

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



**ILMD** INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

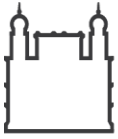
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA**  
**INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO**

**THAÍSSY DOS SANTOS XAVIER**

**DISFUNÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B EM PESSOAS VIVENDO**  
**COM HIV/AIDS INTERNADOS NA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL**  
**DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO**

**MANAUS – AM**

**2023**



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



**ILMD** INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA**  
**INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO**

**THAÍSSY DOS SANTOS XAVIER**

**DISFUNÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B EM PESSOAS VIVENDO**  
**COM HIV/AIDS INTERNADOS NA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL**  
**DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração em bioquímica, biologia celular e molecular de patógenos e seus vetores.

**Orientador: Prof. Dr. Yury Oliveira Chaves**

**Coorientador: Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira**

**MANAUS – AM**

**2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

X3d

Xavier, Thaíssy dos Santos

Disfunção de subpopulações de linfócitos B em pessoas vivendo com HIV/AIDS internados na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado. / Thaíssy dos Santos Xavier. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2023.

107 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2023.

Orientador: Profº. Dr. Yury Oliveira Chaves.

Co-orientador: Profº. Dr. Paulo Afonso Nogueira.

1. HIV 2. AIDS I. Título

CDU 616.98(043.3)

CDD 616.079

22. ed.

**Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – CRB-11 N° 287**

**THAÍSSY DOS SANTOS XAVIER**

**DISFUNÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFOCITOS B EM PESSOAS VIVENDO  
COM HIV/AIDS INTERNADOS NA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL  
DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração em bioquímica, biologia celular e molecular de patógenos e seus vetores.

**Aprovada em:** 14/07/2023.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Yury Oliveira Chaves

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Profa. Dra. Jéssica Amaral Lopes - Membro externo

Fiocruz Rondônia – FIOCRUZ/RO

Prof. Dr. Paulo Renato Rivas Totino - Membro interno

Fundação Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ

Aos meus pais, José Gilson e Idoneth, por todo amor e apoio  
durante essa jornada,

A minha avó Francisca, por ser a minha maior inspiração,

Ao meu primo Guilherme, pelo companheirismo,

Aos meus orientadores, Dr. Yury Chaves e Dr. Paulo Nogueira,  
por tornar este trabalho possível.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, o criador da vida e a quem firmo minha fé. Aquele que me ama desde sempre, apesar dos meus pecados e falhas.

A mim mesma, por ser resiliente, persistente, e acima de tudo não desistir de mim, mesmo nos piores dias da minha vida.

Aos meus pais, José Gilson e Idoneth, por todo apoio, todo esforço e dedicação para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Por acreditarem e me incentivarem a realizar meus sonhos, e especialmente por me amarem incondicionalmente, e compreenderem minhas ausências ao longo desses anos de vida acadêmica.

A toda minha família, minhas irmãs, Thaís, Kamilly, Kemelly e Júlia, e meus primos Igor e Guilherme, pela parceria em todas as brincadeiras, aventuras e, claro, vez ou outra, das brigas e discussões também. Meus tios, Vinícius e Iraíde, por me ajudarem quando precisei e por acreditarem no meu potencial. Aos meus avós maternos, Izaurino e Clarice, e meus avós paternos, José e Francisca, por sempre apostarem em mim.

Ao meu orientador, Dr. Yury Chaves, por ter me acolhido no início do mestrado, e por ter acreditado em mim. Por ter me orientado da melhor forma possível, sempre com muita dedicação e paciência. Sou grata por todo esforço dedicado a mim e a este trabalho. Obrigada por me inspirar.

Ao meu coorientador, Dr. Paulo Nogueira, por ter me aceitado como aluna de iniciação científica lá em 2019, contribuindo para o meu futuro acadêmico e profissional. Sou muita grata por toda ajuda pessoal e profissional durante todos esses anos.

As minhas amigas da turma de mestrado, Gabrielle Medeiros e Eunice Brandão, por dividirem comigo durante esses dois anos, as dores e as delícias de estar em uma pós-graduação.

As amigas que a pesquisa me deu, Carolina Shuan, Rebeca Pinheiro, Adriane Batalha, Alanna Paiva, Janilma Viegas e Fabíola Ramalho, por me ajudarem e me apoiarem. Sou grata pela existência e amizade de cada uma.

A Dra. Rafaella Santos, pela disposição em ajudar a executar o CBA e por ter revisado meu trabalho, e a Dra. Elizângela Farias pela ajuda na execução dos ELISAS. E aos demais membros do grupo DCDIA, Kássia Katarina, Krys Duarte, Rami Colares, Andresa Cortez, e

Fernanda Batalha. Agradeço a todos pela companhia e ajuda, pelas bagunças, risos e momentos, dentro e fora do laboratório.

A todos os meus amigos pessoais, em especial, Fran Oliveira, Alexsandro Abreu e Gabrielle Mello, presentes na minha vida desde o ensino médio. Obrigada por existirem e tornarem minha vida mais alegre e divertida.

Ao meu gato, Sirius Black, meu filhote, que com sua simples existência, faz dos meus dias os mais felizes.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia (ILMD/ Fiocruz Amazônia) pela oportunidade de realizar esta etapa da vida acadêmica e profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro (PPBGIO-Interação), por contribuir no meu crescimento profissional e por sempre buscar melhorias para formação dos acadêmicos.

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e a Unidade de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (UPCCB), por disporem de seus espaços para execução deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pelo suporte financeiro e técnico.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte ou contribuíram com minha formação e com este trabalho, sou extremamente grata!

“Vivemos para realizar nossos desejos, mas parece que  
na escuridão da noite, esquecemos disso”

Fullmetal Alchemist



## RESUMO

A síndrome da imunodeficiência humana está associada à desregulação e disfunção envolvendo todas as principais populações de linfócitos, incluindo células B, a hipergamaglobulinemia e imunidade humoral defeituosa são as características da anormalidade de células B na infecção por HIV-1, mas estas permanecem não esclarecidas mecanisticamente. Objetivo: Investigar a disfunção das subpopulações de linfócitos B em pessoas vivendo com HIV/AIDS, internadas na Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado, com ou sem história frequente de internação. Amostras de sangue de 70 PVHA internadas foram coletadas até 24h da admissão. Níveis plasmáticos de citocinas IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70 foram quantificadas por citometria de fluxo, CD14 solúvel (sCD14) e IgM foram quantificados por ELISA. Células mononucleares foram separadas do sangue periférico em gradiente de ficoll visando a imunofenotipagem *ex vivo* e *in vitro*. Linfócitos B foram fenotipados por marcadores CD19, CD27, CD70 e a produção intracelular de IgM por citometria de fluxo. As células foram cultivadas com diferentes antígenos (peptídeo gp120 e p24, CpG e Lipopolissacarídeo (LPS) durante 24h para dosagem de citocinas e IgM no sobrenadante de cultura. As características clínicas analisadas nas PVHA internados, demonstrou 1,5 vezes mais chances de óbito em pessoas reinternadas com prevalência as do sexo masculino (77,8%), em uso de TARV irregular (61,1%) baixo nível de CD4 (113 céls/mm<sup>3</sup>) e carga viral (78.000 cópias) com aumento de linfócitos B imaturos produtores de IgM (p=0,0184) e níveis séricos de IgM (p=0,037) durante a internação com baixa produção de IL-10 (p=0,0388), com perda de correlações com as citocinas inflamatórias IL-8, IL-6, TNF e IL-1 $\beta$ . Problemas de reconhecimento da imunidade adaptativa a antígenos HIV foram observados *in vitro* com baixa produção de IL-6 (p=0,0499) e IgM (p=0,0127), nesse grupo. A relação entre IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF, frente a antígeno CpG foi encontrada, semelhantes às do grupo que não necessita de reinternação após a alta, que podem estar relacionados a problemas de restituição imunológica e favorecimento da hipergamaglobulinemia nos reinternados. Conclusão: O presente estudo demonstrou que problemas na restituição imunológica podem estar envolvida na hipergamaglobulinemia causada pela disfunção das subpopulações de linfócitos B produtores de IgM em PVHA com vários episódios de internação como fator de risco de vida.

**Palavras-chave:** Linfócitos B, HIV, AIDS, IgM, Internação

## ABSTRACT

**Introduction:** Hypergammaglobulinemia and defective humoral immunity are hallmarks of B cell abnormality in HIV-1 infection, but these remain mechanistically unclear. **Objective:** Investigate the dysfunction of B lymphocyte subpopulations in people living with HIV/AIDS, hospitalized at the Tropical Medicine Foundation – Heitor Vieira Dourado, with or without a frequent history of hospitalization. **Methodology:** Blood samples from 70 hospitalized PLWHA were collected within 24 hours of admission. Plasma levels of cytokines IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF and IL-12p70 were quantified by flow cytometry and soluble CD14 (sCD14) and IgM were quantified by ELISA. Mononuclear cells were separated from peripheral blood using a Ficoll gradient for ex vivo and in vitro immunophenotyping. B lymphocytes were phenotyped by CD19, CD27, CD70 markers and intracellular IgM production by flow cytometry. Cells were cultured with different antigens (gp120 and p24 peptide, CpG and Lipopolysaccharide) for 24 hours to measure cytokines and IgM in the culture supernatant. **Results:** The clinical characteristics analyzed in hospitalized PLWHA showed a 1.5 times greater chance of death in people readmitted with a prevalence of males (77.8%), using irregular ART (61.1%) low CD4 levels (113 cells/mm<sup>3</sup>) and viral load (78,000 copies) with an increase in immature B lymphocytes that produce IgM and serum levels of IgM (p=0.037) during hospitalization with low production of IL-10 (p=0.0388), with loss of correlations with the inflammatory cytokines IL-8, IL-6, TNF and IL-1 $\beta$ . Problems in recognizing adaptive immunity to HIV antigens were observed in vitro with low production of IL-6 (p=0.0499) and IgM (p=0.0127) in this group. The correlations between IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF, against CpG antigen was found, similar to those of the group that does not need readmission after discharge, which may be related to problems of immune restitution and favoring hypergammaglobulinemia in readmitted patients. **Conclusion:** The present study demonstrated that problems in immune restitution may be involved in hypergammaglobulinemia caused by the dysfunction of subpopulations of IgM-producing B lymphocytes in PLWHA with several episodes of hospitalization as a life-threatening factor.

**Keywords:** B Lymphocytes, HIV, AIDS, IgM, Hospitalization

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Taxa de detecção de AIDS (por 100.000 hab.) segundo região de residência, por ano de diagnóstico. ....	21
<b>Figura 2</b> - Estrutura do vírus HIV. ....	24
<b>Figura 3</b> - Ciclo replicativo do HIV e papel de enzimas virais. ....	25
<b>Figura 4</b> - Evolução clínica da infecção pelo HIV. ....	27
<b>Figura 5</b> - O papel do TFH na diferenciação de células B. ....	34
<b>Figura 6</b> - Exaustão de células B induzida por infecção persistente por HIV e replicação viral contínua. ....	35
<b>Figura 7</b> - Dinâmica das subpopulações de células B nos diferentes compartimentos em uma infecção pelo HIV. ....	39
<b>Figura 8</b> – Desenho experimental do estudo ....	44
<b>Figura 9</b> – Estratégia de gates e análises de subpopulações de linfócitos B IgM+ ....	46
<b>Figura 10</b> - Correlação entre subpopulações de linfócitos B naive (CD19+/CD27-CD70+) e dados clínicos em PVHA internadas no D0 na Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado ....	53
<b>Figura 11</b> - Análise de biomarcadores de disfunção de linfócitos B produtores de IgM sérica em PVHA entre grupos de retorno (vermelho) e não retorno internação (cinza) após alta ....	54
<b>Figura 12</b> - Análise da expressão de IgM em linfócitos B naive ativados em PVHA entre grupos de retorno (vermelho) e não retorno internação (cinza) após alta durante o dia 3 e 7 da internação.....	55
<b>Figura 13</b> - Análise da dosagem de citocinas séricas de plasma de PVHA entre grupos de retorno (vermelho) e não retorno internação (cinza) após alta. ....	56
<b>Figura 14</b> - Ilustração de estruturas de rede dos marcadores séricos de plasma e de imunofenotipagem celular de PVHA entre grupos de retorno (vermelho) e não retorno internação (cinza) após alta.. ....	57
<b>Figura 15</b> - Análise de disfunção de linfócitos B naive frente a diferentes tipos de estímulos em PVHA entre grupos de retorno (vermelho) e não retorno internação (cinza) após alta.. ....	58
<b>Figura 16</b> - Matriz de correlação citocinas e anticorpos IgM secretados, e células B naivas do sobrenadante de cultura de PBMC de PVHA entre grupos não retorno internação (à esquerda) e retorno (à direita) após alta. ....	61

<b>Figura 17</b> - Correlações entre a expressão de IgM intracelular em linfócitos B (CD27 <sup>-</sup> CD70 <sup>+</sup> ) e a produção de IgM secretada do sobrenadante de cultura frente a diferentes tipos de estímulos em PVHA do grupo NÃO RETORNO (Spearman).....	61
<b>Figura 18</b> - Correlações entre a expressão de IgM intracelular em linfócitos B (CD27 <sup>-</sup> CD70 <sup>+</sup> ) e a produção de IgM secretada no sobrenadante de cultura, frente a diferentes tipos de estímulos em PVHA do grupo RETORNO (Spearman). ....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características gerais da população .....	49
<b>Tabela 2.</b> Características Clínicas da população.....	50
<b>Tabela 3.</b> Análises Hematológicas.....	51
<b>Tabela 4.</b> Análises Bioquímicas .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>BCR</b>	Receptor de célula B
<b>bNAbs</b>	Anticorpos amplamente neutralizantes
<b>CBA</b>	<i>Cytometric Bead Array</i>
<b>CCR5</b>	Receptor de quimiocina tipo 5
<b>CD</b>	Cluster de diferenciação
<b>CXCR4</b>	Receptor de lectina tipo 4
<b>DC</b>	Célula dendrítica
<b>DC-SIGN</b>	Receptores de lectina tipo C
<b>DHL</b>	Desidrogenase láctica
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>Env</b>	Gene estrutural do HIV
<b>FMT-HVD</b>	Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado
<b>FO</b>	Foliculares
<b>Gag</b>	Gene estrutural do HIV
<b>GC</b>	Centro germinativo
<b>gp120</b>	Glicoproteína 120 do HIV
<b>gp41</b>	Glicoproteína 41 do HIV
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitário humano
<b>HSC</b>	Células-tronco hematopoiéticas
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IgD</b>	Imunoglobulina D
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G

<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ILMD</b>	Instituto Leônidas e Maria Deane
<b>LB</b>	Linfócito B
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MO</b>	Medula Óssea
<b>MZ</b>	Zona Marginal
<i>Nef</i>	Gene estrutural do HIV
<b>NK</b>	Células natural killer
<b>p17</b>	Matriz proteica do HIV
<b>p24</b>	Capsídeo viral do HIV
<b>pDC</b>	Células dendríticas plasmocitoides
<i>Pol</i>	Gene estrutural do HIV
<b>PVHA</b>	Pessoas vivendo com HIV/AIDS
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>sCD14</b>	CD14 solúvel
<b>sIgM</b>	IgM sérica
<b>SIV</b>	Vírus da imunodeficiência símia
<b>SHM</b>	Hipermutação somática
<i>Ver</i>	Gene funcional do HIV
<b>T CD4+</b>	Linfócito T auxiliar
<b>T CD8+</b>	Linfócito T citotóxico
<b>TAP</b>	Tempo de Atividade da Protombina
<b>TARV</b>	Terapia antirretroviral
<i>Tat</i>	Gene funcional do HIV
<b>TCR</b>	Receptor de célula T
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>TGO</b>	Transaminase glutâmico-oxalacética
<b>TGP</b>	Transaminase glutâmico-pirúvica

<b>T<sub>FH</sub></b>	Células T auxiliares foliculares
<b>TLR</b>	Receptores Toll-like
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>T<sub>regs</sub></b>	Células T reguladoras
<b>UNAIDS</b>	<i>The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
<b>Vif</b>	Gene funcional do HIV
<b>Vpr</b>	Gene funcional do HIV
<b>Vpu</b>	Gene funcional do HIV
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
2.1 Epidemiologia do HIV e AIDS .....	21
2.1.1 Hospitalizações por HIV .....	22
2.2 Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV .....	23
2.2.1 Características gerais .....	23
2.2.2 Ciclo de replicação do HIV-1 .....	24
2.2.3 História natural da infecção pelo HIV .....	26
2.2.4 A interação imunológica entre patógeno e hospedeiro .....	28
2.3 Desenvolvimento e ativação dos Linfócitos B .....	31
2.3.1 O papel das T <sub>FH</sub> na ativação das células B .....	33
2.3.2 Disfunção de Linfócitos B .....	34
2.3.3 Estado da arte da Patogênese da disfunção de linfócitos B .....	37
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
3.1 Objetivo Geral .....	41
3.2 Objetivos Específicos .....	41
<b>4. ESTRATÉGIAS METODOLÓGICAS</b> .....	<b>42</b>
4.1 Aspectos éticos .....	42
4.2 Tipo, população e local do estudo .....	42
4.3 Critérios de Inclusão .....	42
4.4 Critérios de não inclusão .....	42
4.5 Desenho experimental e Recrutamento .....	43
4.6 Obtenção dos dados clínicos .....	44
4.7 Coleta das amostras biológicas .....	44
4.8 Obtenção de Plasma .....	45
4.9 Obtenção das PBMCs (Células Mononucleadas do Sangue Periférico) para análise dos Linfócitos B .....	45
4.10 Cultivo das PBMC (Linfócitos B) frente a agonistas TLRs .....	45
4.11 Análise das moléculas de superfície dos linfócitos B .....	45
4.12 Quantificação de sIgM e sCD14 no sobrenadante e plasma .....	46
4.13 Quantificação de Citocinas do sobrenadante e plasma .....	46
4.14 Análise estatística .....	47
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>

5.1 Características gerais da população .....	48
5.2 Análises dos parâmetros laboratoriais .....	50
5.3 Frequência de Células B imatura/transicional/naive como marcador de disfunção de linfócitos B em Pessoas vivendo com AIDS .....	52
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....</b>	<b>70</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS – do inglês: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) foi considerada uma nova doença pela primeira vez em 1981 (CDC, 1981), e desde então, levou a alta taxa de mortalidade em pessoas infectadas, tornando-se um grave problema de saúde pública. No mundo, estima-se que 38,4 milhões de pessoas estão vivendo com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV – do inglês: *Human Immunodeficiency Virus*), e 40,1 milhões de pessoas morreram de doenças relacionadas à AIDS desde o início da epidemia, sendo 650 mil mortes somente no ano de 2021 (UNAIDS, 2022). Também em 2021, foram registrados no Brasil, aproximadamente, 11,2 mil óbitos por causas associadas à AIDS (BRASIL, 2022).

O HIV induz uma infecção crônica e latente, que as defesas imunológicas do hospedeiro não são capazes de eliminar, isso abrange perturbações tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Através de mecanismos patogênicos diretos e indiretos, o vírus induz danos extensos ao sistema imunológico, onde tanto o braço celular quanto o humoral do sistema imunológico são incapacitados de controlar a infecção, resultando em exaustão severa de várias funções dos linfócitos, isso inclui as células B e os anticorpos que elas produzem. (DE MILITO, 2004; MOIR; FAUCI, 2014).

A imunopatogênese da infecção pelo HIV está relacionada à desregulação e disfunção celular resultante da depleção de células TCD4<sup>+</sup>. A diminuição destas células influencia outras populações de linfócitos, incluindo células B, que leva a uma disfunção caracterizada desde os primeiros estudos de HIV no início da década de 80 (LANE et al., 1983). Essa disfunção consiste em problemas como hipergamaglobulinemia, ativação policlonal e respostas imunes fracas contra patógenos e antígenos de vacinação. Estes distúrbios ocorrem no começo da infecção e são estimuladas em grande parte pela ativação imunológica decorrente da replicação constante do HIV, resultando a efeitos secundários nas células B, podendo ser também consequências de alterações no desenvolvimento fisiológico das células B (MOIR; FAUCI, 2013; PENSIEROSO et al., 2013).

Em pessoas não infectadas pelo HIV, a maioria das células B no sangue periférico são células B virgens ou células B de memória. Em amostras de pessoas infectadas com HIV, os números de células B virgens e B de memória são reduzidos, e vários subpopulações de células B adicionais podem ser detectados no sangue periférico, incluindo células B transicionais,

regulatórias e esgotadas. Embora a disfunção de células B periféricas na infecção precoce pelo HIV seja estabelecida, ainda é pouco compreendido como as subpopulações de células B são alterados pela infecção (MOIR; FAUCI, 2009).

Ainda que as populações de células B não sejam o alvo direto da infecção pelo vírus, a disfunção nessas células pode ser em decorrência da redução no número de células T CD4<sup>+</sup> (ASCHER; SHEPPARD, 1988). Com o desbalanço imunológico causando pelo estado de imunodeficiência, há, por outro lado, uma hiperatividade das células B (HAAS; ZIMMERMANN; OXENIUS, 2011; MOUQUET, 2014; SODORA; SILVESTRI, 2008).

Com o advento da Terapia Antirretroviral (TARV) e consequente redução da carga viral do HIV, as pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) convivem com um estado de ativação imune crônica e que influencia o aumento da expressão dos marcadores de ativação nas células T. Também é visto ativação policlonal das células B com aumento dos níveis séricos das imunoglobulinas, caracterizada pela hipergamaglobulinemia (LANE et al., 1983). A hipergamaglobulinemia no HIV demonstra o estado hiperativo dessas células, desde os estágios iniciais da infecção, apresentando diferenças nas pessoas entre a fase de AIDS, daquelas pessoas com carga viral suprimida (AMADORI et al., 1991; KACANI; STOIBER; DIERICH, 1997; KEHRL et al., 1992; MACCHIA et al., 1991, 1993; MÜLLER et al., 1998).

Segundo estudos, a população de linfócitos B expressando CD27, característica dos linfócitos B de memória, é diminuída no HIV, que é uma das causas das respostas imunes fracas contra patógenos e antígenos vacinais (NAGASE et al., 2001; SAMUELSSON et al., 1997). A perda das células B de memória é progressiva, desde o início da infecção, e se intensifica com a redução do número de células TCD4<sup>+</sup> na AIDS. Para essas pessoas que entram em processo de AIDS, o déficit das populações de linfócitos B de memória não é corrigido, mesmo com o uso contínuo da terapia antirretroviral (DE MILITO, 2004). Assim, a maior parte das células B de pessoas vivendo com HIV é composta por células B naive (CD27-), que respondem de maneira ineficiente aos antígenos e contribuem, em grande parte, para a hipergamaglobulinemia observada na infecção pelo HIV. Por outro lado, há um o aumento da expressão do CD70 pelos linfócitos T ativados e sua interação com os linfócitos B implicaria na plasmocitose e, consequentemente, na hipergamaglobulinemia (BOLIAR et al., 2012; DE MILITO et al., 2001; HUNZIKER et al., 2003).

A infecção nas pessoas não tratadas leva à perda progressiva de células T CD4<sup>+</sup>, gerando uma ativação imune crônica por meio de mecanismos que estão amplamente relacionados aos

efeitos indiretos sistêmicos causados pela viremia do HIV (MOIR; FAUCI, 2009). Este ambiente aumenta a ativação de células imunológicas, contudo a hiperativação das células B, sem um controle imunológico eficiente pela ausência ou diminuição de células T CD4, tem impactos substanciais que contribuem para a progressão da doença. Assim, este estudo avaliou se fatores associados a disfunção de linfócitos B em PVHA hospitalizadas na FMT-HVD possam predizer a mortalidade. Sabe-se que a internação recorrente de PVHA é um fator de risco de óbito pouco conhecido. Aqui, a avaliação de dois dos principais fatores de disfunção de linfócitos B, a saber, a hipergamaglobulinemia por IgM sérica e fenótipos de linfócitos B imaturos *ex vivo* e *in vitro* foram capazes de determinar associações relacionadas as PVHA com histórico de internações recorrentes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Epidemiologia do HIV e AIDS

Em 1981, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças relataram agrupamentos incomuns de pneumonia por *Pneumocystis carinii* e sarcoma de Kaposi em homens gays em partes dos EUA. Esses foram os primeiros casos de AIDS relatados (CDC, 1981). Desde então, a epidemia causada pelo HIV tornou-se um grave problema de saúde pública, com taxas elevadas de novas infecções (BEYRER et al., 2013). Mundialmente, no ano de 2021, foram registrados um total 38,4 milhões de pessoas vivendo com HIV, 1,5 milhão de novas infecções pelo vírus, e 650 mil pessoas morreram de doenças relacionadas à AIDS em 2021 (UNAIDS, 2022).

No Brasil, desde o início da epidemia de AIDS em 1980 até junho de 2022, foram notificados 1.088.536 casos, com a maior concentração correspondente a região Sudeste com 50,1% do total de casos, seguida da região Sul com 19,7%, e as regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste que correspondem a 16,7%, 7,1% e 6,3% do total dos casos, respectivamente. A taxa de detecção de AIDS vem caindo no Brasil desde o ano de 2013. Em 2013, essa taxa foi de 21,9 casos por 100 mil habitantes; em 2020, de 14,5 casos por 100 mil habitantes, o menor valor observado desde a década de 90 (BRASIL, 2022) (Figura 1).

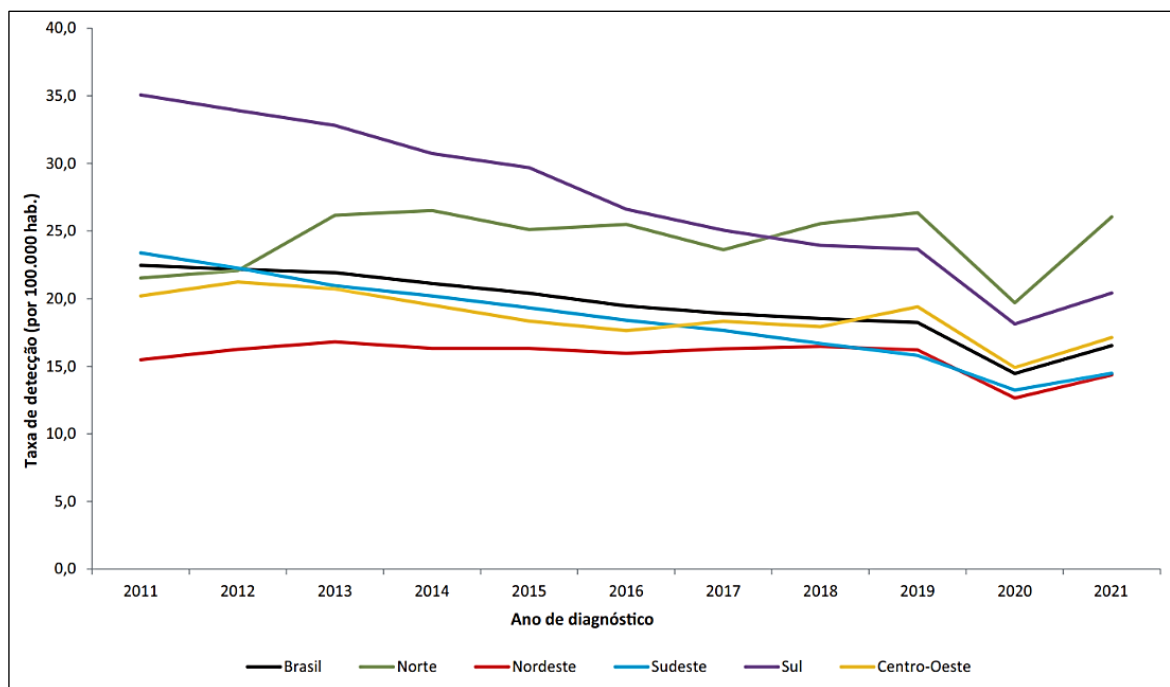


Figura 1 - Taxa de detecção de AIDS (por 100.000 hab.) segundo região de residência, por ano de diagnóstico. Brasil, 2011 a 2022\* Fonte: (BRASIL, 2022).

Em 2021, a taxa de detecção de AIDS elevou-se em 14,2%, representando 16,5 casos por 100 mil habitantes; contudo, manteve-se inferior à taxa de 2019. Foi demonstrado também o ranking das Unidades Federais referente às taxas de detecção de AIDS, que estados com as maiores taxas de detecção, foram o Amazonas com 39,7 casos, Roraima com 29,3 casos, Amapá com 25,1 casos, Pará e Rio Grande do Sul ambos com 24,3 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2022).

### **2.1.1 Hospitalizações por HIV**

A expectativa de vida das pessoas infectadas pelo HIV melhorou significativamente na era da TARV, em grande parte devido à redução da mortalidade atribuível a doenças relacionadas à AIDS (MOCROFT et al., 2003). Uma revisão sistemática e meta-análise resumiu os dados sobre as causas de internação hospitalar entre crianças e adultos vivendo com HIV em todo o mundo: doenças relacionadas à AIDS, incluindo tuberculose e infecções bacterianas, foram a segunda causa mais comum de internações de adultos por HIV em todas as regiões geográficas e a causa mais comum de mortalidade hospitalar (FORD et al., 2015).

Um estudo realizado no sudeste dos Estados Unidos, analisou as taxas de hospitalização entre 1996 e 2016, e mostraram que essas taxas diminuíram ao longo dos anos, mas as reinternações persistiram. Pessoas mais velhas, de raça/etnia minoritária e com carga viral não controlada apresentaram taxas mais altas e piores resultados de hospitalização. Esses achados ressaltam a importância da TARV precoce e do envolvimento com os cuidados, principalmente na alta hospitalar. (DAVY-MENDEZ et al., 2020).

Estudos em países de alta renda mostraram mudanças nas principais causas de hospitalização e morte de pessoas vivendo com HIV, onde doenças oportunistas deram lugar a doenças crônicas e neoplasias não associadas à AIDS (FORD et al., 2015; GRINSZTEJN et al., 2011; INGLE et al., 2014; MAY et al., 2011). Por outro lado, países de baixa e média renda, a maioria das internações ainda se deve a eventos definidores da AIDS, e uma proporção significativa de pessoas é diagnosticada com HIV durante essa admissão inicial ou morre com um diagnóstico recente (FISHER, 2008; LEWDEN et al., 2014).

A mortalidade está associada a estágios avançados da doença, gravidade do comprometimento imunológico, presença de infecções oportunistas e falta de recursos para o cuidado (KIM et al., 2013; LEWDEN et al., 2014). Indicadores clínicos de HIV não controlado, contagem de CD4 <200 células/ $\mu$ L e carga viral >400 cópias/mL, são fortemente associados a permanência mais longa e maior risco de readmissão hospitalar (DAVY-MENDEZ et al.,

2020). Sendo assim, as causas que levam a hospitalização dependem dos contextos particulares de cada região, como mencionado anteriormente. Um editorial recente destaca que para alcançar zero mortes atribuíveis ao HIV é necessário atingir zero hospitalizações e considera cada hospitalização como uma falha da saúde pública (COLASANTI; DEL RIO, 2020). Um estudo realizado na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) mostrou a prevalência de tuberculose, síndrome digestiva, perda de peso aumentos de interleucina IL-8 e lactato desidrogenase (LDH) associados ao óbito de pessoas hospitalizadas (GAMA et al., 2021).

Compreender as tendências e os fatores de risco nas taxas de hospitalização e nos desfechos entre as PVHA, pode ajudar a melhorar as estratégias de manejo, para prevenir a morbidade que requer cuidados hospitalares e pode levar a desfechos clínicos ruins. Os fatores imunológicos relacionados a frequência de hospitalização ainda não estão claros e possivelmente podem ter relação com a disfunção imunológica.

## **2.2 Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV**

### **2.2.1 Características gerais**

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é agrupado em gênero Lentivírus dentro da família *Retroviridae*, e subfamília Orthoretrovirinae (SEITZ, 2016). É um retrovírus envelopado com um núcleo em forma de cone distinto que envolve o genoma viral, possui morfologia esférica e mede pouco mais de 100 a 120 nm de diâmetro. Sua estrutura consiste em uma membrana de bicamada lipídica que envolve um nucleocapsídeo contendo duas fitas simples de RNA, e três enzimas essenciais: protease, integrase e transcriptase reversa (Figura 2). O envelope viral contém 72 glicoproteínas, destacando-se a gp120 e gp41, ambas importantes para a entrada do vírus nas células do hospedeiro (SAKURAGI, 2011; SIERRA; KUPFER; KAISER, 2005; ZULFIQAR et al., 2017).

Além das enzimas essenciais mencionadas anteriormente, o HIV possui 9 genes que regulam a replicação viral, são eles (*gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*). Três desses genes codificam para a formação de proteínas estruturais: *gag* para o capsídeo nuclear (incluindo p24) e proteínas da matriz, *pol* para as enzimas protease, integrase e transcriptase reversa, e *env* para o envelope externo. Enquanto aos outros seis genes, estes codificam tantas proteínas de mesmo nome que desempenham importantes papéis reguladores no ciclo biológico do HIV (LOZANO DE LEÓN-NARANJO, 2014). Estes genes são sitiados por longas sequências terminais



repetidas (*LTRs*), onde exercem o papel de regular a expressão dos genes virais, a integração do genoma viral no genoma hospedeiro e replicação viral (NAGATA et al., 2017; PATEL; RAIZES; BROYLES, 2020; SÜKÖSD et al., 2015).

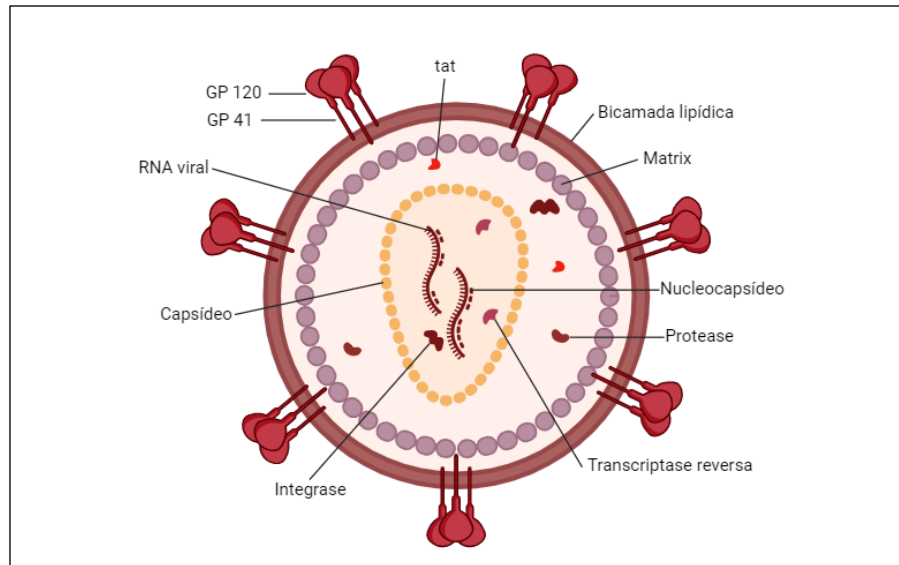


Figura 2 - **Estrutura do vírus HIV.** (Adaptado de ROSSI et al., 2021)

Existem apenas dois sorotipos principais do HIV sendo: HIV-1 e HIV-2, que se diferenciam por parâmetros de dispersão, patogenicidade, transmissibilidade e evolução clínica. O sorotipo HIV-1 é o mais predominante, e está vastamente disseminado em todo o mundo, enquanto o HIV-2, mais prevalente na África Ocidental, é considerado menos virulento e transmissível que o HIV-1, com um período de incubação mais longo, levando a desenvolvimento tardio da doença (ROSA; SILVA; HORA, 2016).

### 2.2.2 Ciclo de replicação do HIV-1

Durante o ciclo de replicação do HIV-1, o vírus reconhece as proteínas de membrana da célula alvo, reconhecendo especialmente o receptor  $CD4^+$  na membrana celular (Fig. 3-1). Esse reconhecimento ocorre pela alteração da forma conformacional da glicoproteína gp120 e ao acoplar-se ao correceptor CCR5 ou CXCR4 (receptor de quimiocina). O uso desses correceptores pelo HIV é principalmente determinado por uma sequência de aminoácidos presentes na gp120 (ALKHATIB, 2009). Após a ligação, a gp41 (glicoproteína transmembranar) medeia a fusão da membrana do envelope viral à membrana celular, e após ocorre a liberação do capsídeo, contendo o genoma e proteínas do vírus no citoplasma celular (Fig. 3-2), revisado por (WILEN; TILTON; DOMS, 2012).

Após o desnudamento do capsídeo viral, há a liberação do RNA e enzimas virais, importantíssima para a fase de transcriptase reversa do HIV, dando início a retrotranscrição do RNA viral em DNA (Fig.3-3), após o material genético ser transportado ao núcleo da célula irá ocorrer a integração pela ação da enzima integrase, ao DNA do hospedeiro (Fig.3-4).

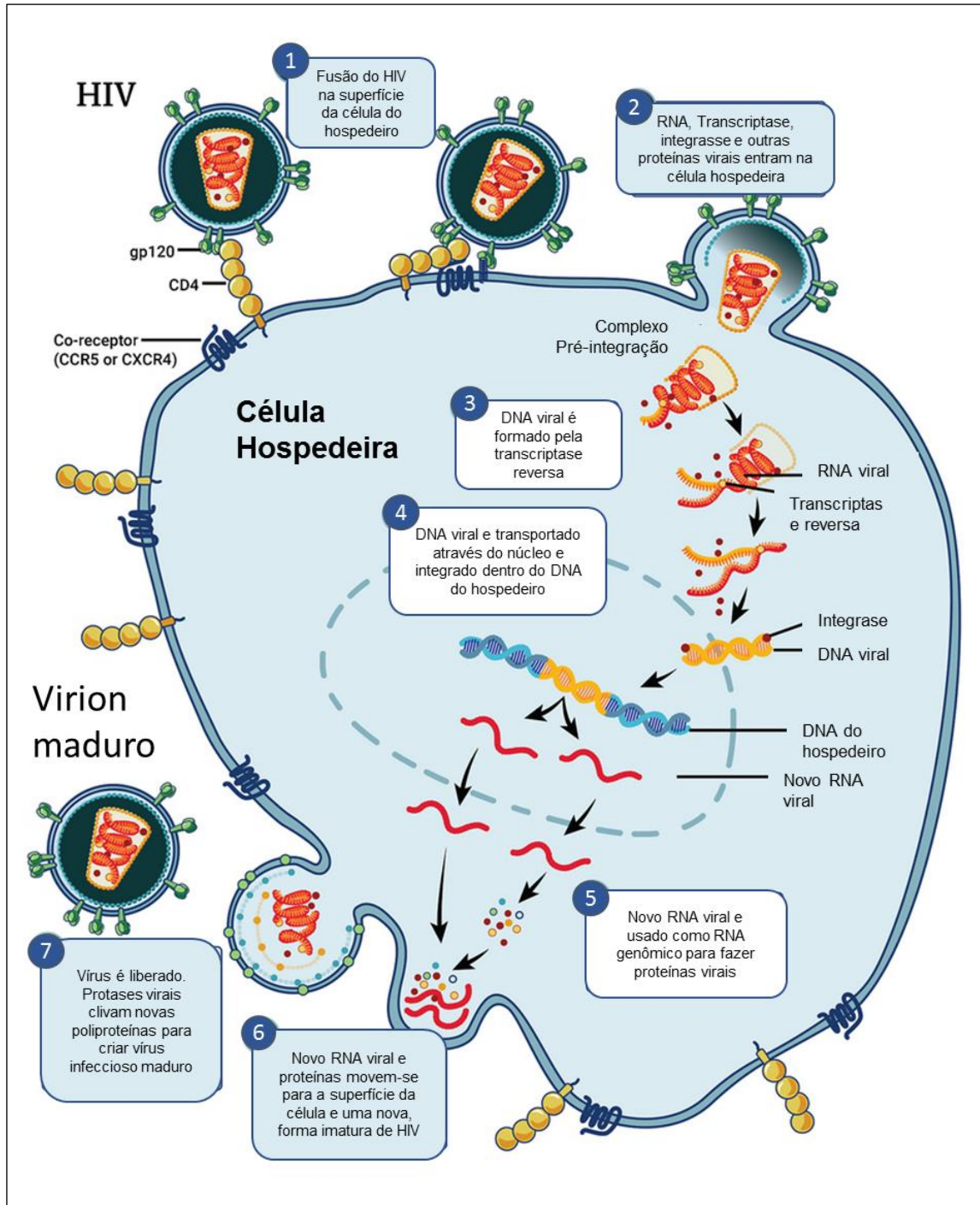


Figura 3 - Ciclo replicativo do HIV e papel de enzimas virais. (Adaptado de <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>)

Uma vez que o provírus é integrado ao DNA do hospedeiro, a célula passa a produzir material genético viral (transcrição de RNA viral), produzindo múltiplas cópias do novo RNA do HIV. Parte deste RNA torna-se o genoma de um novo vírus, enquanto a célula usa outras cópias do RNA para fazer novas proteínas do HIV (Fig.3-5) (CHAN; KIM, 1998; HOPE, 1997).

Essas proteínas virais se reúnem próximos a membrana plasmática (Fig.3-6) e os novos vírions são montados próximos a membrana, brotando para fora da célula. Somente após brotamento estes passam por processo de maturação e através da ação da protease viral, e então, os vírions maduros são capazes de infectar novas células (Fig. 3-7) (CHAN; KIM, 1998; HOPE, 1997).

### 2.2.3 História natural da infecção pelo HIV

A história natural da infecção pelo HIV é caracterizada inicialmente pela infecção às células do sistema imunológico, principalmente células T CD4<sup>+</sup>, dando início a fase aguda (DOUEK, 2007). O vírus geralmente penetra no organismo através do epitélio das mucosas. Os eventos patogênicos e manifestações clínicas após a infecção podem ser divididos em três fases: (1) infecção primária ou fase aguda - é o período que se inicia após a infecção inicial pelo HIV-1 e vai até o desenvolvimento da resposta de anticorpos (0-12 semanas); (2) fase assintomática ou de latência clínica - ocorre por um período de 1 a 10 anos, durante o qual não há manifestações clínicas evidentes; e (3) fase sintomática ou AIDS - nesta fase, surgem as doenças que caracterizam a AIDS (Figura 4) (KUMAR et al., 2010; LETVIN; WALKER, 2003; STEVENSON, 2003).

Após a infecção das mucosas ocorre a disseminação do vírus e o desenvolvimento de respostas imunes do hospedeiro, denominado viremia primária (KUMAR et al., 2010). As células dendríticas (DC – do inglês: *dendritic cells*) do epitélio capturam o vírus no local de entrada e migram para os linfonodos, onde elas disseminam o vírus para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> através de contato direto de célula a célula (KUMAR et al., 2010). À medida que o vírus se replica rapidamente e se alastra por todo o corpo e para outros tecidos linfoides, o corpo começa a montar respostas imunes contra o vírus (GANDHI; WALKER, 2002).

A resposta imune humoral é desenvolvida pelas células do sistema imunológico, os linfócitos B, que começam a produzir anticorpos específicos para o HIV cerca de 12 semanas após a infecção, esses anticorpos neutralizam o vírus reduzindo a carga viral (TOMARAS et al., 2008). No entanto, essa resposta pode apresentar falhas durante a eliminação do vírus, tanto por conta das mutações que levam à recolonização de novas variantes virais, como por evasão

imune devido a alterações epitópicas dos antígenos, ou mesmo por mudanças nos sacarídeos das glicoproteínas que tornam os vírus mais resistentes à neutralização (RICHMAN et al., 2003; WEI et al., 2003).

Após a fase aguda da infecção, há um declínio na viremia, marcando assim, o início da fase crônica da infecção, que apesar de ocorrer recuperação do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que pode se manter estável em determinado período durante o curso da infecção, contudo, com o passar dos anos irá sofrer um declínio gradual tanto no sangue periférico quanto nas regiões do trato gastrointestinal (Figura 4) (KASSUTTO; ROSENBERG, 2004). Na infecção crônica, o HIV-1 induz ativação policlonal, esgotamento, hipergamaglobulinemia e reduções no número de células B de memória no sangue e aumento na frequência de células B imaturas circulantes (FOURNIER et al., 2002; LANE et al., 1983; MOIR; FAUCI, 2008; SHIRAI et al., 1992).

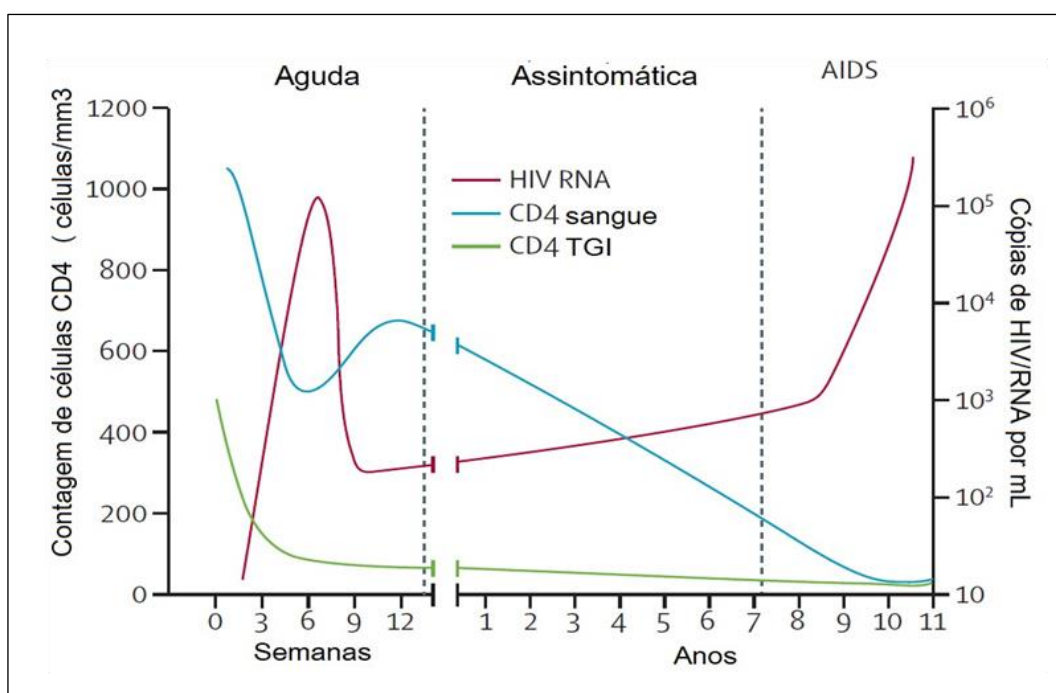


Figura 4 - **Evolução clínica da infecção pelo HIV**. Carga viral plasmática (vermelho), contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue (azul) e linfócitos T CD4<sup>+</sup> no TGI: trato gastrointestinal (verde) (Adaptado de MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

Essa fase é caracterizada por um estado clínico assintomático devido à queda dos níveis de viremia no sangue pela ação antiviral induzida pelas respostas imunes inatas e adaptativas (PARANJAPE, 2005). A fase crônica pode durar em torno de meses ou anos. Nesta fase há uma perda lenta e progressiva de células T CD4<sup>+</sup> que leva a um comprometimento do sistema imunológico dessas pessoas. Esse comprometimento é evidenciado também por um estado de

ativação imune crônica das células imunológicas e acompanhado por um desarranjo do equilíbrio homeostático das células do sistema imune nos tecidos linfoides (FANALES-BELASIO et al., 2010; FORD; PURONEN; SERETI, 2009).

Assim, com o declínio progressivamente lento do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> somado ao aumento da replicação viral resultam na fase conhecida como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ou AIDS, na qual, o organismo fica vulnerável a uma variedade de infecções oportunistas, aumentando o risco de morte na ausência de um diagnóstico e tratamento (LANGFORD; ANANWORANICH; COOPER, 2007) (Figura 4).

#### **2.2.4 A interação imunológica entre patógeno e hospedeiro**

A morte dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e a imunossupressão sistêmica são as características marcantes da infecção pelo HIV. Esses marcos são produzidos por diferentes mecanismos que desenham um quadro complexo da imunopatogênese da AIDS. Durante a fase aguda da infecção, as células dendríticas (DC – do inglês: *dendritic cells*), que são os alvos primários do HIV após a exposição da mucosa, executam um papel importante na patogênese da doença, fazendo o reconhecimento inicial do vírus, e se mantendo durante toda a infecção (MCMICHAEL et al., 2010; TURVILLE et al., 2001).

A infecção das DC's pelo HIV ocorre através da ligação da proteína do envelope viral gp120 ao receptor CD4, e aos correceptores CCR5 ou CXCR4 expressos na membrana celular (TURVILLE et al., 2002). As DCs possuem a capacidade de capturar o HIV através de receptores de lectina presente em sua membrana celular, em particular, o CD209, também denominado DC-SIGN (GEIJTENBEEK; VAN KOOYK, 2003). Durante a interação entre o HIV-1 e o receptor DC-SIGN, o vírus é internalizado e se mantém intacto, e as DC's ao transportar o vírus para os linfonodos para apresentação antigênica, ampliam a chance de infecção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e a decorrente disseminação do vírus (MARTIN-GAYO; YU, 2017; SABATTÉ et al., 2007).

Na infecção pelo HIV, as células dendríticas plasmocitoides (pDC) são aptas a gerar, uma condição antiviral estabelecida pelas grandes quantidades de interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) e outras quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias, produzidas a partir da identificação do RNA viral via receptor TLR-7 (*Toll Like Receptor -7*) (MANCHES; FRLETA; BHARDWAJ, 2014). Além disso, as pDC também podem induzir a secreção de IL-10, bem como a diferenciação das células T reguladoras (T<sub>regs</sub>) (MANCHES et al., 2008). As células NK (*natural killer*) também são ativadas e desempenham um papel importante na infecção pelo HIV, formando um

mecanismo antiviral nas fases iniciais da infecção, antes das respostas mediadas por linfócitos T e B serem desenvolvidas (HENS; JENNES; KESTENS, 2016; IANNELLO et al., 2008).

O incremento do estado antiviral e antitumoral é realizado por meio das ações efetoras das células NK pela produção de IFN- $\alpha$  em conjunto com outras citocinas pró-inflamatórias (FAUCI; MAVILIO; KOTTILIL, 2005; HENS; JENNES; KESTENS, 2016; MAILLIARD et al., 2003). Em tese, a resposta imune no decorrer da fase aguda da infecção pelo HIV abrange o reconhecimento do vírus pelas DCs. Esta comunicação resulta na ativação das DCs, que após a ativação secretam IL-12, IL-15, IL-18 e IFN- $\alpha$  que induzem as células NK, que por sua vez produzem interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que atua na maturação de DCs e promovendo a resposta T do tipo 1 ( $T_H1$ ). Contudo, durante a infecção, esta resposta pode ser afetada pela imunodeficiência gradual causada pelo HIV (ALTFELD et al., 2011).

Dessa forma, esses mecanismos básicos de defesa são ineficazes contra o HIV, o vírus começa a infectar as células T  $CD4^+$ , demonstrando um alto potencial de replicação nessas células que quando ativadas são demasiadamente suscetíveis à replicação viral, principalmente as células T quiescentes ou células T em repouso que não suportam a transcrição reversa, integração e expressão do genoma viral devido presença de baixos níveis de nucleotídeos, ATP e fatores de transcrição (COIRAS et al., 2009).

O HIV continua sua replicação viral e infectividade nas células T  $CD4^+$  por intermédio de mecanismos que promovem a imunomodulação dessas células, mais precisamente por meio do TCR (NERI et al., 2011). No entanto, embora a manutenção da infectividade viral ocorra em células T  $CD4^+$  ativadas ou em repouso, a infecção direta pelo HIV-1, resulta na apoptose de células ativadas e a morte de células por mecanismos de citotoxicidade por linfócitos T  $CD8^+$  favorecendo depleção maciça e gradual de células T  $CD4^+$  durante a infecção (HAZENBERG et al., 2000).

A reconstituição imunológica é caracterizada pela recuperação da quantidade de células T  $CD4^+$  circulantes, entretanto, a permanência de viremia resulta na disfunção das células T  $CD4^+$  que levam a falha na divisão celular, resultando na perda da resposta imune de memória a antígenos, aloantígenos e mitógenos (CLERICI et al., 1989). Defeitos de proliferação estão associados à expressão reduzida de IL-2 em células T  $CD4^+$  de PVHA (SIEG et al., 2001). Em contraste, a expressão de IFN- $\gamma$  foi geralmente mantida, sugerindo que a resposta defeituosa não foi consequência da depleção de células reativas ao antígeno, mas sim, de um defeito na capacidade dessas células em responder após o reconhecimento pelo TCR (SIEG et al., 2001).

As subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> auxiliares foliculares (T<sub>FH</sub> – do inglês: *T follicular helper cells*) também constituem um compartimento importante para a infecção, replicação e produção de partículas virais nos gânglios linfáticos (COLINEAU et al., 2015; PERREAU et al., 2013; XU et al., 2017). Por serem altamente permissivas ao HIV, as células T<sub>FH</sub> são visadas logo após a infecção (KOHLENER et al., 2016; MILLER et al., 2017). A infecção das T<sub>FH</sub> dos centros germinativos (CG) é perigosa, visto que elas são essenciais para o funcionamento adequado das células B na produção de anticorpos (BREITFELD et al., 2000). Por fim, as células T<sub>FH</sub> residentes nos tecidos se acumulam durante as fases crônicas da infecção (COLINEAU et al., 2015; KOHLER et al., 2016; PERREAU et al., 2013), sugerindo que a infecção pelo HIV promove o desenvolvimento das células T<sub>FH</sub> em um ambiente linfóide propício. A persistência do HIV nos tecidos linfóides promove a ativação imune, que exacerba a secreção de citocinas como IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-6 (FAUCI et al., 1996).

A infecção pelo HIV também é contida pela ação de anticorpos (imunidade humoral) capazes de responder a vários antígenos virais. A produção dos primeiros anticorpos acontece dentro de 6 a 9 semanas após a infecção (ABBAS; ANDREW H. LICHTMAN; SHIV PILLAI, 2015). Os anticorpos anti-HIV-1 foram inicialmente produzidos contra epítomos da glicoproteína do envelope viral, mas não eram neutralizantes, portanto, eram fracos inibidores da infectividade viral (TOMARAS et al., 2008). Anticorpos primários foram criados contra as proteínas gp120, gp41 e p24, bem como transcriptase reversa e produtos *gag* e *pol* (ABBAS; ANDREW H. LICHTMAN; SHIV PILLAI, 2015).

Acredita-se que os anticorpos anti-gp41 sejam produzidos ainda durante a fase aguda da infecção, entre 5 e 13 dias após o pico da viremia, quando os níveis plasmáticos podem ser determinados. Esses anticorpos podem ser IgM e IgG, sugerindo assim que a mudança de classe ocorre de forma precoce no início da infecção pelo HIV (TOMARAS et al., 2008). Já os anticorpos anti-gp120 surgem aproximadamente 28 dias após o pico da viremia, no entanto, no 38º dia, esses anticorpos não conseguem conter o vírus, que rapidamente altera o epítomo imunodominante de sua proteína de envelope (PANTOPHLET; BURTON, 2006).

Os anticorpos amplamente neutralizantes (bNAbs – do inglês: *Broadly Neutralizing Antibodies*) contra a glicoproteína do envelope do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) desenvolvem-se de forma relativamente lenta em comparação com as células T CD8 citotóxicas específicas para peptídeos do HIV, que se desenvolvem semanas depois (KROUP et al., 1994; SCHMITZ et al., 1999). Os bNAbs surgem vários meses após a infecção (TOMARAS

et al., 2008). Isso se dá pelo fato de que as células B apesar de não serem um alvo primário da infecção pelo HIV-1, a replicação do vírus e a ativação imune a infecção, estão associadas à profunda desregulação do compartimento das células B (XU et al., 2009), causando múltiplas anormalidades, incluindo hiperprodução de anticorpos inespecíficos, o que evidencia essa resposta tardia de bNAbs na infecção aguda (MOIR et al., 2001, 2008; TOMARAS et al., 2008).

### 2.3 Desenvolvimento e ativação dos Linfócitos B

Os linfócitos B são uma população de células que expressam receptores de imunoglobulina (Ig) de superfície celular, clonalmente diversos, que reconhecem epítomos antigênicos específicos. Juntamente com os linfócitos T, são responsáveis pela imunidade adaptativa (COOPER; ALDER, 2006). A imunidade adaptativa, além de uma resposta mais eficiente a encontros sucessivos com o mesmo microrganismo (antígeno), também possui uma capacidade altamente especializada e específica de distinguir entre diferentes antígenos, o que é característico da memória imunológica (BURNET, 1961; JANEWAY; TRAVERS, 2014).

Em humanos, os linfócitos B são produzidos ao longo da vida, e o fígado fetal é o principal local hematopoiético antes do nascimento. Após o nascimento, a hematopoiese é transferida para a medula óssea (MO) e é mantida por toda a vida. (DOMEN; WEISSMAN, 1999; OSMOND; NOSSAL, 1974). Nesses locais, as células-tronco hematopoiéticas (HSC – do inglês: *Hematopoietic Stem Cells*), que são células multipotentes e capazes de se autorrenovar, a partir das quais se originam as células sanguíneas, possuem um microambiente que pode levar a sua diferenciação em células B (DOMEN; WEISSMAN, 1999).

Normalmente, o desenvolvimento dos linfócitos B ocorre em uma ordem fixa, emergindo de HSC, essas células recém-geradas se desenvolvem sucessivamente em células pró-B, células pré-B e células B imaturas na MO, seguidas pela saída de células B imaturas da MO, as células B de transição migram através da circulação para o baço onde concluem a maturação. As células B maduras ditas “naive” são compostas por dois subconjuntos: células B da zona marginal (MZ – do inglês: *Marginal Zone*) e células B foliculares (FO) (LEBIEN; TEDDER, 2008). Diferentes subconjuntos de células B têm funções únicas no corpo humano e contribuem para o equilíbrio e a eficácia da resposta imune (YUSEFF et al., 2013).

As células B da MZ residem no baço e carregam receptores de células B (BCRs – do inglês: *B Cell Receptors*) que se ligam preferencialmente a antígenos transmitidos pelo sangue, como componentes da parede celular de bactérias. Combinadas com os sinais do receptor *Toll-like* (TLR) induzidos pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos



(PAMPS), as células B da MZ se desenvolvem rapidamente em células plasmáticas secretoras de imunoglobulina M (IgM) e formam uma defesa de primeira linha contra patógenos que atingem o baço (BURROWS; MAXWELL, 2017; EIBEL et al., 2014).

Enquanto as células B (FO), estas circulam no organismo e são encontradas no baço e no linfonodo. A ativação destas células requer o transporte de antígenos para os folículos das células B dos órgãos linfoides secundários. Após o reconhecimento e ativação do antígeno, as células B FO apresentam seus antígenos às células T auxiliares para receber sinais de ativação adicionais fornecidos pelas células T auxiliares na forma de CD40L e citocinas (Figura 5). Essas interações B-T promovem a diferenciação de células B (FO) ativadas em blastos que se dividem rapidamente formando centros germinativos (GC – do inglês: *Germinal Centers*) (BURROWS; MAXWELL, 2017; EIBEL et al., 2014).

As interações com as células do estroma GC e com as células T<sub>FH</sub> permitem que as células B GC passem por recombinação de mudança de classe de imunoglobulina para alterar as especificidades de seus BCRs por hipermutação somática (SHM – do inglês: *Somatic hypermutation*), e se desenvolver em células B de memória que expressam imunoglobulinas G (IgG) de superfície, E (IgE) ou A (IgA), ou em células plasmáticas de vida longa que secretam imunoglobulinas com troca de classe (BREITFELD et al., 2000; KIM et al., 2001). A ativação da célula B no GC aumenta a enzima AID (do inglês: *activation-induced cytidine deaminase*), esta que é crucial para aumentar as hipermutações somáticas da IgM, que vão aumentar ou diminuir a afinidade dos anticorpos para os antígenos (PIEPER; GRIMBACHER; EIBEL, 2013).

As cinco classes de imunoglobulinas são IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, sendo cada classe diferenciada por sequências únicas de aminoácidos na região constante da cadeia pesada que conferem propriedades estruturais e funcionais específicas de cada classe (MEGHA; MOHANAN, 2021). A imunoglobulina M (IgM) é a principal classe de imunoglobulinas produzidas durante a resposta imune primária, e é a maior parte dos chamados anticorpos naturais, podendo desempenhar um importante papel regulador na saúde e na doença (VOLLMERS; BRÄNDLEIN, 2006).

No organismo, a IgM existe como um componente dos receptores de antígenos nas membranas dos linfócitos B (RETH, 1992), circulando nas moléculas do sangue, nas membranas mucosas e nas secreções das glândulas excretoras como IgM secretora (sIgM) (WOOF; MESTECKY, 2005). Após infecções agudas, a IgM é a primeira classe de anticorpos

a responder, e está presente em todos os vertebrados (FELLAH et al., 1992). É uma imunoglobulina necessária para a maturação das respostas de IgG, regulação do desenvolvimento de células B e modulação de respostas inflamatórias (BAKER; EHRENSTEIN, 2002; YATES et al., 2013; ZHANG et al., 2004).

### 2.3.1 O papel das T<sub>FH</sub> na ativação das células B

As células T<sub>FH</sub> são um subconjunto de células T CD4 de memória que caracterizam um componente-chave da imunidade protetora. Os T<sub>FH</sub> são achados principalmente nos folículos das células B dos órgãos linfoides secundários, onde interatuam com as células B específicas do antígeno, concedendo respostas imunes humorais eficazes, desempenhando um papel importante na formação e manutenção de centros germinativos (CGs). A interação eficiente das células T<sub>FH</sub> com as células B, é fundamental para a geração de anticorpos comutados de alta afinidade e com troca de classe de isotipo, bem como para a determinação de células B de memória de longa duração e plasmócitos (BREITFELD et al., 2000; FAZILLEAU et al., 2009, 2009; KIM et al., 2001; SCHAERLI et al., 2000).

Podem ser encontradas também no sangue periférico, apesar de serem menos abundantes em condições normais; em doenças autoimunes ou no quadro de infecção, eles migram dos tecidos linfoides para o sangue periférico (YU; VINUESA, 2010). As características distintivas das células T<sub>FH</sub> são a expressão do receptor de quimiocina CXCR5, a molécula coestimuladora induzível ICOS (do inglês, *inducible costimulatory*), e interleucina-21 (IL-21), sendo os dois últimos importantes na diferenciação dessas células. Dos marcadores mencionados, nenhum é exclusivo dessas células, visto que podem também ser encontrados em outras populações de linfócitos (CROTTY, 2011; NURIEVA et al., 2008; SCHAERLI et al., 2000).

As células T<sub>FH</sub> fornecem os principais sinais essenciais para o recrutamento e seleção de células B para geração de respostas protetoras de anticorpos. Durante a infecção crônica pelo HIV não tratada, as células T<sub>FH</sub> tornam-se altamente expandidas nos gânglios linfáticos (WENDEL et al., 2018). Apesar desse aumento na frequência das células T<sub>FH</sub> de pessoas vivendo com HIV, elas são menos eficientes em providenciar ajuda apropriada às células B (CUBAS et al., 2013). A estimulação antigênica persistente estimula a expansão anormal das T<sub>FH</sub> e eles permanecem capazes de responder aos antígenos do HIV, mas tornam-se funcionalmente afetados (Figura 5) (NOTO; PANTALEO, 2017; WENDEL et al., 2018).

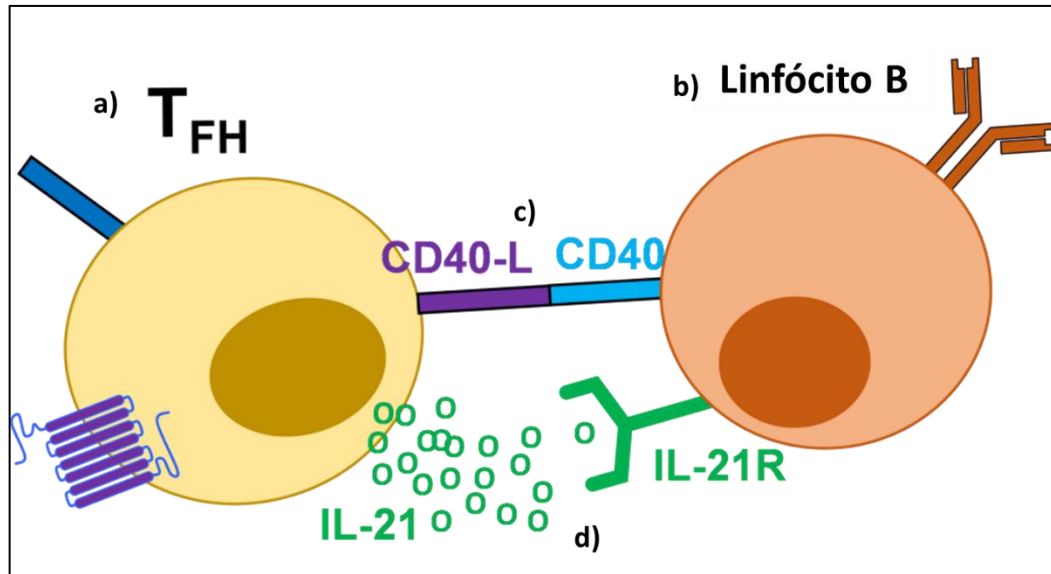


Figura 5 - **O papel do TFH na diferenciação de células B.** T<sub>FH</sub> (a) fornece a coestimulação às células B (b), através da molécula coestimuladora CD40 interagindo com o ligante CD40 (CD40-L) (c), na célula B (b) e produzindo a citocina IL-21 (d) que impulsiona a proliferação de células B (Adaptado de UWADIAE, 2016).

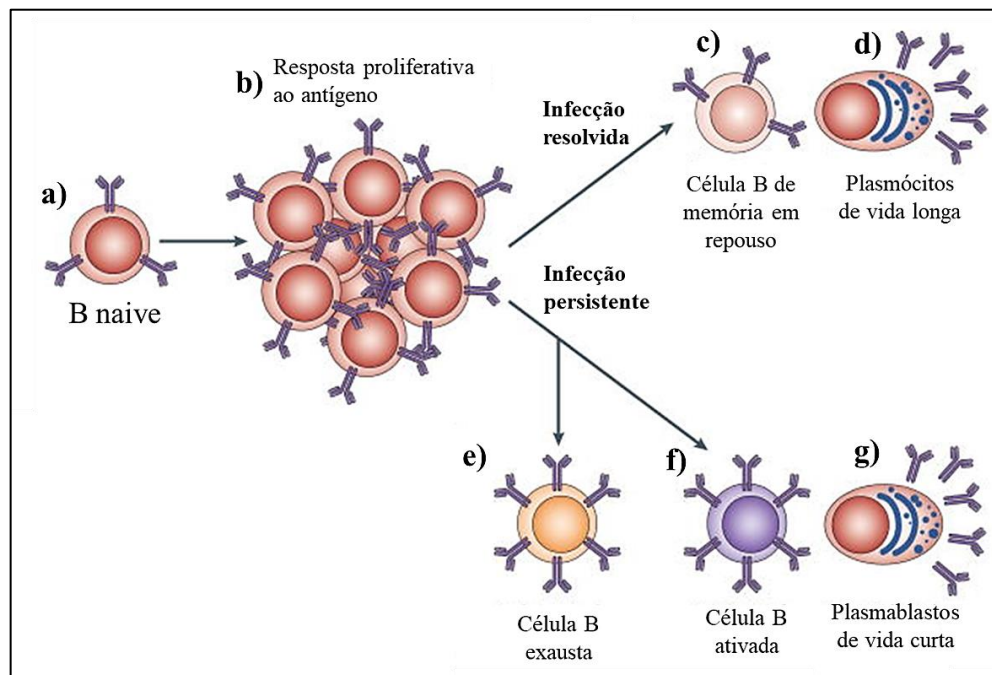
### 2.3.2 Disfunção de Linfócitos B

Respostas imunes humorais mediadas por células B são fundamentais para a imunidade adaptativa. As células B produzem um conjunto diversificado de anticorpos, que ajudam na eliminação eficaz de antígenos, incluindo patógenos. Além disso, as células B desempenham um papel indispensável no sistema imunológico por meio da apresentação de antígenos e secreção de citocinas (COOPER, 2015; LEBIEN; TEDDER, 2008; YUSEFF et al., 2013). A imunodeficiência causada pelo HIV leva um desequilíbrio nas funções do sistema imune, caracterizada principalmente pela redução significativa no número de células TCD4<sup>+</sup> juntamente com a suscetibilidade a uma variedade de infecções, e embora as populações de células B não sejam o alvo da infecção pelo vírus, a disfunção nessas células pode ser devido a um defeito nas células T CD4 funcionais (ASCHER; SHEPPARD, 1988).

A infecção pelo HIV está associada a distúrbios graves das células B como uma ativação anormal (também descrita como hiperatividade) que resulta em aumento da concentração de anticorpos, fenômeno conhecido como hipergamaglobulinemia e autoanticorpos (MOIR; FAUCI, 2008). A hipergamaglobulinemia origina de uma manifestação dos efeitos policlonais ativadores da replicação do HIV nas células B, levando à sua diferenciação terminal em plasmablastos ou células plasmáticas (MOIR; FAUCI, 2014). Esse distúrbio também leva imunidade humoral defeituosa em especial nas células B da memória e por isso as respostas de

anticorpos são prejudicadas, particularmente no contexto de vacinações como também na suscetibilidade as infecções bacterianas (Figura 6) (HAAS; ZIMMERMANN; OXENIUS, 2011; MOUQUET, 2014; SODORA; SILVESTRI, 2008).

Esses distúrbios não ocorrem apenas sistemicamente, mas também localmente. No intestino a hiperatividade das células B intestinais leva a destruição dos centros germinativos gastrointestinais e comprometimento intrafolicular. A patogênese dessa hiperativação está intimamente ligada à infecção do trato gastrointestinal (TGI), pois as células T CD4 intestinais que são alvos preferenciais do vírus são massivamente depletadas no início da infecção. Essa depleção causa a enteropatia por HIV que é bem descrita como inflamação do TGI, e está associada a uma miríade de manifestações, dentre elas má absorção, diarreia, aumento da permeabilidade intestinal e translocação de produtos microbianos (HAAS; ZIMMERMANN; OXENIUS, 2011).



**Figura 6 - Exaustão de células B induzida por infecção persistente por HIV e replicação viral contínua.** No contexto de infecções virais autolimitadas, as células B virgens (a) respondem ao antígeno exógeno migrando para áreas ricas em células T dos tecidos linfoides, tornando-se ativadas (b), iniciando uma reação do centro germinativo que seleciona as células B com melhor ligação ao antígeno e finalmente saindo o centro germinativo como células B de memória de repouso de longa duração (c) ou células plasmáticas de vida longa (d). No contexto de uma infecção viral persistente, como o HIV, a ativação imune crônica aumenta a frequência de células B exaustas (e), células B hiperativadas (f), e plasmablastos de vida curta (g). (Adaptado de MOIR; FAUCI, 2009).

A hiperativação de células B e a hipergamaglobulinemia de especificidade não patogênica são frequentemente observadas em muitas infecções virais e bacterianas, além do contexto de doenças autoimunes. Contudo, o diferencial, é a depleção das células CD4 a nível intestinal. Foi recentemente abordado se a enteropatia associada ao HIV e o aumento da exposição sistêmica a antígenos microbianos do TGI contribuem para a hipergamaglobulinemia associada ao HIV de maneira dependente do antígeno. Uma vez que a translocação microbiana do TGI é sistêmica e está intimamente ligada à ativação crônica de células T na infecção pelo HIV, é concebível que ela também afete a hiperativação sistêmica de células B, talvez até mesmo de maneira dependente de antígeno (HAAS; ZIMMERMANN; OXENIUS, 2011).

Com a translocação microbiana, espera-se uma forte resposta de anticorpos ao intestino comensal bactérias. No entanto, as respostas de anticorpos ao intestino comensal as bactérias não foram alteradas em pessoas infectadas pelo HIV, e foram bem mantidas no estágio avançado da doença em níveis comparáveis aos de controles não infectados (revisado por HAAS; ZIMMERMANN; OXENIUS, 2011). Em consonância com esse fato, a hiperativação de células B na infecção pelo HIV é caracterizada principalmente por aumento da expressão de marcadores de ativação de superfície que gera respostas policlonais (HAAS; ZIMMERMANN; OXENIUS, 2011).

Assim, o mecanismo para a ativação de células B policlonais na infecção pelo HIV-1 tem sido proposto pelas seguintes vias: 1) interação da glicoproteína gp120 do envelope do HIV-1, dentre outros, 2) pela estimulação TLR9 via DNA CpG derivado do vírus, e 3) pela interação mediada por células T por exemplo via CD40/CD40L, em combinação de vários fatores com citocinas, que incluem IL-10, IL-2, IL-3 e IL-4, o fator de ativação de célula B (ligante do TNF- $\alpha$ ) e outros marcadores inflamatórios, tais como a ferritina. Notavelmente, a maioria dessas células T e B ativadas não são específicas ao HIV e as especificidades antigênicas são amplamente desconhecidas (HAAS; ZIMMERMANN; OXENIUS, 2011).

Curiosamente, essa hiperativação de células B gera níveis elevados de autoanticorpos (incluindo especificidades para DNA, lipídios, actina e miosina), e células B polirreativas com especificidades irrelevantes, como por exemplo, para ovalbumina ou haptenos (HAAS; ZIMMERMANN; OXENIUS, 2011). A hipergamaglobulinemia está associada a um forte componente de hiperativação antigênica inespecífica de células B, e não pela estimulação direta da microbiota e com anticorpos polirreativos durante a infecção por HIV-1 não tratada, afinal de contas não haveria a suscetibilidade às infecções bacterianas (DE MILITO et al., 2004).

Mesmo com o advento da terapia antirretroviral (TARV) e consequente redução da carga viral do HIV, as PVHA convivem com um estado de ativação imune crônica, e que influencia o aumento da expressão dos marcadores de ativação nas células T e ativação policlonal das células B com aumento dos níveis séricos das Imunoglobulinas, caracterizada pela hipergamaglobulinemia (Figura 6) (LANE et al., 1983). No entanto, a hipergamaglobulinemia e os níveis de anticorpos autorreativos e poliespecíficos foram comparáveis em pacientes com células B normais e de baixa memória (DE MILITO et al., 2004).

A hipergamaglobulinemia no HIV demonstra o estado hiperativo dessas células desde os estágios iniciais da infecção. Essa hipergamaglobulinemia favorece diversos mecanismos de inflamação crônica no organismo de indivíduos infectados pelo HIV-1, aumento da produção de citocinas e ativação celular pela ligação de imunoglobulinas em receptores específicos de células do sistema imune. Ao mesmo tempo, há o surgimento de anticorpos contra antígenos próprios, como por exemplo, autoanticorpos contra fosfolipídios, neutrófilos, moléculas HLA (antígeno leucocitário humano), antígenos nucleares e DNA, actina e miosina, levando ao desenvolvimento de doenças autoimunes, tendo como consequência o aparecimento de diversas comorbidades, como doenças cardiovasculares, artrite, diabetes, entre outras (AMADORI et al., 1991; KACANI; STOIBER; DIERICH, 1997; KEHRL et al., 1992; MACCHIA et al., 1991, 1993b; MÜLLER et al., 1998).

### **2.3.3 Estado da arte da Patogênese da disfunção de linfócitos B**

A disfunção das células B pode ser decorrente de um conjunto de fatores: i) alterações nos níveis de citocinas oriundas de processo de hiperativação causado pela depleção de células T-CD4 e translocação microbiana; ii) diminuição da população de células T CD4 comprometendo a cooperação com as células B e consequentemente disfunção na geração de células de memória. As interações celulares bidirecionais entre as T e B (dentre elas, a interação CD27-CD70). O CD27 é um receptor da família do receptor do Fator de Necrose Tumoral, e quando interage com seu ligante CD70, expresso nos linfócitos T ativados, promove a diferenciação dos linfócitos B de memória em plasmócitos (NAGASE et al., 2001; SAMUELSSON et al., 1997).

Segundo estudos, a população de linfócitos B expressando CD27, característica dos linfócitos B de memória é diminuída no HIV. A perda das células B de memória que ocorre no início da infecção e não é corrigida mesmo com o uso contínuo da terapia antirretroviral. Assim,

a maior parte das células B de pacientes HIV soropositivos é composta por células B naive (CD27-), elas respondem de maneira ineficiente aos antígenos e contribuem, em grande parte, para a hipergamaglobulinemia observada na infecção pelo HIV (DE MILITO, 2004; MOIR; FAUCI, 2009).

Por outro lado, há um aumento da expressão do CD70 pelos linfócitos T ativados e sua interação com os linfócitos B implicaria na plasmocitose e conseqüentemente na hipergamaglobulinemia (BOLIAR et al., 2012; DE MILITO et al., 2001; HUNZIKER et al., 2003). A produção desequilibrada induzida pelo HIV de várias citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6), IL-10, dentre outras, está envolvida em disfunções de células B e associadas a uma acentuada síntese de imunoglobulinas pelas células B (MACCHIA et al., 1993). No primeiro a secreção de anticorpos foi inibida com anticorpos contra TNF- $\alpha$  indicando que essa citocina está envolvida na ativação policlonal de células B (MACCHIA et al., 1993). No segundo produção de citocinas foi correlacionada com a secreção de anticorpos no sobrenadante de culturas de PBMC contendo T CD4+ humanas infectadas com HIV e monócitos (MACCHIA et al., 1993).

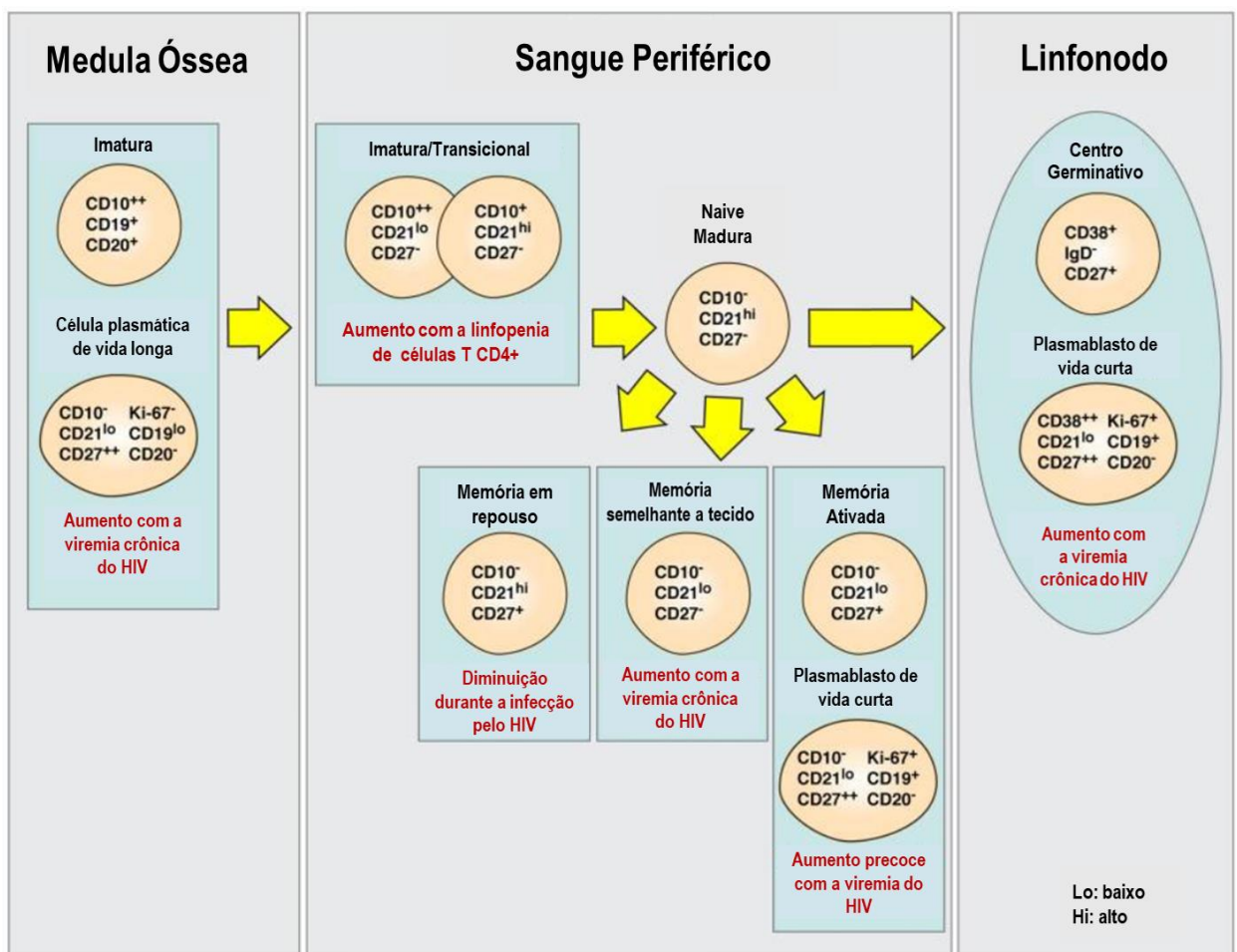
Segundo estudo, a imunidade humoral defeituosa contra antígenos específicos foi avaliada em relação a possíveis defeitos nas células B virgens e de memória em pacientes infectados pelo HIV-1. Ao avaliá-los, os autores observaram que a hipergamaglobulinemia e os níveis de anticorpos autorreativos poliespecíficos foram comparáveis em pacientes com células B normais e de baixa memória (DE MILITO et al., 2004).

Assim, a redução dos linfócitos B de memória na infecção pelo HIV-1 se correlaciona com a imunidade humoral defeituosa e que as células B virgens hiperativadas podem representar a fonte de produção anormal de IgG na infecção por HIV-1 (DE MILITO et al., 2004). Células B virgens (*naive*) de pacientes infectados com HIV-1 exibem expressão anormal dos marcadores de ativação/diferenciação. Um deles é o marcador CD70. Estudo mostrou que aumentos significativos no conteúdo de IgG intracelular nestas células B de pacientes mostram *ex vivo* estavam correlacionados com hipergamaglobulinemia e com a capacidade de células B virgens de pacientes de secretar IgG *in vitro* (DE MILITO et al., 2004).

A perda de células B de memória pode ser mediada pela superexpressão de CD70 em linfócitos T ativados. a perda dessas células pode ser um dos principais defeitos na imunidade humoral. Linfócitos B de memória de indivíduos infectados pelo HIV-1 sofrem apoptose espontânea *in vitro*. Por outro lado, o fenótipo que confere ativação aos linfócitos B virgens

(células B virgens hiperativadas CD70+CD27-) tem sido positivamente correlacionado com hipergamaglobulinemia (DE MILITO et al., 2004).

Além dessa relação, essas células B CD27-CD38+ estabelecidas como transicional e com alta taxa de renovação. Em indivíduos saudáveis, a maioria das células B no sangue periférico são virgens ou de memória, células B CD27- ou CD27+ respectivamente, enquanto na infecção aguda e crônica pelo HIV é observado um acúmulo de células B CD27- e com expressão de receptor de ativação (CD38+). Segundo os autores, essas células CD27-CD38+ também são definidos como células B imaturas/transicionais humanas e aqueles pacientes com taxas mais altas dessas células B tendem a se tornar progressores rápidos (Figura 7) (FU et al., 2021).



**Figura 7 - Dinâmica das subpopulações de células B nos diferentes compartimentos em uma infecção pelo HIV.** As subpopulações estão fenotipadas por alguns marcadores fenotípicos mais usados e os compartimentos medula óssea, sangue periférico e linfonodo são ilustrados. Em vermelho estão as alterações que nos indivíduos infectados pelo HIV (Adaptado de (MOIR; FAUCI, 2017).



Sendo assim, fica evidente a necessidade de se estudar mecanismos e alterações funcionais dos linfócitos B, uma das principais células do sistema imunológico contra o HIV, para a identificação de parâmetros que possam prever comorbidade, mortalidade e desenvolvimentos de terapias futuras no tratamento de HIV/AIDS.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar a disfunção de linfócitos B em pessoas vivendo com HIV/AIDS internados na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Investigar parâmetros laboratoriais e marcadores de disfunção de linfócitos B em pessoas vivendo com HIV/AIDS hospitalizados com e sem histórico de reinternação;
2. Determinar, *ex vivo*, correlações dos níveis séricos de anticorpos IgM e de citocinas inflamatória/regulatória (IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70) com disfunção de células B associado ao histórico de reinternação.
3. Verificar, *in vitro*, os mecanismos envolvidos na disfunção de células B associado ao histórico de reinternação pela imunofenotipagem de células B e dosagem de sobrenadantes de cultura de PBMC frente a antígenos inatos e específico indicativo de perfil inflamatório/modulador.

## **4. ESTRATÉGIAS METODOLÓGICAS**

### **4.1 Aspectos éticos**

Este estudo integra um projeto principal intitulado: “PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS COMO PREDITORES DE ÓBITO EM PACIENTES HIV/AIDS INTERNADOS”, aprovado pelo Comitê de Ética do FMT- HVD, sob o número de parecer (3.345.985) e CAAE (89665118.6.0000.0005) (Anexo 3).

### **4.2 Tipo, população e local do estudo**

Trata-se de um estudo longitudinal retrospectivo/prospectivo com pessoas vivendo com HIV/AIDS, internados no Hospital Nelson Antunes da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado/Amazonas (FMT-HVD/AM), onde o recrutamento das pessoas se deu por demanda espontânea. O processamento das amostras e armazenagem foram realizadas na Unidade de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (UPCCB).

Em ambos, a abordagem foi realizada com a pessoa ou seu acompanhante no leito de internação, onde foram inicialmente esclarecidos a respeito da pesquisa e convidados a participar, o seguimento se deu após o aceite através do termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE (Anexo 4).

Dividiu-se as PVHA em grupos, onde a classificação se deu de acordo com a frequência de hospitalizações durante quatro anos, sendo dois anos antes do recrutamento e dois anos após o recrutamento, dados acompanhados no prontuário eletrônico disponível pelo iDoctor. As PVHA que apresentaram mais de uma internação hospitalar, foram classificadas como grupo RETORNO, e PVHA que tinham apenas uma internação durante esse período estabelecido, foram classificadas como grupo NÃO RETORNO

### **4.3 Critérios de Inclusão**

Foram incluídos no estudo pessoas vivendo com HIV/AIDS, na faixa etária entre 18-70 anos, de ambos os sexos, internados no período de até 24 horas em unidade de terapia intensiva e enfermaria da FMT-HVD.

### **4.4 Critérios de não inclusão**

Não foram incluídos no estudo, gestantes, puérperas, crianças, população carcerária, e que não assinaram ou estavam incapazes de assinar o termo de consentimento.

#### 4.5 Desenho experimental e Recrutamento

Ao todo foram usadas amostras de sangue periférico de 70 PVHA internadas na Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Elas foram classificadas em dois grupos, sendo o grupo RETORNO composto por 36 PVHA internadas que apresentavam mais de uma internação no período de quatro anos, sendo dois anos antes do recrutamento e dois anos após a coleta. O grupo NÃO RETORNO foi composto por 34 PVHA que tinham apenas uma internação dois anos antes e até os dias de hoje. Desses 70 pacientes, foram realizadas comparações entre parâmetros hematológicos, bioquímicos, e de óbito para investigar o impacto da reinternações no estado geral do paciente.

Para responder questões específicas do estudo, as amostras foram obtidas em dois recrutamentos. (Figura 8). O primeiro recrutamento foi realizado com 48 amostras de PVHA (em azul) e buscou responder se dois dos principais fatores de disfunção de linfócitos B estariam associados a risco de reinternação das PVHA. 1) avaliou-se os níveis de IgM séricos para comparar os níveis de hipergamaglobulinemia nos dois grupos; 2) avaliou-se a frequência de células B imatura/transicional/naive produtoras de IgM. Para isso avaliou-se por citometria, fenótipos de linfócitos B naive (CD19+) que não possuem marcador de memória CD27 (CD19+CD27-) e comparou-se os níveis intracitoplasmáticos de IgM a partir da permeabilização celular. Ambos os marcadores foram avaliados na admissão (denominado D0) e ao longo da internação em dois pontos específicos: três dias de internação (D3) e sete dias de internação (D7). Além disso, foi comparado o estado inflamatório a partir da determinação dos níveis séricos de CD14 solúvel e de citocinas do perfil inflamatório/regulatório.

O segundo recrutamento (em vermelho) foi realizado com 22 pacientes e as amostras foram coletadas exclusivamente para os ensaios de cultura celular a fim de responder questões as vias de ativação de células B na disfunção na resposta de produção IgM intracitoplasmática nas células imatura/transicional/naive sob estímulo inato e específico. Baseado nos mecanismos de ativação de células B policlonais na infecção por HIV-1 proposto acima, a saber 1) estímulo específico com peptídeo da glicoproteína gp120 do envelope do HIV-1; 2) pela estimulação por agonista inato por via CpG; e 3) o estudo avaliou níveis de citocinas inflamatórias/regulatória para pressupor a ativação das célula B imatura/transicional/naive via interação mediada por células T por meio da modulação com citocinas a nível do sobrenadante. Nesse caso, as amostras foram coletadas apenas no dia de admissão (D0). (Figura 8).

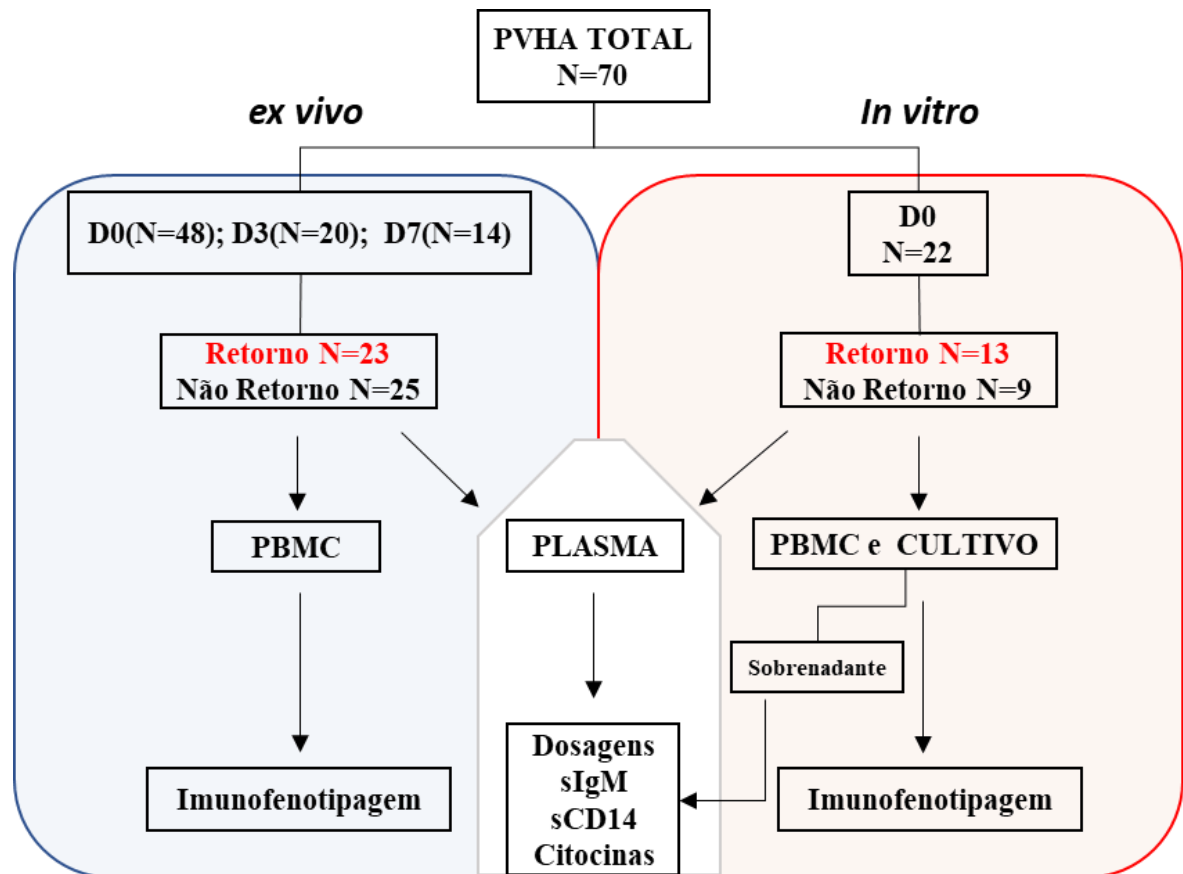


Figura 8 – Desenho experimental do estudo

#### 4.6 Obtenção dos dados clínicos

O acesso ao histórico médico das PVHA foi realizado através do prontuário eletrônico *iDoctor* versão 1.0.69b86, onde foram coletados os seguintes dados clínicos: estado de saúde geral, comorbidades, coinfeções, tratamento, retornos e óbito. Como também os dados laboratoriais: hemograma, sorologia, marcadores imunológicos (carga viral e contagem de células T CD4<sup>+</sup>) e marcadores hematológicos e bioquímicos.

#### 4.7 Coleta das amostras biológicas

Para o primeiro recrutamento, as amostras de sangue foram coletadas em três pontos diferentes, sendo o primeiro D0, onde a coleta foi feita em até 24h após a internação, o segundo D3, coleta realizada três dias após o D0, e o terceiro D7, onde realizou-se a coleta sete dias após o D0. Para o segundo recrutamento realizou-se apenas coletas no dia da abordagem da PVHA em até 24h após a internação. Em ambos foram coletados até 9 mL de sangue em tubos com heparina, logo após serão encaminhadas ao laboratório para o processamento.

#### **4.8 Obtenção de Plasma**

As amostras foram centrifugadas a 20°C em 1500 RPM por 10 min para separação do plasma. Após a separação, foram armazenadas duas alíquotas contendo 1 mL de plasma, para as dosagens séricas.

#### **4.9 Obtenção das PBMCs (Células Mononucleadas do Sangue Periférico) para análise dos Linfócitos B**

As amostras foram centrifugadas a 20°C em 500 xg por 30 min com baixa aceleração e sem freio, e a obtenção das PBMCs foi por intermédio do gradiente de concentração Ficoll-Hypaque (Sigma, EUA) e as lavagens foram realizadas com PBS 1x (*Phosphate buffered saline*) (Sigma-Aldrich®) de acordo com o protocolo de PBMC (Anexo 5). AS PBMCs do primeiro recrutamento (48) foram congeladas em criotubos e imunofenotipadas após 3 meses, já a do segundo recrutamento (22) foram cultivadas logo em seguida.

#### **4.10 Cultivo das PBMC (Linfócitos B) frente a agonistas TLRs**

O cultivo foi realizado com  $1 \times 10^6$  de células por poço. Em placas de 96 poços com fundo U (CORNING, 3599), em estufa de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, as células foram adicionadas na presença de agonistas de TLRs, Lipopolissacarídeo - LPS (Invitrogen™) a 20 µg/mL, e CpG (ODN2006, Invitrogen™) a 3 µg/mL. Também foram estimulados com Peptídeo HIV (gp120 e p24) (PETTIT et al., 1994) como antígeno específico para HIV a 2 µg/mL. Após as 24h, foram separados 100 µL do sobrenadante de cultivo e armazenados em -30°C. Foi utilizada a solução de EDTA (20 mM) para interromper a reação celular frente aos estímulos e iniciar a imunofenotipagem das células (AL-HARTHI; ROEBUCK; LANDAY, 1998; ZANUSSI et al., 1996) conforme o protocolo de cultivo celular e imunofenotipagem (Anexo 6).

#### **4.11 Análise das moléculas de superfície dos linfócitos B**

As PBMCs cultivadas foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos para detecção de moléculas da superfície e identificação das diferentes subpopulações de linfócitos B (CD19, CD70, CD27) (Invitrogen™) e suas alterações fenotípicas a serem estudadas (IgM intracelular) (Invitrogen™) segundo o protocolo de cultivo celular e imunofenotipagem (Anexo 6). A análise foi realizada por citometria de fluxo no FACS Canto II, da plataforma de citometria de fluxo RPT08J. E os dados gerados foram analisados utilizando o programa Flow-Jo v.10, conforme a estratégia de gates abaixo.

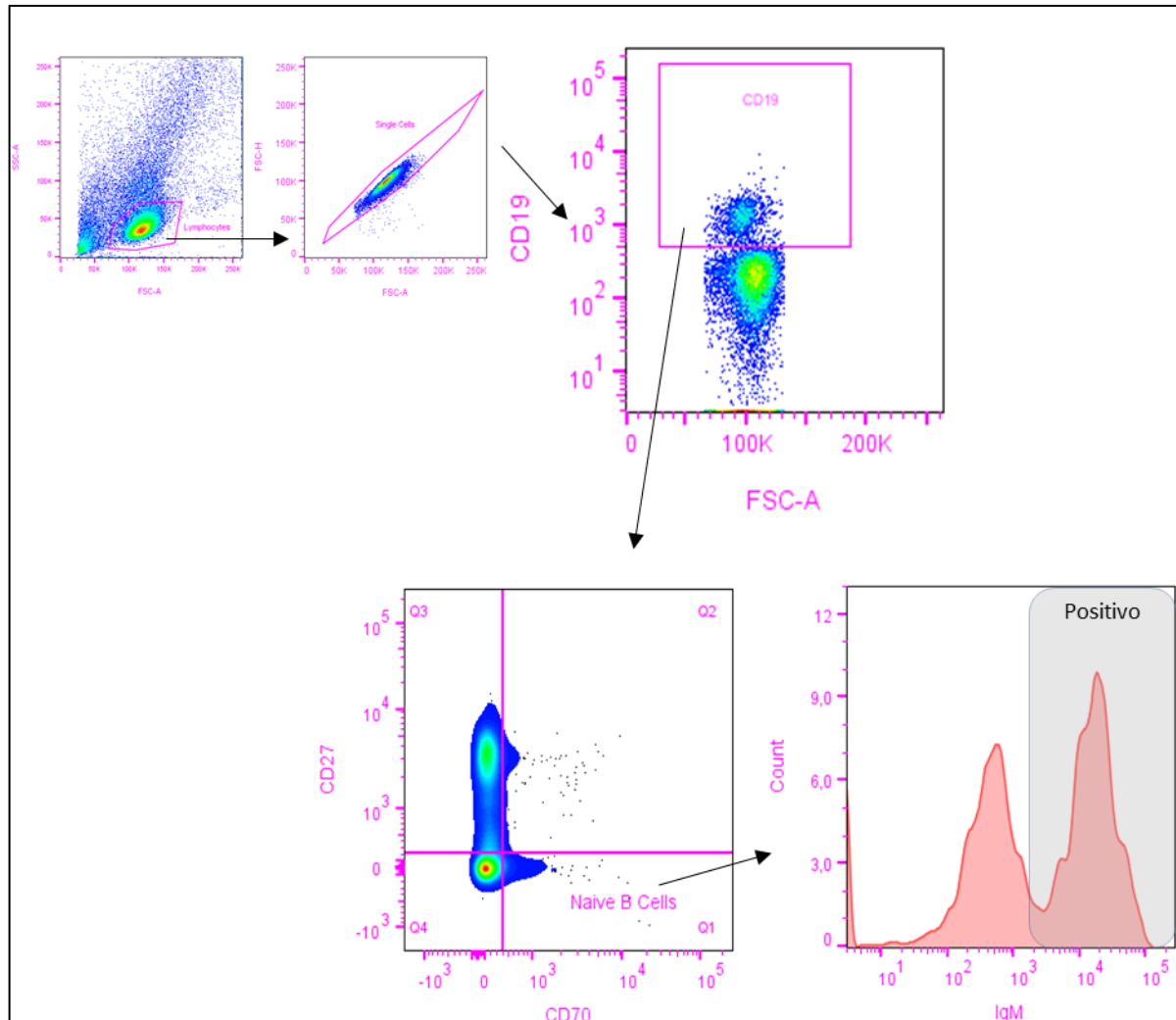


Figura 9 – Estratégia de gates e análises de subpopulações de linfócitos B IgM+

#### 4.12 Quantificação de sIgM e sCD14 no sobrenadante e plasma

Os anticorpos presentes no sobrenadante de cultivo e no plasma foram quantificados por *Ezyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) - IgM Human ELISA Standard (for Uncoated ELISA Kit) - Invitrogen™. O CD14 solúvel presente no plasma dos PVHA foi quantificado por *Ezyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) - Human CD14 Matched Antibody Pair Kit – ABCAM.

#### 4.13 Quantificação de Citocinas do sobrenadante e plasma

As dosagens das citocinas, interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), níveis de proteína do fator de necrose tumoral (TNF) e

interleucina-12p70 (IL-12p70) foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo *Cytometric Bead Array* - CBA, utilizando o Kit Human Inflammatory Cytokine - Cat. N° 551811, Lot.: 1267105, marca BD™ Biosciences, San Diego, CA), seguindo as orientações do protocolo de CBA (Anexo 7)

#### **4.14 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no Stata (versão 13.0). Foi realizado teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição das variáveis e diagrama de dispersão para as correlações. Para análises das variáveis numéricas utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney com mediana e intervalo interquartil e como paramétrico o teste t student. A significância em comparações simples entre dois grupos foi avaliada pelo teste t. Comparações de múltiplos grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA). As análises de correlação foram realizadas no GraphPad Prism (versão 9.0.2) foi utilizado o teste de Spearman. A partir das análises de correlação, verificou-se quais correlações eram positivas (próximo de 1.0) ou negativas (próximo de -1.0). Para elaboração das redes e matriz de correlação utilizou-se o Cytoscape (versão 3.9.1) e o Excel. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentarem valores de  $p < 0,05$ .



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características gerais da população

Foram incluídas no estudo, 70 PVHA internadas na FMT-HVD, estas foram classificadas em dois grupos, sendo, o grupo RETORNO (n=36) aquelas que apresentavam mais de uma internação no período de quatro anos, sendo dois anos antes do recrutamento e dois anos após, o grupo NÃO RETORNO (n=34) aquelas PVHA que tinham apenas uma internação durante o período estabelecido. O estudo foi realizado em duas etapas, na primeira foram recrutadas 48 PVHA, onde as coletas foram feitas em 3 seguimentos, sendo D0 (até 24h), D3 (3 dias) e D7 (7 dias). Na segunda etapa, foram recrutadas 22 PVHA, com apenas um ponto de coleta (D0). (Figura 8).

As análises foram processadas e analisadas conforme a descrição dos resultados abaixo (Tabela 1). Em ambos os grupos, observou-se a predominância do sexo masculino. Quanto ao uso de terapia antirretroviral (TARV) observou-se a prevalência do uso irregular, sendo 61,1% e 35,3% nos grupos RETORNO e NÃO RETORNO, respectivamente.

Dos motivos de internações, o grupo RETORNO apresentou 50,0% para síndrome retroviral, seguido de 27,8% para tuberculose. Já no grupo NÃO RETORNO, a síndrome retroviral foi predominante com 55,9%. O grupo RETORNO apresentou 50,0% para coinfeções. Quando analisados os desfechos clínicos dessas pessoas, o grupo RETORNO apresentou a maioria dos óbitos, sendo 27,8% enquanto o grupo NÃO RETORNO apresentou a maioria das altas hospitalares sendo 88,2% (Tabela 1).

A mediana de idade dos grupos foi de 37 anos para o grupo RETORNO e 35 anos para o grupo NÃO RETORNO (Tabela 1). Quanto ao tempo do uso de TARV, o grupo RETORNO apresentou maior tempo quando comparado ao grupo NÃO RETORNO. Na avaliação da carga viral (CV) inicial, o grupo NÃO RETORNO apresentou maior carga viral inicial, sendo 159,514 cópias/ml, e maior carga viral durante a internação sendo 165,833 cópias/ml, diferente do grupo RETORNO que apresentou a mediana de 52,267 cópias/ml na fase inicial e 77,581 cópias/ml durante a internação. Já em relação a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, ambos os grupos apresentaram a mediana abaixo de 350 células/mm<sup>3</sup>, tanto na fase inicial quanto na internação (Tabela 2).

**Tabela 1.** Características gerais da população

Variáveis	Total (n=70)		NÃO RETORNO (n=34)		RETORNO (n=36)		Razão de probabilidade (IC95%)
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
<b>Sexo</b>							
Masculino	54	(77,1)	26	(76,5)	28	(77,8)	-
Feminino	16	22,9	8	23,5	8	22,2	
<b>Uso de TARV</b>							
Irregular	34	48,6	12	35,3	22	61,1	
Regular	11	15,7	4	11,8	7	19,4	-
Naive	25	35,7	18	52,9	7	19,4	
<b>Motivo de internação</b>							
Tuberculose	20	28,6	10	29,4	10	27,8	
Síndrome retroviral	37	52,9	19	55,9	18	50,0	-
Neurotoxoplasmose	10	14,3	4	11,8	6	16,7	
Pneumonia	1	1,4	0	0,0	1	2,8	
Sífilis	1	1,4	0	0,0	1	2,8	
Neurocriptococose	1	1,4	1	2,9	0	0,0	
<b>Coinfecção</b>							
Sim	33	47,1	15	44,1	18	50,0	-
Não	37	52,9	21	61,8	18	50,0	
<b>Desfecho Clínico</b>							
Óbito	14	20,0	4	11,8	10	27,8	1,58 (1,17 - 2,02)
Alta	56	80,0	30	88,2	26	72,2	

TARV: Terapia antirretroviral; CD4: linfócitos T CD4 Razão de probabilidade: ou *Odds ratio*; IC95%: intervalo de confiança a 95%

**Tabela 2.** Características Clínicas da população

Variáveis	Total (n=70) Mediana (IQR)	NÃO RETORNO (n=34) Mediana (IQR)	RETORNO (n=36) Mediana (IQR)	p valor
<b>Idade</b>	36 (30-42)	35 (30-42)	37 (30-43)	0,869
<b>Tempo de uso de TARV (anos)</b>	4 (0-8)	1,5 (0-6)	6,5 (2,5-10)	<b>0.003*</b>
<b>Dias de internação</b>	10(5-17)	12 (5-17)	10 (5-17)	0.795
<b>CD4 (cél/mm<sup>3</sup>)<sup>+</sup> inicial</b>	127 (43-279)	116(37-231)	136 (53-291)	0.384
<b>CD4(cél/mm<sup>3</sup>)<sup>+</sup> internação</b>	96 (35-242)	91 (31-201)	113 (54-280)	0.584
<b>Carga viral (cópias) inicial</b>	92.000 (21.000- 407.000)	160.000 (54.000- 656.000)	52.000 (19.000- 140.000)	<b>0.015*</b>
<b>Carga viral (cópias) internação</b>	103.000 (40.000- 286.000)	166.000 (41.000- 414.000)	78.000 (40.000- 180.000)	0.063

TARV: Terapia antirretroviral; CD4: linfócitos T CD4<sup>+</sup>

## 5.2 Análises dos parâmetros laboratoriais

Para avaliar os dados laboratoriais, foi realizada análise de comparação entre os grupos. Nos dados hematológicos não foram observadas diferenças significativas, no entanto, alguns parâmetros mostraram-se alterados. Observou-se que as hemácias de ambos os grupos estavam abaixo dos valores normais de referências, assim como o hematócrito do grupo NÃO RETORNO. Baseado nas medianas, foram observadas também linfocitose no grupo NÃO RETORNO, e monocitose em ambos os grupos (Tabela3).

Quanto aos dados bioquímicos, o grupo RETORNO apresentou um leve aumento da glicose, assim como a gama GT, o TAP e a ferritina que estavam elevadas nos grupos RETORNO e NÃO RETORNO (Tabela 4).

**Tabela 3.** Análises Hematológicas

Parâmetros Hematológicos	Referência	Total (n=70)	NÃO RETORNO (n=34)	RETORNO (n=36)	p valor
		Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	
Hemácias ( $\times 10^3$ cél./mm <sup>3</sup> )	4,2-5,5	3,9 (2,4-4,6)	3,9 (2,8-4,6)	3,9 (2,0-4,6)	0,777
Hemoglobina (g/dL)	12,5-15,5	12,8 (9,8-14,6)	13,0 (9,2-14,8)	12,8 (10,0-14,2)	0,593
Hematócrito (%)	36,0-47,0	36,8 (31-40,5)	34,2 (30,7-39,8)	37,5 (31,0-40,5)	0,612
VCM (fL)	80,0-100,0	84,6 (81,7-89,5)	83,8 (81,4-88,6)	86,0 (81,9-90,5)	0,308
HCM (pg)	27,0-32,0	28,2 (26,5-29,8)	28,0 (26,6-29,6)	28,8 (26,1-29,8)	0,55
CHCM (g/dL)	32,0-36,0	33,0 (32,0-33,8)	33,0 (32,1-33,6)	33,0 (31,6-33,8)	0,619
RDW (%)	10,0-15,0	12,6 (11,8-13,8)	12,4 (11,8-13,3)	12,7 (11,8-14,1)	0,328
Leucócitos ( $\times 10^3$ cél./mm <sup>3</sup> )	4-10	6,4 (4,6-10,6)	7,2 (4,5-11,2)	6,1 (4,7-10,2)	0,609
Neutrófilos ( $\times 10^3$ cél./mm <sup>3</sup> )	2-7	4,8 (3,2-9)	5,4 (3,3-9,9)	4,2 (3,2-7,6)	0,58
Linfócitos ( $\times 10^3$ cél./mm <sup>3</sup> )	1-3	2,7 (1,3-4,4)	3,7 (1,3-4,6)	1,8 (1-4,3)	0,161
Monócitos (cél./mm <sup>3</sup> )	200-1.000	1,282 (399-1,525)	1,336 (591-1,525)	1,251 (341-1,573)	0,297
Eosinófilos (cél./mm <sup>3</sup> )	20-500	120 (43-277)	88 (31-264)	151 (76-358)	0,132
Plaquetas ( $\times 10^3$ /mm <sup>3</sup> )	150-450.	218,7 (161,3-267,7)	227,1 (181,5-292,7)	200 (121-252,4)	0,139

VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (do inglês: Red Cell Distribution Width)

**Tabela 4.** Análises Bioquímicas

Parâmetros Bioquímicos	Referência	Total (n=70) Mediana (IQR)	NÃO RETORNO (n=34) Mediana (IQR)	RETORNO (n=36) Mediana (IQR)	<i>p</i> valor
Glicose (mg/dL)	70-100	98 (87-115)	97 (82-107)	103 (90-131)	0,09
Sódio (mEq/L)	135-145	138 (133-140)	138 (133-141)	137 (133-140)	0,733
Cálcio (mg/dL)	8,5-10,5	9 (8,5-9,6)	8,8 (8,4-9,7)	9,0 (8,5-9,5)	0,977
Potássio (mEq/L)	3,6-5,2	4 (3,6-4,3)	3,9 (3,6-4,2)	4,05 (3,4-4,3)	0,913
Magnésio (mg/dL)	1,3-2,5	1,8 (1,6-2)	1,95 (1,75-2)	1,75 (1,6-1,95)	0,652
Proteínas totais	6.0-8.3	7,3 (6,1-8)	7,3 (6,1-8,0)	7,25 (6,20-8)	0,939
Globulina (g/dL)	2.0-4.0	3,3 (2,6-3,8)	3,8 (3,1-3,9)	3,1 (2,6-3,8)	0,307
Bil. Total (mg/dL)	0,01-1,3	0,60 (0,35-0,99)	0,53 (0,37-0,77)	0,62 (0,33-1,13)	0,934
Bil. Direta (mg/dL)	0,01-0,3	0,17 (0,10-0,34)	0,17 (0,13-0,35)	0,17 (0,09-0,32)	0,614
Bil. Indireta (mg/dL)	0,01-0,7	0,36 (0,24-0,64)	0,35 (0,25-0,61)	0,39 (0,24-0,64)	0,872
Ureia (mg/ dL)	10-45	35,5 (27-56)	34 (29-51)	37 (26-60)	0,497
Creatinina (mg/dL)	0.5-1.2	0,9 (0,7-1,4)	0,9 (0,7-1,2)	0,90 (0,80-1,50)	0,572
DHL (U/ $\mu$ L)	211-423	436 (336-662)	397 (331-704)	447 (348-592)	0,814
Gama GT (U/ $\mu$ L)	5-45	65 (36,5-125,5)	65 (44-116)	64 (34-135)	0,509
Albumina (g/dL)	3.5-5.0	3,6 (3,1-4,1)	3,6 (3,0-4,1)	3,6 (3,1-4,1)	0,874
Fosfatase alcalina (U/L)	65-300	272 (216-387)	285 (220-387)	257 (204-378)	0,595
TGO (U/ $\mu$ L)	2-38	32 (23-55)	30,5 (22-70)	33,5 (23-55)	0,87
TGP (U/ $\mu$ L)	2-44	28 (18-40)	28 (20-43)	25 (17-35)	0,335
CK MB (ng/mL)	24-190	68 (41,5-125,5)	53 (39-107)	73 (48,5-171,5)	0,313
TAP	0,8 -1.0	1,2 (1,1-1,4)	1,3 (1,2-1,4)	1,2 (1,1-1,4)	0,649
Ferritina (ng/mL)	11-336	585 (259-1,295)	951 (444-1,258)	415 (234-1,467)	0,48

DHL: desidrogenase láctica; Gama GT: gama glutamil transpeptidase; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; TAP: Tempo de Atividade da Protrombina.

### 5.3 Frequência de Células B imatura/transicional/naive como marcador de disfunção de linfócitos B em Pessoas vivendo com AIDS

Imunidade humoral defeituosa em pessoas vivendo com AIDS está associada a uma tríade composta pela diminuição de linfócitos B de memória, aumento de células imaturas/transicionais/naives hiperativadas, e consequente aumento na produção de anticorpos polirreativos. Para verificar a importância de disfunção de linfócitos B na AIDS, o estudo verificou quanto maior a frequência de linfócitos imaturas/transicionais/naives hiperativadas (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>CD70<sup>+</sup>) maior foi tempo de hospitalização das PVHA, independente do histórico de reinternação (P=0,0314) (Figura 10A). Da mesma forma evidenciamos que PVHA que passam mais tempo internadas apresentam menores quantidade de CD4 circulantes (P= 0,0353) (Figura 10B), e que a presença de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>CD70<sup>+</sup>) está inversamente

correlacionada com a contagem de CD4 mostrando que quanto maior a imunodeficiência adquirida maior a presença de células imaturas/transicionais/naives ( $P=0,0276$ ) (Figura 10C).

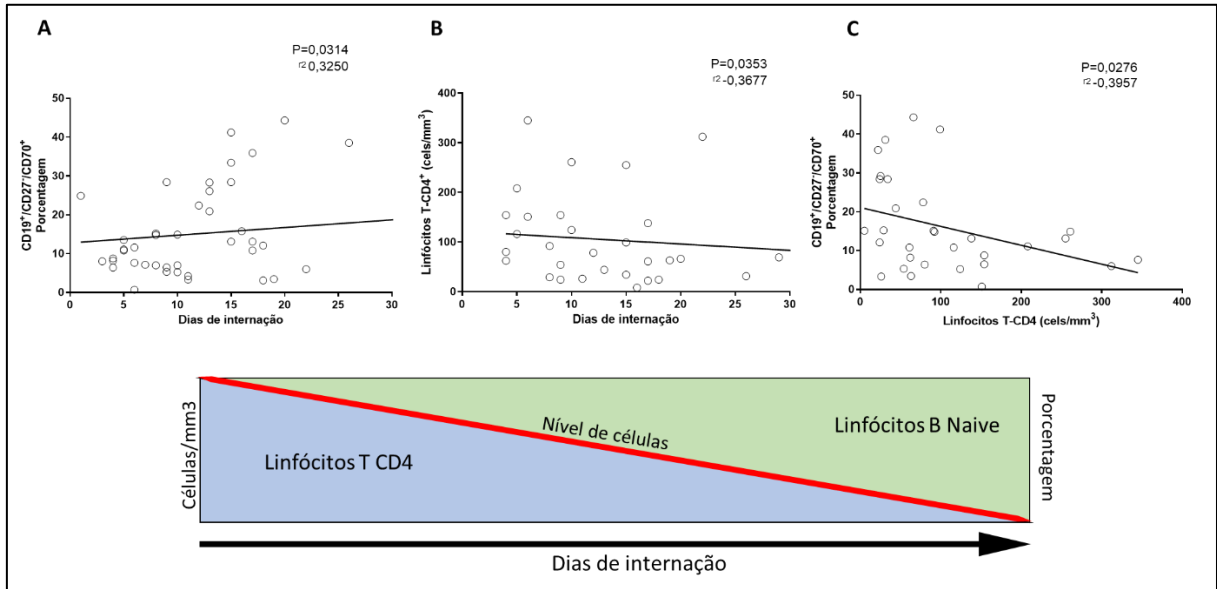


Figura 10 - **Correlação entre subpopulações de linfócitos B naive (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>CD70<sup>+</sup>) e dados clínicos em PVHA internadas no D0 na Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado.** (A) Correlação entre as subpopulações de linfócitos B naive (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>CD70<sup>+</sup>) e os dias de internação (B) Correlação entre a quantidade de CD4 circulante e os dias de internação. (C) Correlação entre as subpopulações de linfócitos B naive (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>CD70<sup>+</sup>) e a quantidade de CD4 circulante. É importante ressaltar que o fato de alguns dos pessoas serem naive de tratamento, não há dados de células CD4 e/ou carga viral, Análise feita com N=36 (Spearman).

Como a disfunção de linfócitos B está associada a imunidade defeituosa, e esta deficiência decorre de hiperativação celular e manifestada por uma hipergamaglobulinemia, o estudo avaliou se esses dois eventos estão relacionados a reinternação. Para isso, as PVHA hospitalizadas foram classificadas em dois grupos distintos relacionados ao histórico de reinternação num período de 4 anos, sendo 2 antes e 2 após alta. Classificados em RETORNO n=36 (PVHA que necessitou de retorno a internação após alta) e NÃO RETORNO n=34 (PVHA que não necessitou de retorno a internação após alta), a fim demonstrar as possíveis alterações imunológicas em manter os níveis de imunidade após a alta clínica. A hipergamaglobulinemia foi maior nas pessoas do grupo RETORNO ( $p=0,0037$ ). Conforme a figura 11, no dia da internação, as PVHA que retornam a internar tiveram aumentados os níveis séricos de IgM, contudo, a porcentagem de linfócitos B imaturos/transicionais/naives ativados (CD27<sup>-</sup>/CD70<sup>+</sup>, Figura 11B), linfócitos B totais produtores de IgM (CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>, Figura 11C)

não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Embora os níveis de IgM intracitoplasmático dos linfócitos B imaturos/transicionais/naives ativados ( $CD27^-/CD70^+$ ) entre os dois grupos não tivessem diferença, a produção aumentada de IgM ( $IgM^+$  intracelular) nos linfócitos B ( $CD27^-/CD70^+$ ) em pessoas reinternados tem uma tendência de aumento (Figura 11D). No entanto, o estado inflamatório os níveis de CD14 solúvel (sCD14) não diferiu (Figura 11E).

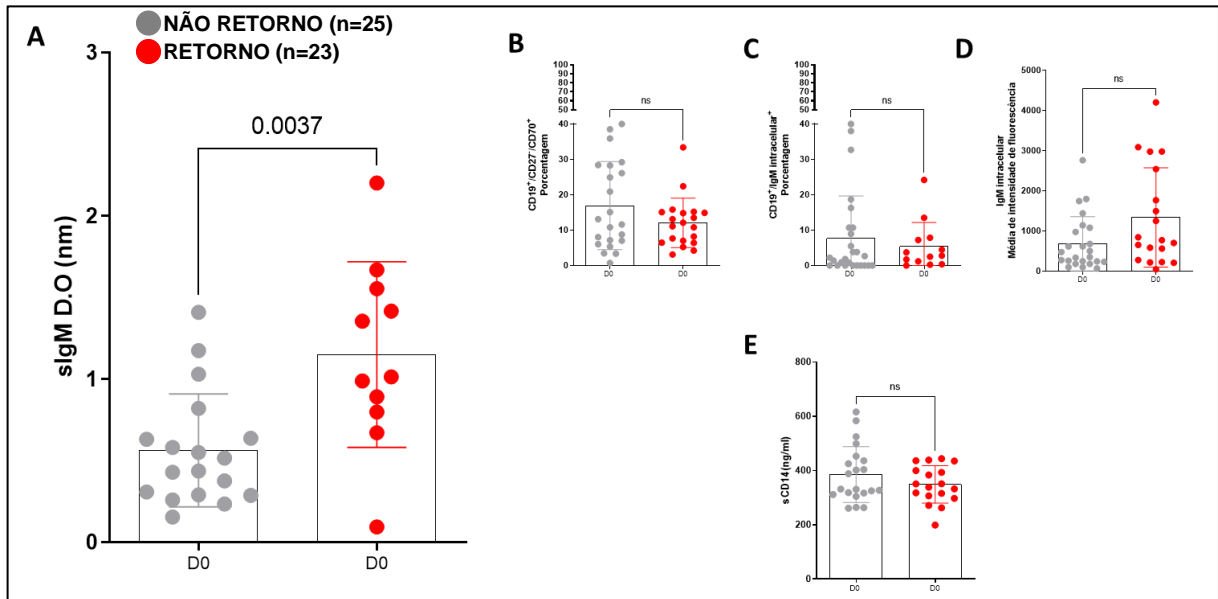


Figura 11 - **Análise de biomarcadores de disfunção de linfócitos B produtores de IgM sérica em PVHA entre grupos de retorno (vermelho) e não retorno internação (cinza) após alta.** (A) Dosagem de IgM sérica (sIgM), (B) Porcentagem de subpopulações de linfócitos B ( $CD19^+/CD27^-CD70^+$ ), (C) Porcentagem de subpopulações de linfócitos B expressando IgM intracelular, (D) Média de intensidade de fluorescência de IgM intracelular em subpopulações de linfócitos B, (E) Dosagem da concentração de CD14 solúvel durante o D0 de internação.

A fim de verificar a possibilidade de hipergamaglobulinemia por linfócitos B imaturos (Figura 12), foi realizada a análise de IgM intracelular nessas células durante o D3 e D7 da internação, os resultados demonstram que há um aumento gradual na porcentagem dessas células no D3 ( $p=0,0829$ ) e D7 ( $p=0,0184$ ), e igual modo, a expressão intracelular de IgM no D3 ( $p=0,0240$ ) e D7 ( $p=0,0531$ ) nas PVHA do grupo RETORNO, indicando que a disfunção de linfócitos B contribui para reinternações dessa pessoas.

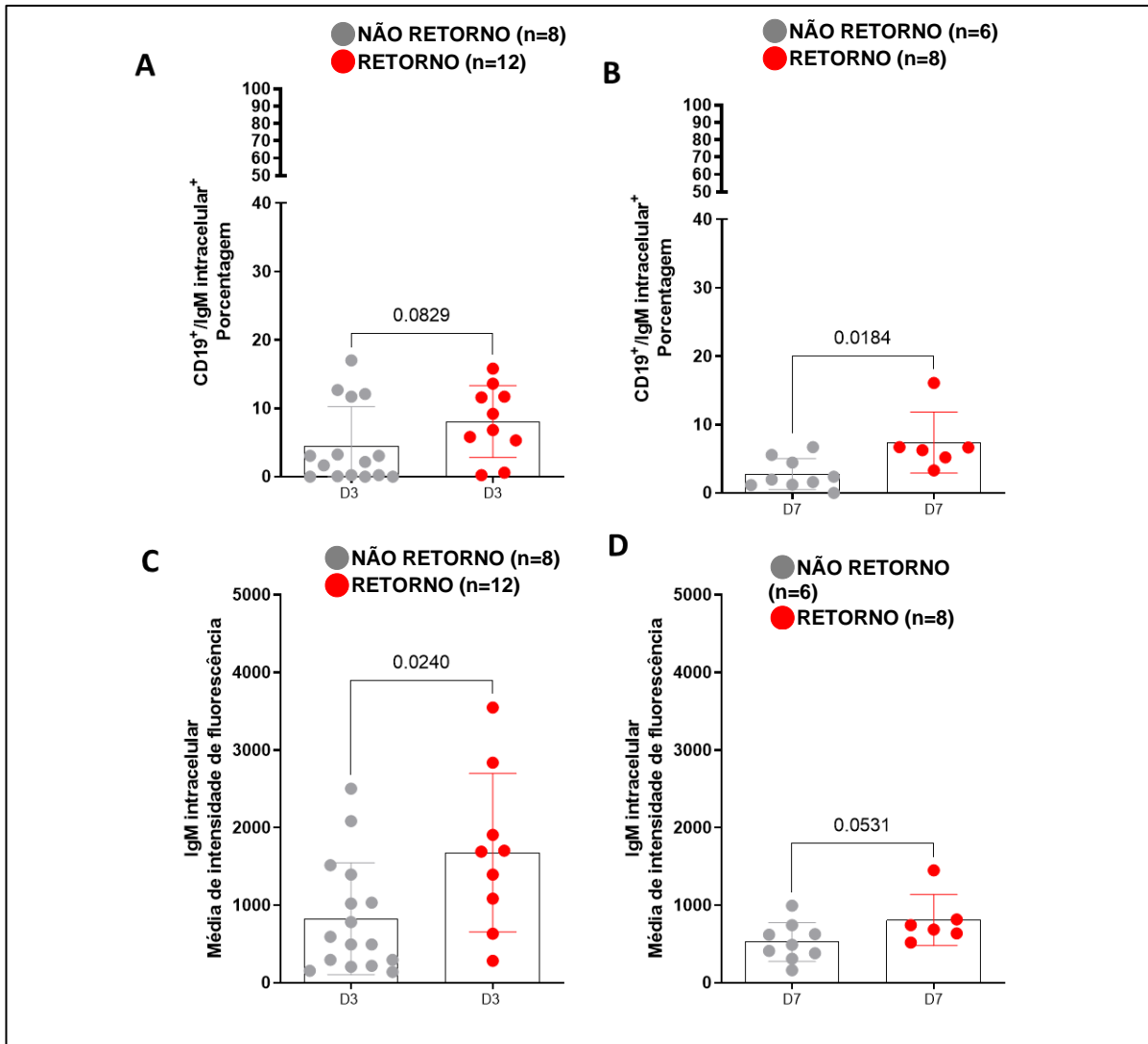


Figura 12 - Análise da expressão de IgM em linfócitos B naive ativados em PVHA entre grupos de retorno (vermelho) e não retorno internação (cinza) após alta durante o dia 3 e 7 da internação. (A) Porcentagem de subpopulações de linfócitos B expressando IgM intracelular no dia 3 (B) Porcentagem de subpopulações de linfócitos B expressando IgM intracelular no dia (C) Média de intensidade de fluorescência de IgM intracelular em subpopulações de linfócitos B no dia 3, (D) Média de intensidade de fluorescência de IgM intracelular em subpopulações de linfócitos B no dia 7.

Para verificar se o grupo que possui maior risco de óbito apresenta elevados níveis de citocinas inflamatórias, foram verificadas, através de dosagem sérica, as citocinas de perfil inflamatório/regulatório entre os grupos de RETORNO (vermelho) e NÃO RETORNO (cinza) no dia da internação (D0) (Figura 13). Curiosamente, apenas a citocina IL-10 apresentou níveis inferiores ( $p=0,0388$ ) no grupo RETORNO, enquanto as outras citocinas inflamatórias: interleucinas 12p70 (IL-12p70), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-6 (IL-6),



interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), e interleucina-8 (IL-8), não apresentaram diferenças entre os grupos, indicando uma influência maior de imunomodulação sobre um cenário inflamatório.

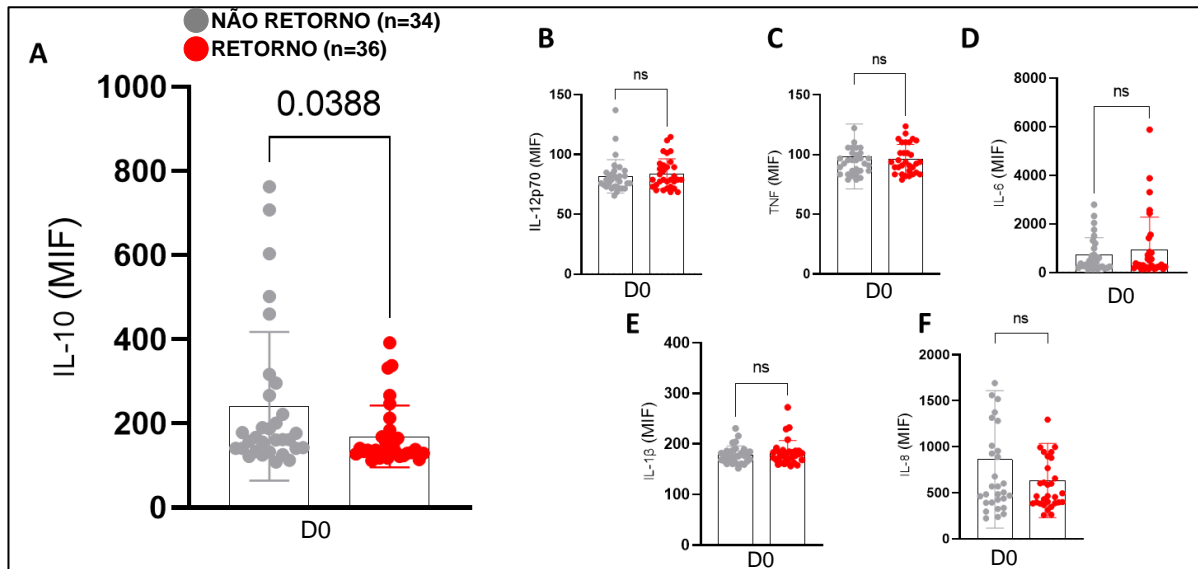


Figura 13 - Análise da dosagem de citocinas séricas de plasma de PVHA entre grupos de retorno (vermelho) e não retorno intersetim (cinza) no D0. A média de intensidade de fluorescência de IL-10 (A), IL-12p70 (B), TNF (C), IL-6 (D), IL-1 $\beta$  (E), IL-8 (F).

Para caracterizar as relações encontradas entre os marcadores imunológicos foi realizada uma análise de rede dos marcadores séricos de plasma e de imunofenotipagem celular de PVHA entre grupos de RETORNO (vermelho) e NÃO RETORNO (cinza) (Figura 14). Os níveis de correlações significativas ( $p \leq 0,05$ ) foram demonstradas por traços e tracejados, e evidenciaram uma rede de correlações positivas comuns entre os grupos, entre as citocinas IL-8, IL-6, TNF e IL-1 $\beta$ , por outro lado, no grupo RETORNO foi observada a falta de correlações com IL-10, provavelmente em razão de redução sérica dessa citocina (Figura 12A). O grupo RETORNO mostrou uma correlação fortemente positiva entre IL-6 e os linfócitos B (CD27<sup>-</sup>/CD70<sup>+</sup>) que expressam IgM intracelular (Figura 14).

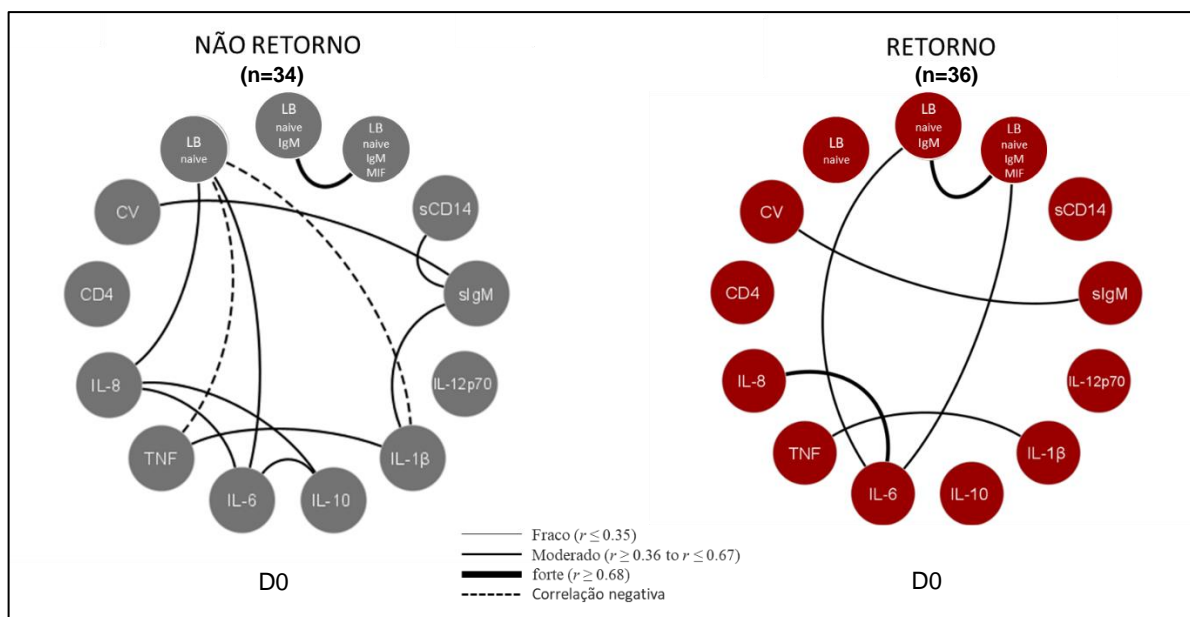


Figura 14 - **Ilustração de estruturas de rede dos marcadores séricos de plasma e de imunofenotipagem celular de PVHA entre grupos de retorno (vermelho) e não retorno internação (cinza) após alta.** Níveis de correlações significativas demonstradas por traços e tracejados. Elaboradas no programa estatístico CytoScape.

As análises séricas evidenciaram a hipergamaglobulinemia como a principal fator da disfunção de linfócitos B associado ao histórico de reinternação. No entanto, alguns achados levantaram suspeitas sobre como os mecanismos dessa disfunção envolvendo imunidade defeituosa e produção aumentada de IgM por linfócitos B ( $CD27^-/CD70^+$ ). A fim de avaliar se sinalização da resposta inata e/ou específica estariam ligados à disfunção imunológica de linfócitos B ( $CD27^-/CD70^+$ ), foi realizado o cultivo de PBMCs para avaliação da expressão e produção de IgM frente a estímulo de peptídeo da p24 e gp120, e dois agonistas de resposta inata.

Um dos mecanismos de ativação policlonal de células B na infecção por HIV-1 é a interação mediada por células T via contato célula a célula como também pela ação de citocinas. A nível sérico, apenas a citocina IL-10 havia apresentado níveis inferiores. Foi realizado, então, o cultivo celular por 24 horas de PBMC frente a diferentes estímulos (peptídeo HIV, CpG, LPS e CpG+LPS) de PVHA que compõem os grupos RETORNO (vermelho) e NÃO RETORNO (cinza), (Figura 15). Os resultados foram contabilizados pelo índice de reatividade calculando os valores da IgM intracitoplasmática/sérica ou de citocinas após estímulo sobre os valores das mesmas citocinas determinados sem estímulo (controle negativo), a fim de determinar o nível

de expressão da IgM intracitoplasmática/sérica ou da citocina, respectivamente. Após a análise foi possível observar, a elevada expressão de IgM intracelular nos linfócitos B ( $CD27^+/CD70^+$ ) ( $P=0,0127$ ), assim como, a produção de IL-6 ( $p=0,0499$ ) no grupo NÃO RETORNO, quando estimuladas com peptídeos HIV. Apesar de serem observadas uma maior expressão de IgM intracelular no grupo NÃO RETORNO, não houve diferenças significativas entre os grupos em relação a dosagem de IgM sérica (Anexo A), tão pouco em relação as outras citocinas do perfil inflamatório/regulatório (IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF e IL-12p70) analisadas ( Anexo B).

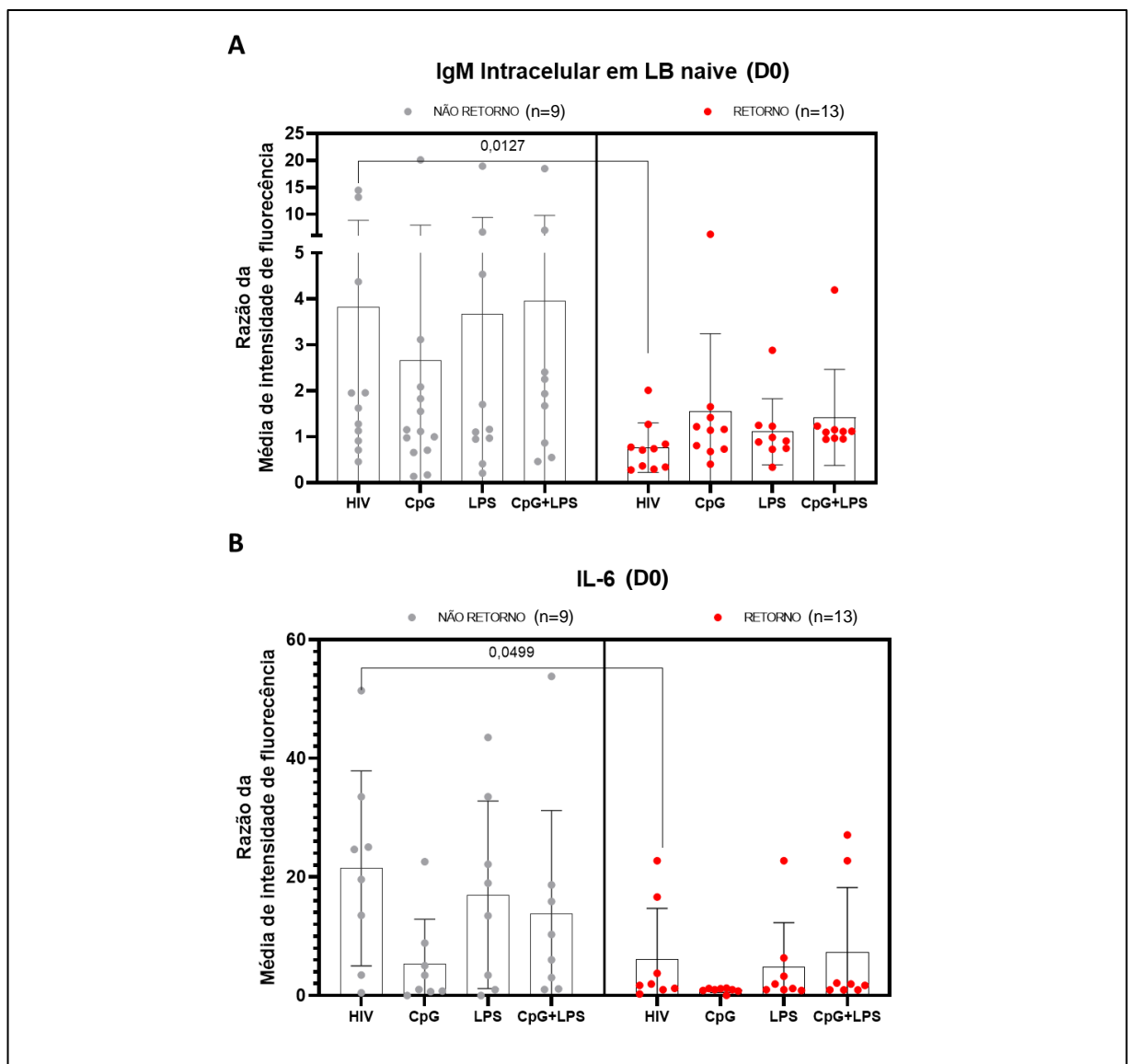


Figura 15 - Análise disfunção de linfócitos B naive frente a diferentes tipos de estímulos em PVHA entre grupos de retorno (vermelho) e não retorno internação (cinza) após alta. (A) Expressão de IgM intracelular em Linfócitos B naive, e (B) Nível de IL-6 de sobrenadante de cultura no D0 da internação.

As análises séricas do dia zero de internação (D0), demonstram redes significantes entre as citocinas IL-8/IL-1 $\beta$ /IL-6/IL-10/TNF (Figura 14). Buscou-se, portanto, através do cultivo celular, entender quais estímulos poderiam estar envolvidos na manutenção dessas correlações, e entender melhor a disfunção imunológica evidenciada nos resultados anteriores. Para isto, foi realizada uma Matriz de correlação entre os fenótipos de células B (CD27<sup>-</sup>/CD70<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup>intracelular), citocinas inflamatórias/regulatória e IgM secretada de sobrenadante de cultura de PBMC de PVHA entre grupos NÃO RETORNO (à esquerda) e RETORNO (à direita). Foi estabelecida uma escala visual por intensidade de cores, com variância de 1 a -1 conforme o valor de correlação representadas pela cor em azul para as correlações positivas e em vermelho as negativas dos que apresentaram  $p < 0,05$ . Os resultados demonstram que ambos os grupos tiveram uma correlação positiva entre IL-10/TNF no controle negativo, IL-10/TNF, IL-6/TNF, IL-1 $\beta$ /TNF, IL-6/IL-10, IL-1 $\beta$ /IL-10 e IL-6/IL-1 $\beta$  no estímulo CpG, IL-1 $\beta$ /TNF no estímulo LPS, IL-1 $\beta$ /TNF e TNF/IL-12p70 e no estímulo CpG+ LPS (Figura 16). A visão geral exibida na figura 16 ajuda a entender melhor as características que diferenciaram os grupos, a começar pelo controle negativo do grupo RETORNO, que apresentou uma maior quantidade de correlações entre as citocinas IL-1 $\beta$ /IL-6/IL-10/TNF.

Curiosamente, essas correlações se assemelham quando estimuladas com CpG para ambos os grupos. Entretanto, ao observar a resposta imune adaptativa, frente a um antígeno específico (peptídeos HIV), observou-se que as características entres os grupos são bem diferentes, com correlações positivas entre IL-10/TNF, IL-6/TNF, IL-6/IL-10, IL-1 $\beta$ /IL-10 e IL-6/IL-1 $\beta$  no grupo NÃO RETORNO, semelhantes ao estímulo por CpG e de igual modo nas análises de rede dos marcadores séricos apresentados anteriormente.

O grupo RETORNO, quando estimulado com peptídeo HIV, houve correlações bem diferentes do grupo NÃO RETORNO, caracterizado principalmente pelas correlações negativas de IL-6/IL-10, IL-8/IL-10 e correlação positiva de IL-6/IL-8, semelhante as análises de rede apresentados anteriormente (Figura 14).



Figura 16 - **Matriz de correlação citocinas e anticorpos IgM secretados, e células B naives do sobrenadante de cultura de PBMC de PVHA entre grupos não retorno internação (à esquerda) e retorno (à direita) após alta.** A escala visual por intensidade de cores varia de 1 a -1 conforme o valor de correlação. Em azul estão as correlações positivas e em vermelho as negativas. As análises foram realizadas no GraphPad Prism utilizando o teste estatístico de Spearman.

A Spearman, análise da capacidade de expressão de IgM intracelular em linfócitos B (CD27<sup>-</sup>/CD70<sup>+</sup>) e a produção de IgM secretada, foi avaliada para entender quais estímulos poderiam estar envolvidos com essa produção. Para isto, foram verificadas as correlações entre a expressão de IgM intracelular em linfócitos B (CD27<sup>-</sup>/CD70<sup>+</sup>) e a produção de IgM secretada do sobrenadante de cultura frente a diferentes tipos de estímulos ( HIV, CpG, LPS, CpG+LPS), entre os grupos NÃO RETORNO (Fig. 17) e RETORNO (Fig. 18).

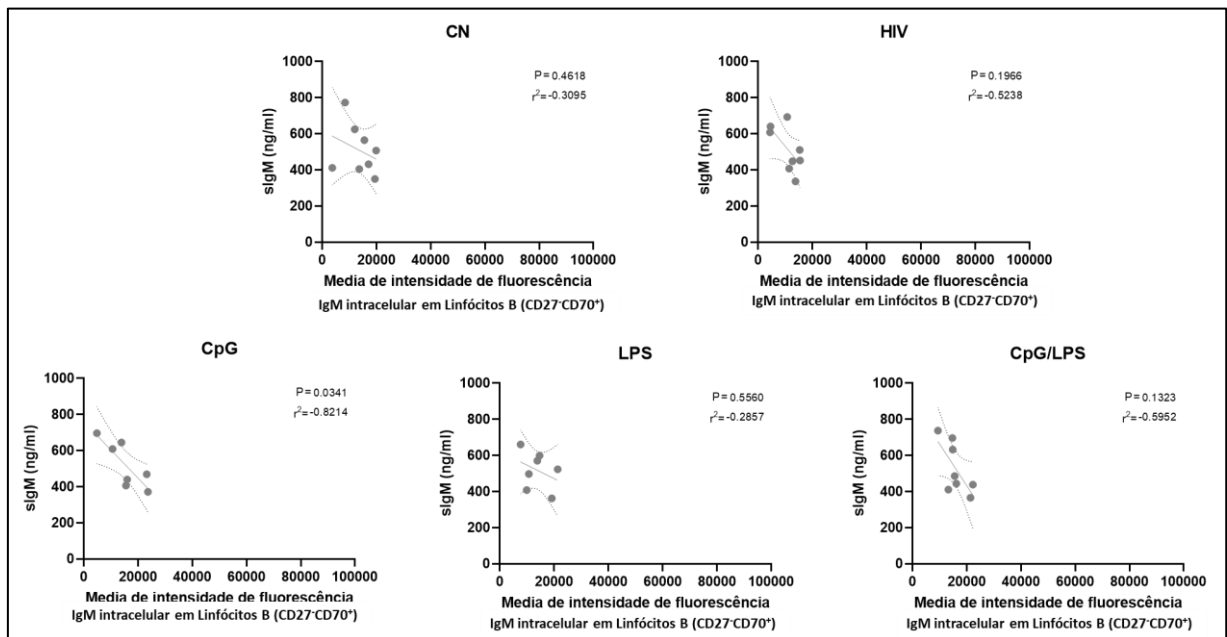


Figura 17 - **Correlações entre a expressão de IgM intracelular em linfócitos B (CD27<sup>-</sup>CD70<sup>+</sup>) e a produção de IgM secretada do sobrenadante de cultura frente a diferentes tipos de estímulos em 9 PVHA do grupo NÃO RETORNO (Spearman).** Eixo Y valores de concentração de IgM secretadas (ng/ml) e no eixo X Média de intensidade de fluorescência de IgM intracelular em Linfócitos B (CD27<sup>-</sup>CD70<sup>+</sup>).

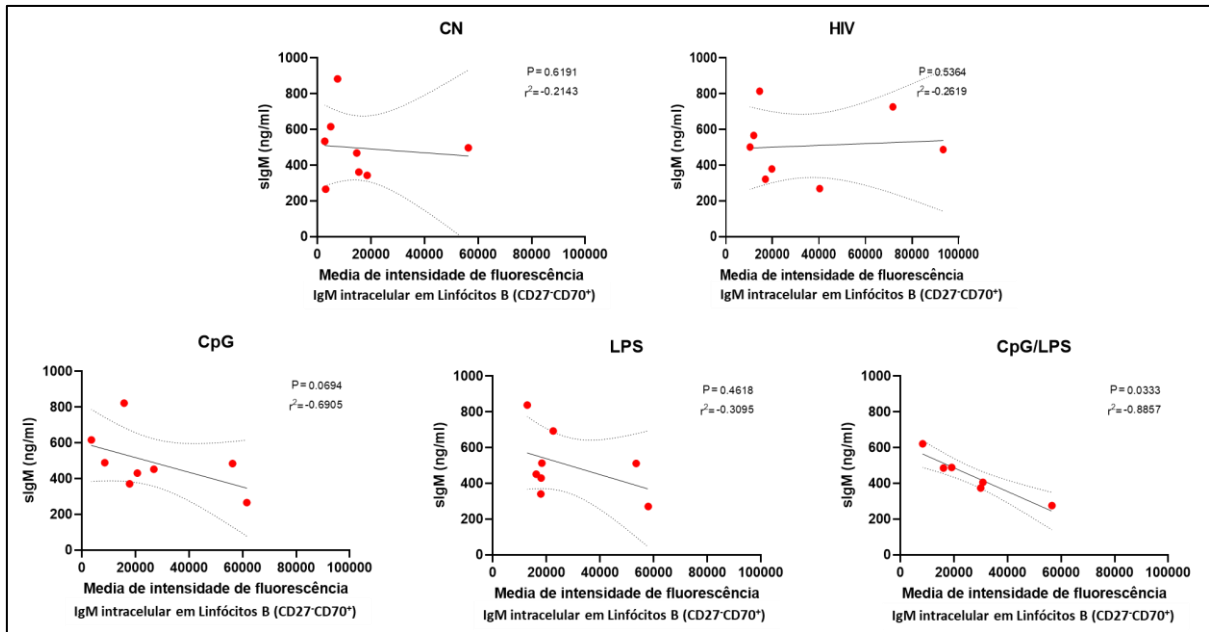


Figura 18 - Correlações entre a expressão de IgM intracelular em linfócitos B (CD27-CD70<sup>+</sup>) e a produção de IgM secretada no sobrenadante de cultura, frente a diferentes tipos de estímulos em 13 PVHA do grupo RETORNO (Spearman). Eixo Y valores de concentração de IgM secretadas (ng/ml) e no eixo X Média de intensidade de fluorescência de IgM intracelular em Linfócitos B (CD27-CD70<sup>+</sup>).

Essas análises demonstraram uma correlação significativa na mensuração intracelular e extracelular de IgM de PBMCs quando estimulados com PAMP CpG ( $p=0,0341$ ,  $r^2=0,8214$ ) no grupo NÃO RETORNO, o que não foram vistos em relação aos outros estímulos LPS ( $p=0,5560$ ) e CpG+LPS ( $0,1323$ ) apesar de ser vista uma tendência a no peptídeo HIV ( $p=0,1966$ ). Curiosamente, no grupo RETORNO, quando estimulado com CPG, o p valor encontrou-se aproximado da significância ( $p=0,0694$ ), já quando estimulado com CpG+LPS, foi observada a correlação significante ( $0,0333$ ,  $r^2=0,8877$ ), outros estímulos para esse grupo não apresentaram correlações significantes HIV ( $p=0,5364$ ) e LPS ( $p=0,4518$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, os boletins epidemiológicos têm demonstrado elevação dos casos de AIDS na região norte, principalmente no estado do Amazonas. Estudos tentam esclarecer quais fatores clínicos e imunológicos estão relacionados a mortalidade em PVHA para definir diretrizes de manejo clínico dessa população (BRASIL, 2018, 2022; COELHO et al., 2017; DE PAULA et al., 2020; LIANG et al., 2021; NASCIMENTO; IMPROTA-CARIA; BRITES, 2022; SANTOS et al., 2020; WORKIE; BIRHAN; ANGAW, 2021). Além do fato PVHA hospitalizadas em estágio de AIDS correm maior risco de morte, que pode persistir após a alta com as frequentes reinternação (re-hospitalização) (FORD et al., 2022). Abordagens para uma gestão adequada de pessoas com doença avançada por HIV é um componente chave na resposta contra HIV para fornecer intervenções direcionadas a populações em risco contínuo de mortalidade associada ao HIV (HOFFMANN et al., 2019). Em paralelo, o presente estudo buscou avaliar disfunções imunológica que podem predizer a necessidade de frequência de re-hospitalização, que aumenta o risco de vida em PVHA em especial aquelas pessoas com AIDS avançada.

Segundo o boletim epidemiológico nacional, a detecção de AIDS entre homens foi de 24,1 casos a cada 100 mil habitantes, que ocorreu entre as pessoas na faixa etária de 25 a 29 anos, a maior concentração dos casos no Brasil foi observada nas pessoas com idade entre 25 e 39 anos. Na população da região norte, no período de 2010 a 2020, no Amazonas, a maioria dos casos de AIDS (63,9%) estavam na faixa etária de 20 a 39 anos. (AMAZONAS, 2021; BRASIL, 2022). Estudos mais recentes trazem um cenário mais atualizado em relação a idade média de PVHA internadas no estado do Amazonas, apresentando uma média de 36,2 a 37,6 anos (GAMA et al., 2021), esses resultados corroboram com os encontrados em nossos estudos, onde a idade mediana (IQR) encontrada foi de 36 (30-42) anos. Assim, como descritos nos boletins epidemiológicos e em outros estudos, encontramos uma maior prevalência de PVHA do sexo masculino n=54 (77,1%), isto pode ter relação com a redução gradual da incidência de internação no sexo feminino em relação a taxa de detecção de AIDS nas faixas etárias de 20 a 29 anos e de 35 a 44 anos. (AMAZONAS, 2021; COELHO et al., 2017).

O padrão imunológico que é caracterizado pela baixa contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e presença de doenças oportunistas confirmou o baixo status de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (127 céls/mm<sup>3</sup>), independente das doenças oportunistas encontrado nos participantes. Esses níveis são semelhantes aos encontrados em outros estudos regionais que demonstram que cerca de



80% das PVHA internadas tinham uma contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> inferior a 350 céls/mm<sup>3</sup> (GAMA et al., 2021). Aqui, o estudo mostrou dois achados importantes: o primeiro que PVHA do grupo NÃO RETORNO apresentavam perfis de doenças oportunistas semelhantes aos que NÃO RETORNO; e segundo, o nosso estudo é o primeiro a demonstrar importância da disfunção de linfócito B e uma evidência de não recuperação imunológica como fatores que levam o risco de re-hospitalização, que podem servir de abordagem adicional aos programas de cuidado integral às pessoas que vivem com HIV pela Atenção Básica (BRASIL, 2022).

Do ponto de vista epidemiológico, o estudo apresentou diversos fatores preocupantes, a primeira é a prevalência de 35,7% de pessoas virgens de tratamento internadas. No contexto regional, é elevada a probabilidade de se encontrar valores reduzidos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em PVHA que são internadas, principalmente, os que não haviam feito uso de TARV (virgens de tratamento), isto está relacionado a apresentação tardia do diagnóstico e tratamento. Essa apresentação tardia ao início da TARV pode ter relação as características demográficas da região norte, onde residir em municípios/regiões com índice de vulnerabilidade social alto, pode aumentar em mais de 20% as chances de não estar em uso de TARV (PASCOM; MEIRELES; BENZAKEN, 2018). O segundo fator preocupante foi que apesar de ser visto que 52,9% (N=25) das PVHA participantes do estudo, apresentavam apenas síndrome retroviral como motivo da internação, 47,1% (N=33) apresentaram coinfeções tendo como maioria N=20 (28,2%), a presença de tuberculose. Esta coinfeção pode ocorrer em qualquer ponto do curso da infecção pelo HIV, tanto para a reativação da infecção latente quanto para a doença primária progressiva (KROUP et al., 1994; SAHA et al., 2011). Segundo a literatura, é estimado que PVHA tenham 20 vezes mais o risco de desenvolver tuberculose (TB) ativa que pessoas sem infecção pelo HIV (WHO, 2022). Essa alta prevalência de infecções oportunista, principalmente por tuberculose, seguida da necessidade de internação, pode ter relação com o uso irregular de TARV ou abandono da TARV, caracterizado principalmente por problemas emocionais e efeitos colaterais associados, que contribui significativamente no número de casos de PVHA que evoluem para imunossupressão severa, aumentando risco de infecções oportunistas e necessidade de maior frequência de internação, no Amazonas (RODRIGUES et al., 2021).

A terceira foi que a necessidade de internação em PVHA pode ser visto com indicador de mal prognóstico. Nossos resultados têm demonstrado que as pessoas que retornam a internar apresentam uma tendência a 1,5 vezes mais chances do desfecho óbito (*Odds ratio*=1,53,

$p > 0,050$ ). Outros estudos relatam que podem apresentar 3 vezes mais chances de óbito, tendo em vista as características clínicas que acompanham essa pessoa durante o tempo de internação ou a frequência da necessidade da internação, isto pode ser exacerbado quando há condições de vulnerabilidade sociodemográficas favorecendo a indecência considerável de doenças oportunistas aumentando a demanda de cuidados intensivos futuros, característica comum das pessoas da região norte (MAIA et al., 2021; NAVON, 2018; PASCOM; MEIRELES; BENZAKEN, 2018).

Ao tentarmos traçar perfis clínicos entre os grupos internados aqui analisados, podemos observar que apesar de não terem sido vistas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação aos dias de internação ( $p = 0.795$ ), quantidade de CD4 inicial ( $p = 0.384$ ) e quantidade de CD4 no dia da internação ( $p = 0.584$ ), foi observado que PVHA que necessitam de maior frequência de internação apresentaram e maior tempo de TARV (6,5 anos), e no primeiro diagnóstico baixa carga viral (52.000) quando comparado aos que internaram apenas uma vez ( $p = 0,003$  e  $p = 0,015$ ), respectivamente. Essas características clínicas somadas a baixa quantidade de CD4 e uso irregular de TARV tem sido descrita como fator de risco de vida em PVHA que necessitam de hospitalização, e pode ser agravante para a progressão de um mal desfecho, em ambos os grupos estudados (HAGUIHARA et al., 2019; NASCIMENTO; IMPROTA-CARIA; BRITES, 2022).

Clinicamente, durante a infecção pelo HIV, a linfopenia é uma característica comum, marcada, principalmente, pela depleção maciça e gradual dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pessoas virgens de tratamento (OWIREDU et al., 2011). Em nossos resultados, apesar de não terem sido vistas diferenças significantes nas análises hematológicas entre os grupos analisados, temos demonstrado que ambos os grupos apresentam uma linfopenia de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, característica da evolução da infecção, entretanto, observamos uma linfocitose (3.734 cél/mm<sup>3</sup>) no grupo NÃO RETORNO, que pode ter relação com um aumento de outras populações de linfócitos como CD8 e monocitose (1,282 cél/mm<sup>3</sup>) em ambos os grupos, essas alterações podem ter relação com a elevada quantidade de carga viral (103.000 cópias), ou relacionada a presença de infecções oportunistas encontradas em 47,1% das PVHA participantes (HUAMAN et al., 2021; SMITH et al., 2000; TAN et al., 2012; YUAN et al., 2023).

Já para as análises bioquímicas, não foram vistas diferenças significantes na dosagem bioquímica dos grupos internados, contudo, ambos internados apresentaram elevações médias na gamaglutamiltransferase – Gama GT (65 U/ $\mu$ l), Tempo de protrombina -TAP (1,2) e ferritina

(585 ng/ml). Por outro lado, as pessoas que necessitam de mais internações apresentaram média de dosagem de glicose de 103mg/dl (pré-diabético). Segundo a literatura, podem ser vistas alterações metabólicas associadas ao uso prolongado de TARV e a maior idade de PVHA, contudo, é necessária atenção no manejo clínico adequado a essas populações, pois isto pode representar um indicativo de doenças silenciosas não associadas ao HIV como as cardiovasculares, em ambos os grupos (BOCCARA, 2017; BROWN et al., 2005; CAPEAU et al., 2012; EPHRAIM et al., 2018; EZEAMAMA et al., 2018; MARY-KRAUSE et al., 2003; NANSSEU et al., 2018; NGUYEN; PEER; KENGNE, 2021).

A busca de marcadores clínicos relacionados a gravidade da AIDS durante a internação, tem sido a área de concentração de muitos estudos, na era da TARV. Essas informações auxiliam no desenvolvimento de diretrizes de manejo clínico dessas pessoas. Em nossos resultados, demonstramos que uma das características mais agravante relacionada aos óbitos, nessas pessoas, está na frequência de internações somado a presença de disfunção imunológica caracterizada pela elevada presença de linfócitos B imaturos (LAHER et al., 2021).

Segundo a literatura, a necessidade do tempo de permanência na internação em PVHA pode representar um indicador agravante para desfechos de óbito, isto porque, a necessidade maior de tempo de internação está relacionada com quadros clínicos graves da doença. Em nossos resultados, apresentamos uma tríade significativa (porcentagem de linfócitos B imaturos, contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e dias de internação) que somado necessidade de reinternação, pode favorecer o risco de desfecho óbito em PVHA (BARBOUR; FABIO; PEARLMAN, 2009; CISSOKO et al., 2019; MALASPINA et al., 2006, 2007; MAPHULA; LAHER; RICHARDS, 2020).

Dentro do cenário que leva a necessidade de internação, um estudo demonstrou que as variáveis clínicas como carga viral acima de 1000 cópias, linfócitos T CD4<sup>+</sup> menor que 100 células/mm<sup>3</sup>, diagnóstico recente e não aderência a TARV, não foram considerados como fatores que levam a necessidade de maior tempo de internação, contudo, a presença de coinfeções como tuberculose e meningite tuberculosa, criptocócica e bacteriana tiveram a necessidade de mais dias de internação (LAHER et al., 2021).

Por outro lado, durante a internação não são considerados fatores imunológicos que, por muitos profissionais da saúde, podem passar despercebidos nas PVHA. Nossos resultados vêm demonstrando uma disfunção imunológica em subpopulações de linfócitos B que não são avaliados nos exames de rotina durante a internação. Alguns estudos têm demonstrado que para

ativação e desenvolvimento de linfócitos B imaturos é necessário a estimulação dos receptores de células B - BCR, somado a interação com células T auxiliares, e por final a ativação de receptores inatos nas células B. O comprometimento em umas das vias pode desfavorecer o desenvolvimento de uma resposta adaptativa efetiva, principalmente em PVHA que são internadas por causa de coinfeções como encontradas em 47,1% das pessoas do estudo (RUPRECHT; LANZAVECCHIA, 2006).

As bases que reforçam a hipótese de disfunção em linfócitos B são esclarecidas pelas características encontradas, inicialmente *ex vivo*, onde a disfunção imunológica foi observada em PVHA do grupo RETORNO. Os nossos resultados mostram aumento gradual da presença de linfócitos B imaturos/transicionais/naives hiperativadas ( $CD19^+CD27^-CD70^+$ ), que expressam níveis maiores de  $IgM^+$  a nível intracitoplasmáticos. Ao longo da internação, essas subpopulações de linfócitos B aumentam a produção intracelular de  $IgM$  o que corrobora com  $IgM$  sérica mais elevado na admissão ( Figuras 11 E 12). Além de constatar o problema da disfunção de linfócitos B nas pessoas em AIDS (DE MILITO, 2004; DE MILITO et al., 2004; FU et al., 2021; MOIR; FAUCI, 2009, 2017), esses achados são os primeiros a demonstrar que essas disfunções estão associadas ao em risco de óbito desses pessoas com re-hospitalizações frequentes.

A ativação policlonal de células B na infecção por HIV-1 é gerado por vias onde há interação antígenos específicos, agonistas de resposta inata e interação mediada por células T pela combinação de citocinas (HAAS; ZIMMERMANN; OXENIUS, 2011). Aqui, as baixas concentrações de IL-10 ( Fig. 13) que podem ter influenciado a rede de correlação (Fig. 14). Foi possível observar a falta correlação com as citocinas chave, importantes para o estabelecimento de uma imunidade efetiva para o controle do HIV ( $IL-8/IL-6/ TNF/IL-1\beta$ ), ao contrário do que foi visto nas pessoas do grupo NÃO RETORNO (BORGES et al., 2015; LANE et al., 2001; NAKAJIMA et al., 1989).

A relação da disfunção de Linfócitos B e a baixa quantidade de IL-10 em PVHA reinternadas pode ser explicada pela baixa recuperação imunológica de linfócitos T  $CD4$ , que não se caracteriza apenas pelo valor numérico, mas sim pela característica funcional (CUBAS et al., 2013) tornam-se funcionalmente afetados (NOTO; PANTALEO, 2017; WENDEL et al., 2018). A IL-10 possui característica pleiotrópica com função principal de regulação do sistema imunológico, limitando o desenvolvimento de outras citocinas, necessárias para o desenvolvimento completo e correto dos linfócitos T  $CD4^+$ , dessa forma, a diminuição de IL-

10 não está relacionada a elevação de citocinas inflamatórias no grupo RETORNO, como observados em nossos resultados, mas sim, contribuindo para problemas na recuperação imunológica de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e maturação de Linfócitos B (CORBEAU; REYNES, 2011; ROUSSET et al., 1992; SARAIVA; VIEIRA; O’GARRA, 2020).

Outra citocina que mostrou papel importante na disfunção foi a IL-6, conforme as correlações com as subpopulações de Linfócitos B imaturos, no grupo RETORNO (Figura 15). Segundo a literatura, a IL-6 aumenta a secreção de imunoglobulina, mas não induz uma alteração no isotipo segregado. Para isto, é necessária a interação com várias citocinas. Dessa forma, as correlações encontradas nas redes entre IL-6 e a porcentagem de linfócitos B que expressam IgM intracelular podem promover um cenário para favorecer ainda mais a hipergamaglobulinemia, caso não haja a produção correta de outras citocinas que auxiliem no desenvolvimento de anticorpos mais efetivos (BERTOLINI; BENSON, 1990), cenário este, que não é visto no grupo NÃO RETORNO, que apresentou redes significantes entre as citocinas séricas IL-1 $\beta$ /IL-6/IL-10/TNF/IL-8 (ADELMAN et al., 1990; KISHIMOTO, 2006; NURIEVA et al., 2009).

A caracterização da disfunção da resposta adaptativa foi verificada *in vitro* com a baixa produção de IgM em linfócitos B imaturos, e a baixa produção de IL-6 em PBMCs estimulados com peptídeos HIV nas pessoas que tornam a internar. Isto se confirmou quando realizada a análises da matriz de correlação, ao qual podemos evidenciar correlações entre as citocinas bastantes diferentes as encontradas no grupo NÃO RETORNO, que foram semelhantes às encontradas nas análises séricas ( Figuras 14 e 15). Entretanto, a relação entre IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 e IL-10 frente a exposição ao antígeno CpG foi semelhante em ambos os grupos. Curiosamente, essa mesma rede foi observada nas análises séricas em ambos os grupos ( Fig. 14), evidenciando que o reconhecimento dos receptores da imunidade inata em linfócitos B imaturos não fica comprometido durante a infecção pelo HIV, isto é objeto de estudo para futuras formulações vacinais (COOPER et al., 2005; CUSS et al., 2006; KRIEG, 2006; MALASPINA et al., 2008).

Dessa forma, podemos inferir um prejuízo no reconhecimento de antígenos importantes para o desenvolvimento da imunidade adaptativa. Isto porque, os PBMCs estimulados com antígenos HIV do grupo RETORNO, não mostram uma rede de citocinas como a observada no grupo NÃO RETORNO, a nível sérico na admissão e em na cultura *in vitro*. Essa ativação da resposta imune para CpG e a baixa resposta imune para antígenos HIV encontrado no grupo

RETORNO pode potencializar ativação de subpopulações de células B imaturas e favorecer a produção de anticorpos menos efetivos além da exacerbação da hipergamaglobulinemia. (LANE et al., 1983; MALASPINA et al., 2005, 2006, 2008; MOIR et al., 2004; RUPRECHT; LANZAVECCHIA, 2006)

Conseguirmos por métodos *in vitro*, demonstrar o que ocorre *ex vivo*, principalmente pelo entendimento de mecanismos que podem ter relação com a disfunção de imunológica em PVHA internadas com risco de vida. Observamos nas análises plasmáticas, no D0 da internação, que pessoas com episódios de reinternação apresentaram problemas na recuperação imunológica que favorece o aumento de linfócitos B imaturos seguidos de hipergamaglobulinemia ativados, principalmente ou apenas, por receptores da imunidade inata. Outros estudos podem esclarecer quais vias de maturação do linfócito B ou a interação Linfócito B-T estão comprometidas em PVHA que tem maior frequência de internação.

## 7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar do estudo apresentar resultados promissores, alguns desafios foram encontrados ao qual geraram limitações para responder, de forma mais completa, as perguntas do projeto. 1º) a dificuldade de coleta do estudo de coorte (*ex vivo*) nas PVHA internadas que devido debilidade física dificultaram o acesso venoso para a amostragem de PBMCs e de plasmas para quantificação de um N maior nos D3 e D7 além da inviabilidade de analisar a produção e o reconhecimento de outros tipos de anticorpos (IgG); 2º) A evasão de muitos participantes que decidiram sair da internação sem alta médica ou evoluíram para óbito antes das coletas; 3º) Devido a COVID-19, muitas pessoas foram internadas, e dessa forma, não incluídas no estudo; 4º) Nos experimentos (*in vitro*) tivemos limitações em relação a dosagem de IgM sérica, pois não tínhamos quantidade suficiente de células para fazer uma análise dinâmica da produção até o D7 de cultivo, adotando apenas o D0 como ponto de análise; 5º) Não foi possível a caracterização de outras células, (linfócitos T) nos participantes para reforçar os achados de problemas de reconstituição imunológica, objeto de estudos futuros.

## 8. CONCLUSÃO

O padrão imunológico encontrado, nesse estudo, revelou que as PVHA internadas, no Amazonas, apresentam cenário epidemiológico preocupante caracterizado por uma alta prevalência de AIDS avançada ( $>200$  céls/mm<sup>3</sup>), sem recuperação imunológica, impactando, principalmente, no tempo de internação, que somado necessidade de reinternação, pode favorecer o risco de desfecho óbito, onde devido a problemas na manutenção de resposta imune adaptativa contra o HIV, caracterizada pelo aumento de subpopulações de linfócitos B imaturos produtores de IgM, favorecem a hipergamaglobulinemia.



## 9. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; ANDREW H. LICHTMAN; SHIV PILLAI. **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ADELMAN, D. C. et al. Elevated serum interleukin-6 associated with a failure in B cell differentiation in common variable immunodeficiency. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 86, n. 4, p. 512–521, 1 out. 1990.
- AL-HARTHI, L.; ROEBUCK, K. A.; LANDAY, A. Induction of HIV-1 replication by type 1-like cytokines, interleukin (IL)-12 and IL-15: Effect on viral transcriptional activation, cellular proliferation, and endogenous cytokine production. **Journal of Clinical Immunology**, v. 18, n. 2, p. 124–131, 1998.
- ALKHATIB, G. The biology of CCR5 and CXCR4. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 4, n. 2, p. 96–103, mar. 2009.
- ALTFELD, M. et al. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 176–186, 2011.
- AMADORI, A. et al. B cell activation during HIV-1 infection. II. Cell-to-cell interactions and cytokine requirement. **Journal of Immunology**, v. 146, n. 1, p. 57–62, jan. 1991.
- AMAZONAS. Boletim Epidemiológico de HIV/AIDS. **Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas**, p. 9–24, 2021.
- ASCHER, M. S.; SHEPPARD, H. W. AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis. **Clinical and experimental immunology**, v. 73, n. 2, p. 165–7, ago. 1988.
- BAKER, N.; EHRENSTEIN, M. R. Cutting Edge: Selection of B Lymphocyte Subsets Is Regulated by Natural IgM. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 12, p. 6686–6690, 15 dez. 2002.
- BARBOUR, K. E.; FABIO, A.; PEARLMAN, D. N. Inpatient charges among HIV/AIDS patients in Rhode Island from 2000-2004. **BMC health services research**, v. 9, n. 1, 2009.
- BERTOLINI, J. N.; BENSON, E. M. The role of human interleukin-6 in B-cell isotype regulation and differentiation. **Cellular immunology**, v. 125, n. 1, p. 197–209, 1990.
- BOCCARA, F. Cardiovascular health in an aging HIV population. **AIDS**, v. 31, p. S157–S163, 1 jun. 2017.
- BOLIAR, S. et al. B-Lymphocyte Dysfunction in Chronic HIV-1 Infection Does Not Prevent Cross-Clade Neutralization Breadth. **Journal of Virology**, v. 86, n. 15, p. 8031–8040, ago. 2012.
- BORGES, Á. H. et al. Factors Associated With Plasma IL-6 Levels During HIV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 4, p. 585, 8 ago. 2015.
- BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. **Ministério da Saúde**, dez. 2018.

BRASIL. Boletim Epidemiológico HIV / Aids | 2022. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2022.

BREITFELD, D. et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 11, p. 1545–1552, dez. 2000.

BROWN, T. T. et al. Antiretroviral therapy and the prevalence and incidence of diabetes mellitus in the multicenter AIDS cohort study. **Archives of internal medicine**, v. 165, n. 10, p. 1179–1184, 23 maio 2005.

BURNET, F. M. Immunological recognition of self. **Science**, v. 133, n. 3449, p. 307–311, 3 fev. 1961.

BURROWS, N.; MAXWELL, P. H. Hypoxia and B cells. **Experimental Cell Research**, v. 356, n. 2, p. 197–203, 15 jul. 2017.

CAPEAU, J. et al. Ten-year diabetes incidence in 1046 HIV-infected patients started on a combination antiretroviral treatment. **AIDS**, v. 26, n. 3, p. 303–314, 28 jan. 2012.

CDC. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 30, n. 25, p. 305–308, jul. 1981.

CHAN, D. C.; KIM, P. S. HIV entry and its inhibition. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 681–684, 1998.

CISSOKO, Y. et al. Profile of Pathologies Diagnosed in Patients Hospitalized in a Ward of Infectious Diseases at the Era of HIV in Bamako, Mali West Africa. **Journal of Infectious Diseases and Epidemiology**, v. 5, n. 1, 31 mar. 2019.

CLERICI, M. et al. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. **The Journal of clinical investigation**, v. 84, n. 6, p. 1892–1899, 1989.

COELHO, L. E. et al. Hospitalization rates, length of stay and in-hospital mortality in a cohort of HIV infected patients from Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 190–195, 1 mar. 2017.

COIRAS, M. et al. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 798–812, 2009.

COLASANTI, J. A.; DEL RIO, C. Declining Hospitalizations Among Persons With Human Immunodeficiency Virus: Time to Leave No Patient Behind. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 7, p. 1624–1626, 23 out. 2020.

COLINEAU, L. et al. HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular Helper T Cell (Tfh) Subsets and Skewed B Cell Maturation. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0140978, 2015.

COOPER, C. L. et al. CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults. **AIDS**, v. 19, n. 14, p. 1473–1479, 23 set. 2005.

- COOPER, M. D. The early history of B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 191–197, 27 mar. 2015.
- COOPER, M. D.; ALDER, M. N. The evolution of adaptive immune systems. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 815–822, 24 fev. 2006.
- CORBEAU, P.; REYNES, J. Immune reconstitution under antiretroviral therapy: the new challenge in HIV-1 infection. **Blood**, v. 117, n. 21, p. 5582–5590, 26 maio 2011.
- CROTTY, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). **Annual review of immunology**, v. 29, p. 621–663, 2011.
- CUBAS, R. A. et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. **Nature medicine**, v. 19, n. 4, p. 494–499, abr. 2013.
- CUSS, A. K. et al. Expansion of Functionally Immature Transitional B Cells Is Associated with Human-Immunodeficient States Characterized by Impaired Humoral Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 1506–1516, 1 fev. 2006.
- DAVY-MENDEZ, T. et al. Hospitalization Rates and Outcomes Among Persons Living With Human Immunodeficiency Virus in the Southeastern United States, 1996-2016. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 7, p. 1616–1623, out. 2020.
- DE MILITO, A. et al. Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. **AIDS**, v. 15, n. 8, p. 957–964, maio 2001.
- DE MILITO, A. B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. **Current HIV research**, v. 2, n. 1, p. 11–21, jan. 2004.
- DE MILITO, A. et al. Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2180–2186, 15 mar. 2004.
- DE PAULA, A. A. et al. Perfis de mortalidade em pessoas vivendo com HIV/aids: comparação entre o Rio de Janeiro e as demais unidades da federação entre 1999 e 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 23, p. e200017, 20 mar. 2020.
- DOMEN, J.; WEISSMAN, I. L. **Self-renewal, differentiation or death: Regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. Molecular Medicine Today**, 1999.
- DOUEK, D. HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut. **Topics in HIV medicine : a publication of the International AIDS Society, USA**, v. 15, n. 4, p. 114–117, 2007.
- EIBEL, H. et al. B cell biology: An overview topical collection on basic and applied science. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 14, n. 5, p. 1–10, 1 maio 2014.
- EPHRAIM, R. K. D. et al. Abnormal coagulation profile in people living with HIV-AIDS on combined Antiretroviral Therapy: findings from a case-control study in the Ho municipality, Ghana. **PAMJ. 2018; 29:121**, v. 29, n. 121, 20 fev. 2018.

- EZEAMAMA, A. E. et al. Impaired Hematologic Status in Relation to Clinical Outcomes among HIV-Infected Adults from Uganda: A Prospective Cohort Study. **Nutrients**, v. 10, n. 4, 12 abr. 2018.
- FANALES-BELASIO, E. et al. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Annali dell'Istituto superiore di sanita**, v. 46, n. 1, p. 5–14, 2010.
- FAUCI, A. S. et al. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. **Annals of internal medicine**, v. 124, n. 7, p. 654–663, abr. 1996.
- FAUCI, A. S.; MAVILIO, D.; KOTTILIL, S. NK cells in HIV infection: Paradigm for protection or targets for ambush. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 11, p. 835–843, 2005.
- FAZILLEAU, N. et al. Follicular helper T cells: lineage and location. **Immunity**, v. 30, n. 3, p. 324–335, mar. 2009a.
- FAZILLEAU, N. et al. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. **Nature immunology**, v. 10, n. 4, p. 375–384, abr. 2009b.
- FELLAH, J. S. et al. Evolution of vertebrate IgM: complete amino acid sequence of the constant region of *Ambystoma mexicanum*  $\mu$  chain deduced from cDNA sequence. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 10, p. 2595–2601, 1 out. 1992.
- FISHER, M. Late diagnosis of HIV infection: major consequences and missed opportunities. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–3, fev. 2008.
- FORD, E. S.; PURONEN, C. E.; SERETI, I. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 4, n. 3, p. 206–214, maio 2009.
- FORD, N. et al. Causes of hospital admission among people living with HIV worldwide: a systematic review and meta-analysis. **The lancet. HIV**, v. 2, n. 10, p. e438-44, out. 2015.
- FORD, N. et al. Outcomes of people living with HIV after hospital discharge: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet HIV**, v. 9, n. 3, p. e150–e159, 1 mar. 2022.
- FOURNIER, A. M. et al. Spontaneous secretion of immunoglobulins and anti-HIV-1 antibodies by in vivo activated B lymphocytes from HIV-1-infected subjects: monocyte and natural killer cell requirement for in vitro terminal differentiation into plasma cells. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 103, n. 1, p. 98–109, abr. 2002.
- FU, Y. et al. CD27–CD38+ B cells accumulated in early HIV infection exhibit transitional profile and promote HIV disease progression. **Cell Reports**, v. 36, n. 2, 13 jul. 2021.
- GAMA, W. M. et al. Immunologic biomarkers, morbidity and mortality among HIV patients hospitalised in a Tertiary Care Hospital in the Brazilian Amazon. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2021.
- GANDHI, R. T.; WALKER, B. D. Immunologic Control of HIV-1. **Annual Review of Medicine**, v. 53, n. 1, p. 149–172, fev. 2002.

GEIJTENBEEK, T. B. H.; VAN KOOYK, Y. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 276, p. 31–54, 2003.

GRINSZTEJN, B. et al. Impact of late diagnosis and treatment on life expectancy in people with HIV-1: UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Study. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e59768, jul. 2011.

HAAS, A.; ZIMMERMANN, K.; OXENIUS, A. Antigen-Dependent and -Independent Mechanisms of T and B Cell Hyperactivation during Chronic HIV-1 Infection. **Journal of Virology**, v. 85, n. 23, p. 12102–12113, dez. 2011.

HAGUIHARA, T. et al. Factors associated with mortality in HIV patients failing antiretroviral therapy, in Salvador, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 160–163, 1 maio 2019.

HAZENBERG, M. D. et al. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. **Nature Medicine**, v. 6, n. 9, p. 1036–1042, 2000.

HENS, J.; JENNES, W.; KESTENS, L. The role of NK cells in HIV-1 protection: Autologous, allogeneic or both? **AIDS Research and Therapy**, v. 13, n. 1, p. 15, 2016.

HOFFMANN, C. J. et al. Readmission and death following hospitalization among people with HIV in South Africa. **PLOS ONE**, v. 14, n. 7, p. e0218902, 1 jul. 2019.

HOPE, T. J. Viral RNA export. **Chemistry and Biology**, v. 4, n. 5, p. 335–344, maio 1997.

HUAMAN, M. A. et al. Monocyte activation in persons living with HIV and tuberculosis coinfection. **AIDS**, v. 35, n. 3, p. 447–452, 1 mar. 2021.

HUNZIKER, L. et al. Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. **Nature Immunology**, v. 4, n. 4, p. 343–349, 2003.

IANNELLO, A. et al. Antiviral NK cell responses in HIV infection: II. viral strategies for evasion and lessons for immunotherapy and vaccination. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 1, p. 27–49, 2008.

INGLE, S. M. et al. Impact of risk factors for specific causes of death in the first and subsequent years of antiretroviral therapy among HIV-infected patients. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 59, n. 2, p. 287–297, jul. 2014.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P. **Immunobiology - the immune system in health and disease**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

KACANI, L.; STOIBER, H.; DIERICH, M. P. Role of IL-15 in HIV-1-associated hypergammaglobulinaemia. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 108, n. 1, p. 14–18, abr. 1997.

- KASSUTTO, S.; ROSENBERG, E. S. Primary HIV type 1 infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 10, p. 1447–1453, 2004.
- KEHRL, J. H. et al. Lymphokine production by B cells from normal and HIV-infected individuals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 651, p. 220–227, maio 1992.
- KIM, C. H. et al. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 12, p. 1373–1381, jun. 2001.
- KIM, J. H. et al. All-cause mortality in hospitalized HIV-infected patients at an acute tertiary care hospital with a comprehensive outpatient HIV care program in New York City in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). **Infection**, v. 41, n. 2, p. 545–51, abr. 2013.
- KISHIMOTO, T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. Suppl 2, p. S2, jul. 2006.
- KOHLER, S. L. et al. Germinal Center T Follicular Helper Cells Are Highly Permissive to HIV-1 and Alter Their Phenotype during Virus Replication. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 196, n. 6, p. 2711–2722, mar. 2016.
- KOUP, R. A. et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. **Journal of Virology**, v. 68, n. 7, p. 4650–4655, 1994.
- KRIEG, A. M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 6, p. 471–484, jun. 2006.
- KUMAR, V. et al. Robbins & Cotran: Patologia, bases patológicas das doenças. **Doenças do sistema immune**, p. 157–183, 2010.
- LAHER, A. E. et al. Predictors of prolonged hospital stay in HIV-positive patients presenting to the emergency department. **PLOS ONE**, v. 16, n. 4, p. e0249706, 1 abr. 2021.
- LANE, B. R. et al. Interleukin-8 Stimulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication and Is a Potential New Target for Antiretroviral Therapy. **Journal of Virology**, v. 75, n. 17, p. 8195, set. 2001.
- LANE, H. C. et al. Abnormalities of B-Cell Activation and Immunoregulation in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 309, n. 8, p. 453–458, 1983.
- LANGFORD, S. E.; ANANWORANICH, J.; COOPER, D. A. Predictors of disease progression in HIV infection: A review. **AIDS Research and Therapy**, v. 4, p. 11, maio 2007.
- LEBIEN, T. W.; TEDDER, F. T. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, 2008.
- LETVIN, N. L.; WALKER, B. D. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 861–866, 1 jul. 2003.

LEWDEN, C. et al. Disease patterns and causes of death of hospitalized HIV-positive adults in West Africa: a multicountry survey in the antiretroviral treatment era. **Journal of the International AIDS Society**, v. 17, n. 1, p. 18797, jan. 2014.

LIANG, M. et al. Prevalence and Mortality due to COVID-19 in HIV Co-Infected Population: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 10, n. 3, p. 1267–1285, 1 set. 2021.

LOZANO DE LEÓN-NARANJO, F. Infección por el VIH (I). **Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 11, n. 49, p. 2893–2901, 2014.

MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. **HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention**. The Lancet. **Anais...Elsevier B.V.**, 2014.

MACCHIA, D. et al. In vitro infection with HIV enables human CD4+ T cell clones to induce noncognate contact-dependent polyclonal B cell activation. **Journal of Immunology**, v. 146, n. 10, 1991.

MACCHIA, D. et al. Membrane tumour necrosis factor- $\alpha$  is involved in the polyclonal B-cell activation induced by HIV-infected human T cells. **Nature**, v. 363, n. 6428, p. 464–466, 1993.

MAIA, J. K. DE O. et al. Fatores associados a óbitos de adultos hospitalizados vivendo com AIDS. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 45, n. 2, p. 66–81, 30 jun. 2021.

MAILLIARD, R. B. et al. Dendritic Cells Mediate NK Cell Help for Th1 and CTL Responses: Two-Signal Requirement for the Induction of NK Cell Helper Function. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 5, p. 2366–2373, 2003.

MALASPINA, A. et al. Compromised B cell responses to influenza vaccination in HIV-infected individuals. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 9, p. 1442–1450, 1 maio 2005.

MALASPINA, A. et al. Appearance of immature/transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: Correlation with increased IL-7. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2262, 2 fev. 2006.

MALASPINA, A. et al. Idiopathic CD4+ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2086, 3 mar. 2007.

MALASPINA, A. et al. CpG Oligonucleotides Enhance Proliferative and Effector Responses of B Cells in HIV-Infected Individuals. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 2, p. 1199–1206, 2008.

MANCHES, O. et al. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 10, p. 3431–3439, 2008.

MANCHES, O.; FRLETA, D.; BHARDWAJ, N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 3, p. 114–122, 2014.

MAPHULA, R. W.; LAHER, A. E.; RICHARDS, G. A. Patterns of presentation and survival of HIV-infected patients admitted to a tertiary-level intensive care unit. **HIV medicine**, v. 21, n. 5, p. 334–341, 1 maio 2020.

MARTIN-GAYO, E.; YU, X. G. Dendritic Cell Immune Responses in HIV-1 Controllers. **Current HIV/AIDS reports**, v. 14, n. 1, p. 1–7, fev. 2017.

MARY-KRAUSE, M. et al. Increased risk of myocardial infarction with duration of protease inhibitor therapy in HIV-infected men. **AIDS (London, England)**, v. 17, n. 17, p. 2479–2486, 21 nov. 2003.

MAY, M. et al. Impact of late diagnosis and treatment on life expectancy in people with HIV-1: UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 343, p. d6016, out. 2011.

MCMICHAEL, A. J. et al. The immune response during acute HIV-1 infection: Clues for vaccine development. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 1, p. 11–23, 2010.

MEGHA, K. B.; MOHANAN, P. V. Role of immunoglobulin and antibodies in disease management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 28–38, 1 fev. 2021.

MILLER, S. M. et al. Follicular Regulatory T Cells Are Highly Permissive to R5-Tropic HIV-1. **Journal of virology**, v. 91, n. 17, set. 2017.

MOCROFT, A. et al. Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. **Lancet (London, England)**, v. 362, n. 9377, p. 22–29, jul. 2003.

MOIR, S. et al. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 18, p. 10362–10367, ago. 2001.

MOIR, S. et al. Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 5, p. 587–599, set. 2004.

MOIR, S. et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 8, p. 1797–1805, ago. 2008.

MOIR, S.; FAUCI, A. S. Pathogenic mechanisms of B-lymphocyte dysfunction in HIV disease. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 122, n. 1, p. 11–12, jul. 2008.

MOIR, S.; FAUCI, A. S. B cells in HIV infection and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 235–245, 2009.

MOIR, S.; FAUCI, A. S. Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. **Immunological reviews**, v. 254, n. 1, p. 207–224, jul. 2013.

MOIR, S.; FAUCI, A. S. B-cell exhaustion in HIV infection: the role of immune activation. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 9, n. 5, 2014.



- MOIR, S.; FAUCI, A. S. B-cell responses to HIV infection. **Immunological reviews**, v. 275, n. 1, p. 33–48, jan. 2017.
- MOUQUET, H. Antibody B cell responses in HIV-1 infection. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 11, p. 549–561, 2014.
- MÜLLER, F. et al. Possible Role of Interleukin-10 (IL-10) and CD40 Ligand Expression in the Pathogenesis of Hypergammaglobulinemia in Human Immunodeficiency Virus Infection: Modulation of IL-10 and Ig Production After Intravenous Ig Infusion. **Blood**, v. 92, n. 10, p. 3721–3729, nov. 1998.
- NAGASE, H. et al. Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: Circulating memory B-cell reduction with plasmacytosis. **Clinical Immunology**, v. 100, n. 2, p. 250–259, ago. 2001.
- NAGATA, S. et al. Evolutionary Analysis of HIV-1 Pol Proteins Reveals Representative Residues for Viral Subtype Differentiation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- NAKAJIMA, K. et al. Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor-2/IFN-beta 2) production by HIV. **The Journal of Immunology**, v. 142, n. 2, p. 531–536, 15 jan. 1989.
- NANSSEU, J. R. et al. Incidence and risk factors for prediabetes and diabetes mellitus among HIV-infected adults on antiretroviral therapy. **Epidemiology**, v. 29, n. 3, p. 431–441, 1 maio 2018.
- NASCIMENTO, L.; IMPROTA-CARIA, A. C.; BRITES, C. Mortality in hospitalized HIV-infected patients in a referral center in Bahia, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 102716, 1 nov. 2022.
- NAVON, L. Hospitalization trends and comorbidities among people with hiv/aids compared with the overall hospitalized population, illinois, 2008-2014. **Public Health Reports**, v. 133, n. 4, p. 442–451, 1 jul. 2018.
- NERI, F. et al. CD4 downregulation by the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is dispensable for optimal output and functionality of viral particles in primary T cells. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 1, p. 141–150, 1 jan. 2011.
- NGUYEN, K. A.; PEER, N.; KENGNE, A. P. Associations of gamma-glutamyl transferase with cardio-metabolic diseases in people living with HIV infection in South Africa. **PLoS ONE**, v. 16, n. 2, 1 fev. 2021.
- NOTO, A.; PANTALEO, G. B-cell abnormalities, and impact on antibody response in HIV infection. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 12, n. 3, p. 203–208, maio 2017.
- NURIEVA, R. I. et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. **Immunity**, v. 29, n. 1, p. 138–149, jul. 2008.
- NURIEVA, R. I. et al. Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5943, p. 1001, 8 ago. 2009.

OSMOND, D. G.; NOSSAL, G. J. Differentiation of lymphocytes in mouse bone marrow. **Cellular immunology**, v. 13, n. 1, p. 117–31, 1 jul. 1974.

OWIREDU, W. K. B. A. et al. Prevalence of anaemia and immunological markers among Ghanaian HAART-naïve HIV-patients and those on HAART. **African Health Sciences**, v. 11, n. 1, p. 2, 2011.

PANTOPHLET, R.; BURTON, D. R. **GP120: Target for neutralizing HIV-1 antibodies. Annual Review of Immunology**, 2006.

PARANJAPE, R. S. Immunopathogenesis of HIV infection. **Indian Journal of Medical Research**, v. 121, n. 4, p. 240–255, abr. 2005.

PASCOM, A. R. P.; MEIRELES, M. V.; BENZAKEN, A. S. Sociodemographic determinants of attrition in the HIV continuum of care in Brazil, in 2016. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 1S, p. S69–S74, 2018.

PATEL, P.; RAIZES, E.; BROYLES, L. N. Human Immunodeficiency Virus Infection. Em: RYAN, E. T. et al. (Eds.). London: Elsevier, 2020. p. 232–266.

PENSIEROSO, S. et al. B-cell subset alterations and correlated factors in HIV-1 infection. **AIDS**, v. 27, n. 8, 2013.

PERREAU, M. et al. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. **The Journal of experimental medicine**, v. 210, n. 1, p. 143–156, jan. 2013.

PETTIT, S. C. et al. The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. **Journal of Virology**, v. 68, n. 12, p. 8017, dez. 1994.

PIEPER, K.; GRIMBACHER, B.; EIBEL, H. B-cell biology and development. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 4, p. 959–971, 1 abr. 2013.

RETH, M. Antigen Receptors on B Lymphocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 10, n. 1, p. 97–121, 28 abr. 1992.

RICHMAN, D. D. et al. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, 2003.

RODRIGUES, S. P. et al. Motivos de abandono aos antirretrovirais entre pacientes internados em um hospital de referência em doenças infecto contagiosas do Amazonas. **Revista Feridas**, v. 9, n. 49, p. 1754–1761, 2 ago. 2021.

ROSA, M. C. DA; SILVA, N. M. O. DA; HORA, V. P. DA. PATHOGENESIS OF HIV - CLASSIFICATION, CHARACTERISTICS OF THE VIRUS AND MOTHER TO CHILD TRANSMISSION. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 4, 2016.

ROSSI, E. et al. Structure, Function, and Interactions of the HIV-1 Capsid Protein. **Life** **2021**, Vol. 11, Page 100, v. 11, n. 2, p. 100, 29 jan. 2021.

- ROUSSET, F. et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 5, p. 1890–1893, 1 mar. 1992.
- RUPRECHT, C. R.; LANZAVECCHIA, A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 4, p. 810–816, 1 abr. 2006.
- SABATTÉ, J. et al. Human Seminal Plasma Abrogates the Capture and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to CD4 + T Cells Mediated by DC-SIGN. **Journal of Virology**, v. 81, n. 24, p. 13723–13734, 2007.
- SAHA, K. et al. Recent pattern of Co-infection amongst HIV seropositive individuals in tertiary care hospital, Kolkata. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 116, 2011.
- SAKURAGI, J. I. Morphogenesis of the infectious HIV-1 virion. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. DEC, p. 1–5, 2011.
- SAMUELSSON, A. et al. Progressive B cell apoptosis and expression of Fas ligand during human immunodeficiency virus type 1 infection. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 13, n. 12, p. 1031–1038, ago. 1997.
- SANTOS, A. C. F. et al. Perfil epidemiológico dos pacientes internados por HIV no Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 48, p. e3243, 7 maio 2020.
- SARAIVA, M.; VIEIRA, P.; O’GARRA, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **The Journal of experimental medicine**, v. 217, n. 1, 6 jan. 2020.
- SCHAERLI, P. et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 11, p. 1553–1562, dez. 2000.
- SCHMITZ, J. E. et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 283, n. 5403, p. 857–860, 5 fev. 1999.
- SEITZ, R. Human Immunodeficiency Virus (HIV). **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 203–222, 2016.
- SHIRAI, A. et al. Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n. 2, p. 561–566, fev. 1992.
- SIEG, S. F. et al. Differential Expression of Interleukin-2 and Gamma Interferon in Human Immunodeficiency Virus Disease. **Journal of Virology**, v. 75, n. 20, 2001.
- SIERRA, S.; KUPFER, B.; KAISER, R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. **Journal of Clinical Virology**, v. 34, n. 4, p. 233–244, dez. 2005.
- SMITH, P. R. et al. Benign monoclonal expansion of CD8+ lymphocytes in HIV infection. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, n. 3, p. 177–181, 1 mar. 2000.
- SODORA, D. L.; SILVESTRI, G. Immune activation and AIDS pathogenesis. **AIDS**, v. 22, n. 4, p. 439–446, 2008.

- STEVENSON, M. HIV-1 pathogenesis. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 853–860, jul. 2003.
- SÜKÖSD, Z. et al. Full-length RNA structure prediction of the HIV-1 genome reveals a conserved core domain. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 21, p. 10168–10179, dez. 2015.
- TAN, I. L. et al. HIV-associated opportunistic infections of the CNS. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 7, p. 605–617, 1 jul. 2012.
- TOMARAS, G. D. et al. Initial B-Cell Responses to Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1: Virion-Binding Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies Followed by Plasma Anti-gp41 Antibodies with Ineffective Control of Initial Viremia. **Journal of Virology**, v. 82, n. 24, p. 12449–12463, 15 dez. 2008.
- TURVILLE, S. G. et al. Bitter-sweet symphony: defining the role of dendritic cell gp120 receptors in HIV infection. **Nature immunology**, v. 22, n. 10, p. 229–239, out. 2001.
- TURVILLE, S. G. et al. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. **Nature immunology**, v. 3, n. 10, p. 975–983, out. 2002.
- UNAIDS. Estatísticas globais do HIV. **Joint United Nations Program on HIV/AIDS. UNAIDS, Brasil.**, p. 1–7, 2022.
- UWADIAE, F. I. T follicular helper cells. **Elsevier**, 2016. (Nota técnica).
- VOLLMERS, H. P.; BRÄNDLEIN, S. Natural IgM antibodies: The orphaned molecules in immune surveillance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 5–6, p. 755–765, 7 ago. 2006.
- WEI, X. et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. **Nature**, v. 422, n. 6929, 2003.
- WENDEL, B. S. et al. The receptor repertoire and functional profile of follicular T cells in HIV-infected lymph nodes. **Science immunology**, v. 3, n. 22, abr. 2018.
- WHO, W. H. O. Global Tuberculosis Teport 2022. **Annual Global TB Report of WHO**, v. 8, n. 1, p. 1–68, 2022.
- WILEN, C. B.; TILTON, J. C.; DOMS, R. W. HIV: Cell binding and entry. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, p. a006866, ago. 2012.
- WOOF, J. M.; MESTECKY, J. Mucosal immunoglobulins. **Immunological Reviews**, v. 206, n. 1, p. 64–82, 1 ago. 2005.
- WORKIE, K. L.; BIRHAN, T. Y.; ANGAW, D. A. Predictors of mortality rate among adult HIV-positive patients on antiretroviral therapy in Metema Hospital, Northwest Ethiopia: a retrospective follow-up study. **AIDS Research and Therapy**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 1 dez. 2021.
- XU, W. et al. HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. **Nature immunology**, v. 10, n. 9, p. 1008–1017, set. 2009.

XU, Y. et al. HIV-1 and SIV predominantly use CCR5 expressed on a precursor population to establish infection in T follicular helper cells. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. APR, p. 1–15, 2017.

YATES, J. L. et al. T Cell–Dependent IgM Memory B Cells Generated during Bacterial Infection Are Required for IgG Responses to Antigen Challenge. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 3, p. 1240–1249, 1 ago. 2013.

YU, D.; VINUESA, C. G. The elusive identity of T follicular helper cells. **Trends in immunology**, v. 31, n. 10, p. 377–383, out. 2010.

YUAN, R. et al. Characteristics of refined lymphocyte subsets changes in people living with HIV/AIDS during antiretroviral therapy period: An observation from Wuhan, China. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1089379, 9 fev. 2023.

YUSEFF, M.-I. et al. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 7, p. 475–486, 2013.

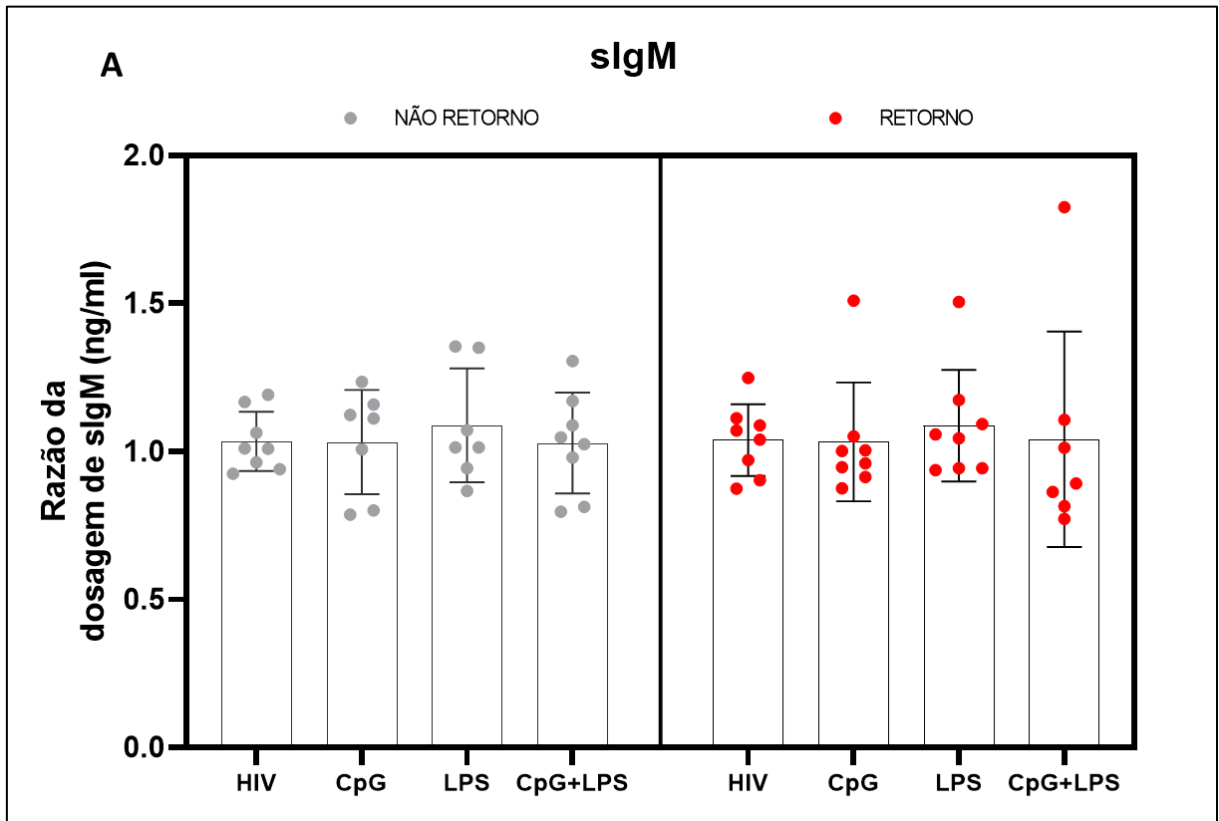
ZANUSSI, S. et al. CD8+ lymphocyte phenotype and cytokine production in long-term non-progressor and in progressor patients with HIV-1 infection. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 105, n. 2, p. 220–224, 1 jul. 1996.

ZHANG, M. et al. Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 11, p. 3886–3891, 16 mar. 2004.

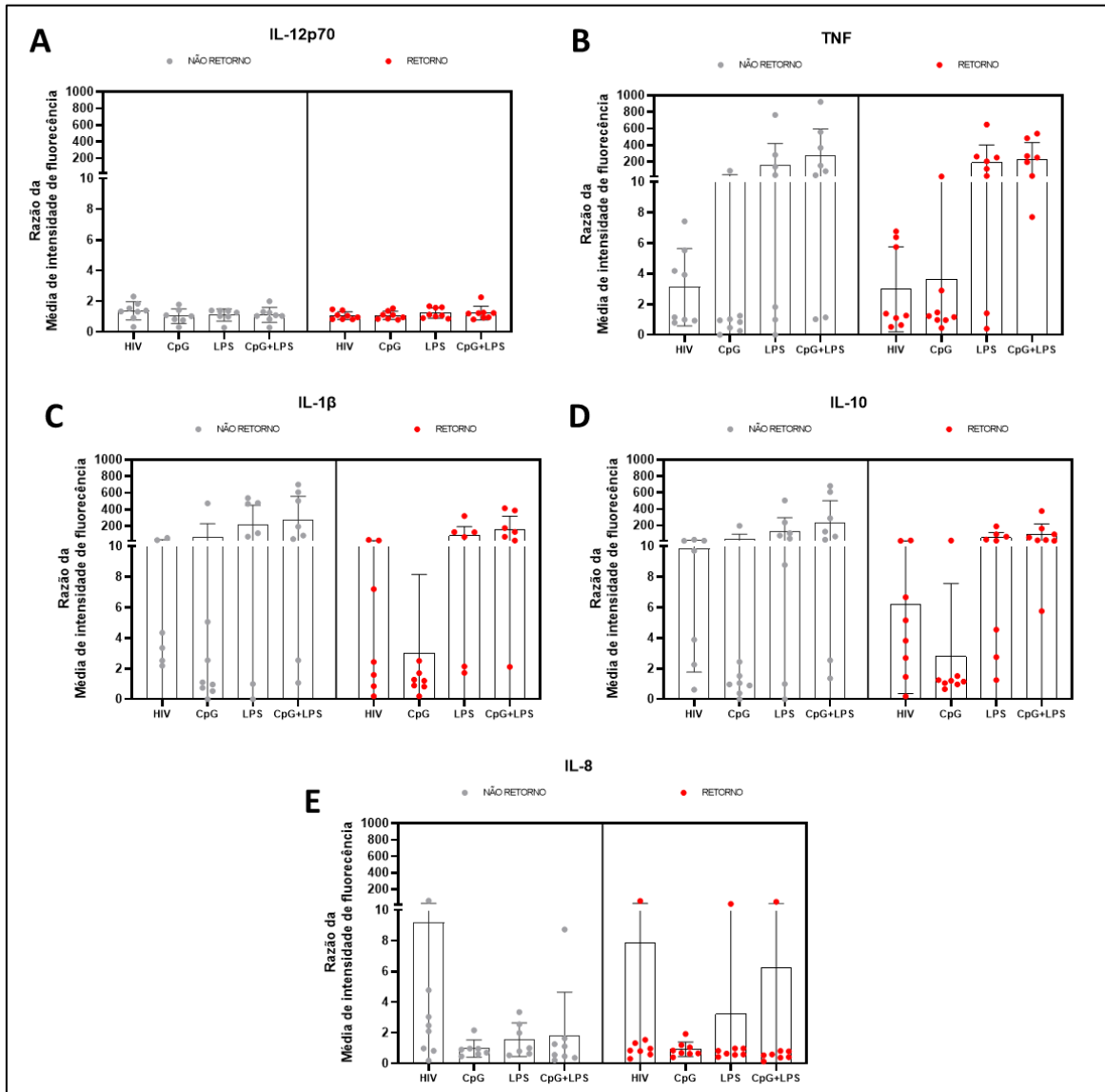
ZULFIQAR, H. F. et al. HIV Diagnosis and Treatment through Advanced Technologies. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. March, p. 1–16, 2017.

## 10. ANEXOS


**Anexo 1** – Dosagem de IgM sérica de sobrenadante de cultura, frente a diferentes tipos de estímulos em PVHA entre grupos de retorno (vermelho) e não retorno intersetorização (cinza) após alta.



**Anexo 2** - Análise da dosagem de citocinas séricas do sobrenadante de cultura de PBMC de PVHA entre grupos de retorno (vermelho) e não retorno internação (cinza) após alta.



## Anexo 3. Parecer CEP

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL "DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO"</b></p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>								
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>								
<b>DADOS DA EMENDA</b>								
<b>Título da Pesquisa:</b> PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS COMO PREDITORES DE ÓBITO EM PACIENTES HIV/AIDS INTERNADOS								
<b>Pesquisador:</b> Monique Freire dos Reis								
<b>Área Temática:</b>								
<b>Versão:</b> 4								
<b>CAAE:</b> 89665118.6.0000.0005								
<b>Instituição Proponente:</b> Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE								
<b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio								
<b>DADOS DO PARECER</b>								
<b>Número do Parecer:</b> 3.345.985								
<b>Apresentação do Projeto:</b> conforme parecer #2.772.107, aprovado em 16 de julho de 2018.								
<b>Objetivo da Pesquisa:</b> conforme parecer #3.083.615, aprovado em 14 de dezembro de 2018 (emenda 1).								
<b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b> conforme parecer #3.083.615, aprovado em 14 de dezembro de 2018 (emenda 1).								
<b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b> trata-se da apresentação de nova emenda ao protocolo original, desta vez para a inclusão de novos membros à equipe original, a saber:								
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Taynná Vernalha Rocha Almeida CPF: 04421197980 (UFAM – Pós-doutoranda)</li> <li>2. Bárbara José Antunes Baptista CPF: 12499795794 (FIOCRUZ - Pós-doutoranda)</li> <li>3. Wilson Zacarias Aires Neto CPF: 88877914220 (UFAM - Mestrando)</li> <li>4. Wellington Mota Gama CPF: 01629683299 (UFAM - Mestrando)</li> <li>5. Rosilynne Ericka Silva Costa CPF: 00389097233 (PAIC - FIOCRUZ)</li> <li>6. Jaqueline de Sousa Veras Barbosa CPF: 34375716215 (UFAM - Mestrando)</li> <li>7. Nadia Ketssa Lima Lucas CPF: 52078779253 (UFAM - Mestrando)</li> <li>8. Rogerio Rudson Passos do Nascimento CPF: 00044447280 (UFAM - Mestrando)</li> </ol>								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;"><b>Endereço:</b> Av. Pedro Teixeira, 25</td> <td style="border: none;"><b>CEP:</b> 69.040-000</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"><b>Bairro:</b> D. Pedro I</td> <td style="border: none;"><b>Município:</b> MANAUS</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"><b>UF:</b> AM</td> <td style="border: none;"><b>E-mail:</b> cep@fmt.am.gov.br</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"><b>Telefone:</b> (92)2127-3572</td> <td style="border: none;"><b>Fax:</b> (92)2127-3572</td> </tr> </table>	<b>Endereço:</b> Av. Pedro Teixeira, 25	<b>CEP:</b> 69.040-000	<b>Bairro:</b> D. Pedro I	<b>Município:</b> MANAUS	<b>UF:</b> AM	<b>E-mail:</b> cep@fmt.am.gov.br	<b>Telefone:</b> (92)2127-3572	<b>Fax:</b> (92)2127-3572
<b>Endereço:</b> Av. Pedro Teixeira, 25	<b>CEP:</b> 69.040-000							
<b>Bairro:</b> D. Pedro I	<b>Município:</b> MANAUS							
<b>UF:</b> AM	<b>E-mail:</b> cep@fmt.am.gov.br							
<b>Telefone:</b> (92)2127-3572	<b>Fax:</b> (92)2127-3572							
<small>Página 01 de 03</small>								



FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 3.345.985

9. Denilson da Silva Veras CPF: 00292701209 (UFAM - Mestrando)
10. Maria Gracilene Gomes Diniz CPF: 33626537315 (UFAM - Mestrando)
11. Suzy Cristina França Rodrigues CPF: 00912210214 (UFAM - Mestrando)
12. Thiago de Oliveira Pires CPF: 78975573249 (UFAM - Mestrando)
13. João Viriato Mazolo CPF: 097972511 (UFAM - Mestrado)

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

de acordo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

diante do exposto, considero a presente emenda APROVADA, salvo melhor juízo.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A presente EMENDA (E2) está APROVADA e os interessados ficam informados de dar continuidade em apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1341457_E2.pdf	07/05/2019 12:22:33		Aceito
Outros	emenda.pdf	07/05/2019 12:21:08	Taynná Vernalha Rocha Almeida	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2.docx	11/12/2018 19:33:06	Monique Freire dos Reis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_tese_CEP.docx	11/12/2018 19:32:51	Monique Freire dos Reis	Aceito
Outros	carta.pdf	11/12/2018 19:30:23	Monique Freire dos Reis	Aceito
Outros	E_Anexo3_TDCLE_subestudo_2.pdf	11/12/2018 19:13:06	Monique Freire dos Reis	Aceito
Outros	E_Anexo_2b_Emenda_1_clean.docx	11/12/2018 19:12:51	Monique Freire dos Reis	Aceito
Outros	E_Anexo_2a_Emenda_1_com_alteracoes_marcadas.docx	11/12/2018 19:12:29	Monique Freire dos Reis	Aceito
Outros	E_Anexo_1_TCLE_subestudo1_clean.	11/12/2018	Monique Freire dos Reis	Aceito

**Endereço:** Av. Pedro Teixeira, 25

**Bairro:** D. Pedro I

**CEP:** 69.040-000

**UF:** AM

**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)2127-3572

**Fax:** (92)2127-3572

**E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 3.345.985

Outros	docx	19:12:09	Reis	Aceito
Outros	E_anexotclesubestudo.docx	11/12/2018 19:09:45	Monique Freire dos Reis	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	15/05/2018 23:04:41	Monique Freire dos Reis	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 24 de Maio de 2019

---

**Assinado por:  
Marilaine Martins  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Pedro Teixeira, 25

**Bairro:** D. Pedro I

**CEP:** 69.040-000

**UF:** AM

**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)2127-3572

**Fax:** (92)2127-3572

**E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

#### Anexo 4. Termo de Compromisso Livre e Esclarecido

Rubricas:

Responsável pelo sujeito de pesquisa \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

### **“Parâmetros clínicos e laboratoriais como preditores de desfecho clínico em pacientes HIV/Aids internados”**

**Pesquisadora: Monique Freire Santana – Médica Patologista**

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

O paciente acima referido foi acompanhado e internado em uma enfermaria ou Unidade de Terapia Intensiva (UTI) da Fundação de Medicina Tropical - Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) por ter sofrido complicações da infecção pelo vírus HIV. Você está sendo convidado a autorizar sua participação (ou a participação do paciente em sua responsabilidade) em um estudo chamado **“Parâmetros clínicos e laboratoriais como preditores de desfecho clínico em pacientes HIV/Aids internados”**. Nesta pesquisa estamos estudando quais são as complicações que ocorrem em alguns pacientes internados. Vamos estabelecer uma forma de identificar precocemente os pacientes com risco de piora clínica partir do levantamento de dados clínicos, laboratoriais, exames radiológicos e dados dos prontuários dos pacientes estudados.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações:

#### **PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

Se você autorizar a participação neste estudo, neste primeiro dia de internação será coletado sangue para exames. Será coletada, através de punções venosas (retiradas de sangue da veia, geralmente do braço), 4 ml de sangue, o que corresponde a aproximadamente 1 colher de chá. Uma parte será usada para ver a presença de substâncias que fazem a defesa contra infecções no corpo, que serão estudadas nesta pesquisa. Estas coletas serão realizadas durante a internação e as outras informações serão coletadas a partir da sua ficha de internação. Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD.

#### **RISCOS**

Caso você recuse a participação no estudo não terá qualquer mudança no tratamento. O tratamento e o acompanhamento irão ocorrer independente da autorização do estudo. A coleta de sangue será realizada apenas durante a internação. Estas coletas de sangue que são partes da rotina de internação podem causar dor no local da punção e/ou manchas roxas que desaparecem com o tempo.

#### **BENEFÍCIOS**

A participação contribuirá para um melhor entendimento das defesas de pessoas vivendo com HIV/Aids, e quais são as causas que levam esses pacientes a morte. Também auxiliará a equipe de assistência aos outros pacientes, pois a partir dos dados gerados com este trabalho, eles poderão identificar de forma mais precoce quem são os pacientes com maior risco de complicações.

#### **ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS**

O paciente será acompanhado e receberá assistência do quadro de funcionários composto por profissionais que são especialistas da FMT-HVD e terá



Rubricas:

Responsável pelo sujeito de pesquisa \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

toda a assistência disponível no hospital para seu cuidado. Durante os dias de internação e durante a participação neste estudo, sempre terá como referência os responsáveis pela pesquisa, listados neste Termo de Consentimento. O participante tem a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será assistido, tratado e acompanhado na Fundação de Medicina Tropical, sem qualquer gasto, durante todo o tempo que for necessário. Da mesma forma, o participante tem direito à indenização garantida caso ocorra algum dano permanente devido à participação nesse estudo ou a ressarcimento de qualquer gasto que venha a ter pela sua participação.

#### CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde da qual o paciente recebe cuidados, os registros médicos referentes ao paciente serão consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos, porém o nome não será revelado em nenhum momento ainda que as informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão para divulgação dos resultados da pesquisa.

#### CUSTOS

Não haverá qualquer custo para o paciente ou qualquer forma de pagamento/remuneração ao mesmo por sua participação neste estudo.

#### EM CASO DE PARTICIPAÇÃO

A participação neste estudo é totalmente voluntária. Você pode se recusar a autorizar essa participação. Se autorizar, mas em qualquer momento desistir, pode interromper a participação a qualquer momento sem penalidade ou perda de benefício. Caso decidir que quer interromper a participação no estudo, a equipe deverá ser informada e as coletas de material referentes à pesquisa serão interrompidas imediatamente. Além disso, o médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

#### ESCLARECIMENTOS

Você ou seus familiares podem fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, entre em contato ligando para a médica patologista Monique Freire Santana no número de telefone (92) 99214-2856. Se você tiver perguntas com relação aos direitos do seu paciente como participante deste estudo, também pode contar com outra forma de esclarecimento, com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical, pelo telefone (92) 2127-3572 ou e-mail: cep@fmt.am.gov.br.

Rubricas:

Responsável pelo sujeito de pesquisa \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

- Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo.
- Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por meio deste documento, dou livremente o consentimento para participar do referido neste estudo.
- Entendo que o paciente será submetido a exames laboratoriais necessários para seu tratamento e não receberei de forma alguma qualquer compensação financeira por sua participação neste estudo.
- Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do Paciente ou seu responsável)

\_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_  
dia    mês    ano



(Impressão datiloscópica do Paciente ou seu responsável)


\_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_  
dia    mês    ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao responsável pelo paciente indicado acima.

\_\_\_\_\_  
Monique Freire Médica Patologista (CRM-AM 8129)

\_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_  
dia    mês    ano

## Anexo 5. Processamento de sangue para isolamento de PBMC

	<b>INSTITUTO DE PESQUISA CLINICA CARLOS BORBOREMA</b>		
	<b>Procedimento Operacional Padrão</b>		<b>Código: XXXXX-XXXX</b>
	<b>Processamento de sangue para isolamento de PBMC</b>		<b>Folhas: 09</b> <b>13/03/2021</b>

<b>Autor (es):</b>	Carlos Eduardo Morais (FMT-HVD)
	Flavia Alencar Fontenelle (FMT-HVD)

<b>Histórico de revisões</b>	<b>Versão nº1</b>	<b>Data da revisão</b>	<b>Descrição</b>

<b>Cópias distribuídas para:</b>	<b>Local</b>	<b>nº de cópias</b>

*Eu afirmo que li, entendi e concordo com o presente POP.*


<b>Nome</b>	<b>Assinatura</b>	<b>Data</b>
Gisely Cardoso de Melo		
Larissa Wanderley Brasil		
Cecilia Carvalho		

### 1. CONDIÇÕES GERAIS

As amostras de sangue coletadas nas visitas D0, D28, D90 ..... devem seguir este procedimento para isolamento de PBMC. A coleta, transporte e armazenamento temporário destas amostras antes deste procedimento devem seguir as normas estabelecidas no POP XXX – Transporte, processamento e armazenamento de amostras biológicas.

### 2. OBJETIVO



	<b>INSTITUTO DE PESQUISA CLINICA CARLOS BORBOREMA</b>		
	<b>Procedimento Operacional Padrão</b>		<b>Código: XXXXX-XXXX</b>
	<b>Processamento de sangue para isolamento de PBMC</b>		<b>Folhas: 09</b> <b>13/03/2021</b>

- f) Dimetilsulfóxido (DMSO), cell-culture grade
- g) Pipetas sorológicas de 10 mL
- h) Pipetador automático para pipetas sorológicas
- i) Pipetas de 20 µL, 200 µL, 1000 µL
- j) Ponteiras estéreis, livres de DNase e RNase, com filtro (20µL, 200µL, 1000µL)
- k) NALGENE® “**Mr. Frosty**”, Biocision® “CoolCell”, or Stratagene StrataCooler® para o congelamento gradual de PBMC
- l) Álcool isopropílico
- m) Microscópio
- n) Contador manual (e.g. Hemacytometer) e/ou Câmara de Neubauer
- o) Tubos cônicos de 15 mL, estéril, polipropileno.
- p) Tubos cônicos de 50 ml, estéril, polipropileno.
- q) Microtubos de 0,5 ou 1,5 mL
- r) Criotubos de polipropileno (2mL), estéril, de tampa de rosca interna, graduados, “self-standing”, da marca “**Corning**”, formulados para suportar a imersão em Nitrogênio líquido ou outra marca que atenda as especificações.
- s) Etiquetas de identificação
- t) Caixas 9x9 ou 5x5 próprias para o armazenamento nos tanques de nitrogênio.
- u) Cabine de segurança Classe II
- v) Centrífuga com capacidade de 300 a 1800 x g, com rotor de ângulo móvel (Swing-Bucket).
- w) Refrigerador (2 a 8°C)
- x) Freezer -20°C
- y) Freezer -80°C (±2)
- z) Gelo picado (-20°C)
- aa) Tanque de nitrogênio líquido


### PROCEDIMENTOS

Todos os procedimentos devem ser realizados em ambiente estéril, sendo utilizados material descartável estéril, soluções estéreis e ponteiras com barreira estéreis.

#### 8.1. Preparação de materiais:

Para agilizar o fluxo de trabalho os seguintes materiais podem ser preparados previamente à chegada da amostra ao laboratório (quantidades para cada paciente):

- Identificar 6 criotubos para armazenamento do PBMC
- 3 tubos cônicos de 15 mL contendo 4 mL de solução Histopaque-1077
- 1 tubo cônico de 50 mL vazio (para transferência do sangue total)

	<b>INSTITUTO DE PESQUISA CLINICA CARLOS BORBOREMA</b>		
	<b>Procedimento Operacional Padrão</b>		<b>Código: XXXXX-XXXX</b>
	<b>Processamento de sangue para isolamento de PBMC</b>		<b>Folhas: 09</b> 13/03/2021

- 4 tubos cônicos de 15 mL vazios
- 1 tubo de 0,5 ou 1,5 mL contendo 90 µL de Azul de Trypan

### 8.2. Amostra de sangue


Devem ser recebidos tubos de sangue total contendo XXXXX com volume total de aproximadamente 20 mL. O processamento do sangue total deve ocorrer imediatamente após sua chegada no laboratório.

Documentar qualquer característica inesperada observada nos tubos contendo amostra de sangue como: coágulos, hemólise, volume insuficiente ou excessivo, ausência de identificação (descartar tubo não identificado), tubos com lotes diferentes, tubos com data de validade vencida, etc.

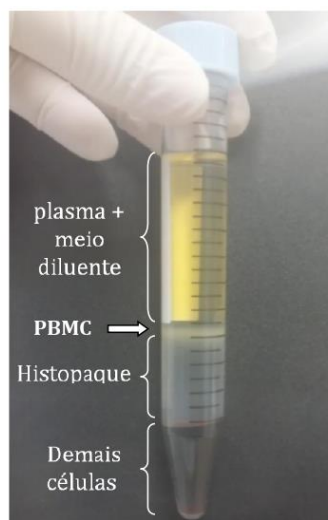
### 8.3. Isolamento de PBMC

- a. Com auxílio de uma pipeta, transferir o sangue total contido nos tubos para o mesmo tubo cônico de 50 mL. Anotar o volume total de sangue coletado.
- b. Acrescentar 50% do volume de sangue total coletado de meio PBS estéril para diluir o sangue (proporção 2:1). Homogeneizar cuidadosamente, evitando formação de bolhas.
- c. Para cada paciente, preparar 3 tubos cônicos de 15 mL contendo 4 mL de solução gradiente de densidade (Ficoll ou histopaque).
- d. Com auxílio de uma pipeta sorológica de 10 mL, adicionar 1/3 do volume de sangue diluído em meio PBS (aproximadamente 10 mL) sobre cada tubo contendo a solução XXXXX. Para tal, o sangue deve ser adicionado em velocidade lenta, na parede do tubo, para a formação do gradiente. Ao final da realização do gradiente deveremos visualizar duas fases bem definidas, sendo a inferior contendo XXXXX e a superior contendo sangue diluído.
- e. Feche bem o tubo e centrifugue a 500 x g (1650RPM), durante 30 minutos a 20°C, **em baixa aceleração e sem freio (a temperatura de centrifugação, assim como aceleração e freio devem ser respeitadas, caso contrário o procedimento pode não funcionar)**.
- f. Ao finalizar a centrifugação, observe a formação da nuvem de células (Fig. 1) e transfira os tubos cuidadosamente para o fluxo laminar, evitando perturbar o gradiente.



	<b>INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA</b>	
	<b>Procedimento Operacional Padrão</b>	<b>Código: XXXXX-XXXX</b>
	<b>Processamento de sangue para isolamento de PBMC</b>	<b>Folhas: 09</b> <b>13/03/2021</b>

**Figura 1.** Imagem do tubo contendo o gradiente de densidade com as diferentes fases obtidas após centrifugação (plasma/meio diluente, PBMC, XXXXXXX e demais células como hemácias e polimorfonucleares). A seta indica a nuvem de PBMC que deve ser coletado com cuidado para não recolher células presentes na parte inferior do tubo.




g. Com auxílio de uma pipeta sorológica, remova o excesso de plasma + meio diluente da camada superior do tubo.

h. Com o uso de uma pipeta sorológica ou de transferência, colete o anel de células PBMC e transfira para um novo tubo de 15 mL. Nesta etapa, as células coletadas devem ser transferidas para novos tubos cônicos.

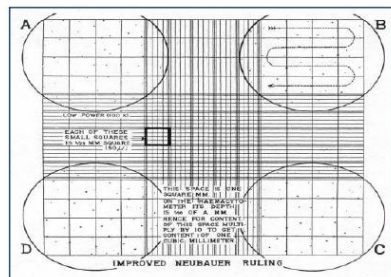
i. Complete os tubos cônicos contendo a suspensão de células para 14 mL utilizando meio PBS estéril, homogeneizando cuidadosamente

- com uma pipeta.
- j. Centrifugue por 10 minutos a 500 x g com o uso do freio a 20 °C.
  - k. Em seguida, inverta os tubos cônicos desprezando o sobrenadante com cuidado para não ressuspender o pellet de células no fundo do tubo.
  - l. Feche os tubos e desfaça o pellet com leves batidas com o dedo no fundo do tubo. Utilizando um pequeno volume (aproximadamente 2-3 ml) ressuspensa e transfira este pequeno volume para um único novo tubo cônico.
  - m. Repita a etapa de lavagem completando o volume para 14 ml de meio PBS estéril (10 minutos a 500 x g com o uso do freio, a 20°C).
  - n. Em seguida, inverta o tubo cônico desprezando o sobrenadante com cuidado para não ressuspender o pellet de células no fundo do tubo, e com o auxílio de uma pipeta automática aspire o restante de sobrenadante que fica na borda do tubo mantendo-o invertido.
  - o. Feche o tubo e desfaça o pellet com leves batidas com o dedo no fundo do tubo.
  - p. Ressuspensa as células em 5 mL de meio PBS e homogenize bem.
  - q. Mantenha a suspensão celular refrigerada em banho de gelo durante todo o período da contagem até o momento do congelamento.

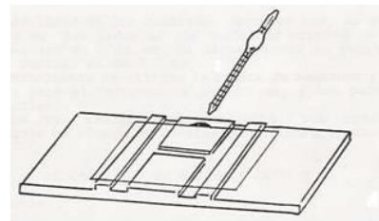
	<b>INSTITUTO DE PESQUISA CLINICA CARLOS BORBOREMA</b>		
	<b>Procedimento Operacional Padrão</b>		<b>Código: XXXXX-XXXX</b>
	<b>Processamento de sangue para isolamento de PBMC</b>		<b>Folhas: 09</b> <b>13/03/2021</b>

#### 8.4. Contagem de células

- a. Montar uma câmara de Neubauer com cuidado para que a mesma esteja totalmente seca no local onde será inserida a amostra
- b. Para a contagem e avaliação da viabilidade, dilua 10  $\mu\text{L}$  da suspensão celular (**bem homogênea**) em 90  $\mu\text{L}$  de azul tripan 0,4%. **Obs.** Garanta que a amostra esteja bem homogênea antes de retirar a alíquota para diluir em azul de tripan.



- c. Homogeneizar bem a diluição e carregar o volume necessário para preencher o espaço entre a câmara e a lamínula, aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  (Fig. 2).




**Figura 2:** Câmara de Neubauer

**Figura 3:** Esquema para contagem de células na câmara de Neubauer

- d. Aguarde 30 segundos para que as células sedimentem e estejam no mesmo plano. Faça a contagem das células viáveis (não coradas) e as não viáveis (coradas em azul) utilizando microscópio de luz (objetiva de 40x). A contagem deverá ser realizada nos 4 quadrantes (A, B, C e D) conforme a Figura 3.

**Cuidado** para não incluir hemácias na contagem do PBMC. Em algumas ocasiões, algumas hemácias podem ser observadas, porém menores que as células mononucleares e podem ser distinguidas pelo tamanho.

- e. Após a contagem realize os seguintes cálculos:

	<b>INSTITUTO DE PESQUISA CLINICA CARLOS BORBOREMA</b>		
	<b>Procedimento Operacional Padrão</b>		<b>Código: XXXXX-XXXX</b>
	<b>Processamento de sangue para isolamento de PBMC</b>		<b>Folhas: 09</b> <b>13/03/2021</b>

1) **Concentração de células viáveis/mL =**

*Número Total de células viáveis (A + B + C + D)*

$$\frac{\text{Número Total de células viáveis (A + B + C + D)}}{4 \text{ (número de quadrantes contados)}} \times 10^4 \text{ (Fator de correção)} \times 10 \text{ (Fator de Diluição)}$$

2) **Número total de células viáveis =** Concentração de células viáveis/mL x 10  
(volume da suspensão de células)

3) **% viabilidade celular =**  $\frac{\text{Número total de células viáveis} \times 100}{\text{Número total de células viáveis} + \text{Número total de células mortas}}$


4) **Volume de solução de congelamento (mL) =**  $\frac{\text{número total de células viáveis}}{5 \times 10^6}$

O número total de células viáveis esperado após o processamento de 20 mL de sangue total é de aproximadamente  $20 \times 10^6$  de PBMC e a viabilidade celular deve estar acima de 90%. Rendimentos muito abaixo ou muito acima de  $20 \times 10^6$  de células ou viabilidade celular abaixo de 90% podem sugerir problemas com o processamento da amostra. Neste caso, recomenda-se uma nova diluição (pode-se usar outro fator de diluição) seguida de nova contagem.

Para volume de suspensão de congelamento, utilizar volume mais próximo de 1ml (arredondar volume para baixo). Registrar quantidade de células/ml em cada criotubo.

#### 8.5. Congelamento de PBMC

- a. Após a contagem de células, preparar volume necessário de solução de congelamento, que consiste de 90% SBF e 10% DMSO. Preparar 1 mL a mais do volume necessário calculado no passo 8.5.e. Homogeneizar e manter a solução estéril em banho de gelo por pelo menos 10 minutos ou até a utilização.
- b. Centrifugue a suspensão celular por 10 minutos a 500 x g, a 4° C, com o uso de freio.
- c. Durante a centrifugação, prepare os criotubos com as etiquetas apropriadas e os mantenha-os sem as tampas dentro do fluxo laminar para receber as células.
- d. Após centrifugação inverta o tubo cônico desprezando o sobrenadante com cuidado para não ressuspender as células no fundo do tubo, e com o auxílio de uma pipeta automática aspirar o restante do sobrenadante que fica na borda do tubo mantendo-o invertido.
- e. Ressuspenda as células com solução de meio de congelamento gelado utilizando o volume definido pelo cálculo acima (concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL). Certificar que

	<b>INSTITUTO DE PESQUISA CLINICA CARLOS BORBOREMA</b>		
	<b>Procedimento Operacional Padrão</b>		<b>Código: XXXXX-XXXX</b>
	<b>Processamento de sangue para isolamento de PBMC</b>		<b>Folhas: 09</b> <i>13/03/2021</i>

a amostra estará bem homogênea para garantir a quantidade exata de células por criotubo.

- f. Distribuía rapidamente 1 mL da suspensão celular em cada criotubo ( $5 \times 10^6$  células/criotubo).
- g. Feche os criotubos e transfira imediatamente para o Mr. Frosty previamente acondicionados a 4° C. Feche o container e o coloque no freezer -80° C até o dia seguinte.

Após a adição da solução de congelamento, deve-se trabalhar rapidamente até a transferência das células para o freezer -80° C, pois a solução de DMSO é tóxica e pode afetar a viabilidade celular.

- h. No dia seguinte, transfira os criotubos do Mr. Frosty para uma caixa 10x10 ou 5x5 próprias para o armazenamento nos tanques de nitrogênio, previamente acondicionada a -80° C ou no nitrogênio líquido.

O Mr. Frosty deverá ser mantido a 4° C quando não estiver sendo utilizado. Observar se o nível de isopropanol encontra-se correto e que o mesmo tenha sido substituído a cada 5 ciclos de congelamento a -80° C.

- i. Armazenar a caixa contendo amostras no tanque de nitrogênio líquido, mantendo anotação da localização de cada tubo no tanque.

## Anexo 6. Protocolo de Cultivo Celular e Imunofenotipagem



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia



DCDIA  
Diagnóstico e Controle de  
Doenças Infecciosas na  
Amazônia

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS & MARIA DEANE – FIOCRUZ AMAZÔNIA**  
**LABORATÓRIO DIAGNÓSTICO E CONTROLE DE DOENÇAS INFECCIOSAS NA AMAZÔNIA - DCDIA**

### REAGENTES PARA CITOMETRIA

REAGENTES	APLICAÇÃO
EDTA	
PMA	
BREFELDINA	
IONOMICINA	
RPMI	
SFB	
PBS-1X	
Azul de Tripán	

### SOLUÇÕES PARA CITOMETRIA

Solução de Lise 10x (Billig) – Solução Estoque  
Solução de Lise 1x (Billig) – Solução de Uso  
PBS Wash (PBS-W)

### Protocolo de preparação do EDTA 20mM

- Calcular a concentração de EDTA, conforme a fórmula:

M = molaridade

m1 = massa

MM = massa molar ou peso molar

V = volume

$$M = \frac{m1}{MM \cdot V}$$

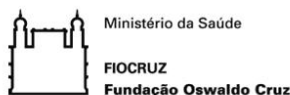
- Adicionar no Becker a quantidade em grama de EDTA e adicionar água destilada conforme o volume desejado
- Homogeneizar usando o agitador magnético
- Ajusta o pH para 7,2 ou 7,4



REDE DE  
PLATAFORMAS  
TECNOLÓGICAS  
FIOCRUZ

Plataforma de Citometria de Fluxo - RPT08J  
Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000  
IPCCB - Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema - Térreo





### Preparação do meio de cultivo de células PBMC

#### MEIO COMPLETO:

- Preparar RPMI 1640 (GIBICO, Catalog number: 11875093) estéril.
- Adicionar **SBF** para concentração final de 10%

**Ex:** 50ml de meio completo = 45 ml de RPMI + 5ml SFB

### Protocolo de cultura de curta duração – PBMC

#### Procedimento





**Preparo da cultura** – Deverá ser feita em placa de 96 poços fundo U.

Volume final em cada poço: 200  $\mu$ L

#### CONTAGEM DE CÉLULAS

Dependendo da contagem a quantidade de células em cada POÇO será diferente.

Ex: Se a contagem deu  $2,3 \times 10^6$ , faz-se o cálculo  $C1.V1 \times C2.V2$

 ___ $\mu$ L PBMC + ___ $\mu$ L Meio Completo	 ___ $\mu$ L PBMC + ___ $\mu$ L Meio Completo + 40 $\mu$ l PMA ( ng/ml)	 ___ $\mu$ L PBMC + ___ $\mu$ L Meio Completo + 3 $\mu$ l P. Pep ( g/ml)	 ___ $\mu$ L PBMC + ___ $\mu$ L Meio Completo + DNA CpG ( g/ml)
---	---	--	---

#### Imunofenotipagem:

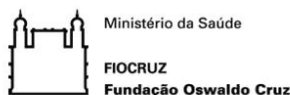
- Incubar por 24 horas na estufa, 37°C + Co2
- Adicionar 0,4 $\mu$ l de Brefeldina e 2 $\mu$ l de Ionomicina 4 horas antes do término de 24h de incubação;

**OBS: Os passos acima devem ser realizados de acordo com a cinética do seu experimento e se haverá necessidade da adição de Brefeldina e Ionomicina.**

- Após incubar por 24h, retirar a placa e adicionar em cada poço 22 $\mu$ l de EDTA (volume de 200 $\mu$ l) [20 mM] solução estoque, em todos os tubos e incubar por 15 minutos;
- Em seguida, homogeneizar cada poço e passar as amostras para os tubos de citometria previamente identificados, fazer a lavagem dos poços com PBS-W, certificando-se que não ficou nenhum resquício de amostra nos poços da placa, e adicionar nos tubos de citometria 2mL de PBS-W, e centrifugar todos os tubos a 1500 rpm, 10 min, 20°C, aceleração 9 e freio 9;



Plataforma de Citometria de Fluxo - RPT08J  
 Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000  
 IPCCB - Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema - Térreo



- Retirar o sobrenadante e ressuspender a 50µl com PBS-W de acordo com a quantidade de tubos. (Ex.: CN = 100µl, pois serão dois tubos de citometria CN com marcação e CN sem marcação. Ou seja, muda de acordo com a quantidade de tubos, em cada tubo será necessário 50ul de amostra)

#### IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS DE PBMC

Materiais
Aparelho de Vórtex
Tubos de citometria
Pipetas e Ponteiros de 1000ul, 200ul e 10ul (µl – microlitro)
Rack para tubos
PBS-W - Tampão fosfato salina - lavagem
PBS-P - Tampão fosfato salina saponina - permeabilizante
Tampão de Lise 1x
Centrífuga
Papel toalha
Luvas
Óculos de proteção
Jaleco
Lixo para descarte de ponteiros
Pipetas Pauster
Anticorpos

#### PROTOCOLO DE CITOMETRIA

- Homogeneizar no vórtex os anticorpos de citometria antes de colocar no tubo
- Distribuir os **anticorpos de superfície nos tubos de citometria** seguindo a tabela abaixo  
**Obs:** Os anticorpos utilizados seguirão o estudo de cada projeto, identificando na tabela abaixo os anticorpos de superfície e intracelular.

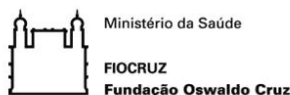
CONDIÇÃO	FITC	PE	PECy7	APC
LINFÓCITO B TUBO 1	CD19 (2 µl)	CD70 (3 µl)	IGM (1 µl)	CD27 (21µl)

- Distribuir nos tubos a amostra (volume de 50ul), homogeneizar no vórtex cada tubo e em seguida **incubar em temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos no escuro**.
- Após a incubação, adicionar 1ml de tampão de lise 1x e **incubar por 10 minutos no escuro**:



REDE DE  
PLATAFORMAS  
TECNOLÓGICAS  
FIOCRUZ

Plataforma de Citometria de Fluxo - RPT08J  
Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000  
IPCCB - Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema - Térreo



**ATENÇÃO:** *ao mesmo tempo que adicionar o tampão de lise deve deixar a amostra no vórtex*

**Caso não tenham pronto o tampão 1x preparar seguindo o modelo:**

Adicionar ao tubo Falcon de 50 ml  
5ml de tampão de lise 10x + 45 ml de água destilada  
Homogeneizar suavemente

- e)** Após a incubação levar para centrifuga (1500 RPMI por 10 minutos em temperatura de 21°C, 9 de aceleração e 9 de freio).
- f)** Descartar o sobrenadante vertendo o tubo e tomando cuidado para não perder a mostra, deve-se tirar o excesso com o tubo virado para baixo em papel toalha.
- g)** Lavar uma vez com PBS-W, adicionando 2ml após levar para centrifuga (1500 RPMI por 10 minutos em temperatura de 21°C, 9 de aceleração e 9 de freio).
- h)** Descartar o sobrenadante vertendo o tubo e tomando cuidado para não perder a mostra, deve-se tirar o excesso com o tubo virado para baixo em papel toalha.

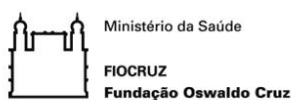
#### **ETAPA DE PERMEABILIZAÇÃO**

- i)** Adicionar 1ml de PBS-P (saponina) e **incuba por 10 minutos no escuro** em temperatura ambiente
- j)** Após a incubação deve-se levar para centrifuga (1500 RPMI por 10 minutos em temperatura de 21°C, 9 de aceleração e 9 de freio).
- k)** Descartar o sobrenadante vertendo o tubo e tomando cuidado para não perder a mostra, deve-se tirar o excesso com o tubo virado para baixo em papel toalha.
- l)** **Marcação intracelular:** Adicionar **TNF-a, IFNy, IL-2, KI-67 e IL-21** apenas nos tubos que foram permeabilizados, após adicionar os anticorpos, homogeneizar no vórtex cada tubo e em seguida **incubar em temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos no escuro.**
- m)** Após incubação, adicionar 1mL de PBS-P em cada tubo, após levar para centrifuga (1500 RPMI por 10 minutos em temperatura de 21°C, 9 de aceleração e 9 de freio).
- n)** Descartar o sobrenadante vertendo o tubo e tomando cuidado para não perder a mostra, deve-se tirar o excesso com o tubo virado para baixo em papel toalha.



Plataforma de Citometria de Fluxo - RPT08J  
Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000  
IPCCB - Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema - Térreo





- o)** Lavar uma vez com PBS-W, adicionando 2ml após levar para centrifuga (1500 RPMI por 10 minutos em temperatura de 21°C, 9 de aceleração e 9 de freio).
- p)** Descartar o sobrenadante vertendo o tubo e tomando cuidado para não perder a mostra, deve-se tirar o excesso com o tubo virado para baixo em papel toalha.
- q)** E ler no citômetro, se a leitura acontecer no dia seguinte, adicionar 100µl de PBS-W e guardar na geladeira para leitura posterior.



Plataforma de Citometria de Fluxo - RPT08J  
Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000  
IPCCB - Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema - Térreo

## Anexo 7. Protocolo de CBA

### Protocolo CBA – Dosagem de Citocinas e Quimiocinas

#### 1. Preparando o experimento (Dia Anterior):

1.1 Verificar o número de amostras a serem feitas;

**Obs:** O kit faz aproximadamente 200 testes, ou seja, 180 amostras e 2 curvas de calibração. É possível dividir o kit ao meio, portanto, dá pra fazer 2 experimentos com 90 amostras cada.

1.2 Separar as amostras em alíquotas;

**Obs:** Descongelar as amostras em banho-maria (37°C), depois passar no vórtex e centrifugar 14000 RPM por 7min.

1.3 Adicionar 25ul do sobrenadante das amostras em cada poço, deixar 12 poços para a curva padrão (utilizar placa de fundo U)

**Obs:** Colocar as placas em papel alumínio e deixar na geladeira

1.4 Identificar os tubos das amostras a serem utilizadas. É preferível utilizar números sequenciais para facilitar o procedimento. (ex: 1, 2, 3,4....)

1.5 Identificar o tubo para controle negativo “CN” e identificar o tubo para fazer o pool de Beads (citocinas) com a sigla “BD” (tubo de cônico 15ml)

1.6 Identificar 9 tubos da curva padrão para fazer a diluição. Todos com sua respectiva concentração e diluição;



1.7 Calcular quanto será usado de cada Bead.

Exemplo: Vou realizar 180 amostras

**Soma-se:** 180 amostras

09 Curva

03 CN

18 poços (segurança) – Para não faltar reagente

**Total:** 210 poços

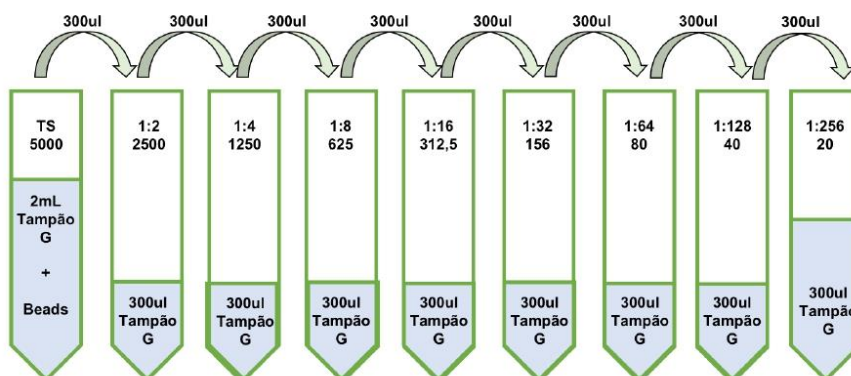
**Cálculo:** 210 poços x 21ul (quantidade que eu vou colocar em cada tubo) = 4410  
 4410/7 (Número de Beads que vou utilizar) = 630ul  
 Vou pegar 630ul de cada Bead.

## 2. Início do experimento:

2.1 Separar o kit que será utilizado;

2.2 Preparo dos Padrões:

- Reconstituir o padrão 15 minutos antes de começar o experimento. O padrão deve ser reconstituído com 2ml do Tampão G (Diluyente de ensaio). Adicionar 1400ul do tampão G no tubo TS;
- Após abrir o padrão, adicionar 300ul do Tampão G (de 100ul em 100ul) e homogeneizar suavemente a cada 3 min durante 15min. Com uma pipeta, passar o padrão para o tubo TS. Usar mais 300ul para lavar o tubo do padrão (passar para o tubo TS);
- Homogeneizar o tubo TS com a pipeta de 1000ul (30x suavemente);
- E em seguida iniciar a diluição seriada;



**OBS: NUNCA VORTEXAR O PADRÃO E NEM AGITAR FORTEMENTE**

2.3 Preparo do pool de beads:

- Pegar o cálculo de quanto você vai precisar utilizar das Beads (Ex. 630ul);
- Passar cada tubo no vórtex por 1min.
- Colocar 630ul de cada Bead (reagentes A1 – A7 do kit) no Tubo BD. Em seguida, passar no vórtex (Embrulhar o mix no papel alumínio);

- Utilizaremos 21ul do mix de Beads para cada tubo de amostra, curva padrão e CN.

#### 2.4 Execução das reações:

- Adicionar 25ul de cada padrão nos seus respectivos poços;
- Adicionar 25ul do Tampão G em cada poço de CN;
- Adicionar 21ul do mix de beads em todos os poços, inclusive no padrão e CN.

Não esquecer de vortexar as Beads de tempo em tempo;

- Adicionar 17ul do PE (Reagente B) em cada poço, inclusive no padrão e CN;
- Deixar as placas incubando por 3 horas (no agitador).

#### 2.4 Preparar o Setup (calibração):

- Centrifugar o Wash buffer (Tampão F) para retirar qualquer sujeira
- Adicionar 400ul do wash buffer e 100ul do Cytometer Setup Beads (Reagente D)

#### 2.5 Finalização do experimento:

- Após o período de incubação de 3 horas, lavar as placas com wash buffer (Reagente F). Adicionar 200ul em cada poço com o auxílio da multicanal
- Deixar 2 min (dando leves batidas na placa);
- Em seguida, centrifugar 2000g, 18°C, 10min;
- Verter as placas na pia e secar cuidadosamente;
- Adicionar 200ul de wash buffer para leitura;
- Homogeneizar no agitador e em seguida transferir para os tubos.