UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo de biomarcadores imunológicos das funções de monócitos
derivados de pacientes HIV+**

Maira da Costa Cacemiro

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo de biomarcadores imunológicos das funções de monócitos
derivados de pacientes HIV+**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências
Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientada: Maira da Costa Cacemiro
Orientadora: Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz

**Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de pós graduação Biociências Aplicadas à Farmácia em
14/02/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**

Ribeirão Preto
2014

Ficha Catalográfica

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Cacemiro, Maira da Costa

Estudos de biomarcadores imunológicos das funções de monócitos derivados de pacientes HIV+. Ribeirão Preto, 2014.

95 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Frantz, Fabiani Gai.

1.HIV/AIDS 2.Monócitos 3.*Salmonella* enteritidis, 4.biomarcadores

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia e Epigenética do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da CAPES e FAPESP

FOLHA DE APROVAÇÃO

CACEMIRO, M. C.

Estudo de biomarcadores imunológicos das funções de monócitos derivados de pacientes HIV+

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências
Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe Rosângela e meu pai Sebastião, por me ensinarem o valor do trabalho e a sempre persistir em busca dos meus sonhos.

Ao meu irmão Rafael que sempre me apoiou.

Vocês são a razão de quem hoje eu sou...

Compartilharam comigo os momentos de alegria, mas também de tristeza e fraqueza, sempre dando força e me incentivando pra seguir adiante, portanto, este trabalho é por vocês, Muito Obrigada!

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela sua presença constante na minha vida, iluminando meus sonhos e guiando meus passos.

À minha orientadora Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz, por me receber e permitir que eu fizesse parte de seu grupo de pesquisa, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, pela paciência e principalmente pelos ensinamentos.

À profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, pelas conversas, conselhos e ensinamentos.

*À profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão por ceder a cepa de **Salmonella** Enteritidis utilizada no desenvolvimento do trabalho e a seu aluno Fábio Campioni pelo auxílio.*

Aos professores Dr. Valdes Roberto Bollela e Dra. Simone Kashima Haddad pela colaboração que tornou possível a realização deste projeto.

Aos médicos e funcionários da UETDI pela atenção e carinho nos dias de coleta.

À Dra. Fernanda Guioti, ao Dr. João Terra Filho e todos os funcionários do Centro de Saúde Escola “Joel Domingos Machado”, pela colaboração.

À Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado pela disponibilização de seu laboratório para a realização de experimentos e sua aluna Juliana Escher Toller Kawahisa pela ajuda e apoio.

Ao Marco Aurélio Prata, por toda ajuda com as análises.

Aos colegas de mestrado que conviveram comigo durante as disciplinas e principalmente àquelas que se tornaram, acima de tudo, amigas: Gisele, Ana Flávia e Adriana.

A todos os amigos de laboratório, pessoas maravilhosas que tive oportunidade de conhecer e que me acolheram com carinho, me ajudaram nas dificuldades, riram comigo nos momentos de alegrias e brincadeiras.

Agradeço aos membros do LIIP (Cláudia, Elyara, Adriana, Márcio, Tânia, Francisco, Karina, Priscilla, Patrícia, Carlos, Alyne, Gisele, Morgana, Ana

Carolina) por fazerem parte da minha vida num momento tão importante de crescimento pessoal e profissional

Agradeço aos amigos do LIMÉ: Milena, Luana, Fabiana, Leonardo, Cecília, Gabriel, Caroline e Thaísa, pelas dicas e discussões que agregaram muito conhecimento a este trabalho, pelas conversas, risadas, lágrimas e é claro, pela amizade e companheirismo. Todos vocês se tornaram mais do que companheiros de laboratório, são amigos reais e estarão sempre guardados no meu coração.

Em especial agradeço à Milly (Milena), por toda a ajuda que me deu desde o momento em que cheguei ao laboratório. Obrigada por tudo o que me ensinou, por cada experimento que me ajudou e acompanhou, pelos resultados discutidos, pelas dicas, pelos conselhos, enfim, obrigada por orientar meus primeiros passos no mundo científico.

E a todos àqueles que de certa forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Epígrafe

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar". — Chico Xavier

Resumo

CACEMIRO, M.C. **Estudo de biomarcadores imunológicos das funções de monócitos derivados de pacientes HIV+.** 103 f. 2013. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o responsável pela pandemia mundial da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Uma vez infectado pelo HIV, o hospedeiro apresenta a forma aguda da doença, caracterizada por aumento da carga viral circulante, rápido declínio das células TCD4+ e ativação da resposta imune inata. Quando o HIV se estabelece no organismo, induz latência em algumas células e leva à cronicidade da infecção e nessa fase o principal alvo do HIV são as células T CD4+, observa-se então constante diminuição desta população, que tem como consequência a imunodeficiência, com desativação de outras células imunes, como os monócitos, macrófagos, células Natural Killer e neutrófilos. Portanto, há o favorecimento das infecções oportunistas por fungos, bactérias, parasitas e outros vírus, além do surgimento de neoplasias principais responsáveis pela morbidade e mortalidade relacionadas à AIDS. Para conter a destruição do sistema imune pelo vírus, inicia-se a terapia antirretroviral (TARV), sendo que o parâmetro disponível na clínica para início da terapia é a carga viral e contagem de células TCD4+. Neste sentido, investigamos se fatores relacionados à função e fenótipo de monócitos de pacientes HIV+ poderiam servir como biomarcadores da progressão da infecção. Para tanto, monócitos provenientes do sangue periférico de indivíduos HIV+, virgens ou não de tratamento e de indivíduos controle foram ou não infectadas *in vitro* com *Salmonella* Enteritidis. A capacidade fagocítica, a atividade microbicida, a produção de óxido nítrico (NO) e de citocinas foi avaliada e para avaliar a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs), os monócitos foram ainda estimulados ou não com PMA. Concluímos que a infecção pelo HIV leva ao aumento da capacidade fagocítica de monócitos de homens quando comparados à mulheres nas mesmas condições, entretanto a infecção não altera funções como a atividade microbicida, produção de EROs ou NO, entretanto, o perfil de citocinas entre os grupos foi muito diferente, entretanto o uso de TARV é capaz de recuperar parcialmente as correlações formadas entre citocinas comparadas ao grupo controle. Desta forma uma bioassinatura funcional poderia ser descrita, tendo como base a produção diferencial de citocinas e quimiocinas, como IL-1 β , IL-6 e IL-12p70.

Palavras-chave: 1.HIV/AIDS 2.Monócitos 3.*Salmonella* Enteritidis, 4.Biomarcadores

Abstract

CACEMIRO, M.C. **Study of immunological biomarkers of functions of monocytes derived from HIV + patients.** 103 f. 2013. Dissertation (Master degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The human immunodeficiency virus (HIV) is the responsible for the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) global pandemic. Once infected with HIV, the host has an acute form of the disease, characterized by a very high circulating level of virus and a rapid decline in CD4+ T cells, and then, the activation of innate immune response. The HIV is established in the body, inducing latency in some cells and leads to chronic infection, phase which the main target of HIV are the CD4+ T cells, and then what we observe is the constant decline of this population, which brings the immunodeficiency as a consequence, characterized by the deactivation of other immune cells, such as monocytes, macrophages, natural killer and neutrophils. In this way, opportunistic infections by fungal, bacteria, parasites and others viuses in addition to the neoplasm are established, being the main responsible for the morbidity and mortality related to AIDS. To contain the immune system destruction by the virus, the antiretroviral therapy (HAART) can be initiated, and the clinical parameter available considered to the onset of therapy to is the viral load and CD4+ T cell counts. In this sense, we have investigated if the factors related to the function and phenotype of monocytes from HIV+ patients could serve as biomarkers of the progression of infection. To this end, monocytes from the peripheral blood of HIV+ patients treated or not with HAART and control subjects were infected or not *in vitro* with *Salmonella* Enteritidis. The phagocytic capacity, microbicidal activity, the production of nitric oxide (NO) or cytokines were evaluated and when monocytes were stimulated or not with PMA, the production of reactive oxygen species (ROS) was evaluated. We conclude that HIV infection leads to increased phagocytic ability of monocytes of men compared to women in the same conditions, however, the infection does not alter functions such as microbicidal activity and ROS and NO production, however, the cytokine profile between groups was very different, however the use of HAART is able to partially recover the correlations formed between cytokines compared to the control group. Thus a functional biosignature could be described based on the differential production of cytokines and chemokines such as IL-1 β , IL-6 and IL-12p70.

Keywords: 1. HIV/AIDS 2. Monocytes 3. *Salmonella* Enteritidis 4. Biomarkers

Resumen

CACEMIRO, M.C. **Estudio de biomarcadores de las funciones inmunes de los monocitos derivados de pacientes HIV+.** 103 f. 2013. Disertación (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es responsable por la pandemia mundial del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Una vez infectados con VIH, el huésped presenta la forma aguda de la enfermedad, caracterizada por el aumento de la carga viral circulante, así como una rápida disminución de las células T CD4 + y la activación de la respuesta inmune innata. El VIH se establece en el cuerpo induciendo un estado de latencia en algunas células y conduciendo al desarrollo de una infección crónica . En esta fase, las células T CD4 + son el blanco principal del VIH y se observa una constante disminución de esta población, así como la desactivación de otras poblaciones de células del sistema inmune, tales como monocitos , macrófagos, células asesinas naturales y neutrófilos . Este proceso de disminución y desactivación lleva al desarrollo de un cuadro de inmunodeficiencia, favoreciendo así el establecimiento de infecciones oportunistas por hongos, bacterias, parásitos y otros virus, además de la neoplasia, principales responsables de la morbilidad y la mortalidad relacionadas con el SIDA. Para contener la destrucción del sistema inmunológico por el virus es iniciado una terapia antirretroviral (HAART) y los parámetros clínicos para iniciar la terapia son la carga viral y el número de células T CD4 + . Por lo tanto, investigar los factores relacionados con la función y el fenotipo de los monocitos de los pacientes VIH + puede servir como biomarcadores de la progresión de la infección. Para este fin, monocitos de sangre periférica de individuos VIH + , tratados o no tratados y de individuos control fueron infectados in vitro con *Salmonella* Enteritidis para evaluar su capacidad de fagocitosis , actividad microbicida , producción de óxido nítrico (NO) y de citocinas. Asimismo fue evaluada la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el estímulo con PMA. En conclusión, la infección por VIH conduce a un aumento de la capacidad fagocítica de monocitos de los hombres en comparación con mujeres en las mismas condiciones, sin embargo, la infección no altera las funciones tales como la actividad microbicida, la producción de ROS y NO, sin embargo, el perfil de citocinas entre los grupos era muy diferente, sin embargo el uso de la terapia HAART es capaz de recuperar parcialmente las correlaciones formados entre citoquinas en comparación con el grupo de control. Así, un biofirma funcional podría ser descrito sobre la base de la producción diferencial de citocinas y quimiocinas tales como IL-1 β , IL-6 e IL-12p70.

Palabras clave: 1. HIV/AIDS 2. Monocitos 3. *Salmonella* Enteritidis 4. Biomarcadores

Lista de figuras

Figura 1. Delineamento experimental.

Figura 2. Avaliação da proliferação bacteriana após o uso do antibiótico cloranfenicol.

Figura 3. Avaliação da pureza de células CD14+ separadas por *microbeads* magnéticas. Representação da população celular de um indivíduo analisada por citometria de fluxo.

Figura 4. Avaliação da influência da infecção por bactéria *Salmonella* enteritidis e da ação direta do antibiótico cloranfenicol na viabilidade celular.

Figura 5. Análise da frequência dos subtipos de monócitos na população de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes HIV+ virgens de tratamento ou em uso de terapia antiretroviral.

Figura 6. Fagocitose e atividade microbicida de monócitos de indivíduos controle (Controles), pacientes HIV+ virgens de tratamento (HIV) ou em terapia antirretroviral (HIV+TARV), após infecção por *Salmonella* Enteritidis *in vitro*.

Figura 7. Quantificação de espécies reativas de oxigênio liberadas por monócitos de indivíduos controle ou HIV+ virgens de tratamento (HIV) ou em tratamento antirretroviral (HIV+TARV), após estímulo com PMA.

Figura 8. Liberação de nitrito no sobrenadante de cultura de monócitos estimulados com *S. Enteritidis* morta.

Figura 9. Quantificação de citocinas no plasma de indivíduos controle e pacientes HIV+ virgens de tratamento ou em uso regular de terapia antirretroviral.

Figura 10. Produção de citocinas por monócitos após estímulo *in vitro* com *Salmonella* Enteritidis.

Lista de tabelas

Tabela 1. Características dos grupos de estudos.

Tabela 2. Representação das médias de fagocitose e atividade microbicida ajustadas para os efeitos de grupo e gênero.

Tabela 3. Médias de fagocitose ajustadas para gênero entre os grupos.

Tabela 4. Correlação entre citocinas presentes no plasma.

Tabela 5. Correlação entre citocinas do sobrenadante.

Lista de abreviaturas e siglas

CDC - Centers for disease Control and prevention

LAV - Lymphadenopathy-associated virus

HTLV-III - Human T lymphotropic virus tipo III

HIV - Human Immunodeficiency virus

TCD4+ - Linfócitos T que expressa o cluster of differentiation 4

gp 120 - Glicoproteína 120

gp 41 - Glicoproteína 41

CCR5 - C-C chemokine receptor type 5

CXCR4 - C-X-C chemokine receptor type 4

RNA - Ribonucleic acid

DNA - Deoxyribonucleic acid

TCD8+ Linfócito T que expressa o Cluster of Differentiation tipo 8

TLR - Toll like receptor

IFN- α 2 - Interferon alfa tipo 2

TNF- α - Tumor necrosis factor tipo alfa

IL-6 - Interleucina tipo 6

CD 21 - Cluster of differentiation 21

NK - Natural killer

CD 25 - Cluster of differentiation 25

Foxp3 - Forkhead box P3

Nef - Negative Regulatory Factor

Tat - Trans-Activator of Transcription

HLA - Human leukocyte antigen

ADCC - Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity

IgM - Imunoglobulina M

IgG - Imunoglobulina G

p24 - Proteína 24

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

TARV - Terapia antirretroviral

EROs - Espécies reativas de oxigênio

PMA - Phorbol 12-myristate 13 acetate

NO - Óxido nítrico

S. Enteritidis - *Salmonella* Enteritidis

HC-FMRP - Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

BHI - Brain Heart Infusion Broth
 UFC - Unidades formadoras de colônia
 PBMC - Peripheral blood mononuclear cells
 PBS - Phosphate buffered Saline
 SBF - Soro bovino fetal
 Anti CD14 - Anticorpo contra o cluster of differentiation 14
 Anti CD16 - Anticorpo contra o cluster of differentiation 16
 PercP - Peridinin Chlorophyll Protein Complex
 PE - Phycoerythrin
 MOI - Multiplicity of infection
 nm - Nanômetro
 Pen-strep - Penicilina e estreptomicina
 NO_2^- - nitrito
 NEED - Naftil-etilenodiamino dihidroclorídrico
 H_3PO_4 - Ácido fosfórico
 IL-1 β - Interleucina tipo 1 beta
 IL-5 - Interleucina tipo 5
 IL-10 - Interleucina tipo 10
 IL-12p70 - Interleucina tipo 12 subunidade 70
 IL-4 - Interleucina tipo 4
 IFN- γ - Interferon tipo gama
 IP-10 - Interferon gamma-induced protein 10
 CXCL10 - C-X-C motif chemokine 10
 RANTES - regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
 CCL5 - C-C motif ligand 5
 MCP-1 - monocyte chemotactic protein-1
 CCL2 - C-C motif ligand 2
 Log 10 - Logarítmo 10
 SAS - Statistical Analysis System
 n - número
 QL - Quimiluminescência
 VS - versos
 iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
 NF- κ B - Factor nuclear kappa B
 NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 RNAm - Ribonucleic acid messenger

Th1 - linfócito T helper tipo 1

Th2 - linfócito T helper 2

SIV - Simian Immunodeficiency virus

CXC - C-X-C motif receptor 3

μL - Microlitro

mL - Mililitro

M - Molar

Lista de símbolos

α - alfa

β - beta

γ - gama

μ - mi

κ - kappa

® - registrado

$\pm$ - mais ou menos

Sumário

Resumo	13
Abstract	14
Resumen	15
Lista de figuras	16
Lista de tabelas.....	17
Lista de abreviaturas e siglas.....	18
Lista de símbolos.....	21
1. Introdução.....	24
1.1. Histórico e Epidemiologia	25
1.2 Infecção e Resposta imune ao HIV-1	26
1.3. Diagnóstico	30
1.4. Tratamento da AIDS.....	30
1.5. Infecção Oportunista por <i>Salmonella</i> Enteritidis	31
2.Objetivos.....	33
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos Específicos	34
3. Delineamento Experimental	35
4. Casuística.....	37
4.1. Pacientes	38
4.2. Indivíduos Controles.....	38
5. Métodos.....	39
5.1. <i>Salmonella</i> Enteritidis	40
5.2. Teste de sensibilidade ao antibiótico Cloranfenicol em caldo BHI	40
5.3. Morte da bactéria <i>Salmonella</i> Enteritis pelo calor	41
5.4. Amostras de Sangue	41
5.5. Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....	41
5.6. Contagem celular	42
5.7. Citometria de Fluxo para avaliar o fenótipo de monócitos	42
5.8. Separação de monócitos por microbeads magnéticas.....	43
5.9. Teste de Viabilidade Celular.....	43
5.9.1. Fagocitose.....	44
5.9.2. Atividade Microbicida.....	45

5.9.3. Dosagem de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) por quimiluminescência.....	46
5.9.4. Preparo das amostras de plasma e sobrenadante para dosagem de citocinas e quimiocinas	46
5.9.5. Dosagem de Óxido Nítrico.....	46
5.9.6.Quantificação da produção de citocinas e quimiocinas.....	47
5.9.7. Análises Estatística	47
6. Resultados.....	49
7. Discussão	71
8. Conclusão.....	79
9.Referências	81
Anexo I	90
Anexo II	91

1. Introdução

1.1. Histórico e Epidemiologia

Descrita ao redor do mundo a partir de 1977, uma estranha e misteriosa doença chamou a atenção do Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América em 1981. Em junho daquele ano, o CDC relatou cinco casos da pneumonia causada pelo fungo *Pneumocystis carinii*, que é rara e acomete indivíduos gravemente imunocomprometidos. Pouco depois, um número inesperado de homens gays desenvolveu um tipo de câncer de pele raro chamado sarcoma de Kaposi. Em 1982, com inúmeros casos relacionados à doença, e principalmente devido à população acometida e aos fatores de transmissão descritos, adotou-se temporariamente o nome Doença dos 5 H, representando os homossexuais, hemofílicos, haitianos, heroinômanos (usuários de heroína injetável) e hookers (nome em inglês dado às profissionais do sexo). Outros termos surgiram para identificar a doença, como "GRID", de gay-related immune deficiency e "Sarcoma de Kaposi e infecções oportunistas", mas em 1982 cunhou-se o termo AIDS, do inglês, acquired immunodeficiency syndrome (Gottlieb 2006).

Em 1983, as equipes de Robert Gallo e Luc Montagnier publicaram dados que comprovavam a existência de um vírus que seria o responsável pelo imunocomprometimento do sistema imunológico dos indivíduos com AIDS (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983; Gallo, Sarin et al. 1983). Desta forma, sugeriu-se que a disfunção imune induzida pelo vírus estaria predispondo tais indivíduos a infecções oportunistas como a pneumocistose e o sarcoma de Kaposi (Wain-Hobson, Vartanian et al. 1991; Gottlieb 2006). Inicialmente o vírus recebeu o nome de Vírus Associado à Linfadenopatia (LAV) pelo grupo de Montagnier e de HTLV-III por Gallo (pela sua semelhança com outros vírus T-linfotrópicos). Em 1986 descobriu-se que os dois vírus eram na verdade o mesmo vírus e logo foi aceito como agente causador da AIDS e passou a ser chamado de vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Wain-Hobson, Vartanian et al. 1991; Marsili, Remoli et al. 2012).

O HIV é um vírus pertencente ao gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae*, com genoma composto por fita simples de RNA de polaridade positiva, transcrita pela enzima *transcriptase reversa* para uma dupla fita de DNA que é acoplada ao DNA genômico da célula hospedeira para que ocorra a replicação viral (Gelderblom, Hausmann et al. 1987).

Em 1986 foi ainda isolada uma segunda variável genética de retrovírus de pacientes com AIDS oriundos do oeste da África, inicialmente denominado LAV-2, e posteriormente identificado como HIV-2. Ambos os vírus (HIV-1 e HIV-2) têm efeito citopático em linhagens de células TCD4+, porém com diferenças substanciais em seu genoma. (Clavel, Guyader et

al. 1986). Atualmente, o HIV-1 está disseminado pelo mundo inteiro e é o principal responsável pela grande maioria dos casos de AIDS. A infecção causada pelo HIV-2 é caracterizada por menor taxa de transmissão e de mortalidade e declínio mais lento de células TCD4+, enquanto o vírus HIV-1 leva a uma disfunção imune mais rápida e apresenta maior taxa de mortalidade e transmissão (Esbjornsson, Mansson et al. 2012)

Os números globais associados à infecção pelo HIV continuam impressionando. Em 2012 estimou-se que cerca de 35,3 milhões de pessoas estavam infectadas pelos diferentes subtipos de HIV no mundo todo, sendo que ocorreram 2,3 milhões de novas infecções, apenas naquele ano. Entretanto, neste mesmo ano houve diminuição na porcentagem de mortes em decorrência da AIDS comparado à estatísticas anteriores, sendo 33% menor que em 2001 (UNAIDS 2013).

Houve também decréscimo de 35% no número de infecções em crianças quando comparado a 2009, provavelmente devido ao maior acesso à terapia antirretroviral que reduziu a transmissão vertical, pois em 2012 a terapia atingiu 62% das mulheres grávidas. Também em 2012, cerca de 9,7 milhões de pessoas que vivem em países em desenvolvimento tiveram acesso à terapia antirretroviral, representando 61% da população elegível desses países, um aumento de 20% em relação à estimativas anteriores (UNAIDS 2013).

1.2 Infecção e Resposta imune ao HIV-1

Após o contágio por contato com secreções, ou sangue contaminado, ou através da transmissão vertical, a infecção da célula hospedeira ocorre inicialmente pela interação entre a glicoproteína gp120 do vírus e o receptor CD4 das células do hospedeiro. Essa interação induz uma mudança conformacional na gp120 expondo seu sítio de ligação ao receptor CD4 e aos co-receptores CCR5 e CXCR4 das células do hospedeiro. A mudança conformacional do vírus permite também alterações da gp41 de modo que ela exponha seu peptídeo de fusão e se insira à membrana plasmática celular (Sterjovski, Roche et al. 2010; Bozek, Eckhardt et al. 2012; Gobeil, Lodge et al. 2012). Após a fusão do envelope com a membrana da célula hospedeira o core viral é desencapsulado, originando uma partícula subviral composta por RNA e proteínas associadas, incluindo a *transcriptase reversa* (RT). A partícula subviral é liberada da membrana celular, copiada para DNA e transportada para o núcleo, onde o genoma viral é inserido no genoma do hospedeiro por ação das enzimas integrases, levando a formação de um provírus funcional (Tripathi and Agrawal 2007).

Quando o HIV foi descoberto, as células T CD4+ foram apontadas como único alvo viral, mais tarde descobriu-se que outras células como monócitos, macrófagos e células

dendríticas também podiam ser infectadas pois apresentam os receptores e co-receptores importantes na infecção. Atualmente, sabe-se que essas são as primeiras células a ser infectadas pelo HIV e servem como reservatório viral durante todos os estágios da infecção, pois são mais resistentes do que os linfócitos T CD4+ aos efeitos citopáticos do vírus, sobrevivendo e possibilitando replicação viral por mais tempo (Zybarth, Reiling et al. 1999; Kuroda 2010; Melendez, Colon et al. 2011). Para que o vírus entre na célula é necessária além da interação com o receptor CD4, a interação com um co-receptor de quimiocina. Sabe-se que *in vitro* doze co-receptores de quimiocinas podem funcionar como co-receptores do HIV, mas *in vivo* apenas dois desempenham essa função. Esses co-receptores são CXCR4, expresso na membrana de linhagens de células T e CCR5 expresso na membrana de monócitos e macrófagos (Cardozo, Kimura et al. 2007; Bozek, Thielen et al. 2009).

Desta forma, o HIV-1 com tropismo por macrófagos usa principalmente CCR5 como co-receptor (R5-trópico), enquanto que vírus com tropismo por células T, usam CXCR4 (X4-trópico). Existem ainda cepas virais com duplo tropismo (Sterjovski, Roche et al. 2010; Melendez, Colon et al. 2011), e já foi demonstrado que vírus R5-trópicos estão presentes principalmente na fase assintomática da infecção, enquanto que vírus X4-trópicos surgem nas fases tardias da infecção, o que se relaciona com a diminuição do número de células T CD4+ e progressão da infecção para a AIDS (Tsang, Chain et al. 2009; Bozek, Eckhardt et al. 2012).

Atualmente sabe-se que a infecção de monócitos ocorre numa menor taxa do que em macrófagos pois essas células são menos permissíveis à infecção pelo HIV, devido à menor expressão do co-receptor CCR5. Já foi demonstrado que, em um indivíduo infectado, a cada 100.000 monócitos no sangue periférico, em cerca de 30 a 125 é possível detectar genoma viral, enquanto que a cada 100 macrófagos presentes no cérebro, por exemplo, é possível detectar genoma viral em cerca de 1 a 10 deles (Stoler, Eskin et al. 1986; McElrath, Pruett et al. 1989; McElrath, Steinman et al. 1991; Tuttle, Harrison et al. 1998; Tsang, Chain et al. 2009; Collini, Noursadeghi et al. 2010).

A progressão da infecção pelo HIV leva ao desenvolvimento da AIDS, que é caracterizada por um colapso do sistema imunológico com drástica depleção de células T CD4+, perda progressiva da função citotóxica das células T CD8+ e desativação de outras células imunes, como os monócitos e macrófagos, resultando na imunodeficiência sistêmica. Recentemente foi descrito ainda que a infecção pelo HIV também induz debilidade na produção tímica, o que contribui para a rápida progressão da doença (Kedzierska, Azzam et al. 2003; Gottlieb 2006; Tripathi and Agrawal 2007).

Há duas teorias para explicar como o HIV persiste no hospedeiro mesmo com o uso da terapia antirretroviral, a primeira delas sugere que a replicação em curso tem como consequência a resistência às drogas e a outra sugere que o HIV entra em estado de latência nas células mais resistentes que passam a atuar como reservatórios virais, como o caso das células T CD4 + de memória, monócitos, macrófagos, micróglia e células dendríticas (Melendez, Colon et al. 2011).

Monócitos e macrófagos desempenham papel importantíssimo na resposta imune inata nas infecções, por isso, essas células deveriam ser capazes de impedir que patógenos oportunistas causassem infecções, entretanto, possíveis alterações provocados pelos vírus nas funções celulares podem ser o motivo pelo qual patógenos oportunistas consigam escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Zybarth, Reiling et al. 1999; Kuroda 2010).

O início da infecção é caracterizado como fase aguda, na qual há um aumento da carga viral circulante e um rápido declínio das células TCD4+, porém com a ativação da resposta imune inata, inicialmente esse quadro consegue ser revertido, levando à diminuição da carga viral e consequente aumento de células TCD4+, entretanto, essa resposta não consegue se manter eficiente por muito tempo e o indivíduo é incapaz de eliminar a infecção, de modo que o HIV se estabelece no organismo, induzindo latência em algumas células e levando à cronicidade da infecção (Grossman, Meier-Schellersheim et al. 2006; Mogensen, Melchjorsen et al. 2010).

O período a partir do momento da infecção até o momento em que ocorre a primeira detecção de RNA viral é chamado de fase de eclipse. A partir deste ponto, até o momento em que é possível observar a produção dos primeiros anticorpos específicos (3 a 4 semanas após a infecção), a infecção é considerada como em fase aguda (Keele, Giorgi et al. 2008).

Na fase aguda, o HIV livre é reconhecido via receptores do tipo *toll* (TLR) 7 e 8, resultando numa super ativação de células dendríticas, recrutamento de macrófagos, liberação de IFN do tipo 1, IL-1 e TNF- α , e a diminuição na produção de IL-6. Os vírus são então transportados aos linfonodos drenantes através da própria disseminação sanguínea e linfática. Células apresentadoras de antígenos, como por exemplo, células dendríticas e linfócitos B, nas quais o vírus se liga através de receptores de lectina do tipo C e do receptor CD21 respectivamente, podem aumentar a disseminação viral através da apresentação para a ativação dos linfócitos T nos linfonodos (Diebold, Kaisho et al. 2004; Mogensen, Melchjorsen et al. 2010).

A hiperativação nas mucosas caracteriza a ativação inadequada da imunidade inata durante a fase aguda. Esta disfunção da imunidade celular e humoral específicas tem como consequência a desregulação da ativação, localização e reposição de células TCD4+. Além

disso, as demais células do sistema imune também sofrem as consequências desta hiperativação, como células B que são ativadas de forma policlonal, células NK são desativadas, e ocorre diminuição do número de células dendríticas circulantes (Lepelley, Louis et al. 2011).

Uma vez instaurada, a infecção pelo HIV-1 é caracterizada por ativação crônica do sistema imune. Em conjunto com a imunidade inata, a imunidade adaptativa também começa a atuar com o intuito de ajudar na eliminação viral. Os linfócitos T CD4+, células de extrema importância para a resposta imune adaptativa, produzem as citocinas que irão induzir a formação da população de células TCD8+ e TCD4+ de memória, estimulam a produção de anticorpos por linfócitos B, estimulam macrófagos a aumentar sua capacidade microbida, atuam no recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e basófilos para o sítio de infecções oportunistas. Entretanto, por ser um dos principais alvos virais, esta população sofre depleção considerável, contribuindo enormemente para a progressão para a AIDS (Zhu and Paul 2008).

Um outro grupo de linfócitos T CD4+, que expressam CD25+ e Foxp3+, os chamados reguladores, ainda tem um papel controverso durante a infecção. Os produtos derivados da ativação desta população celular podem ser responsáveis pela indução da imunossupressão, contribuindo para a rápida progressão da doença (Kinter, McNally et al. 2007). Outros grupos de pesquisadores demonstraram ainda que as células T reguladoras podem atuar protegendo os indivíduos dos efeitos deletérios da hiperativação imunológica (Fazekas de St Groth and Landay 2008).

Além disso, o vírus apresenta mecanismos de escape da resposta imune que desfavorecem o hospedeiro. Por exemplo, uma proteína viral chamada Nef modula a expressão de HLA do tipo I, de modo a diminuir sua expressão na célula hospedeira, desta forma, o reconhecimento das células infectadas por linfócitos T citotóxicos é dificultado. E mesmo que as células natural killer (NK) pudessem reconhecer esta alteração, o vírus não altera a expressão de HLA-C e HLA-E e a célula infectada também não sofre a ação das células NK (Cohen, Gandhi et al. 1999). No entanto, as células NK poderiam ainda ser eficientes na resposta contra o vírus, pois sabemos que apesar dos anticorpos produzidos na resposta humoral não serem neutralizantes para o vírus, podem mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), capaz de controlar a infecção com um bom impacto na progressão da doença (Kramski, Schorcht et al. 2012).

Desta forma, todas as respostas direcionadas à eliminação da infecção não são capazes de erradicar o vírus de forma eficaz e estes fatores culminam com a facilitação da replicação viral e progressão da AIDS (Lepelley, Louis et al. 2011; Pitha 2011).

1.3. Diagnóstico

Desde 1985 os testes de triagem para HIV são baseado na detecção de anticorpos anti-HIV no soro do paciente. Na 1º geração de ensaios desenvolvida, faltava sensibilidade e especificidade. Melhorias foram feitas na 2º e 3º geração, sendo que esta última possibilitava a detecção tanto de HIV-1 quanto HIV-2 e também anticorpos das classes IgM e IgG. Os ensaios da 4º geração foram licenciados nos Estados Unidos em 2010 e combinam a detecção de anticorpos contra o vírus com a detecção do antígeno p24. No Brasil os principais testes usados para diagnóstico do HIV são: Reação de ensaio Imunoenzimático (ELISA), Imunofluorescência para o HIV-1, Immunoblot, Western blot para detecção da proteína p24 ou detecção de ácido nucleico viral. Em alguns casos, é aplicado o teste rápido para detecção de anticorpos por ELISA e a confirmação, caso positivo, é feita pelos teste supracitados (Murphy and Aitken 2011; Saúde 2011; Arora, Maheshwari et al. 2013).

1.4. Tratamento da AIDS

O tratamento antirretroviral (TARV) começou a ser utilizado há mais de 25 anos e desde então, contribuiu para a redução drástica do número de co-infecções oportunistas e também do número de mortes em decorrência da progressão para a AIDS (Thompson, Aberg et al. 2012). Em 1994 surgiram as primeiras evidências de que o uso de TARV diminuía o risco de transmissão viral, porém o tratamento não tem eficácia na eliminação do vírus, pois o mesmo permanece em latência dentro de outras células como macrófagos e células de memórias. (Abbas and Herbein 2012).

As indicações para o início de TARV baseavam-se no número de células TCD4+ circulantes associados à viremia dos pacientes. Recentemente, estipulou-se que todos os indivíduos HIV+ com contagem de células TCD4+ menores que $500/\text{mm}^3$ iniciem o uso de medicações antirretrovirais, entretanto, ainda é controverso o início do uso de TARV em pacientes assintomáticos mesmo com números baixos de linfócitos TCD4+ (Lundgren, Babiker et al. 2013; McGrath, Richter et al. 2013)

A terapia antirretroviral associa duas ou mais drogas que tem como princípio agir como inibidoras da transcriptase reversa ou inibidoras de protease, porém a combinação entre essas drogas varia de acordo com a resposta do paciente e da resistência apresentada pela cepa viral com a qual o indivíduo está infectado (Hirsch, Gonzales et al. 2011).

Mundialmente, cinco classes de drogas são utilizadas na clínica, isoladas ou em combinação:

- **Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa**, que atuam na enzima transcriptase reversa, são elas: Abacavir, Didanosina, Estavudina, Lamivudina, Tenofovir, Zidovudina e a combinação Lamivudina/Zidovudina.
- **Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa**, que bloqueiam diretamente a ação da enzima e a multiplicação do vírus, são eles: Efavirenz, Nevirapina e Etravirina.
- **Inibidores de Protease**, que bloqueiam a enzima protease impedindo a produção de novas cópias virais, são eles: Atazanavir, Darunavir, Fosamprenavir, Indinavir, Lopinavir/r, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir e Tipranavir.
- **Inibidores de fusão**, que impedem a entrada do vírus na célula e, por isso, ele não pode se reproduzir e a droga é a Enfuvirtida.
- **Inibidores da Integrase**, que atuam bloqueando a atividade da enzima integrase, responsável pela inserção do DNA viral após a transcrição ao DNA humano, inibindo a replicação do vírus, a droga é o Raltegravir {Ministério, , Quais são os antirretrovirais}.

1.5. Infecção Oportunista por *Salmonella* Enteritidis

Dentre todas as possíveis formas de infecções oportunistas em pacientes HIV+, a gastroenterite bacteriana é causada principalmente por *Salmonella* não tifoidal (Tiphimurium e Enteritidis), *Shigella*, *Campylobacter* e *Clostridium Difficile*, sendo que a *Salmonella* é responsável por causar recorrente septicemia em pacientes imunocomprometidos (Seddon and Bhagani 2011). As bactérias são normalmente ingeridas junto com alimentos ou água contaminados e alojam-se no intestino, causando gastroenterites, mas culminam em doenças sistêmicas quando são fagocitadas por macrófagos intestinais e disseminadas via sistema reticuloendotelial. (Prost, Sanowar et al. 2007). Sabe-se ainda que a translocação bacteriana pela via intestinal é considerada um evento complicador na infecção pelo HIV (Vujkovic-Cvijin, Dunham et al. 2013).

O gênero *Salmonella* é composto de duas espécies: *bongori* e *enterica*, existindo mais de 2500 sorotipos desta última espécie, entre as quais estão aquelas causadoras de febre tifoide (*Typhi* e *Paratyphi*) e as demais são ditos não-tifoidais (Andrews-Polymenis, Baumler et al. 2010).

A salmonelose não tifoidal é a maior causa de bacteremia em pacientes infectados com HIV. Em 1983 foi sugerida sua primeira associação com HIV e, e ainda hoje, é

considerada a principal co-infecção por bactérias invasivas que acometem indivíduos infectados com HIV em países onde a disponibilidade da terapia antirretroviral é limitada. Nestes países, Salmoneloses permanecem como causa importante de morbidade e mortalidade em indivíduos HIV+ (Clumeck, Mascart-Lemone et al. 1983; MacLennan, Gilchrist et al. 2010; Moir and Fauci 2010; Preziosi, Kandel et al. 2012).

Desta forma, o desenvolvimento deste projeto buscou entender como os monócitos de sangue periférico de pacientes HIV+ respondem à infecção *in vitro* por *Salmonella* Enteritidis, uma vez que os produtos da ativação celular nestas condições poderiam ser utilizados como biomarcadores da função imune visto que na prática clínica, o momento de início do tratamento antirretroviral está diretamente relacionado à melhora na qualidade de vida do paciente HIV+.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Identificar uma bioassinatura da resposta imune inata no sangue periférico de indivíduos HIV+, virgens ou não de tratamento.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliação da presença de citocinas e biomarcadores de resposta imune no plasma dos pacientes HIV+, virgens ou não de tratamento em relação aos indivíduos do grupo controle

2. Avaliação em culturas de monócitos purificados e isolados do sangue periférico de indivíduos HIV+ virgens ou não de tratamento, em relação aos indivíduos do grupo controle, dos seguintes parâmetros:

- função celular, através da análise da capacidade fagocítica e microbicida na presença da bactéria *Salmonella* Enteritidis.
- produção de citocinas, quimiocinas e nitrito pelas células quando cultivadas ou não com *Salmonella* Enteritidis morta por calor.
- produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células cultivadas com o estímulo policlonal PMA (phorbol myristate acetate)

3. Delineamento Experimental

Figura 1. Delineamento experimental. Foram coletados 40 mL de sangue periférico de cada indivíduo, o sangue foi centrifugado, o plasma foi armazenado para posterior dosagem de citocinas, enquanto as células foram separadas por gradiente de densidade utilizando Ficoll-Paque®, em seguida as células CD14+ foram separadas com microbeads magnéticas, infectadas com *S. Enteritidis*, cultivadas, ou com bactérias inativadas por calor ou estimuladas com PMA, dependendo do desenho experimental. Os ensaios biológicos foram realizados e o sobrenadante de cultura foi utilizado para dosar nitrito e citocinas*.

4. Casuística

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, CEP/FCFRP nº. 276 em 11/12/2012. (Anexo I)

4.1. Pacientes

Foram selecionados 33 pacientes HIV+ atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP) divididos em dois grupos. Um grupo foi composto por 13 pacientes virgens de tratamento antirretroviral e o outro com 20 pacientes em uso de tratamento antirretroviral regular. Todos os pacientes estavam dentro da faixa etária entre 18 e 65 anos e assentiram sua participação no projeto de pesquisa através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II).

4.2. Indivíduos Controles

Os indivíduos controles foram selecionados no Hemocentro de Ribeirão Preto do HC-FMRP, e convidados a participar da pesquisa. O grupo foi composto por 20 indivíduos com faixa etária entre 18 a 65 anos e que concordaram em participar da pesquisa através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Foram considerados na pesquisa, apenas os indivíduos negativos para qualquer infecção após a triagem clínica feita pela própria instituição.

5. Métodos

5.1. *Salmonella* Enteritidis

A cepa bacteriana de *Salmonella* Enteritidis utilizada em todos os experimentos foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão, do Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica Bacteriana, após ter sido feita sua caracterização microbiológica e molecular.

A partir de uma alíquota de concentração desconhecida de *Salmonella* Enteritidis, foi feita a expansão da bactéria em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth – Himedia) e então preparada uma solução de congelamento de glicerol a 70%. A bactéria foi mantida congelada em alíquotas de 50 µL a -80°C para posterior uso.

Para as nossas condições experimentais, uma alíquota da bactéria foi descongelada, colocada em caldo BHI para expansão e então incubada em estufa a 37°C, em atmosfera com 5% CO₂ até o meio se tornar levemente turvo, 500 µL de BHI puro e estéril foram utilizados para calibrar o espectrofotômetro (UV mini 1240 – Shimadzu) a 600 nm, em seguida foi feita a leitura da densidade óptica do BHI contendo as bactérias.

Foram também depositados 100 µL do BHI contendo as bactérias em diluições seriadas, em meio sólido seletivo Mueller Hinton Agar (Acumedia – Neogen Corporation) para crescimento e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). O restante do caldo foi mantido em geladeira de um dia para outro com antibiótico cloranfenicol (50 µg/mL). No dia seguinte, as unidades formadoras de colônia foram contadas e correlacionadas com a densidade ótica obtida. Assim, pudemos determinar a curva de crescimento bacteriano e garantir sempre o mesmo número de bactérias em todos os experimentos.

5.2. Teste de sensibilidade ao antibiótico Cloranfenicol em caldo BHI

Para utilização da *Salmonella* Enteritidis nos experimentos de fagocitose e atividade microbica foi fundamental que não houvesse durante a incubação com as células em cultura a proliferação espontânea da bactéria, o que atrapalharia a interpretação dos dados. Para isso, estabelecemos a dose bacteriostática do antibiótico cloranfenicol, ou seja, que permite a bactéria manter-se viável, porém impede que a mesma se prolifere em cultura.

Uma alíquota de quantidade desconhecida da bactéria *Salmonella* Enteritidis foi cultivada em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth – Himedia) em estufa em atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C por 3 horas. Para o teste, foram adicionados 450 µL de caldo BHI estéril

em placa de 48 poços e em seguida foram adicionadas em cada poço as diferentes concentrações do antibiótico Cloranfenicol (Sigma) em duplicata para cada concentração (70µg/mL, 60µg/mL, 50µg/mL, 40µg/mL). Foram então adicionados em cada poço da placa contendo o antibiótico, mais 50 µl do BHI contendo a bactéria. Foi feita a leitura da densidade óptica inicial em espectrofotômetro (Biotech Instruments, Inc µQuant) com filtro de 600 nm e para acompanhamento da curva de crescimento na presença das diferentes concentrações de antibiótico, a placa foi incubada em estufa 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas, quando uma nova leitura foi feita nas mesmas condições anteriores. Além das leituras de densidade óptica, 30 µL de cada poço, tanto da cultura inicial quanto após 24 horas de incubação, foram dispostos em placas contendo Agar Mueller Hinton para acompanhamento e contagem do crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC).

De acordo com os dados mostrados na Figura 2, a concentração bacteriostática do antibiótico, capaz de manter a bactéria viável mas sem proliferação foi a de 50 µg/mL. Esta concentração foi então utilizada em todos os experimentos.

5.3. Morte da bactéria *Salmonella* Enteritis pelo calor

O caldo BHI contendo uma concentração conhecida de bactérias foi autoclavado a 121°C por 30 minutos para sua morte total por calor. Para confirmar a morte das bactérias, uma alíquota foi plaqueada em Mueller Hinton Agar e após 18 horas de incubação, na ausência de crescimento de UFC a solução foi utilizada nos experimentos de dosagem de citocinas, quimiocinas e nitrito, de acordo com o desenho experimental.

5.4. Amostras de Sangue

Todos os indivíduos participantes do projeto de pesquisa, tanto pacientes HIV+ quanto indivíduos controles (HIV-), realizaram individualmente uma única doação de 40 mL de sangue venoso periférico que foi coletado em tubo a vácuo contendo o anticoagulante heparina (Vacutainer®; Becton, Dickinson and Company). O sangue foi retirado através de punção venosa, obedecendo todos os cuidados de biossegurança e bioética e mantido à temperatura ambiente.

5.5. Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

As amostras foram centrifugadas a 400 g (Thermo Scientific – Megafuge 16R Centrifuge) por 10 minutos em temperatura ambiente para separação do plasma. O plasma foi coletado e armazenado em freezer a – 20 °C e o volume restante de sangue (aproximadamente 20 mL) foi dividido em dois tubos cônicos (BD-Falcon) de 50 mL. Em cada tubo foi adicionado PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4, temperatura ambiente) até o volume final de 30 mL/tubo.

Em outros dois tubos foram adicionados 13 mL de Ficoll-Paque® PLUS, d=1,078 g/mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), em temperatura ambiente e então o sangue diluído com PBS foi adicionado lentamente sobre o Ficoll-Paque® PLUS com o auxílio de uma pipeta sorológica e centrifugado a 700 g por trinta minutos em temperatura ambiente. Essa centrifugação permite uma separação das células mononucleares devido ao gradiente de densidade, promovendo a formação de um anel de células mononucleares entre as diferentes fases líquidas.

As células mononucleares foram coletadas com o auxílio de uma pipeta e lavadas com PBS estéril em duas centrifugações de 400 g por 10 minutos cada, em temperatura ambiente, para remover resíduos do Ficoll-Paque® PLUS.

5.6. Contagem celular

A quantificação das células mononucleares obtidas foi feita a partir da diluição de uma alíquota celular em azul de Trypan 0,4% (Gibco - Invitrogen). As células foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico.

5.7. Citometria de Fluxo para avaliar o fenótipo de monócitos

Do total de células obtidas do PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*), foram utilizadas duas alíquotas de 5×10^5 células para cada indivíduo. As células foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos a temperatura ambiente e ressuspensas em 100 µL de PBS com 2% de Soro Bovino Fetal (SBF - Gibco) e então foram adicionados 10 µL de anticorpos anti-CD14-PerCP (BD – Pharmingen) e 10 µL de anticorpos anti-CD16-PE (BD – Pharmingen) em uma das alíquotas. A outra alíquota foi utilizada como controle do experimento, sem marcação por anticorpos.

As células foram incubadas a 4 °C por 25 minutos e após este período, foram adicionados 2 mL de PBS com 2% de SBF, e então centrifugadas a 400 g por 10 minutos a 4°C, para a remoção do excesso de anticorpos não ligados.

Após a lavagem, o precipitado celular foi ressuspensionado em 200 μ L de PBS com 1% de formol e foi feita a aquisição de 20.000 células em Citômetro de fluxo (BD FACsCanto) e analisados os fenótipos com auxílio do software Diva.

5.8. Separação de monócitos por microbeads magnéticas

O PBMC obtido através do gradiente de Ficoll-Paque® foi ressuspensionado em tampão de beads (PBS 1x estéril livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} + 2mM de EDTA + 0,5% de Soro Bovino Fetal) a 4 °C e foi então centrifugado a 300 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado celular foi ressuspensionado em 80 μ L de tampão para cada 10^7 células e em seguida adicionou-se 20 μ L de anticorpos anti-CD14 conjugado com *microbeads* magnéticas (MACS- Miltenyi Biotec) para cada 10^7 células, a amostra foi homogeneizada e incubada por 15 minutos sob refrigeração (4 °C).

Após o período de incubação, as células foram lavadas com 2 mL de tampão de beads para cada 10^7 células e centrifugadas por 10 minutos em rotação de 300 g a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado celular foi ressuspensionado em 500 μ L de tampão.

Com o auxílio de uma coluna magnética (Miltenyi Biotec) e um suporte de campo magnético *MidiMACS Separator* e *MACS MultiStand* (Miltenyi Biotec) as células CD14+ foram separadas da seguinte maneira: Primeiro a coluna foi lavada com um volume de 3 mL de tampão de beads, em seguida adicionaram-se as células conjugadas ao anticorpo. Após a passagem de todo o líquido através da coluna, a mesma foi lavada três vezes com 3 mL de tampão por vez para retirada do excesso de células não aderidas.

Após as lavagens a coluna foi removida do separador magnético e colocada sobre um tubo cônico estéril. Foi realizada então a eluição das células aderidas na coluna pela adição de 5 mL de tampão com o auxílio de um êmbolo próprio.

As células foram novamente quantificadas em câmara de Neubauer como descrito anteriormente. Uma alíquota de 5×10^5 células para cada indivíduo foi utilizada para verificação do grau de pureza da separação magnética, por citometria de fluxo, como demonstrado na figura 3.

5.9. Teste de Viabilidade Celular

Para avaliação da viabilidade celular, utilizamos o ensaio de redução de resazurina. A resazurina é um composto azul e não fluorescente, mas quando metabolizado pela célula ou pela bactéria, sofre redução enzimática originando um composto fluorescente e de

coloração rosa (Page, Page et al. 1993). Para tanto, foram distribuídos 1×10^5 monócitos em placa de 96 poços, incubados à 37 °C, em estufa nas condições de 5% de CO₂, por 18 horas, e então foram infectadas com *Salmonella* Enteritidis em um MOI (Multiplicity of infection) 100, ou seja, 100 bactérias para cada célula, utilizando o antibiótico na concentração de 50 µg/mL. À cultura de células foi adicionada resazurina (Resazurin Sodium Salt – Sigma Aldrich) na concentração de 50 µg/mL em cada poço e a placa, protegida da luz, foi incubada por 7 horas à 37 °C, em estufa nas condições de 5% de CO₂. Após a incubação, a placa foi avaliada em fluorímetro de placa (SpectraMax Paradigm Multi-mode detection platform, Molecular Devices) com excitação à 560 nm e emissão à 590 nm.

Para controle positivo alguns poços contendo apenas células não receberam nenhum tipo de estímulo, sendo assim, deveriam permanecer viáveis, e como controle negativo da viabilidade celular, alguns poços tiveram suas células lisadas pela adição de saponina (Saponin from Quilaja Bark – Sigma) na concentração de 0,05 µg/mL. Além de testar se a bactéria teve efeito citotóxico, foi testado também se apenas o antibiótico teve algum tipo de efeito citotóxico, para isso alguns poços sem estímulo receberam apenas a mesma concentração de antibiótico utilizada nos demais (Figura4).

5.9.1. Fagocitose

Foram dispostas 1×10^5 células CD14+ por poço, em placa de 96 poços, diluídas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma), com 10mg/L de antibiótico Penicilina e Estreptomicina (Pen-Strep - Gibco). A placa foi incubada por 18 horas, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C para aderência das células à placa.

Após a incubação, foram infectadas com *Salmonella* Enteritidis com MOI 100. A bactéria foi diluída até concentração ideal utilizando meio RPMI juntamente com antibiótico Cloranfenicol na concentração de 50 µg/mL e adicionado 100 µL por poço. Em poços controle não foram adicionadas as bactérias.

Após a infecção das células a placa foi incubada por 30 minutos (tempo necessário para a fagocitose dessa bactéria) em estufa a 37°, 5% CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi removido e todos os poços foram lavados com PBS estéril duas vezes, para garantir a remoção das bactérias não fagocitadas.

Nos poços em que as células foram infectadas foram adicionados 200 µL de saponina 0,05% filtrada. A saponina rompe a membrana das células eucarióticas, porém não consegue romper a membrana da bactéria. Assim, a fluorescência detectada será a emitida pelas bactérias que foram fagocitadas.

O controle negativo foi composto de células não infectadas e lisadas pela adição de saponina. O controle positivo, do número de bactérias adicionados à cultura, constitui de poços apenas com a bactéria em MOI 100. Controles internos do experimento foram inseridos, como células não lisadas, poços apenas com meio RPMI incompleto ou com saponina.

Após o processo, em todos os poços foi adicionada a solução de resazurina, na concentração de 50 µg/mL e a placa foi incubada em estufa com atmosfera a 5% de CO₂, à 37°C por 7 horas, protegida da luz, para a metabolização da resazurina.

Após a incubação, a placa foi avaliada em fluorímetro de placa (SpectraMax Paradigm Multi-mode detection platform, Molecular Devices) com excitação à 560 nm e emissão à 590 nm

5.9.2. Atividade Microbicida

O ensaio de atividade microbicida foi realizado nas mesmas condições do ensaio de fagocitose. Após a incubação de 30 minutos, suficientes para a fagocitose, o sobrenadante foi removido e todos os poços foram lavados com PBS estéril duas vezes, para a remoção das bactérias não fagocitadas, foram então adicionados 100 µL de meio RPMI sem antibiótico e a placa foi novamente incubada em estufa por mais 90 minutos.

Após o tempo de incubação necessário para que as células exerçam sua função microbicida, a placa foi retirada da estufa, o sobrenadante de todos os poços foi retirado e naqueles em que as células foram infectadas adicionaram-se 200 µL de saponina 0,05% filtrada. Assim, a fluorescência detectada foi a emitida pelas bactérias que foram fagocitadas e permaneceram viáveis mesmo após a função microbicida dos monócitos.

O controle negativo foi composto de células não infectadas e lisadas pela adição de saponina. O controle positivo, do número de bactérias adicionados à cultura, foi constituído de poços apenas com a bactéria em MOI 100. Controles internos do experimento foram inseridos, como células não lisadas, poços apenas com meio RPMI incompleto ou com saponina.

Após o processo, em todos os poços foi adicionada a solução de resazurina, na concentração de 50 µg/mL e a placa foi incubada em estufa com atmosfera a 5% de CO₂, à 37°C por 7 horas, protegida da luz, para a metabolização da resazurina.

Após a incubação, a placa foi avaliada em fluorímetro de placa (SpectraMax Paradigm Multi-mode detection platform, Molecular Devices) com excitação à 560 nm e emissão à 590 nm

5.9.3. Dosagem de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) por quimiluminescência

Para a dosagem de espécies reativas de oxigênio, foram utilizados 2×10^5 monócitos de cada indivíduo, os quais foram separados em dois tubos de vidro, sendo 1×10^5 células por tubo. O primeiro tubo correspondendo à produção espontânea de EROs pelas células sem a adição de nenhum tipo de estímulo, o segundo tubo correspondendo à produção máxima de espécies reativas de oxigênio, quando as células foram estimuladas com Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA – Sigma Aldrich).

O composto utilizado para detecção foi o Luminol (Sigma Aldrich), que interage com todas as espécies reativas de oxigênio que são geradas pelas células, o que torna a molécula eletronicamente excitada, permitindo a detecção de quimiluminescência pela formação de fótons que foram detectados por auxílio do equipamento luminômetro (AutoLumat LB 953 Multi-Tube Luminometer from Berthold).

5.9.4. Preparo das amostras de plasma e sobrenadante para dosagem de citocinas e quimiocinas

Após a obtenção das amostras de sangue, as mesmas foram centrifugadas na rotação de 400 g por 10 minutos em temperatura ambiente para a separação do plasma, que foi armazenado em freezer a -20°C até o momento do uso. No momento do experimento, o plasma foi descongelado e centrifugado a 1000 g por 5 minutos.

Para a obtenção do sobrenadante de cultura, foram distribuídos 1×10^5 monócitos CD14+ em meio RPMI com 10mg/L do antibiótico Pen-Strep em cada poço de placas de 96 poços e estas foram incubadas em estufa por 18 horas. Em seguida, às células foram acrescentadas as bactérias mortas por calor (MOI 100), sendo que os poços de controles negativos foram mantidos sem o estímulo. Novamente a placa foi incubada em estufa por 24 horas. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -20°C para posterior uso na quantificação de citocinas e quimiocinas e também na dosagem da produção de óxido nítrico.

5.9.5. Dosagem de Óxido Nítrico

A dosagem de óxido nítrico foi realizada no sobrenadante de cultura após os monócitos CD14+ serem ou não estimulados por 24 horas com *Salmonella* Enteritidis morta.

A detecção da produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada através da dosagem de nitrito (NO_2^-) pelo método de Greiss. Para a dosagem de nitrito, 100 μL da amostra foram distribuídos em placas de 96 poços e foram adicionados 100 μL do reagente de Greiss contendo uma parte da solução estoque de NEED à 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) e uma parte da solução estoque de sulfanilamida à 1% em ácido fosfórico (H_3PO_4). Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a D.O. foi obtida em leitor de microplacas em filtro de 540 nm (Metertech Inc., modelo 960). Para análise quantitativa das amostras, foi construída na mesma placa a curva padrão em concentrações variando entre 200 a 3 μM de nitrito de sódio. A quantidade de nitrito das amostras foi correlacionada aos valores de absorbância obtidos na curva padrão (Stuehr, Gross et al. 1989).

5.9.6. Quantificação da produção de citocinas e quimiocinas

Foi avaliada a produção das citocinas [IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IL-4, IFN- α 2, IFN- γ , IP-10 (CXCL10), TNF- α , RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL2)] no plasma e no sobrenadante de cultura de células estimuladas ou não com *Salmonella* Enteritidis morta por calor, através da plataforma multiplex Magpix, seguindo as instruções dos kits de microesferas magnéticas. De forma geral, as amostras foram adicionadas a placas de 96 poços, próprias para o ensaio e diluídas em tampão fornecido no kit. Em seguida, adicionaram-se as microesferas fluorescentes recobertas por anticorpos de captura específicos. Após período para ligação com os respectivos analitos, foram adicionados anticorpos biotinilados e estreptoavidina-PE. Nessa etapa, as microesferas passam pelo equipamento, o qual emite um feixe de laser que excita as moléculas fluorescentes e um segundo laser excita o complexo estreptoavidina-PE. Para detectar o conjunto de informações geradas, o *software* desta plataforma identifica cada microesfera e quantifica a fluorescência emitida, sendo estes valores associados à quantidade de analito presente na amostra.

5.9.7. Análises Estatística

A comparação das médias entre os grupos (Grupo controle, grupo HIV e grupo HIV+TARV) para os dados de fagocitose, atividade microbicida e dosagem de espécies reativas de oxigênio foram realizadas pelo PROC GLM (SAS, 2008). O modelo estatístico utilizado nas análises incluiu os efeitos de grupo de indivíduos (Grupo controle, grupo HIV e grupo HIV+TARV) e sexo. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Os valores das citocinas do plasma foram transformados para Log10, a fim de se obter uma distribuição normal dos dados para que pudessem ser analisados, enquanto que as análises de citocinas do sobrenadante foram feitas utilizando os dados em *fold change* em relação às células não estimuladas. As correlações de Spearman entre as citocinas do plasma e de sobrenadantes foram realizadas utilizando-se o PROC CORR (SAS, 2008). Foram considerados significativos *p value* menor que 0,05.

6. Resultados

Determinação da concentração bacteriostática do antibiótico Cloranfenicol

Foram testadas quatro concentrações diferentes do antibiótico Cloranfenicol para verificar qual delas possuía efeito bacteriostático. À cultura de células foi adicionado o antibiótico cloranfenicol e em seguida as células foram infectadas com *Salmonella* Enteritidis, neste momento, foi realizada a leitura da densidade óptica e uma alíquota de cada poço foi plaqueado para contagem das unidades formadoras de colônia e o mesmo foi feito também após 24 horas. Como observamos na figura 2, nas concentrações de 70 µg/mL e 60 µg/mL houve morte da população bacteriana, na concentração de 50 µg/mL não houve alteração significativa do crescimento bacteriano, enquanto que na concentração de 40 µg/mL houve proliferação da população bacteriana. Sendo assim a concentração de escolha do antibiótico foi de 50 µg/mL.

Figura 2. Avaliação da proliferação bacteriana após uso do antibiótico Cloranfenicol. *Salmonella* enteritidis foi cultivada em caldo BHI e então foram testadas várias concentrações do antibiótico cloranfenicol, para avaliar qual a melhor concentração para inibir a replicação bacteriana. A concentração escolhida para uso foi 50 µg/mL.

Determinação da pureza da população de monócitos obtida após separação por *microbeads* magnéticas

O PMBC foi separado pelo uso de *microbeads* magnéticas conjugadas com anticorpos anti-CD14+ para purificar monócitos. Após esse processo, foi realizada a citometria de fluxo para avaliar a pureza dessas células.

Figura 3. Avaliação da pureza de células CD14+ separadas por *microbeads* magnéticas. Representação da população celular de um indivíduo analisada por citometria de fluxo. Foram obtidos um total de 20.000 eventos (A), e feita uma separação para monócitos representado por P1, que correspondeu a 99,3% de células CD14+ (B) e considerando o total de eventos obtidos, a pureza de células CD14+ foi de 96,7% (C).

Avaliação da viabilidade celular após infecção e tratamento com antibiótico

As células foram infectadas com a bactéria, ou apenas foi adicionada a concentração de uso do antibiótico e foi então incubado por 7 horas e a viabilidade celular foi avaliada pela metabolização da resazurina. Observamos que nem a bactéria nem o antibiótico possuem efeito citotóxico sobre as células no período máximo do ensaio realizado por nós.

Figura 4. Avaliação da influência da infecção por bactéria *Salmonella* Enteritidis e da ação direta do antibiótico Cloranfenicol na viabilidade celular. A quantidade de bactérias e a concentração de antibiótico utilizados nos ensaios não induziram efeito citotóxico sobre os monócitos, durante o período utilizado nos ensaios.

Descrição da formação dos grupos incluídos na pesquisa

Como observa-se na Tabela 1, os pacientes foram agrupados em três categorias de acordo com a variável de infecção pelo HIV. O grupo controle foi constituído por indivíduos não infectados pelo vírus, enquanto o grupo HIV foi composto por indivíduos infectados pelo HIV, porém sem uso de terapia antirretroviral. O outro grupo, identificado como HIV+TARV, foi formado por indivíduos HIV+ sob terapia antiretroviral há mais de seis meses. Na tabela também estão descritas as características de cada grupo em relação à idade, sexo, contagem de células TCD4+ e quantificação de carga viral.

Tabela 1. Características dos grupos de estudo.

	Controle	HIV	HIV + TARV
Idade	35,9 ± 10,46	38,41± 9,32	43,95 ± 8,08
Feminino	8	2	6
Masculino	12	11	14
Contagem TCD4+	-	593,75 ± 364,13	401,6 ± 236,99
Carga Viral	-	35441,5 ± 42187,0347	9076,85 ± 29090,98

As subpopulações de monócitos mantiveram-se regularmente distribuídas em indivíduos infectados pelo HIV

Monócitos tem sido divididos em três categorias, de acordo com a expressão de CD14 e CD16. Monócitos clássicos são aqueles CD14+CD16-, enquanto os chamados não clássicos são os que expressam CD14-CD16+, e a terceira classe é composta por monócitos que expressam CD14+CD16+ e são ditos como progressores para infecção HIV (Gama, Shirk et al. 2012).

Na figura 5 podemos observar que as três subpopulações de monócitos estão distribuídas da mesma forma entre os grupos, sugerindo neste caso que a infecção pelo HIV parece não alterar o subtipo de monócito circulante durante a infecção.

Figura 5. Análise da frequência dos subtipos de monócitos na população de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes HIV+ virgens de tratamento ou em uso regular de TARV. As células mononucleares do sangue periférico foram marcadas com anticorpos específicos anti-CD14-PerCP e anti-CD16-PE e adquiridas em citômetro de fluxo (20.000 eventos). A frequência das subpopulações refere-se a porcentagem de cada subpopulação dentro da gate de monócitos. Grupo controle (n=12), grupo HIV (n=5) e grupo HIV+TARV (n=12).

A infecção pelo HIV não altera funções efetoras de monócitos, como a fagocitose e a atividade microbicida

Com o objetivo de verificar se a infecção pelo HIV altera funções essenciais dos monócitos, como a fagocitose e a atividade microbicida, estas células foram infectados com *Salmonella Enteritidis* (MOI 100).

Na Figura 6A estão ilustradas as representações gráficas da quantidade de bactérias no meio intracelular durante os períodos determinados para cada ensaio. Na figura 6B, mostramos a representação do índice fagocítico dos grupos, em relação ao grupo controle, enquanto que na figura 6C mostramos a porcentagem de atividade microbicida de todos os grupos em relação à fagocitose em todos os grupos.

Como podemos observar, a distribuição dos dados entre os grupos foi muito semelhante tanto para fagocitose, quanto para a atividade microbicida, de forma que considerando apenas os valores obtidos nas leituras, não foi possível observar diferença estatística entre eles. Entretanto, outras variáveis como sexo e idade podem ser consideradas quando avaliamos as populações humanas. Desta forma, observamos que quando incluímos a idade como variável, o resultado não foi alterado, ou seja a idade parece não ser um fator limitante na capacidade fagocítica ou microbicida (dados não mostrados). Porém, quando o gênero dos indivíduos foi incluído como variável, observamos que a fagocitose foi diferente entre o grupo HIV e o grupo HIV + TARV, porém não houve diferença na atividade microbicida entre os grupos (Tabela 2).

Para entender as diferenças obtidas na tabela anterior, separamos os grupos masculino e feminino e fizemos outra análise para verificar qual sexo teria maior atividade fagocítica. Como observa-se na Tabela 3, indivíduos do sexo masculino infectados com HIV, independente de tratamento, são capazes de fagocitar mais *S. Enteritidis* do que mulheres nas mesmas condições.

Figura 6. Fagocitose e atividade microbica de monócitos de indivíduos controle (Controles), pacientes HIV+ virgens de tratamento (HIV) ou em terapia antirretroviral (HIV + TARV), após infecção por *Salmonella* Enteritidis *in vitro*. Está representada a intensidade de fluorescência da metabolização da resazurina pela *Salmonella* Enteritidis intracelular após 30 minutos (Fagocitose) e 90 minutos (Atividade microbica) de infecção conforme o grupo. (A) A fagocitose (círculo fechado) e a atividade microbica das células (triângulos), foram analisadas por teste de redução da resazurina após 7 horas de metabolização posteriores aos tempos de infecção, e analisados em fluorímetro. Os gráficos representam média $\pm$ SEM de Unidades Relativas de Fluorescência (RFU). B) Porcentagem do índice fagocítico dos monócitos de pacientes HIV e HIV+TARV relativo aos indivíduos Controle C) Porcentagem da atividade microbica relativa à fagocitose dos monócitos de indivíduos Controle, HIV e HIV+TARV.

Tabela 2. Representação das médias de fagocitose e atividade microbicida ajustadas para os efeitos de grupo e gênero.

Grupos	FAGOCITOSE	ATIVIDADE MICROBICIDA
HIV	1,35 ± 0,33 ^A	27,13% ± 24,57 ^A
HIV + TARV	1,57 ± 0,25 ^B	17,25% ± 19,16 ^A
Controle	1,25 ± 0,25 ^{A,B}	46,52% ± 19,20 ^A

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (5,0%).

Tabela 3. Médias de fagocitose ajustadas para gênero entre os grupos.

Fagocitose				
	HOMEM		MULHER	
	Replicatas	Média ± erro padrão	Replicatas	Média ± erro padrão
Grupo Controle	41	0,82 ± 0,34 ^A	27	1,73 ± 0,27 ^A
Grupo HIV	34	2,10 ± 0,52 ^A	9	0,09 ± 1,02 ^B
Grupo HIV+ARV	49	2,10 ± 0,21 ^A	21	1,11 ± 0,32 ^B

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste Tukey (5,0%).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou Nitrogênio (NO) não foi alterada pela infecção com HIV

Um dos principais mecanismos de morte utilizados por monócitos para a eliminação de patógenos é a produção de espécies reativas de oxigênio. Portanto, monócitos foram ou não estimulados com PMA e a detecção foi realizada por quimiluminescência.

Podemos observar na figura 7 que monócitos estimulados com PMA aumentam consideravelmente sua capacidade de produzir EROs, entretanto, esse aumento ocorre da mesma forma para os três grupos, independente da infecção pelo vírus ou tratamento com TARV. Assim, os três grupos mantiveram o mesmo padrão de produção de EROs, quando estimulados ou não com PMA.

Além das espécies reativas de oxigênio, sabemos que outro produto celular, envolvido na morte de patógenos pelos monócitos é o óxido nítrico, e haja visto que a produção de EROs não é modificada pela infecção pelo HIV, avaliamos se a produção deste composto é alterada. Para isso, monócitos foram estimulados com *S. Enteritidis* morta por 24 horas e o sobrenadante utilizado para a dosagem de nitrito. De acordo com a figura 8, podemos verificar que a liberação de NO^{2-} por monócitos humanos de indivíduos controle ou infectados pelo HIV, mantiveram-se abaixo do nível de detecção da técnica utilizada.

Figura 7. Quantificação de espécies reativas de oxigênio liberadas por monócitos de indivíduos controle ou HIV+ virgens de tratamento (HIV) ou em terapia antirretroviral (HIV+TARV) após estímulo com PMA. Após separação magnética, 1×10^5 monócitos CD14+, foram separados em tubos e a eles foi adicionado luminol ($10^{-4}M$) e PMA ($10^{-7}M$). Imediatamente após estimulação os tubos foram submetidos à leitura de quimiluminescência em luminômetro. Os resultados são expressos em área sob a curva de quimiluminescência do Luminol em monócitos após 3500 segundos de leitura.

Figura 8. Liberação de nitrito no sobrenadante de cultura de monócitos estimulados com *S. Enteritidis* morta. 1×10^5 monócitos foram cultivados por 18 horas e então estimulados ou não com *Salmonella* Enteritidis morta por 24 horas então o sobrenadante foi retirado e utilizado para a mensuração de nitrito pelo método de Greiss.

Avaliação de citocinas e quimiocinas presentes no plasma

Considerando a modulação imune sistêmica causada pela infecção por HIV, o perfil de citocinas no plasma de indivíduos infectados ou não pelo HIV foi avaliado e comparado ao perfil de indivíduos controle.

Como pôde-se observar na Figura 9, houve aumento considerável na concentração de IL-12p70 e IL-6 no grupo HIV + TARV em relação ao grupo controle. Além disso, pôde-se observar um aumento na liberação de IL-5 no grupo HIV+TARV em relação ao grupo HIV, e aumento de IP-10 pelo grupo HIV em relação aos grupos HIV+TARV e controle. O TNF- α também foi detectado em maiores concentrações no grupo HIV em relação aos grupos HIV+TARV e Controle, sendo que o tratamento com TARV também induziu aumento na liberação desta citocina em relação ao grupo controle.

Como a população humana é muito heterogênea e diversos fatores clínicos podem influenciar na interpretação dos dados, foi importante analisarmos a produção de citocinas à luz das conhecidas características clínicas de nossos pacientes. Assim, também foram feitas correlações entre todas as citocinas, a carga viral e o número de células TCD4+ dos indivíduos. Foram ainda correlacionadas as citocinas entre si, visto que a resposta imune é caracterizada pela intensa interação celular, que é orquestrada pela combinação de citocinas liberadas pelas células do sistema imune.

De acordo com a tabela 4, podemos observar no grupo HIV que a quimiocina IP-10 está correlacionada com carga viral (CV) e contagem de CD4+, visto que essa correlação é negativa entre a quimiocina e a contagem de CD4+, de forma que quando a contagem de CD4+ diminui, a produção de IP-10 aumenta. De forma oposta, a correlação é positiva entre IP-10 e a carga viral, visto que quando uma aumenta, a outra também é elevada. Além disso a quimiocina RANTES também está positivamente correlacionada com a carga viral.

Já no grupo HIV+TARV, nenhuma citocina avaliada correlaciona-se com CD4 e carga viral. Este fato deve-se ao controle da expansão viral neste grupo e consequente restabelecimento do número de células CD4, como visto na tabela.

Além disso, podemos notar que correlações diferentes são formadas entre as citocinas dos três grupos de indivíduos, verificamos que as correlações entre os grupos HIV+TARV são semelhantes às correlações do grupo controle, enquanto que, poucas correlações são formadas pelo grupo HIV, além disso, quando atentamos para o grupo HIV+TARV, notamos que novas correlações são formadas entre as citocinas, que são diferentes também do grupo controle, sugerindo que uma pequena alteração na produção de uma ou mais citocinas, pode influenciar a resposta sistêmica que por sua vez pode influenciar na produção de outras citocinas modulando o perfil de resposta de cada indivíduo.

No grupo controle, nenhuma correlação é formada com a citocina TNF- α , enquanto que no grupo HIV+TARV, a citocina TNF- α está positivamente correlacionada com IFN- α 2, IL-1 β , IFN- γ e IL-4, e no grupo HIV a correlação ocorre com a carga viral (CV) e a contagem de CD4.

Notamos também que a citocina IFN- α 2 no grupo controle correlaciona-se positivamente apenas com IP-10, enquanto que no grupo HIV+TARV a correlação é positiva para IL-12p70, IL-10, IL-1 β , IFN- γ e IL-4, enquanto no grupo HIV o IFN- α 2 correlaciona-se apenas com MCP-1.

Em relação à IFN- γ notamos que no grupo controle há correlação com IFN- α 2, IL-12p70, IL-6, IL-5, IL-1 β , e IL-4. No grupo HIV+ TARV esta citocina correlaciona-se com TNF-

α , IFN- α 2, IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-5, IL-1 β , e IL-4, porém no grupo HIV a correlação ocorre apenas com MCP-1, IFN- α 2 e IL-6.

Nos grupos controle e HIV+TARV, a IL-1 β está positivamente correlacionada com TNF- α , IFN- α 2, IL-12p70 e IL-6, enquanto no grupo HIV a correlação é feita apenas com IL-12p70, IL-10 e IL-6.

A IL-6 correlaciona-se positivamente no grupo controle com IFN- α 2 e IL-12p70, no grupo HIV+TARV com IL-1 β e IFN- γ e no grupo HIV apenas com IL-12p70.

A IL-12p70 no grupo controle correlaciona-se apenas com IFN- α 2, enquanto que no grupo HIV+TARV a correlação ocorre com IFN- α 2, IL-10, IL-6, IL-5, IL-1 β , IFN- γ e IL-4 e no grupo HIV a IL-12p70 correlaciona-se com IL-6, IL-5, IL-1 β .

Além disso, também observamos que no grupo controle a IL-5 correlaciona-se positivamente com IP-10 e IL-12p70, no grupo HIV+TARV não é observada nenhuma correlação com IL-5, enquanto que no grupo HIV há correlação com a IL-12p70.

Outra citocina que está positivamente correlacionada é a IL-4 que no grupo controle correlaciona-se apenas com IL-10 e IL-6, enquanto no grupo HIV+TARV a correlação ocorre com TNF- α , IFN- α 2, IL-12p70, IL-10, IL-1 β , IFN- γ , porém nenhuma correlação se formou com IL-4 no grupo HIV.

Uma rede de correlações ocorreu apenas no grupo HIV+TARV com a IL-10 que está correlacionada com IL-5, IL-1 β , IFN- γ e IL-4.

Figura 9. Quantificação de citocinas no plasma de indivíduos Controle e de pacientes HIV+ virgens de tratamento ou em uso regular de terapia antirretroviral. O plasma foi separado através de centrifugação do sangue total e foi congelado e estocado. No momento da quantificação, o plasma foi submetido a centrifugação e o sobrenadante utilizado no ensaio. As citocinas e quimiocinas foram dosadas utilizando-se beads magnéticas dos kits MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine (Millipore) e o equipamento MagPix para leitura e análise dos dados. Os resultados estão expressos em pg/mL e as barras representam o desvio padrão de cada grupo * $p < 0,05$ Grupo controle VS grupo HIV+TARV; # $p < 0,05$ grupo HIV+TARV VS grupo HIV.

Tabela 4. Correlações entre citocinas presentes no plasma. Para fazer as correlações, todos os valores foram normalizados em Log10 e foi utilizado a correlação de Spearman. Em verde estão representadas as correlações formadas pelo grupo controle, enquanto em vermelho estão representadas as correlações perdidas em relação àquelas formadas pelo grupo controle e em amarelo, as correlações formadas pelos grupos infectados pelo HIV (independente de tratamento), porém não vistas no grupo controle.

Grupo Controle

TNF- α	IFN- α 2	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-12p70
			TNF- α		
	IP-10	IP-10			
		IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2
		IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	
		IL-10			
		IL-6	IL-6		IL-6
		IL-5			IL-5
		IL-1 β		IL-1 β	IL-1 β
				IFN- γ	IFN- γ
		IL-4		IL-4	

Grupo HIV

TNF- α	IFN- α 2	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-12p70
			TNF- α		
	MCP-1	MCP-1			
IP-10	IP-10	IP-10			
	IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2
		IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	
		IL-10	IL-10		
		IL-6	IL-6		IL-6
		IL-5			IL-5
		IL-1 β		IL-1 β	IL-1 β
				IFN- γ	IFN- γ
		IL-4		IL-4	

Grupo HIV+TARV

TNF- α	IFN- α 2	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-12p70
	TNF- α	TNF- α	TNF- α		TNF- α
	IP-10	IP-10			
IFN- α 2		IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2
IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	
	IL-10	IL-10	IL-10		IL-10
		IL-6	IL-6		IL-6
		IL-5	IL-5		IL-5
IL-1 β	IL-1 β	IL-1 β		IL-1 β	IL-1 β
IFN- γ	IFN- γ			IFN- γ	IFN- γ
IL-4	IL-4	IL-4	IL-4	IL-4	IL-4

Estímulo *in vitro* de monócitos CD14+ com *S. Enteritidis* morta, induz modulação na correlação de citocinas e quimiocinas avaliadas no sobrenadante

A dosagem de citocinas foi realizada com o intuito de avaliar se a infecção pelo vírus HIV altera a produção de citocinas por monócitos, quando estes são infectados por outro patógeno, considerado oportunista.

Na figura 10, estão representados para cada grupo o quanto cada citocina e quimiocina teve sua produção aumentada após ser estimulada com as bactérias, em relação à liberação das citocinas por monócitos não estimulados com a bactéria. Portanto, os dados estão expressos na forma de *fold change* em relação às células não estimuladas. Por esta análise, houve redução na capacidade de síntese de IL-10 por monócitos do grupo HIV+TARV em relação aos do grupo controle (Figura 10L).

Assim como foi importante realizarmos as correlações entre as citocinas liberadas no plasma dos indivíduos, os mediadores imunológicos liberados em cultura pelos monócitos também passaram por este tipo de avaliação.

O mesmo efeito observado na correlação das citocinas plasmáticas foi constatado no sobrenadante de cultura de monócitos estimulados com *S. Enteritidis*. A rede de correlações formadas entre os grupos controle e HIV+TARV são semelhantes, entretanto, para este último grupo, novas correlações não existentes no primeiro grupo podem ser observadas, enquanto que o grupo HIV possui poucas correlações entre as citocinas, sugerindo mais uma vez que, apesar de não serem estatisticamente diferentes entre os grupos, uma pequena alteração na produção de algumas citocinas pode ter um efeito biológico considerável. Esta ausência de correlações positivas no grupo HIV é totalmente coerente com o perfil imunossupressor da doença.

A produção de TNF- α por monócitos de indivíduos controle bem como de indivíduos do grupos HIV+TARV correlacionou-se positivamente com a liberação de RANTES, MCP-1, IP-10, IFN- α 2, IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-5, IL-1 β e IFN- γ , sugerindo que o tratamento dos pacientes com TARV foi importante para restabelecer a capacidade dos monócitos de produzirem estas citocinas. Entretanto, para o grupo controle foi observado também a correlação de TNF- α com IL-4, sendo que para o grupo HIV+TARV essa correlação não foi observada. No entanto, quando avaliamos monócitos do grupo HIV, a única citocina que se correlaciona com a produção de TNF- α é a IL-6.

Também para os grupos controle e HIV+TARV há uma correlação positiva de IFN- α 2 com a produção de TNF- α , RANTES, MCP-1, IP-10, IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-5, IL-1 β e IFN- γ , sendo que mais uma vez foi observada uma correlação entre IFN- α 2 e IL-4 apenas no

grupo controle. Entretanto, no grupo HIV, IFN- α 2 correlacionou-se positivamente apenas com RANTES, IP-10, IL12p70, IL-5 e IFN- γ .

Correlações semelhantes também ocorreram entre o grupo controle e o grupo HIV+TARV em relação ao IFN- γ , que está positivamente correlacionado em ambos os grupos com TNF- α , RANTES, IFN- α 2, IL-12p70, IL-10, IL-5 e IL-1 β , entretanto, correlações com MCP-1 e IL-6 foram observadas para o grupo HIV+TARV, mas não para o grupo controle. No entanto, para o grupo HIV, a citocina IFN- γ correlacionou-se positivamente apenas com RANTES, IP-10, TNF- α e IL-12p70.

Para a IL-1 β no grupo controle houve correlação positiva com TNF- α , MCP-1, IFN- α 2, IL-12p70, IL-10 e IL-6, enquanto que no grupo HIV+TARV houve correlação de IL-1 β com TNF- α , MCP-1, IFN- α 2, 12p70, IL-6, IL-5 e IFN- γ , e no grupo HIV, IL-1 β correlacionou-se apenas com RANTES e IFN- γ .

A IL-6 também está positivamente correlacionada no grupo controle com TNF- α , IP-10, IFN- α 2, IL-12p70, IL-6, IL-5 e IFN- γ , porém no grupo HIV+TARV essa correlação aconteceu com TNF- α , RANTES, MCP-1, IP-10, IL-12p70, IL-10, IL-5, IL-1 β , IFN- γ e IL-4, enquanto que para o grupo HIV houve correlação de IL-6 apenas com TNF- α e IL-10.

Correlações positivas também foram formadas para IL-12p70, no grupo controle observamos que esta citocina correlaciona-se com TNF- α , RANTES, MCP-1, IP-10, IFN- α 2, IL-10, IL-6, IL-5, IL-1 β , IFN- γ e IL-4, porém no grupo HIV+TARV, IL-12p70 correlaciona-se apenas com TNF- α , RANTES, MCP-1, IP-10, IFN- α 2, enquanto que no grupo controle a correlação ocorre com RANTES, IP-10, IFN- α 2, IL-5 e IFN- γ .

Contudo, apesar do tratamento restabelecer de alguma forma a produção de citocinas, a diferença de correlações positivas entre os indivíduos controle e HIV+TARV concentram-se apenas em determinados pontos, não sendo verdade em outros, como pode ser vista na tabela 6, em amarelo. As duas tabelas superiores demonstram como o tratamento com antirretroviral é capaz de restabelecer a função imune do hospedeiro, visto que a rede de correlações entre citocinas é bastante expandida com o tratamento. Entretanto, as duas tabelas inferiores mostram que nem todas as correlações obtidas no grupo controle são retomadas com o tratamento e que novas correlações aparecem, em especial aquelas correlacionadas à IL12p70, IL-1b e IL-6. Este dado evidencia que a infecção viral, de alguma forma, modifica permanentemente o perfil de ativação celular, uma vez que, mesmo em tratamento, estes pacientes continuam apresentando diferenças funcionais.

A

B

C

D

E

F

Figura 10. Produção de citocinas por monócitos após estímulo *in vitro* com *Salmonella* Enteritidis morta. Os monócitos foram submetidos por 24 horas ao estímulo de *S. Enteritidis* morta (MOI 100). O sobrenadante de cultura foi congelado e estocado. As citocinas e quimiocinas foram dosadas utilizando-se beads magnéticas dos kits MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine (Millipore) e o equipamento MagPix para leitura e análise dos dados. O resultado é expresso em “Fold change” da produção de citocinas por células estimuladas com *Salmonella* Enteritidis em relação às não estimuladas (representadas pela linha contínua nos gráficos).

Tabela 5. Correlação entre citocinas do sobrenadante. A correlação entre as citocinas foi realizada utilizando os valores de *fold change* em relação à produção de citocinas por células não estimuladas com *Salmonella* Enteritidis morta. Foi utilizada a correlação de Spearman. . Em verde estão representadas as correlações formadas pelo grupo controle, enquanto em vermelho estão representadas as correlações perdidas em relação àquelas formadas pelo grupo controle e em amarelo, as correlações formadas pelos grupos infectados pelo HIV (independente de tratamento), porém não vistas no grupo controle.

Grupo Controle					
TNF- α	IFN- α 2	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-12p70
	TNF- α	TNF- α	TNF- α	TNF- α	TNF- α
RANTES	RANTES	RANTES	RANTES		RANTES
MCP-1	MCP-1		MCP-1		MCP-1
IP-10	IP-10	IP-10		IP-10	IP-10
IFN- α 2		IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2
IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	
IL-10	IL-10	IL-10			IL-10
IL-6	IL-6		IL-6	IL-6	IL-6
IL-5	IL-5	IL-5		IL-5	IL-5
IL-1 β	IL-1 β	IL-1 β			IL-1 β
IFN- γ	IFN- γ			IFN- γ	IFN- γ
IL-4	IL-4				IL-4

Grupo HIV					
TNF- α	IFN- α 2	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-12p70
	TNF- α	TNF- α	TNF- α	TNF- α	TNF- α
RANTES	RANTES	RANTES	RANTES	RANTES	RANTES
MCP-1	MCP-1		MCP-1		MCP-1
IP-10	IP-10	IP-10		IP-10	IP-10
IFN- α 2		IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2
IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	
IL-10	IL-10	IL-10		IL-10	IL-10
IL-6	IL-6		IL-6	IL-6	IL-6
IL-5	IL-5	IL-5		IL-5	IL-5
IL-1 β	IL-1 β	IL-1 β			IL-1 β
IFN- γ	IFN- γ		IFN- γ	IFN- γ	IFN- γ
IL-4	IL-4				IL-4

Grupo HIV+TARV					
TNF- α	IFN- α 2	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-12p70
	TNF- α	TNF- α	TNF- α	TNF- α	TNF- α
RANTES	RANTES	RANTES	RANTES	RANTES	RANTES
MCP-1	MCP-1	MCP-1	MCP-1	MCP-1	MCP-1
IP-10	IP-10	IP-10		IP-10	IP-10
IFN- α 2		IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- α 2
IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	IL-12p70	
IL-10	IL-10	IL-10		IL-10	IL-10
IL-6	IL-6	IL-6	IL-6		IL-6
IL-5	IL-5	IL-5	IL-5	IL-5	IL-5
IL-1 β	IL-1 β	IL-1 β		IL-1 β	IL-1 β
IFN- γ	IFN- γ		IFN- γ	IFN- γ	IFN- γ
IL-4	IL-4			IL-4	IL-4

7. Discussão

Fagócitos mononucleares contribuem para a patogênese da infecção pelo HIV-1. Células como macrófagos derivados de monócitos, monócitos do sangue periférico e macrófagos alveolares quando infectadas pelo HIV-1, apresentam debilidade em funções efetoras, como a fagocitose, atividade microbida e produção de citocinas (Delemarre, Stevenhagen et al. 1995; Kedzierska, Mak et al. 2001). De acordo com alguns marcadores de membrana, como CD14 e CD16, podemos caracterizar 3 diferentes populações de monócitos presentes no sangue. Dessa forma, monócitos CD14⁺CD16⁻ foram designados como monócitos clássicos ou inflamatórios e estão expressos normalmente durante a infecção pelo HIV. A população de monócitos CD14⁺CD16⁺ é dita como não clássica ou pró-inflamatória e foi descrito o aumento desta população durante a infecção pelo HIV. A terceira população, que pode ser definida como CD14⁻CD16⁺ ou CD14^{LOW}CD16^{HIGH}, está por sua vez, relacionada com a progressão da infecção, e está aumentada nos estágios mais tardios da infecção (Dutertre, Amraoui et al. 2012; Ansari, Meyer-Olson et al. 2013). Já foi descrito ainda que durante a infecção pelo HIV, a circulação das subpopulações de monócitos é alterada, predominando uma população diferente em cada estágio da infecção (Dutertre, et al, 2013). Em nosso estudo, o fenótipo das subpopulações de monócitos não mostrou-se alterado entre os diferentes grupos, o que poderia ser explicado de acordo com o estágio da infecção de cada indivíduo incluído na pesquisa. Uma análise com mais indivíduos por grupo experimental poderia ser útil nesta caracterização.

Como é possível observar na tabela 2, as médias de fagocitose entre o grupo HIV e o grupo controle são bem próximas, não apresentando alteração significativa entre elas, de modo que a capacidade fagocítica dos monócitos dos sujeitos desses dois grupos é muito semelhante, sugerindo não haver deficiência na função efetora de fagocitose desta célula em indivíduos infectados pelo HIV. Tal assunto é muito controverso, visto que alguns autores mostram debilidade das funções efetoras dos fagócitos mononucleares, outros mostram aumento da capacidade fagocítica dessas células e outros, ainda, afirmam que essa função não é alterada pela infecção com o HIV-1 (Nottet, de Graaf et al. 1993; Kedzierska, Churchill et al. 2003). Ainda de acordo com os resultados de fagocitose apresentados na tabela 2, observamos que o grupo HIV+TARV tem uma média de fagocitose maior que os outros grupos, sendo significativo apenas em relação ao grupo HIV, sugerindo em nosso modelo experimental, que quando os indivíduos fazem uso regular de TARV, a função fagocítica de seus monócitos é aumentada melhorando a capacidade dos monócitos de responderem à patógenos oportunistas. Fato corroborado por alguns autores, que observaram que o uso regular da terapia antiretroviral é capaz de recuperar a competência do sistema imune (Mastroianni, Lichtner et al. 1999; Pugliese, Vidotto et al. 2005; Usuga, Montoya et al. 2008).

Entretanto, quando adicionamos às análises a variável sexo (Tabela 3), observamos que indivíduos do sexo masculino infectados pelo HIV apresentam melhor capacidade fagocítica em relação a indivíduos do sexo feminino no mesmo grupo experimental. Observamos ainda que o tratamento com TARV destes indivíduos não influenciou nesta propriedade. Estes dados corroboram com dados da literatura que indicam que hormônios masculinos e femininos podem influenciar a resposta imunológica em diferentes situações (Wira, Fahey et al. 2010; Klein 2012; Zhao, Ying et al. 2012; Markle, Frank et al. 2013; Rodriguez-Garcia, Patel et al. 2013).

Em relação à atividade microbicida, podemos observar ainda na tabela 2, que os três grupos possuem a mesma capacidade de eliminar a bactéria *S. Enteritidis* fagocitada, sugerindo que a infecção pelo HIV, não alterou esta função da célula.

Sabe-se que os fagócitos limitam a replicação de patógenos fagocitados ou causam a morte dos mesmos através da produção de espécies reativas de oxigênio, via NADPH oxidase (phox), ou nitrogênio via óxido nítrico sintase induzido (iNOS) (Vazquez-Torres, Jones-Carson et al. 2000; Vazquez-Torres and Fang 2001; Imlay 2003). Sabe-se ainda que o estresse oxidativo tem um papel importante na patogênese do HIV, agindo sinergicamente com citocinas pró-inflamatórias, de forma que a regulação da produção de EROs por monócitos é dependente do equilíbrio entre a ativação de NADPH oxidase e os níveis de antioxidantes (Elbim, Pillet et al. 1999).

Desta forma, foi então demonstrado que ocorre um desbalanço na produção de EROs em pacientes HIV, por ação de uma proteína viral chamada Tat que induz um aumento de EROs através da geração mitocondrial de ânion superóxido, ativando o fator de transcrição NF- κ B, levando ao aumento da transcrição do HIV. Além disso, foi demonstrado que o uso do tratamento antirretroviral pode causar aumento ainda mais proeminente de EROs, possivelmente pela maior produção de metabólitos oxidados derivados da interação entre EROs e biomoléculas das células infectadas (Hulgan, Morrow et al. 2003; Mandas, Iorio et al. 2009).

Entretanto, esses dados também são muito controversos, uma vez que existem relatos mostrando produção normal de espécies reativas de oxigênio em pacientes HIV+ (Nielsen, Kharazmi et al. 1986; Flo, Naess et al. 1994), e outros mostrando diminuição da produção (Muller, Rollag et al. 1990; Spear, Kessler et al. 1990; Chen, Roberts et al. 1993).

Estas discrepâncias podem ser devido aos diferentes estágios da doença de cada paciente observado, bem como pelo fato de que em cada ensaio, os monócitos foram obtidos do sangue por diferentes procedimentos, bem como devido à utilização de diferentes anticoagulantes na coleta das amostras, que podem alterar a expressão de receptores de

superfície e assim resposta celular (Macey, McCarthy et al. 1995; Torre, Pugliese et al. 2002; De Groote, Ochsner et al. 1997).

Em nossas condições experimentais, observamos que não houve diferença na produção de espécies reativas de oxigênio entre os grupos estudados, nem quando os monócitos foram estimulados com PMA. Desta forma, podemos sugerir que no nosso modelo de estudo, os monócitos de indivíduos saudáveis, de indivíduos HIV+, bem como indivíduos HIV+ com uso regular de antirretroviral apresentam a capacidade de produção EROs de forma semelhante.

Outro composto envolvido nos mecanismos de eliminação dos patógenos por monócitos, é a liberação de óxido nítrico (Jung, Madan-Lala et al. 2013). Para investigarmos se este era um dos mecanismos pelos quais a bactéria estava sendo morta em nosso modelo, avaliamos a produção deste composto através da dosagem de nitrito no sobrenadante de monócitos estimulados com *Salmonella* Enteritidis morta. No entanto, em nossos ensaios não observamos nenhuma detecção do composto, fato intrigante, devido ao importante papel do óxido nítrico no controle de patógenos.

O óxido nítrico é uma molécula biologicamente ativa com papel importante na defesa contra bactérias, protozoários, células tumorais, também possui efeito contra DNA de alguns vírus como *poxvirus* murino, *herpes simplex*, e *Epstein-Barr vírus* e de RNA de outros como *coxsackievirus*. Além disso, uma super produção de NO também foi notada na presença do HIV-1, podendo estar relacionada à demência associada à infecção pelo HIV-1 (Torre, Pugliese et al. 2002). Segundo Blond e colaboradores, o óxido nítrico tem papel essencial na patogênese do HIV e o aumento da sua produção está correlacionada com o aumento da carga viral plasmática (Blond, Raoul et al. 2000).

Apesar do importante papel já descrito do óxido nítrico, alguns autores também mostraram que não conseguiram detectar produção de NO por monócitos humanos ou macrófagos derivados de monócitos, apesar de terem detectado a presença de mRNA e proteína iNOS nas células (Padgett and Pruett 1992; Weinberg, Misukonis et al. 1995). Em trabalhos do nosso grupo, foram avaliados a expressão de mRNA para iNOS, mas não foi detectada a expressão pelos monócitos dos diferentes grupos (dados não mostrados).

Outros dados da literatura mostram que monócitos/macrófagos humanos não possuem atividade de iNOS, sugerindo que o nitrito detectado pode ser oriundo de contaminação por outras fontes celulares (Schneemann, Schoedon et al. 1993; Bogdan 2001; Pfister, Remer et al. 2002; Schneemann and Schoedon 2002; Perez, Chandrasekar et al. 2006). Dessa forma, esses achados, suportam os dados obtidos em nossos ensaios em que usando monócitos humanos, não conseguimos detectar NO.

Além de poder modular a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio o HIV modula a expressão de citocinas produzida por vários tipos celulares, sendo que essas citocinas, podem agir na replicação viral com função estimuladora, inibitória ou ambas (Kedzierska, Crowe et al. 2003).

Em concordância com dados observados por Cozzi-Lepri, constatamos no plasma de pacientes infectados com HIV, aumento nas concentrações de IL-6, TNF- α , IL-10 e IP-10 (CXCL-10), as quais os autores correlacionam com um crítico papel na modulação do sistema imune em resposta ao HIV (Cozzi-Lepri, French et al. 2011)

O TNF- α por exemplo, é uma citocina pró-inflamatória produzida por uma ampla gama de células, incluindo monócitos, e tem como papel na infecção pelo HIV, aumentar a replicação viral através da ativação do fator de transcrição NF- κ B (Griffin, Leung et al. 1991; Armitage 1994; Kedzierska, Crowe et al. 2003).

Considerando isto, vimos que no plasma dos pacientes infectados, houve aumento na produção de TNF- α . Apesar da liberação de TNF- α ter sido maior no grupo HIV+TARV do que visto no grupo controle, o grupo HIV sem tratamento produziu concentrações ainda maiores desta citocina. Este resultado pode indicar que em ambos os grupos infectados está ocorrendo replicação viral ou ativação descontrolada de monócitos, visto que no grupo em uso de TARV, que apresenta baixa carga viral, esse fenômeno é mais controlado.

Outras citocinas pertencentes ao perfil inflamatório são IL-1 β e IL-6, ambas estão associadas ao aumento da replicação viral, sendo que IL-6 é capaz de potencializar a regulação do HIV em conjunto com TNF- α (Poli, Bressler et al. 1990; Poli, Kinter et al. 1994). Em nossos ensaios, podemos observar apenas aumento na produção de IL-6 pelo grupo HIV+TARV em relação ao grupo controle. Porém Shive e colaboradores demonstraram que a replicação do HIV não está diretamente relacionada com altas concentrações plasmáticas de IL-6 detectados em pacientes infectados (Shive, Biancotto et al. 2012).

A IL-10 é uma citocina produzida por monócitos e por linfócitos T reguladores. Tem efeito pleiotrópico agindo tanto na imunoregulação quanto no controle da inflamação. Na fase aguda da infecção pelo HIV foi descrita por inibir a replicação viral em macrófagos derivados de monócitos através do completo bloqueio de TNF- α e IL-6, entretanto, os mesmos autores mostraram que em baixas concentrações a IL-10 tem o papel de suprimir algumas citocinas endógenas levando ao aumento da replicação viral (Weissman, Poli et al. 1994; Weissman, Poli et al. 1995). Curiosamente, a IL-10 foi a única citocina com produção diferenciada por monócitos estimulados com *Salmonella* Enteritidis morta, vista pela diminuição da produção no grupo HIV+TARV quando comparado ao grupo controle, e essa

ocorrência pode ser efeito do tratamento antirretroviral por consequente diminuição da replicação viral.

A citocina IL-5 é uma hematopoetina que estimula a ativação, migração e proliferação de eosinófilos, presente principalmente em doenças inflamatórias alérgicas e promove a resposta imune do padrão Th2 (Kusano, Kukimoto-Niino et al. 2012). De acordo com Resino e colaboradores a IL-5 está diminuída na infecção HIV em crianças e essa alteração pode ser utilizada como indicador da progressão da doença. Em contrapartida, Shebl e colaboradores mostraram o aumento de IL-5 em indivíduos HIV+.

Além disso, outros autores mostraram ainda, que durante a progressão da doença, há diminuição da expressão de citocinas do perfil Th1 e aumento da expressão de citocinas do perfil Th2, fato que pode estar relacionado ao aumento da replicação viral, como visto para o Vírus da Imunodeficiência Simian (SIV), que infecta e causa imunodeficiência em primatas (Ansari, Mayne et al. 1994; Bostik, Watkins et al. 2004). Também já foi descrito que IL-5 induz aumento da expressão do receptor CCR3 na superfície de eosinófilos e que esse receptor pode ser usado pelo vírus para entrar nesse tipo celular. Nos nossos ensaios, vimos aumento da produção de IL-5 no grupo HIV+TARV quando comparado ao grupo HIV sem tratamento e isto pode estar correlacionado à progressão da doença, uma vez que quando o indivíduo necessita iniciar o tratamento antirretroviral, o sistema imune já encontra-se muito suprimido e provavelmente várias células do indivíduo já foram comprometidas, como os eosinófilos por exemplo (Resino, Sanchez-Ramon et al. 2001; Kozyrev, Miura et al. 2002; Shebl, Yu et al. 2012).

Outro marcador da progressão da infecção é a IL-12p70, uma vez que, altas concentrações dessa citocina estão relacionadas com menor carga viral, já tendo sido sugerida sua utilização como bioassinatura da infecção, ao invés de considerar apenas a quantificação da carga viral e contagem de CD4+. Além disso IL-12p70 juntamente com IFN- γ promovem diferenciação celular para o perfil Th1, favorecendo a imunidade mediada por células e inibindo respostas do perfil Th2. Em macacos infectados com SIV, o tratamento com IL-12p70 durante a infecção aguda foi associado com diminuição da carga viral, aumento o número de células TCD8+ e NK, prolongando a sua sobrevivência (Roberts, Passmore et al. 2010).

De acordo com nossos dados, atentamos para o fato de que a maior detecção de IL-12p70 foi no grupo HIV+TARV, ou seja, aquele que apresenta menor carga viral. Neste grupo, como observamos nas tabela 6, as correlações de produção de citocinas por monócitos estimulados *in vitro* aproxima-se muito do que é visto no grupo controle. Ou seja, de certo modo a terapia foi eficaz em restabelecer a resposta imune. Entretanto, o que chama a atenção são as correlações que não puderam ser observadas neste grupo, que se

concentram principalmente àquelas feitas com a produção de IL12p70. Estas correlações são principalmente de citocinas do padrão Th2 ou imunorregulador.

Além de citocinas, as quimiocinas também tem um papel muito importante na infecção por HIV-1, podem modular a replicação viral, bem como formam o gradiente quimiotático importante no recrutamento celular para o sítio de infecção. Dentre as quimiocinas analisadas em nosso trabalho, temos a IP-10, que é membro da superfamília de quimiocinas CXC, é pró-inflamatória e tem efeito quimioatraente para linfócitos e monócitos.

A IP-10 tem sido relatada por estar aumentada no plasma de indivíduos HIV+ e a sua persistência já foi relacionada à falha terapêutica, além de estar relacionada ao aumento da replicação viral em macrófagos derivados de monócitos e também em linfócitos do sangue periférico. A inibição de IP-10 endógeno ou o bloqueio de CXCR3 que funciona como seu receptor, leva à redução da replicação viral nessas mesmas células. Dito isto, pudemos constatar em nosso experimento, que os indivíduos do grupo HIV exibiram maior produção de IP-10 quando comparados aos do grupo controle ou grupo HIV+TARV, sugerindo assim que nestes indivíduos está ocorrendo grande replicação viral e aparentemente, a terapia antirretroviral é capaz de diminuir a produção de IP-10, levando ao controle da replicação viral, como visto na figura 9K (Luster and Leder 1993; Lane, King et al. 2003)

Apesar de não detectarmos, em nosso modelo, diferenças estatísticas na produção de IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL4, MCP-1 e RANTES, pelos monócitos, não podemos descartar o papel biológico que estão exercendo sistemicamente, visto pelas correlações estabelecidas (tabelas 4 e 5). A análise estatística considerando as médias de produção isoladas não nos permitiu detectar essa importância, talvez devido ao número de sujeitos analisados, mas os dados de correlação deixam claro a sua importância.

Além da análise individual de cada citocina e quimiocina, fizemos uma correlação entre todas elas, para avaliar o perfil de cada grupo e concluímos que tanto nas correlações feitas entre citocinas plasmáticas quanto para as citocinas dosadas do sobrenadante de monócitos estimulados com a bactéria, observamos que o grupo controle tem um perfil característico de ativação da resposta imune. Porém, é nítido observar que a infecção pelo HIV altera o grau de ativação celular, visto que estabelecemos poucas correlações entre as citocinas neste grupo, evidenciando o caráter imunossupressor da infecção pelo HIV. Entretanto, quando os indivíduos infectados recebem tratamento antirretroviral (grupo HIV+TARV), o perfil de correlação estabelecido entre as citocinas é parcialmente restabelecido, mas sobretudo, constatamos que algumas correlações são perdidas e outras são formadas. sugerindo que a terapia antirretroviral não recupera a resposta do sistema imunológico ao que era antes da infecção.

Desta forma, considerando o conjunto de dados aqui demonstrados, sugerimos que é possível identificar uma bioassinatura da infecção pelo HIV, assim como do tratamento com os medicamentos atualmente em uso na clínica. Mais estudos serão realizados na busca destas respostas, mas esta bioassinatura poderá no futuro, auxiliar no desenvolvimento de terapias dirigidas ao fortalecimento imunológico no combate, por exemplo, à infecções oportunistas.

8. Conclusões

- O perfil de marcadores celulares expressos pelos monócitos, a fagocitose, a atividade microbicida e a produção de espécies reativas de oxigênio não são alteradas pela infecção HIV. O tratamento com antirretrovirais não altera este perfil de ativação celular.
- Indivíduos do sexo masculino, quando infectados pelo HIV apresentam melhor capacidade fagocítica do que indivíduos do sexo feminino nas mesmas condições.
- O perfil de citocinas produzidas em indivíduos infectados em uso ou não de tratamento antirretroviral é diferente daquelas produzidas pelo grupo controle, predominando principalmente citocinas que favorecem a replicação viral.
- O tratamento antirretroviral é capaz de restaurar parcialmente o perfil de citocinas, entretanto, a resposta do indivíduo infectado pelo HIV não retorna ao que era antes da infecção.
- Sugerimos que uma bioassinatura funcional pode ser descrita, tendo como base a produção diferencial de citocinas e quimiocinas (principalmente IL-1 β , IL-6 e IL-12p70).

9. Referências

- Abbas, W. and G. Herbein (2012). "Molecular Understanding of HIV-1 Latency." Adv Virol 2012: 574967.
- Andrews-Polymenis, H. L., A. J. Baumler, et al. (2010). "Taming the elephant: Salmonella biology, pathogenesis, and prevention." Infect Immun 78(6): 2356-2369.
- Ansari, A. A., A. Mayne, et al. (1994). "TH1/TH2 subset analysis. I. Establishment of criteria for subset identification in PBMC samples from nonhuman primates." J Med Primatol 23(2-3): 102-107.
- Ansari, A. W., D. Meyer-Olson, et al. (2013). "Selective expansion of pro-inflammatory chemokine CCL2-loaded CD14+CD16+ monocytes subset in HIV-infected therapy naive individuals." J Clin Immunol 33(1): 302-306.
- Armitage, R. J. (1994). "Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands." Curr Opin Immunol 6(3): 407-413.
- Arora, D. R., M. Maheshwari, et al. (2013). "Rapid Point-of-Care Testing for Detection of HIV and Clinical Monitoring." Isrn Aids 2013: 287269.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science 220(4599): 868-871.
- Blond, D., H. Raoul, et al. (2000). "Nitric oxide synthesis enhances human immunodeficiency virus replication in primary human macrophages." J Virol 74(19): 8904-8912.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the immune response." Nat Immunol 2(10): 907-916.
- Bostik, P., M. Watkins, et al. (2004). "Genetic analysis of cytokine promoters in nonhuman primates: implications for Th1/Th2 profile characteristics and SIV disease pathogenesis." Clin Dev Immunol 11(1): 35-44.
- Bozek, K., M. Eckhardt, et al. (2012). "An expanded model of HIV cell entry phenotype based on multi-parameter single-cell data." Retrovirology 9: 60.
- Bozek, K., A. Thielen, et al. (2009). "V3 loop sequence space analysis suggests different evolutionary patterns of CCR5- and CXCR4-tropic HIV." PLoS One 4(10): e7387.
- Cardozo, T., T. Kimura, et al. (2007). "Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop." AIDS Res Hum Retroviruses 23(3): 415-426.
- Chen, T. P., R. L. Roberts, et al. (1993). "Decreased superoxide anion and hydrogen peroxide production by neutrophils and monocytes in human immunodeficiency virus-infected children and adults." Pediatr Res 34(4): 544-550.
- Clavel, F., M. Guyader, et al. (1986). "Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2." Nature 324(6098): 691-695.
- Clumeck, N., F. Mascart-Lemone, et al. (1983). "Acquired immune deficiency syndrome in Black Africans." Lancet 1(8325): 642.

- Cohen, G. B., R. T. Gandhi, et al. (1999). "The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells." Immunity 10(6): 661-671.
- Collini, P., M. Noursadeghi, et al. (2010). "Monocyte and macrophage dysfunction as a cause of HIV-1 induced dysfunction of innate immunity." Curr Mol Med 10(8): 727-740.
- Cozzi-Lepri, A., M. A. French, et al. (2011). "Resumption of HIV replication is associated with monocyte/macrophage derived cytokine and chemokine changes: results from a large international clinical trial." Aids 25(9): 1207-1217.
- De Groote, M. A., U. A. Ochsner, et al. (1997). "Periplasmic superoxide dismutase protects Salmonella from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase." Proc Natl Acad Sci U S A 94(25): 13997-14001.
- Delemarre, F. G., A. Stevenhagen, et al. (1995). "Reduced toxoplasmastatic activity of monocytes and monocyte-derived macrophages from AIDS patients is mediated via prostaglandin E2." Aids 9(5): 441-445.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, et al. (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." Science 303(5663): 1529-1531.
- Dutertre, C. A., S. Amraoui, et al. (2012). "Pivotal role of M-DC8(+) monocytes from viremic HIV-infected patients in TNFalpha overproduction in response to microbial products." Blood 120(11): 2259-2268.
- Elbim, C., S. Pillet, et al. (1999). "Redox and activation status of monocytes from human immunodeficiency virus-infected patients: relationship with viral load." J Virol 73(6): 4561-4566.
- Esbjornsson, J., F. Mansson, et al. (2012). "Inhibition of HIV-1 disease progression by contemporaneous HIV-2 infection." N Engl J Med 367(3): 224-232.
- Fazekas de St Groth, B. and A. L. Landay (2008). "Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response?" Aids 22(6): 671-683.
- Flo, R. W., A. Naess, et al. (1994). "A longitudinal study of phagocyte function in HIV-infected patients." Aids 8(6): 771-777.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, et al. (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science 220(4599): 865-867.
- Gama, L., E. N. Shirk, et al. (2012). "Expansion of a subset of CD14highCD16negCCR2low/neg monocytes functionally similar to myeloid-derived suppressor cells during SIV and HIV infection." J Leukoc Biol 91(5): 803-816.
- Gelderblom, H. R., E. H. Hausmann, et al. (1987). "Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins." Virology 156(1): 171-176.

- Gobeil, L. A., R. Lodge, et al. (2012). "Differential HIV-1 endocytosis and susceptibility to virus infection in human macrophages correlate with cell activation status." J Virol 86(19): 10399-10407.
- Gottlieb, M. S. (2006). *Pneumocystis pneumoniae* Los Angeles, American Public Health Association. 96: 980.
- Griffin, G. E., K. Leung, et al. (1991). "Induction of NF-kappa B during monocyte differentiation is associated with activation of HIV-gene expression." Res Virol 142(2-3): 233-238.
- Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, et al. (2006). "Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys." Nat Med 12(3): 289-295.
- Hirsch, J. D., M. Gonzales, et al. (2011). "Antiretroviral therapy adherence, medication use, and health care costs during 3 years of a community pharmacy medication therapy management program for Medi-Cal beneficiaries with HIV/AIDS." J Manag Care Pharm 17(3): 213-223.
- Hulgan, T., J. Morrow, et al. (2003). "Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection." Clin Infect Dis 37(12): 1711-1717.
- Imlay, J. A. (2003). "Pathways of oxidative damage." Annu Rev Microbiol 57: 395-418.
- Jung, J. Y., R. Madan-Lala, et al. (2013). "The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria." Infect Immun 81(9): 3198-3209.
- Kedzierska, K., R. Azzam, et al. (2003). "Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy." J Clin Virol 26(2): 247-263.
- Kedzierska, K., M. Churchill, et al. (2003). "Phagocytic efficiency of monocytes and macrophages obtained from Sydney blood bank cohort members infected with an attenuated strain of HIV-1." J Acquir Immune Defic Syndr 34(5): 445-453.
- Kedzierska, K., S. M. Crowe, et al. (2003). "The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages." Rev Med Virol 13(1): 39-56.
- Kedzierska, K., J. Mak, et al. (2001). "nef-deleted HIV-1 inhibits phagocytosis by monocyte-derived macrophages in vitro but not by peripheral blood monocytes in vivo." Aids 15(8): 945-955.
- Keele, B. F., E. E. Giorgi, et al. (2008). "Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection." Proc Natl Acad Sci U S A 105(21): 7552-7557.
- Kinter, A., J. McNally, et al. (2007). "Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals." Proc Natl Acad Sci U S A 104(9): 3390-3395.

- Klein, S. L. (2012). "Sex influences immune responses to viruses, and efficacy of prophylaxis and treatments for viral diseases." Bioessays 34(12): 1050-1059.
- Kozyrev, I. L., T. Miura, et al. (2002). "Co-expression of interleukin-5 influences replication of simian/human immunodeficiency viruses in vivo." J Gen Virol 83(Pt 5): 1183-1188.
- Kramski, M., A. Schorcht, et al. (2012). "Role of monocytes in mediating HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity." J Immunol Methods 384(1-2): 51-61.
- Kuroda, M. J. (2010). "Macrophages: do they impact AIDS progression more than CD4 T cells?" J Leukoc Biol 87(4): 569-573.
- Kusano, S., M. Kukimoto-Niino, et al. (2012). "Structural basis of interleukin-5 dimer recognition by its alpha receptor." Protein Sci 21(6): 850-864.
- Lane, B. R., S. R. King, et al. (2003). "The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication." Virology 307(1): 122-134.
- Lepelley, A., S. Louis, et al. (2011). "Innate sensing of HIV-infected cells." PLoS Pathog 7(2): e1001284.
- Lundgren, J. D., A. G. Babiker, et al. (2013). "When to start antiretroviral therapy: the need for an evidence base during early HIV infection." BMC Med 11: 148.
- Luster, A. D. and P. Leder (1993). "IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo." J Exp Med 178(3): 1057-1065.
- Macey, M. G., D. A. McCarthy, et al. (1995). "Effects of cell purification methods on CD11b and L-selectin expression as well as the adherence and activation of leucocytes." J Immunol Methods 181(2): 211-219.
- MacLennan, C. A., J. J. Gilchrist, et al. (2010). "Dysregulated humoral immunity to nontyphoidal Salmonella in HIV-infected African adults." Science 328(5977): 508-512.
- Mandas, A., E. L. Iorio, et al. (2009). "Oxidative imbalance in HIV-1 infected patients treated with antiretroviral therapy." J Biomed Biotechnol 2009: 749575.
- Markle, J. G., D. N. Frank, et al. (2013). "Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity." Science 339(6123): 1084-1088.
- Marsili, G., A. L. Remoli, et al. (2012). "HIV-1, interferon and the interferon regulatory factor system: an interplay between induction, antiviral responses and viral evasion." Cytokine Growth Factor Rev 23(4-5): 255-270.
- Mastroianni, C. M., M. Lichtner, et al. (1999). "Improvement in neutrophil and monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients." Aids 13(8): 883-890.
- McElrath, M. J., J. E. Pruett, et al. (1989). "Mononuclear phagocytes of blood and bone marrow: comparative roles as viral reservoirs in human immunodeficiency virus type 1 infections." Proc Natl Acad Sci U S A 86(2): 675-679.

- McElrath, M. J., R. M. Steinman, et al. (1991). "Latent HIV-1 infection in enriched populations of blood monocytes and T cells from seropositive patients." J Clin Invest 87(1): 27-30.
- McGrath, N., L. Richter, et al. (2013). "Sexual risk after HIV diagnosis: a comparison of pre-ART individuals with CD4>500 cells/microl and ART-eligible individuals in a HIV treatment and care programme in rural KwaZulu-Natal, South Africa." J Int AIDS Soc 16: 18048.
- Melendez, L. M., K. Colon, et al. (2011). "Proteomic analysis of HIV-infected macrophages." J Neuroimmune Pharmacol 6(1): 89-106.
- Mogensen, T. H., J. Melchjorsen, et al. (2010). "Innate immune recognition and activation during HIV infection." Retrovirology 7: 54.
- Moir, S. and A. S. Fauci (2010). "Immunology. Salmonella susceptibility." Science 328(5977): 439-440.
- Muller, F., H. Rollag, et al. (1990). "Reduced oxidative burst responses in monocytes and monocyte-derived macrophages from HIV-infected subjects." Clin Exp Immunol 82(1): 10-15.
- Murphy, G. and C. Aitken (2011). "HIV testing--the perspective from across the pond." J Clin Virol 52 Suppl 1: S71-76.
- Nielsen, H., A. Kharazmi, et al. (1986). "Blood monocyte and neutrophil functions in the acquired immune deficiency syndrome." Scand J Immunol 24(3): 291-296.
- Nottet, H. S., L. de Graaf, et al. (1993). "Phagocytic function of monocyte-derived macrophages is not affected by human immunodeficiency virus type 1 infection." J Infect Dis 168(1): 84-91.
- Padgett, E. L. and S. B. Pruett (1992). "Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages." Biochem Biophys Res Commun 186(2): 775-781.
- Page, B., M. Page, et al. (1993). "A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro." Int J Oncol 3(3): 473-476.
- Perez, L. E., B. Chandrasekar, et al. (2006). "Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen." J Immunol 176(9): 5519-5528.
- Pfister, H., K. A. Remer, et al. (2002). "Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in listeric encephalitis: a cross-species study in ruminants." Vet Pathol 39(2): 190-199.
- Pitha, P. M. (2011). "Innate antiviral response: role in HIV-1 infection." Viruses 3(7): 1179-1203.
- Poli, G., P. Bressler, et al. (1990). "Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms." J Exp Med 172(1): 151-158.
- Poli, G., A. L. Kinter, et al. (1994). "Interleukin 1 induces expression of the human immunodeficiency virus alone and in synergy with interleukin 6 in chronically infected U1

cells: inhibition of inductive effects by the interleukin 1 receptor antagonist." Proc Natl Acad Sci U S A 91(1): 108-112.

Preziosi, M. J., S. M. Kandel, et al. (2012). "Microbiological analysis of nontyphoidal Salmonella strains causing distinct syndromes of bacteremia or enteritis in HIV/AIDS patients in San Diego, California." J Clin Microbiol 50(11): 3598-3603.

Prost, L. R., S. Sanowar, et al. (2007). "Salmonella sensing of anti-microbial mechanisms to promote survival within macrophages." Immunol Rev 219: 55-65.

Pugliese, A., V. Vidotto, et al. (2005). "Phagocytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection." Clin Diagn Lab Immunol 12(8): 889-895.

Resino, S., S. Sanchez-Ramon, et al. (2001). "Impaired interleukin-5 (IL-5) production by T cells as a prognostic marker of disease progression in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected children." Eur Cytokine Netw 12(2): 253-259.

Roberts, L., J. A. Passmore, et al. (2010). "Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression." Aids 24(6): 819-831.

Rodriguez-Garcia, M., M. V. Patel, et al. (2013). "Innate and adaptive anti-HIV immune responses in the female reproductive tract." J Reprod Immunol 97(1): 74-84.

Saúde, M. d. (2011). "Departamento de DST, AIDS e Hepatite."

Schneemann, M. and G. Schoedon (2002). "Species differences in macrophage NO production are important." Nat Immunol 3(2): 102.

Schneemann, M., G. Schoedon, et al. (1993). "Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes." J Infect Dis 167(6): 1358-1363.

Seddon, J. and S. Bhagani (2011). "Antimicrobial therapy for the treatment of opportunistic infections in HIV/AIDS patients: a critical appraisal." HIV AIDS (Auckl) 3: 19-33.

Shebl, F. M., K. Yu, et al. (2012). "Increased levels of circulating cytokines with HIV-related immunosuppression." AIDS Res Hum Retroviruses 28(8): 809-815.

Shive, C. L., A. Biancotto, et al. (2012). "HIV-1 is not a major driver of increased plasma IL-6 levels in chronic HIV-1 disease." J Acquir Immune Defic Syndr 61(2): 145-152.

Spear, G. T., H. A. Kessler, et al. (1990). "Decreased oxidative burst activity of monocytes from asymptomatic HIV-infected individuals." Clin Immunol Immunopathol 54(2): 184-191.

Sterjovski, J., M. Roche, et al. (2010). "An altered and more efficient mechanism of CCR5 engagement contributes to macrophage tropism of CCR5-using HIV-1 envelopes." Virology 404(2): 269-278.

Stoler, M. H., T. A. Eskin, et al. (1986). "Human T-cell lymphotropic virus type III infection of the central nervous system. A preliminary in situ analysis." Jama 256(17): 2360-2364.

- Stuehr, D. J., S. S. Gross, et al. (1989). "Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide." J Exp Med 169(3): 1011-1020.
- Thompson, M. A., J. A. Aberg, et al. (2012). "Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel." Jama 308(4): 387-402.
- Torre, D., A. Pugliese, et al. (2002). "Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe?" Lancet Infect Dis 2(5): 273-280.
- Tripathi, P. and S. Agrawal (2007). "Immunobiology of human immunodeficiency virus infection." Indian J Med Microbiol 25(4): 311-322.
- Tsang, J., B. M. Chain, et al. (2009). "HIV-1 infection of macrophages is dependent on evasion of innate immune cellular activation." Aids 23(17): 2255-2263.
- Tuttle, D. L., J. K. Harrison, et al. (1998). "Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1." J Virol 72(6): 4962-4969.
- UNAIDS (2013). "Global Report - UNAIDS report on the Global AIDS epidemic 2013. UNAIDS - Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. ."
- Usuga, X., C. J. Montoya, et al. (2008). "Characterization of quantitative and functional innate immune parameters in HIV-1-infected Colombian children receiving stable highly active antiretroviral therapy." J Acquir Immune Defic Syndr 49(4): 348-357.
- Vazquez-Torres, A. and F. C. Fang (2001). "Oxygen-dependent anti-Salmonella activity of macrophages." Trends Microbiol 9(1): 29-33.
- Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, et al. (2000). "Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro." J Exp Med 192(2): 227-236.
- Vujkovic-Cvijin, I., R. M. Dunham, et al. (2013). "Dysbiosis of the gut microbiota is associated with hiv disease progression and tryptophan catabolism." Sci Transl Med 5(193): 193ra191.
- Wain-Hobson, S., J. P. Vartanian, et al. (1991). "LAV revisited: origins of the early HIV-1 isolates from Institut Pasteur." Science 252(5008): 961-965.
- Weinberg, J. B., M. A. Misukonis, et al. (1995). "Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages." Blood 86(3): 1184-1195.
- Weissman, D., G. Poli, et al. (1994). "Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus." AIDS Res Hum Retroviruses 10(10): 1199-1206.

Weissman, D., G. Poli, et al. (1995). "IL-10 synergizes with multiple cytokines in enhancing HIV production in cells of monocytic lineage." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 9(5): 442-449.

Wira, C. R., J. V. Fahey, et al. (2010). "Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens." Am J Reprod Immunol 63(6): 544-565.

Zhao, Y., H. Ying, et al. (2012). "Tuberculosis and sexual inequality: the role of sex hormones in immunity." Crit Rev Eukaryot Gene Expr 22(3): 233-241.

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

Zybarth, G., N. Reiling, et al. (1999). "Activation-induced resistance of human macrophages to HIV-1 infection in vitro." J Immunol 162(1): 400-406.

Anexo I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 081/2012
kms

Ribeirão Preto, 12 de dezembro de 2012.

À Pós-graduanda
Maira da Costa Cacemiro
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiani Gai Frantz
FCFRP/USP

Prezada Pós-graduanda

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 110ª Sessão Ordinária, realizada em 11 de dezembro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado “**ESTUDO DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS DAS FUNÇÕES DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE PACIENTES HIV**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 276**.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, “o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador”.

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP - FCFRP/USP

Anexo II

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Campus Universitário Monte Alegre

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: **“ESTUDO DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS DAS FUNÇÕES DE MONÓCITOS DERIVADOS DE PACIENTES HIV⁺”.**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Maira da Costa Cacemiro

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que é desenvolvida pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-RP, em parceria com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular - Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor as funções de monócitos de pacientes infectados com HIV.

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento. Caso não queira participar, a sua doação não será prejudicada.

O que são monócitos?

Os monócitos são células de defesa do corpo importantes para combater doenças causadas por fungos ou bactérias .

O que é biomarcador imunológico?

Os biomarcadores são moléculas das células que poderão ser úteis para o desenvolvimento de um teste para melhorar o tratamento de pacientes infectados com HIV.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

Esta pesquisa trará benefícios para entender de como as células de defesa de um indivíduo infectado com HIV reagem quando em contato com uma bactéria em comparação com as células de indivíduos saudáveis (controle negativo). Este contato da célula com a bactéria será realizado em laboratório. Sendo assim, os participantes desta pesquisa não sofrerão nenhum risco de contaminação.

Para a realização deste trabalho, precisamos da colheita de sangue de pessoas que **NÃO** estejam contaminadas com o vírus HIV-1 e que também **NÃO** tenham nenhum outro tipo de infecção, esse sangue servirá como controle negativo da pesquisa. A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 40 mL de sangue. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde e não atrapalhará a doação de sangue para o Hemocentro – HC-FMRP. A colheita de sangue será realizada no braço, no processo de doação de sangue, juntamente com as amostras usualmente coletadas.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento, e os mesmos serão informados dos resultados finais da pesquisa, caso desejarem. Esta pesquisa não trará benefício direto ao doador, ficando a seu critério a desistência em participar da pesquisa a qualquer momento.

Será feita apenas uma doação de sangue para a pesquisa e não haverá armazenamento do material colhido, o mesmo será descartado ao final da pesquisa.

Seu sangue somente será incluído na pesquisa se for NEGATIVO para os testes de triagem para a doação de sangue, ou seja, se for aprovado para doação no Banco de Sangue

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Maira pelo telefone (16) 3602 – 4189 ou (16) 9249-4720. Telefone para contato do Comitê de Ética em Pesquisa (16) 3602 – 4213, e-mail do Comitê de Ética em Pesquisa: cep@fcfrp.usp.br

Eu, _____

RG nº: _____, autorizo a retirada de 40 ml do meu sangue da veia do braço para a realização de pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é desenvolver um método complementar para ajudar a determinar o momento de iniciar o tratamento contra o HIV. Autorizo também o acesso aos meus exames sorológicos para a exclusão de qualquer outra infecção.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do paciente – Registro

Maira da Costa Cacemiro

Pesquisador Responsável

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: **“ESTUDO DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS DAS FUNÇÕES DE MONÓCITOS DERIVADOS DE PACIENTES HIV⁺”.**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Maira da Costa Cacemiro

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que é desenvolvida na faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto em parceria com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular - Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor as funções de monócitos de pacientes infectados com HIV.

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento. Caso não queira participar, o seu tratamento não será prejudicado.

O que são monócitos?

Os monócitos são células de defesa do corpo importantes para combater doenças causadas por fungos ou bactérias.

O que é biomarcador imunológico?

Os biomarcadores são moléculas das células que poderão ser úteis para o desenvolvimento de um teste para ajudar no diagnóstico e melhorar o tratamento de pacientes infectados com HIV.

Como você, paciente, vai participar da pesquisa?

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 40 mL de sangue. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A coleta de sangue será realizada no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado.

Qual o objetivo desta pesquisa?

Esta pesquisa trará benefícios para o entendimento de como as células de defesa de um indivíduo infectado com HIV reagem quando em contato com uma bactéria em comparação com as células de indivíduos saudáveis (controle negativo). Este contato da célula com a bactéria será realizado em laboratório. Sendo assim, os participantes desta pesquisa não sofrerão nenhum risco de contaminação. A coleta de sangue deverá ser feita em indivíduos HIV positivos e que **NÃO ESTEJAM INFECTADOS** por fungos e bactérias, que são microorganismos capazes de causar

doenças em pessoas com o sistema imune debilitado, ou seja, com células de defesas incapazes de responder corretamente.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento, e os mesmos serão informados dos resultados finais da pesquisa, se desejarem. Esta pesquisa não trará benefício direto ao doador participante, portanto, fica a seu critério decidir participar ou não da nossa pesquisa, podendo desistir a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ao seu seguimento hospitalar.

Será feita apenas uma doação de sangue para a pesquisa e não haverá armazenamento do material colhido, o mesmo será descartado ao final da pesquisa.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Maira pelo telefone (16) 3602-4189, ou (16) 9249-4720. Telefone para contato do Comitê de Ética em Pesquisa (16) 3602 – 4213, e-mail do Comitê de Ética em Pesquisa: cep@fcfrp.usp.br

Eu, _____

RG nº: _____, autorizo a retirada de 40 ml do meu sangue da veia do braço esquerdo para a realização de pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é desenvolver um método complementar para ajudar a determinar o momento de iniciar o tratamento contra o HIV. Autorizo também à consulta do meu prontuário para a obtenção de informações como contagem de células e carga viral.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do paciente – Registro

Maira da Costa Cacemiro

Pesquisador Responsável