunelli et al., 2022). This study has some limitations, such as the impossibility of predicting the number of HCMV reactivations. In addition, a specific response to HCMV was not analyzed. It was also not possible to monitor patients because most of them drop out of the study.

Conclusion:

Our results indicate that the association between overweight/obesity and HCMV infection increases the frequency of CD8 T lymphocytes with senescent phenotype in peripheral blood, which may be related to worse clinical outcomes.

Author contribution

Luiz C. Rodrigues Jr, Gilson D. Pires and Diego D. Lima constructed an idea for research and manuscript, planned methodology, organized, collected the data and supervised the course of the project. Alessandra Peres, Joane S. Ribeiro and Pedro Romão collected, organized, analyzed, and interpreted data. Luiz C. Rodrigues Jr. Gilson D. Pires and Diego D. Lima wrote the manuscript. Pedro Romão was responsible for the grant used to fund the study. All authors have critically reviewed and approved the final draft, and are responsible for the content and similarity index of the manuscript.

Sponsorship

Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES), Research Support Foundation in Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA).

Acknowledgments

We thank all the individuals who participated in the groups and study of this project. The authors have no conflict of interest.

References

- Afolabi, H.A., Zakaria, Z. bin, Hashim, M.N.M., Vinayak, C.R., Ahmed Shokri, A. Bin, 2019. Body Mass Index and predisposition of patients to knee osteoarthritis. *Obes. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2019.100143>
- Alonso Arias, R., Moro-García, M.A., Echeverría, A., Solano-Jaurrieta, J.J., Suárez-García, F.M., López-Larrea, C., 2013. Intensity of the Humoral Response to Cytomegalovirus Is Associated with the Phenotypic and Functional Status of the Immune System. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/jvi.02425-12>
- Apoil, P.A., Puissant-Lubrano, B., Congy-Jolivet, N., Peres, M., Tkaczuk, J., Roubinet, F., Blancher, A., 2017. Influence of age, sex and HCMV-serostatus on blood lymphocyte subpopulations in healthy adults. *Cell. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.02.001>
- Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M.A., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., Little, S., Havlir, D. V., Richman, D.D., Gruener, N., Pape, G., Waters, A., Easterbrook, P., Salio, M., Cerundolo, V., McMichael, A.J., Rowland-Jones, S.L., 2002. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.* 8, 379–385. <https://doi.org/10.1038/nm0402-379>
- Bate, S.L., Dollard, S.C., Cannon, M.J., 2010. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: The national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1086/652438>
- Bigley, A.B., Spielmann, G., Agha, N., O'Connor, D.P., Simpson, R.J., 2016. Dichotomous effects of latent CMV infection on the phenotype and functional properties of CD8+ T-cells and NK-cells. *Cell. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.11.005>
- Borysiewicz, L.K., Hickling, J.K., Graham, S., Sinclair, J., Cranage, M.P., Smith, G.L., Patrick

- Sissons, J.G., 1988. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-KD immediate early protein and glycoprotein b expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.168.3.919>
- Brunelli, D.T., Boldrini, V.O., Bonfante, I.L.P., Duft, R.G., Mateus, K., Costa, L., Chacon-Mikahil, M.P.T., Teixeira, A.M., Farias, A.S., Cavaglieri, C.R., 2022. Obesity Increases Gene Expression of Markers Associated With Immunosenesescence in Obese Middle-Aged Individuals. *Front. Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.806400>
- Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I., Kim, J.B., 2016. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 7, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>
- De Heredia, F.P., Gómez-Martínez, S., Marcos, A., 2012. Chronic and degenerative diseases: Obesity, inflammation and the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* 71, 332–338. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000092>
- Derhovanessian, E., Larbi, A., Pawelec, G., 2009. Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. *Curr. Opin. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.05.012>
- Derhovanessian, E., Maier, A.B., Hähnel, K.H., Beck, R., de Craen, A.J.M., Slagboom, E.P., Westendorp, R.G.J., Pawelec, G., 2011. Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of latedifferentiated CD4 + and CD8 + T-cells in humans. *J. Gen. Virol.* <https://doi.org/10.1099/vir.0.036004-0>
- Dolfi, D. V., Katsikis, P.D., 2007. CD28 and Cd27 costimulation of Cd8+ T cells: A story of survival, in: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-0-387-34814-8_11
- Dorneles, G.P., da Silva, I.M., Santos, M.A., Elsner, V.R., Fonseca, S.G., Peres, A., Romão, P.R.T., 2020. Immunoregulation induced by autologous serum collected after acute exercise in obese men: a randomized cross-over trial. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78750-z>
- Elsaghir, A., El-Sabaa, E.M.W., Ahmed, A.K., Abdelwahab, S.F., Sayed, I.M., El-Mokhtar, M.A., 2023. The Role of Cluster of Differentiation 39 (CD39) and Purinergic Signaling Pathway in Viral Infections. *Pathogens*. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020279>
- Ferreira, A.P. de S., Szwarcwald, C.L., Damacena, G.N., de Souza Júnior, P.R.B., 2021. Increasing trends in obesity prevalence from 2013 to 2019 and associated factors in Brazil. *Rev. Bras. Epidemiol.* <https://doi.org/10.1590/1980-549720210009.SUPL.2>
- Fowler, K., Mucha, J., Neumann, M., Lewandowski, W., Kaczanowska, M., Grys, M., Schmidt, E., Natenshon, A., Talarico, C., Buck, P.O., Diaz-Decaro, J., 2022. A systematic literature review of the global seroprevalence of cytomegalovirus: possible implications for treatment, screening, and vaccine development. *BMC Public Health*. <https://doi.org/10.1186/s12889-022-13971-7>
- Franceschi, C., Valensin, S., Fagnoni, F., Barbi, C., Bonafè, M., 1999. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: The challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp. Gerontol.* [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(99\)00068-6](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(99)00068-6)
- Gerna, G., Lilleri, D., Fornara, C., Comolli, G., Lozza, L., Campana, C., Pellegrini, C., Meloni, F., Rampino, T., 2006. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8 + T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am. J. Transplant.* <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01488.x>
- Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years, 2017. . *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/nejmoa1614362>
- J Heath, J., D Grant, M., 2020. The Immune Response Against Human Cytomegalovirus Links Cellular to Systemic Senescence. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells9030766>
- Jackson, S.E., Sedikides, G.X., Mason, G.M., Okecha, G., Wills, M.R., 2017. Human Cytomegalovirus (HCMV)-Specific CD4 + T Cells Are Polyfunctional and Can Respond to HCMV-Infected Dendritic Cells In Vitro . *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/jvi.02128-16>
- Joisten, N., Wences Chirino, T.Y., Boßlau, T.K., Wasserfurth, P., Hahn, A., Krüger, K., Zimmer, P., 2023. Older adults with cytomegalovirus reveal increased CD8+/CD4+ EMRA T cells and

elevated systemic levels of kynurenic acid. *Immunology*. <https://doi.org/10.1111/imm.13609>

Karrer, U., Sierro, S., Wagner, M., Oxenius, A., Hengel, H., Koszinowski, U.H., Phillips, R.E., Klenerman, P., 2003. Memory Inflation: Continuous Accumulation of Antiviral CD8+ T Cells Over Time. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.2022>

Kim, J., Kim, A.-R., Shin, E.-C., 2015. Cytomegalovirus Infection and Memory T Cell Inflation. *Immune Netw.* <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.4.186>

Kim, S., Parks, C.G., DeRoo, L.A., Chen, H., Taylor, J.A., Cawthon, R.M., Sandler, D.P., 2009. Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0935>

Komatsu, H., Sierro, S., Cuero, A. V., Klenerman, P., 2003. Population analysis of antiviral T cell responses using MHC class I-peptide tetramers. *Clin. Exp. Immunol.* <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02266.x>

Lan, K., Luo, M.H., 2017. Herpesviruses: epidemiology, pathogenesis, and interventions. *Virology*. <https://doi.org/10.1007/s12250-017-4108-2>

Lang, A., Brien, J.D., Nikolich-Zugich, J., 2009. Inflation and Long-Term Maintenance of CD8 T Cells Responding to a Latent Herpesvirus Depend upon Establishment of Latency and Presence of Viral Antigens. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801117>

Mundstock, E., Sarria, E.E., Zatti, H., Mattos Louzada, F., Kich Grun, L., Herbert Jones, M., Guma, F.T.C.R., Mazzola, J., Epifanio, M., Stein, R.T., Barbé-Tuana, F.M., Mattiello, R., 2015. Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Obesity*. <https://doi.org/10.1002/oby.21183>

Nikolich-Zugich, J., van Lier, R.A.W., 2017. Cytomegalovirus (CMV) research in immune senescence comes of age: overview of the 6th International Workshop on CMV and Immunosenescence. *GeroScience*. <https://doi.org/10.1007/s11357-017-9984-8>

Nogalski, M.T., Collins-McMillen, D., Yurochko, A.D., 2014. Overview of human cytomegalovirus pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* 1119, 15–28. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-788-4_2

Ouyang, Q., Wagner, W.M., Voehringer, D., Wikby, A., Klatt, T., Walter, S., Müller, C.A., Pircher, H., Pawelec, G., 2003. Age-associated accumulation of CMV-specific CD8+ T cells expressing the inhibitory killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). *Exp. Gerontol.* [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(03\)00134-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00134-7)

Pawelec, G., 2014. Immunosenescence: Role of cytomegalovirus. *Exp. Gerontol.* <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.010>

Petersen, L.E., Schuch, J.B., de Azeredo, L.A., Baptista, T.S.A., Motta, J.G., do Prado, A.D., Bauer, M.E., 2019. Characterization of senescence biomarkers in rheumatoid arthritis: relevance to disease progression. *Clin. Rheumatol.* <https://doi.org/10.1007/s10067-019-04615-0>

Reilly, S.M., Saltiel, A.R., 2017. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 633–643. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>

Sester, M., Sester, U., Gärtner, B., Kubuschok, B., Girndt, M., Meyerhans, A., Köhler, H., 2002. Sustained High Frequencies of Specific CD4 T Cells Restricted to a Single Persistent Virus. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/jvi.76.8.3748-3755.2002>

Shirakawa, K., Sano, M., 2021. T cell immunosenescence in aging, obesity, and cardiovascular disease. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells10092435>

Snyder, C.M., Cho, K.S., Bonnett, E.L., Allan, J.E., Hill, A.B., 2011. Sustained CD8+ T cell memory inflation after infection with a single-cycle Cytomegalovirus. *PLoS Pathog.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002295>

Spencer, C.M., Schafer, X.L., Moorman, N.J., Munger, J., 2011. Human Cytomegalovirus Induces the Activity and Expression of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase, a Fatty Acid Biosynthetic Enzyme Whose Inhibition Attenuates Viral Replication. *J. Virol.* 85, 5814–5824. <https://doi.org/10.1128/jvi.02630-10>

Tovar-Salazar, A., Patterson-Bartlett, J., Jesser, R., Weinberg, A., 2010. Regulatory function of cytomegalovirus-specific CD4+CD27-CD28- T cells. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.038>

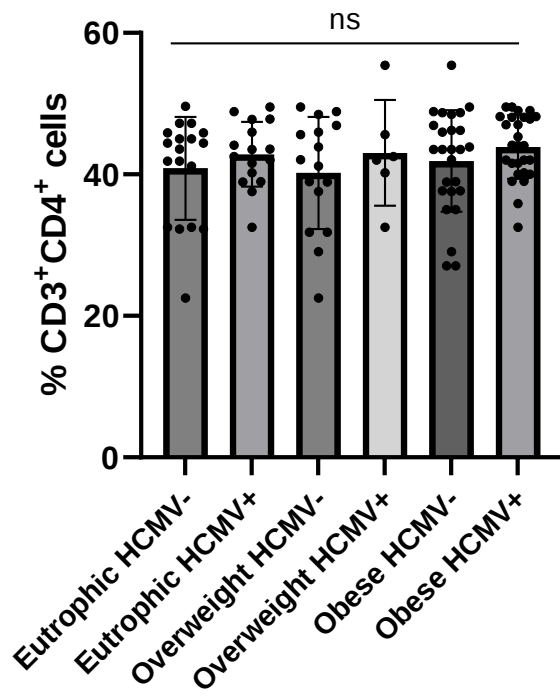
Tremmel, M., Lyssenko, V., Zöller, B., Engström, G., Magnusson, M., Melander, O., Nilsson,

- P.M., Bachus, E., 2018. Characteristics and prognosis of healthy severe obesity (HSO) subjects - The Malmo Preventive Project. *Obes. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2018.06.005>
- Turner, J.E., Campbell, J.P., Edwards, K.M., Howarth, L.J., Pawelec, G., Aldred, S., Moss, P., Drayson, M.T., Burns, V.E., Bosch, J.A., 2014. Rudimentary signs of immunosenescence in Cytomegalovirus-seropositive healthy young adults. *Age (Omaha)*. <https://doi.org/10.1007/s11357-013-9557-4>
- Van De Berg, P.J., Heutinck, K.M., Raabe, R., Minnee, R.C., Young, S. La, Van Donselaar-Van Der Pant, K.A., Bemelman, F.J., Van Lier, R.A., Ten Berge, I.J., 2010. Human cytomegalovirus induces systemic immune activation characterized by a type 1 cytokine signature. *J. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1086/655472>
- van de Berg, P.J.E.J., Griffiths, S.J., Yong, S.-L., Macaulay, R., Bemelman, F.J., Jackson, S., Henson, S.M., ten Berge, I.J.M., Akbar, A.N., van Lier, R.A.W., 2010. Cytomegalovirus Infection Reduces Telomere Length of the Circulating T Cell Pool. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903442>
- Vieira Braga, F.A., Hertoghs, K.M.L., van Lier, R.A.W., van Gisbergen, K.P.J.M., 2015. Molecular characterization of HCMV-specific immune responses: Parallels between CD8+ T cells, CD4+ T cells, and NK cells. *Eur. J. Immunol.* <https://doi.org/10.1002/eji.201545495>
- Weitz, M., Kiessling, C., Friedrich, M., Prösch, S., Höflich, C., Kern, F., Volk, H.D., Sterry, W., Asadullah, K., Döcke, W.D., 2011. Persistent CMV infection correlates with disease activity and dominates the phenotype of peripheral CD8+ T cells in psoriasis. *Exp. Dermatol.* <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01250.x>
- Weltevrede, M., Eilers, R., de Melker, H.E., van Baarle, D., 2016. Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: A systematic review. *Exp. Gerontol.* <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.02.005>
- Wills, M.R., Carmichael, A.J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M.P., Plachter, B., Sissons, J.G., 1996. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/jvi.70.11.7569-7579.1996>
- Wills, M.R., Poole, E., Lau, B., Krishna, B., Sinclair, J.H., 2015. The immunology of human cytomegalovirus latency: Could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies? *Cell. Mol. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.75>
- Yeh, A.C., Varelias, A., Reddy, A., Barone, S.M., Olver, S.D., Chilson, K., Onstad, L.E., Ensbey, K.S., Henden, A.S., Samson, L., Jaeger, C.A., Bi, T., Dahlman, K.B., Kim, T.K., Zhang, P., Degli-Esposti, M.A., Newell, E.W., Jagasia, M.H., Irish, J.M., Lee, S.J., Hill, G.R., 2021. CMV exposure drives long-term CD57+ CD4 memory T-cell inflation following allogeneic stem cell transplant. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2020009492>
- Yu, Y., Maguire, T.G., Alwine, J.C., 2011. Human Cytomegalovirus Activates Glucose Transporter 4 Expression To Increase Glucose Uptake during Infection. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/jvi.01967-10>

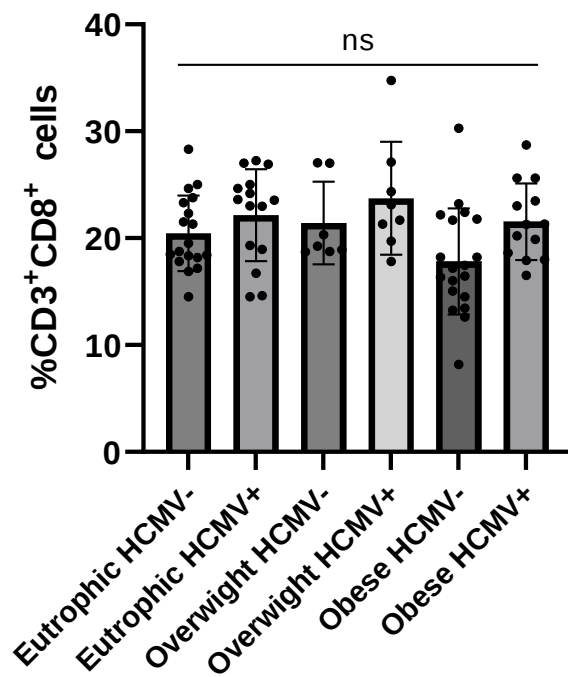
FIGURES

Figure 1

(A)



(B)



(c)

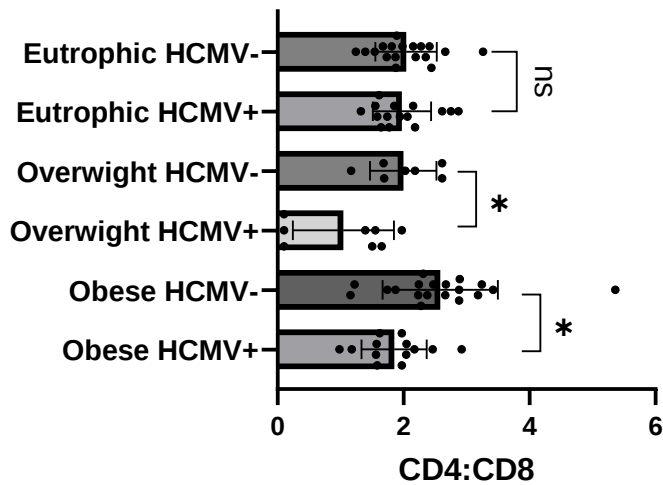
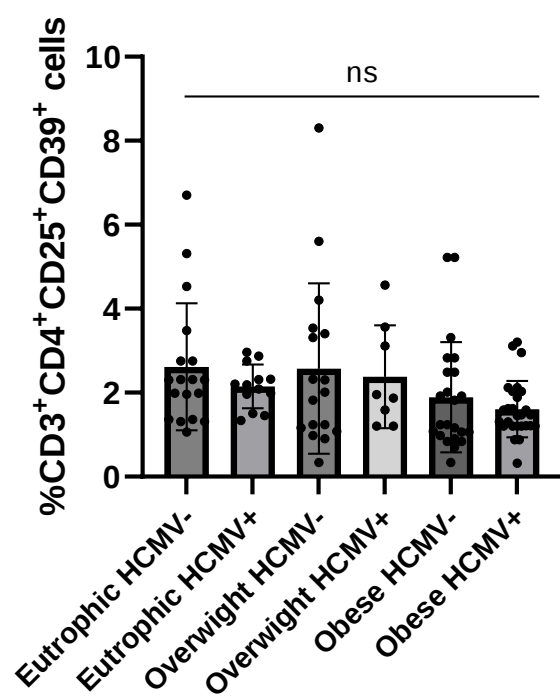


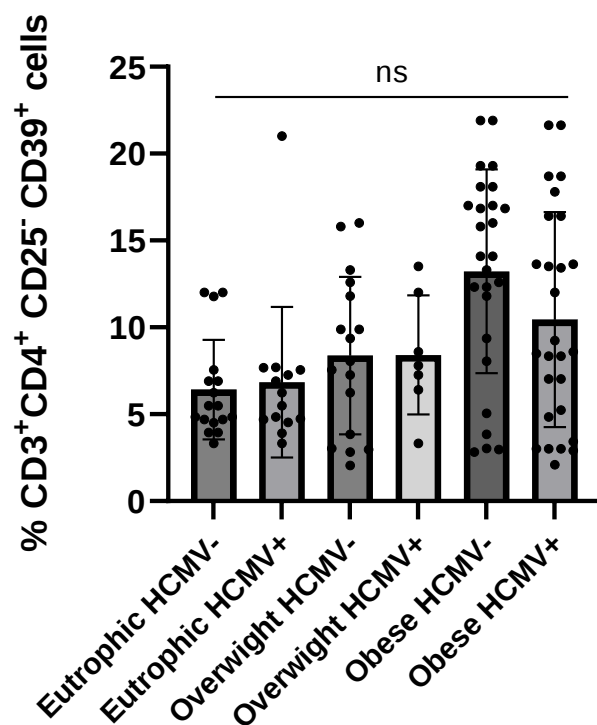
Figure 1: Phenotypic analysis of TCD4+ (T helper cells), TCD8+ (T cytotoxic cells) and CD4/CD8 ratio in HCMV seropositive and seronegative individuals according to BMI (eutrophic, overweight and obese). A) Percentage of CD3+ CD4+ cells. B) Percentage of CD3+CD8 cells. C) CD4:CD8 ratio. Percentage of cells from the total lymphocytes. To perform the comparisons, the Kruskal-Wallis test was used, and to verify the values, the Mann-Whitney U test was used. Asterisks indicate statistical significance (* $P < 0.05$). ns: non-significant ($P \geq 0.05$)

Figure 2

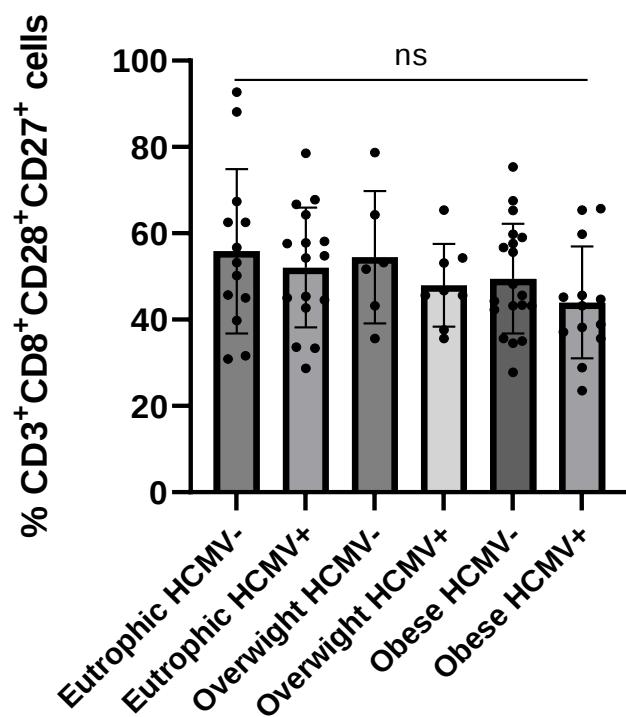
(A)



(B)



(C)



(D)

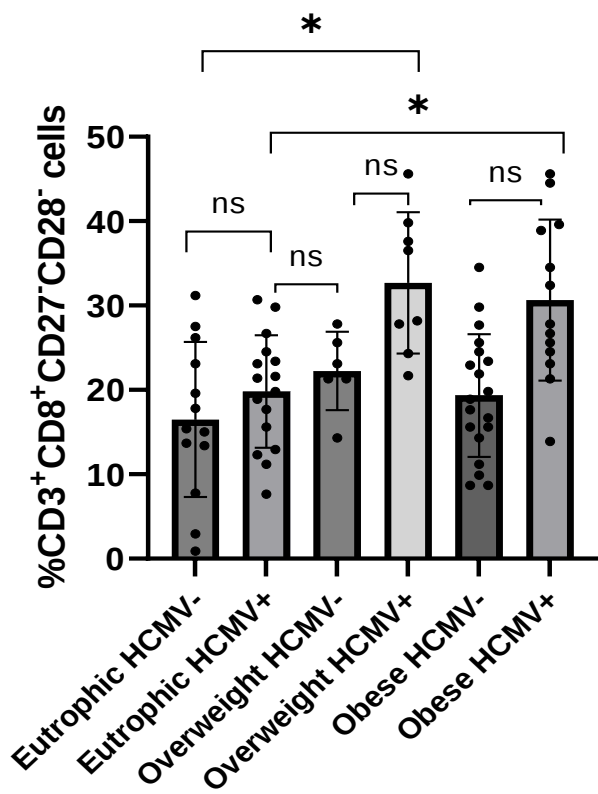


Figure 2: Phenotypic analysis of effector helper memory regulatory cells, effector memory T helper cells, early differentiated memory T cytotoxic cells and highly differentiated memory T cytotoxic cells in HCMV seropositive and seronegative individuals according to BMI (eutrophic, overweight and obese). A) Percentage of CD3+CD4+CD25+ CD39+ cells; B) Percentage of CD3+ CD4+ CD25- CD39+ cells; C) Percentage of CD3+CD8+CD27+CD28+ cells; D) Percentage of CD3+ CD8+CD27-CD28- cells. Percentage of cells from the total lymphocytes. To perform the comparisons, the Kruskal-Wallis test was used, and to verify the values, the Mann-Whitney U test was used. Asterisks indicate statistical significance (*P<0.05). ns: non-significant (P≥ 0.05)

TABLES

Table 1: Anthropometric data and serological status for HCMV of individuals grouped according to BMI

Characteristics	Eutrophic		Overweight		Obese	
	N = 34		N = 26		N = 51	
<i>Serological status</i>	HCMV negative	HCMV positive	HCMV negative	HCMV positive	HCMV negative	HCMV positive
	18	16	17	9	24	27
	16.22%	14.41%	15.31%	8.10%	21.62%	24.32%
Age (years)	33.28 ± 3.56	34.12 ± 2.96	33.53±2.40	34.11±2.47	36.46±4.31	35.26±3.41
BMI (kg/m ²)	22.38 ± 1.95	23.22 ± 1.11	27.87 ±1.30	27.68 ± 1.95	33.65±4.66	34.20±3.22
Mass (Kg)	68.75 ± 5.66	71.57 ± 5.08	86.91 ± 6.56	84.06 ± 8.99	101.20 ± 11.51	93.22 ± 11.72
Fat percentage	20.68 ± 2.69	18.77 ± 2.94	30.90 ± 6.94	27.64 ± 6.13	34.44 ± 3.30	38.87 ± 3.45

Table 2: Biochemical profile of individuals according to BMI and seropositivity for cytomegalovirus

Biochemical profile	Reference values	Eutrophic		Overweight		Obese	
		N = 34		N = 26		N = 51	
<i>Serological Status</i>	negative / positive	HCMV negative	HCMV positive	HCMV negative	HCMV positive	HCMV negative	HCMV positive
		18	16	17	9	24	27
		16.22%	14.41%	15.31%	8.10%	21.62%	24.32%
Glucose	99mg/dL	93.5 ± 13.43	83.56 ± 10.57	92.94 ± 19.53	92.80 ± 21.56	105.84 ± 38.64	97.27 ± 22.92
Triglycerides	Below 175mg/dL	140.61 ± 57.79	135.62 ± 48.26	156.35 ± 41.96	114.42 ± 44.40	159.26 ± 58.16	166.78 ± 88.45
Cholesterol	Below 190 mg/dL	155.55 ± 38.79	166.87 ± 39.75	170.29 ± 40.19	174.93 ± 38.18	189.96 ± 48.91	198.06 ± 57.55
HDL	Above 40 mg/dL	41.38 ± 7.63	50.81 ± 10.13	47.47± 8.70	52.23 ± 10.11	42.65 ± 10.71	50.38 ± 16.59
LDL	Below 130 mg/dL	110.94 ± 24.74	95.12 ± 18.08	105.29 ± 27.79	109.93 ± 25.39	118.76 ± 38.78	115.71 ± 33.12

Table 3: Frequency T lymphocyte subpopulations in peripheral blood from eutrophic, overweight, and obese individuals in relation to HCMV seropositivity

Characteristics / Phenotypic Profile	Eutrophic N = 34		Overweight N = 26		Subject with obesity N = 51	
	HCMV Negative 18 51.42%	HCMV Positive 16 48.57%	HCMV Negative 17 72%	HCMV Positive 9 28%	HCMV Negative 24 40.67%	HCMV Positive 27 59.32%
CD4+ Helper	40.85 ± 7.27	42.84 ± 4.58	41.09 ± 8.51	41.16 ± 4.60	41.89 ± 7.18	43.88 ± 4.51
CD8+ Cytotoxic	20.45 ± 3.52	21.93 ± 4.25	21.87 ± 4.02	23.72 ± 5.28	17.81 ± 4.95	21.54 ± 3.58
Ratio CD4/CD8	2.04 ± 0.48	2.01 ± 0.47	1.72 ± 0.54	1.13 ± 0.97	2.58 ± 0.91	2.12 ± 0.40
CD4+CD25+CD39+ Memory Regulatory T Cells	2.61 ± 1.51	2.14 ± 0.51	2.57 ± 2.02	2.38 ± 1.22	1.89 ± 1.31	1.6 ± 0.67
CD4+CD25-CD39+ (%) Effector memory T cells	6.31 ± 2.81	6.84 ± 4.33	8.38 ± 4.52	8.41 ± 3.42	13.22 ± 5.86	10.44 ± 6.18
CD8+CD27+CD28+ Early differentiated memory cytotoxic cells	55.86 ± 9.03	52.07± 13.89	54.45± 15.33	47.98 ± 9.58	49.47 ± 12.70	43.98 ± 12.94
CD8+CD27-CD28- Highly differentiated memory cytotoxic cells (senescent)	16.49 ± 9.18	19.82 ± 6.66	22.23 ± 4.64	32.68 ± 8.37	19.33 ± 7.28	30.64 ± 9.54