



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE PLAQUETAS
ASSOCIADA À COMORBIDADES RESPIRATÓRIAS
EM PACIENTES HIV/AIDS**

WELLINGTON MOTA GAMA

MANAUS

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

WELLINGTON MOTA GAMA

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE PLAQUETAS
ASSOCIADA À COMORBIDADES RESPIRATÓRIAS
EM PACIENTES HIV/AIDS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G184a Gama, Wellington Mota
Avaliação morfológica e funcional de plaquetas associada á comorbidades respiratórias em pacientes HIV/AIDS / Wellington Mota Gama. 2018
120 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Paulo Afonso Nogueira
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. hiv/aids. 2. comorbidade respiratória. 3. inflamação. 4. plaquetas. I. Nogueira, Paulo Afonso II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

WELLINGTON MOTA GAMA

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE PLAQUETAS
ASSOCIADA À COMORBIDADES RESPIRATÓRIAS
EM PACIENTES HIV/AIDS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira (presidente)

Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia (ILMD/ Fiocruz Amazônia)

Profa. Dra. Aya Sadahiro (membro)

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (ICB-UFAM)

Prof. Dr. Fernando Val (membro)

Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Heitor
Vieira Dourado (FMT-HVD)

Aos meus pais que tanto amo, Cristina e Edilson,

A meu irmão Gabriel,

Aos meus avós paternos Didi e Teodoro e

maternos Rosa e Alonso (*In memoriam*),

À minhas tias RosAngela e Suely

À minha prima irmã Kátia

À minha princesa Alice

AGRADECIMENTOS

A Deus, mentor e essência de tudo, por sempre ser comigo, por me amparar nos momentos de dificuldades e incertezas, por ter me dado forças nesta longa e difícil jornada, por impetrar-me o desejo-ânimo de persistir e por me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, Cristina e Edilson, que tanto amo, por sempre me apoiarem incondicionalmente e nunca medir esforços para a realização deste sonho, que passou a ser nosso.

A toda minha família. A meu irmão Gabriel por respeitar meus momentos de estudo mesmo na hora dos jogos do seu amado flamengo. A meus tios e tias, especialmente tia Rosângela e tia Suely por todo apoio e incentivo. Minhas primas Kátia e Alice por todo carinho e apoio. Minhas avós Francisca e Maria e avôs Teodoro e Alonso (*in memoriam*) por sempre acreditarem que eu era capaz.

A meu orientador Dr. Paulo Nogueira, que me acolheu no início do mestrado e por ter me dado à chance de ingressar em seu grupo de pesquisa e desenvolver este trabalho. Por ter acreditando em mim, contribuindo imensamente ao meu crescimento acadêmico e profissional, além de todo suporte dado para conclusão deste trabalho.

A amiga e companheira de grupo de pesquisa Gleiciene Magalhães. Aquela que tinha cara de mal, mas só a cara mesmo, se mostrou além de uma excepcional profissional, uma pessoa extraordinária, sempre disposta ajudar, apoiar e ensinar. Por cada conselho dado, por toda ajuda na concepção e escrita deste, por não me deixar esmorecer frente às dificuldades e por confiar sempre na minha capacidade. Gratidão!

À minha amiga e parceira de trabalho Danielle Furtado, por todos os momentos que passamos ao longo desses anos. Pelas dificuldades que juntos encontramos e superamos, pelo aprendizado e crescimento que mutuamente desenvolvemos. Fico triste pelo fim do mestrado marcar também o fim dessa parceria de sucesso, claro que, por motivos alheios a nossa vontade, mas independentemente só quero agradecer por toda essa caminhada, desde a graduação, IC até o mestrado, sempre torcerei pelo teu sucesso e a amizade continua, com um aperto no coração.

Aos amigos e ex-integrantes do grupo de pesquisa Sarita Rodrigues, Ingrid Souza e Henrique Marinho pela dedicação, empenho, competência e parceria durante toda a realização do projeto, principalmente durante as desgastantes coletas. Foi difícil seguir sem vocês.

Ao colega de grupo Yury Chaves pelo comprometimento e auxílio sempre que solicitados nos procedimentos e análises inerentes à imunofenotipagem de plaquetas.

Ao colaborador Dr. Allyson Guimarães pelo suporte na execução da técnica de CBA.

Aos queridos e estimados amigos Elizângela Farias, Tatiana Bacry, Ivanildes Bastos, Yury Chaves, Gleiciene Magalhães, Danielle Furtado e Alessandra Cavalcante do grupo “café com ciência” pelos momentos de descontração. Vocês foram essenciais para manter minha sanidade (risos) e o sentimento de que tudo daria certo. Só digo uma coisa: “FARIAS, 2018”.

Aos membros do grupo DCDIA, Alessandra Cavalcante, Danielle Furtado, Gleice Magalhães, Elizângela Farias, Yury Chaves, Tatiana Bacry, Juliane Corrêa, Fernanda Batalha, João Victor, Ruth Moura, Edilene Martins, Walter Neves, Felipe Araújo, Lucas Barbosa, Maele João, Yasmin Cabral, Manoel Neto, Jessiane Taveira, Alice Alencar. Agradeço a todos pela companhia e ajuda, pelas bagunças, risos e cantorias no laboratório e fora dele.

Aos meus amigos pessoais Alessandra Correa e Daniel Machado, presentes na minha vida desde a graduação e como tal, esteios, companheiros de profissão e irmanados na amizade, por cada incentivo quando a jornada do mestrado se fazia quase insustentável e a desistência se fazia uma opção. Muito obrigado! Sintam-se representados nesse título, amo vocês!

A Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM) por disporem de seus laboratórios e equipamentos para realização de experimentos utilizados neste trabalho.

A Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) por dispor de seus espaços para execução deste trabalho.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia (ILMD/ Fiocruz Amazônia) pela disposição de seus laboratórios e equipamentos para realização deste trabalho.

Ao laboratório DCDIA, nas pessoas da Dra. Patrícia Orlandi e Dr. Paulo Nogueira, que me acolheu e pelo apoio e suporte na execução deste trabalho.

Aos órgãos de fomento FAPEAM, CNPQ e CAPES pelo suporte financeiro e técnico.

Ao grupo de canto de Ágape ou como nos autodesignamos “Família Ágape”, por ser presença e por todo apoio para finalização deste. Agradeço imensamente as orações, que D’us nos abençoe e fortaleça nossa união. *“Somos corpo e assim bem ajustado, totalmente ligado, unido, vivendo em amor”*.

Aos amigos da turma de mestrado Dana Monteiro, Danielle Furtado, Grenda Leite, José Júnior, Priscila Souza, Polyane Lima e Pedro Neto por fazerem desta jornada mais leve e divertida. Por cada sofrimento, superação e risos nas disciplinas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA) pela oportunidade de ingresso do mestrado.

Agradeço aos professores do PPGIBA por me proporcionarem o crescimento de meus conhecimentos acadêmicos, cooperando em meu processo de formação profissional. Em especial à Profa. Dra. Aya Sadahiro que me acompanha desde a IC, passando pelo ingresso na pós-graduação, nas disciplinas no mestrado até a exaustiva defesa, sempre disposta a ajudar e entender o lado do aluno.

A Universidade Federal do Amazonas que me oportunizou esta janela que hoje vislumbro com orgulho, me oferecendo durante a formação um ambiente de estudo agradável e motivador.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte e/ou contribuíram com minha formação e com este trabalho, o meu muito obrigado.

“Malfeito feito!”

J.K. Rowling

RESUMO

As comorbidades respiratórias em pessoas infectadas pelo vírus HIV tendem a desenvolver complicações associadas às coinfeções oportunistas. Este estudo teve como objetivo avaliar os aspectos morfológicos e funcionais das plaquetas de pacientes com HIV / AIDS com comorbidades respiratórias. Neste estudo, foi demonstrado que pacientes HIV/AIDS coinfectados com tuberculose (Tb) mostraram alteração plaquetária e tiveram maior chance de risco de óbito. A análise de marcadores inflamatórios mostrou que os níveis de IL-6 foram elevados e associados ao óbito ($p=0.028$), comorbidades (neurológicas e digestivas), manifestações hematológicas ($p=0.0094$) e contagem de células T CD4+ ($p=0.0105$). As alterações na contagem de plaquetas nos pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória foram ou por plaquetopenia ($p=0.0059$) e ou plaquetocitose ($p=0.022$). A análise morfológica mostrou duas subpopulações de plaquetas CD41+DHE+ (reticuladas) e CD41+DHE- (maduras). As plaquetas dos pacientes com HIV-Tb responderam ao estímulo com adrenalina aumentando o número de eventos sugerindo fragmentação desta subpopulação. Apesar de ainda não estar claro o mecanismo envolvido nestas complicações, a inflamação e as alterações nas respostas de plaquetas parecem ser importantes fatores associados à progressão da infecção pelo HIV e óbito.

Palavras chave: HIV/AIDS, comorbidade respiratória, inflamação, plaquetas.

ABSTRACT

Respiratory comorbidities is major causes of hospital admission among people living with HIV worldwide, and their outcome is poor when associated with opportunistic coinfections. This study aimed to evaluate the morphological and functional aspects of the platelets of HIV/AIDS patients with respiratory comorbidities. In this study, tuberculosis coinfecting HIV/AIDS (HIV/AIDS-TB) patients showed a higher risk of death, higher IL-6 levels was associated with death ($p=0.028$), comorbidities (neurological and digestive), hematological manifestations ($p=0.0094$) and CD4+T cell counts ($p=0.0105$). Platelet abnormalities observed in HIV/AIDS-TB were due either thrombocytopenia ($p=0.0059$) or thrombocytosis ($p=0.022$). Morphological analysis showed different behavior of two subpopulations of CD41+/DHE+ (reticulated) and CD41+/DHE- (mature) platelets when they were stimulated with adrenaline. The mature platelets of HIV/AIDS-TB responded increasing the number of events suggesting fragmentation of this subpopulation. Although the mechanism involved in these complications is unclear, inflammation and changes in platelet responses appear to be important factors associated with progression of HIV infection and death.

Key-words: HIV/AIDS, respiratory comorbidities, inflammation, platelets.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taxa de detecção de AIDS (por 100 mil habitantes) segundo sexo e razão de sexos por ano de diagnóstico.....	24
Figura 2: Taxa de detecção de AIDS (por 100 mil habitantes) segundo UF e capital de residência.....	25
Figura 3: Casos de AIDS em adultos e mortes relacionadas com a AIDS no Estado do Amazonas, 2001-2012.....	26
Figura 4: Casos de AIDS e mortes relacionadas com AIDS por município, Estado do Amazonas, 2001-2012.....	27
Figura 5: Estrutura do vírus HIV..	28
Figura 6: Organização genômica do vírus HIV.	29
Figura 7: Ciclo de vida do vírus HIV.....	31
Figura 8: Evolução clínica da infecção pelo HIV.....	32
Figura 9: Ativação de LPS.....	39
Figura 10: Produção de citocinas na infecção pelo HIV na fase aguda.....	40
Figura 11: Receptores de plaquetas que reconhecem o HIV.....	45
Figura 12: Representação esquemática de um possível mecanismo de indução de inflamação em pacientes HIV com comorbidade respiratória.....	47
Figura 13: Estrutura das plaquetas.....	48
Figura 14: Receptores e agonistas plaquetários.....	49
Figura 15: Fluxograma dos processos metodológicos de coleta e análise laboratorial.....	59
Figura 16: Caracterização das subpopulações de plaquetas pela duplamarcação.....	60
Figura 17: Comportamento das subpopulações de plaquetas com estímulo de adrenalina..	74
Figura 18: Frequência de plaquetas (CD41+) em pacientes HIV/AIDS, pacientes saudáveis e pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória na ausência e presença de estímulo.....	75

Figura 19: Avaliação da responsividade da subpopulação de plaquetas reticuladas (CD41+DHE+).....76

Figura 20: Avaliação da responsividade da subpopulação de plaquetas maduras (CD41+DHE-).....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização geral da população estudada.	64
Tabela 2: Comorbidades e manifestações clínicas e sua associação com óbito em pacientes HIV/AIDS.....	66
Tabela 3: Variáveis clínicas individualmente associadas com aumento do risco de óbito em pacientes HIV/AIDS.....	67
Tabela 4: Dados laboratoriais de pacientes HIV/AIDS com insuficiência respiratória associada à tuberculose e pacientes HIV/AIDS sem insuficiência respiratória.	68
Tabela 5: Níveis de citocinas de perfil T _H 1, T _H 2, T _H 17 e quimiocinas e sua associação com óbito em pacientes HIV/AIDS.....	69
Tabela 6: Níveis de citocinas em pacientes HIV/AIDS com e sem comorbidade respiratória, neurológica e digestiva.	71
Tabela 7: Níveis de citocinas em pacientes HIV/AIDS com manifestações hematológicas...	72
Tabela 8: Associação dos níveis de citocinas com a contagem de células T CD4+ e carga viral de pacientes HIV/AIDS.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ADP	Adenosina difosfato
ADR	Adrenalina
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATP	Adenosina trifosfato
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCR5	Receptor de quimiocina tipo 5
CD29	Integrina beta 1
CD94	Receptor de lectina tipo C
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
CLEC-2	Receptor lectina C tipo 2
CMV	Citomegalovírus
CXCR4	Receptor de lectina tipo 4
DC	Célula dendrítica
DC-SIGN	Receptores de lectina tipo C
DHL	Desidrogenase láctica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EBV	Epstein Baar
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Env	Gene estrutural do HIV
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado
Gag	Gene estrutural do HIV
GALT	Tecido linfoide do intestino
GP	Glicoproteína
gp120	Glicoproteína 120 do HIV
gp41	Glicoproteína 41 do HIV
GPI	Glicosilfosfatidilinositolse
HAART	Terapia anti-retroviral altamente ativa
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta frequência
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
KIRs	<i>Killer cell immunoglobulin-like receptors</i>
KYU	Quinurenina
LBP	Proteína de ligação a LPS
LPS	Lipopolissacarídeo
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
mCD14	CD14 de membrana
MD2	Fator de diferenciação mieloide 2
MFI	Intensidade média de fluorescência
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Proteins</i>
NCRs	Receptores de citotoxicidade natural
<i>Nef</i>	Gene funcional do HIV
NF-κB	Fator de transcrição
NK	Células <i>natural killer</i>
NKG2A	Receptor de lectina tipo C
NO	Óxido nítrico
p17	Matriz proteica do HIV
p24	Capsídeo viral do HIV
pDC	Células dendríticas plasmocitoides
PF4	Fator plaquetário 4
PGE₁	Prostaglandina
PMP	Micropartículas de plaquetas
<i>Pol</i>	Gene estrutural do HIV
PRP	Plasma rico em plaquetas
PSGL-1	Ligante leucocitário glicoproteico de P-selectina 1
PVHIV	Pessoas vivendo com HIV
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Expressed e Secreted</i>

RNA	Ácido ribonucleico
sCD14	CD14 solúvel
sCD27	CD27 solúvel
sCD40L	CD40L solúvel
Sinan	Sistema de Informações de Agravos de Notificação
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
sTNFR-1	Receptor de TNF solúvel
T CD4+	Linfócito T auxiliar
T CD8+	Linfócito T citotóxico
TARV	Terapia anti-retroviral
Tat	Gene funcional do HIV
TB	Tuberculose
TCR	Receptor de célula T
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TGI	Trato gastrointestinal
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
T_H1	Linfócitos T auxiliares 1
T_H17	Linfócitos T auxiliares 17
TLR	Receptores Toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
T_{regs}	Células T reguladoras
TRP	Triptofano
TxA2	Tromboxano
UNAIDS	<i>The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
Ver	Gene funcional do HIV
Vif	Gene funcional do HIV
Vpr	Gene funcional do HIV
Vpu	Gene funcional do HIV
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor
cel/mm³	Células por milímetro cúbico
%	Por cento
mm³	Milímetro cúbico
mL	Mililitro
RPM	Rotação por minutos
°C	Graus Celsius
x g	Força centrífuga gravitacional
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
μM	Micromolar
mg/mL	Miligrama por mililitro
Nm	Nanometro
χ^2	Qui-quadrado
μM	Microlitro
pg/mL	Picograma por mililitro
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1. Epidemiologia HIV e HIV/AIDS	23
2.2. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	28
2.2.1. Características biológicas, estruturais, genômica e ciclo de vida	28
2.2.2. Patogênese da infecção pelo HIV	32
2.2.3. Resposta imune na evolução da doença pelo HIV	34
2.3. Alteração da dinâmica da doença com o advento TARV	38
2.4. Fatores associados à inflamação crônica	39
2.5. Comorbidades respiratórias e HIV	42
2.6. Plaquetas e HIV	44
2.7. Plaquetas e comorbidades respiratórias	46
2.8. Morfologia, formação e estrutura das plaquetas	48
2.9. Função plaquetária	50
2.9.1. Agregação plaquetária	51
2.9.2. Inflamação e imunidade	52
3. JUSTIFICATIVA	54
4. OBJETIVOS	55
4.1. Geral	55
4.2. Específicos	55
5. MATERIAL E MÉTODOS	56
5.1. Considerações éticas	56
5.2. Tipo, população e local do estudo	56
5.2.1. Critérios de inclusão	56
5.2.2. Critérios de exclusão	57
5.3. Análise retrospectiva	57
5.4. Abordagem dos pacientes	57
5.5. Obtenção dos dados clínicos	57
5.6. Coleta das amostras biológicas	58
5.7. Obtenção do soro e armazenamento das amostras	58
5.8. Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP)	58

5.9. Isolamento das plaquetas.....	59
5.10. Avaliação da resposta de plaquetas	60
5.11. Dosagem de citocinas plasmáticas.....	60
5.12. Dosagem de CD14 solúvel (sCD14).....	61
5.13. Identificação e quantificação de Triptofano (TRP) e Quinurenina (KYU)	61
5.14. Leitura e análise das amostras de CBA e plaquetas.....	62
5.15. Definições de morbididades abordadas no estudo	62
5.16. Análise estatística	63
6. RESULTADOS.....	64
7. DISCUSSÃO.....	78
8. LIMITAÇÕES.....	85
9. CONCLUSÕES	86
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
11. PERSPECTIVAS	88
12. REFERÊNCIAS	89
13. ANEXOS	109

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é uma pandemia mundial e estima-se que aproximadamente 37 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas pelo HIV (NASSER et al., 2018). Não obstante, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) está associada à alta mortalidade e morbidade nestes indivíduos (FETTING et al., 2014). Desde o início da epidemia ocorreram 35 milhões de mortes por causas relacionadas à AIDS, sendo 1,3 milhão de mortes somente em 2017 (UNAIDS, 2018). No Brasil, neste mesmo ano, foram registrados aproximadamente 16,4 mil casos de HIV, 15,7 de AIDS e 12,4 mil mortes por causas associadas à AIDS (BRASIL, 2017).

Tem-se observado nos últimos anos uma mudança no perfil epidemiológico da infecção pelo HIV. O advento da terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART) fez com que houvesse um declínio exponencial na mortalidade e morbidade associadas ao HIV/AIDS, refletindo na melhora da qualidade de vida, e conseqüentemente no crescimento das taxas de sobrevivência nesta população (WANG et al., 2016). Nesse contexto, a mortalidade nesses indivíduos passou a ser associada a causas subjacentes não convencionais ao HIV, tais como complicações decorrentes da ativação imunológica crônica e inflamação, que estariam ocasionando o aumento de comorbidades, dentre elas as respiratórias (LORENC et al., 2014; GALLANT et al., 2017).

Pessoas vivendo com HIV (PVHIV) podem apresentar elevada prevalência de doenças respiratórias (DRUMOND & KIRK, 2014), e que em parte, se deve ao estabelecimento do processo imunossupressivo, mas também a outros fatores de risco, tais como comportamental (tabagismo) e/ou clínico (co-infecções) (MARINCU et al., 2015). Assim, em algum momento do transcorrer da infecção, a pessoa vivendo pode manifestar algum sintoma e/ou patologia respiratória (ALINAGHI et al., 2011).

As doenças respiratórias de origem infecciosa são as mais comuns e as principais causas de óbito nestas pessoas (GINGO et al., 2013), com destaque para tuberculose (BRUCHFELD et al., 2015) e pneumonia (FELDMAN, 2005). Contudo, doenças crônicas, como a insuficiência respiratória (que também pode ser decorrente do agravamento das doenças infecciosas), frequente em PVHIV internadas, não podem ser excluídas (SARKAR & RASHEED, 2013).

Os quadros clínicos de doenças respiratórias em pacientes HIV podem ser ainda agravados pelo processo de ativação plaquetária, induzido pela exacerbação do constante estado inflamatório nesses pacientes (BOZZA et al., 2009). Sabe-se que a infecção pelo HIV está frequentemente associada com um déficit da função plaquetária, aumento dos níveis de ativadores plaquetários e exacerbação da ativação plaquetária (KIEBALA et al., 2015). Além disso, as plaquetas parecem influenciar na história natural da infecção pelo HIV, uma vez que, o aumento da sua contagem relaciona-se com a carga viral e progressão da doença (TSEGAYE et al., 2013). Contudo, há uma escassez de dados sobre a função plaquetária na infecção pelo HIV, principalmente associada à comorbidades respiratórias, porém indícios de que estes pacientes teriam uma reatividade plaquetária alterada já foram descritos (SATCHELL et al., 2010).

Uma análise retrospectiva das principais comorbidades encontradas em pacientes HIV/AIDS internados na FMT-HVD apontou a maior frequência de comorbidades respiratórias associada ao risco de óbito (dados não publicados). Desse modo, elaboramos a hipótese de que pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória apresentavam atividade plaquetária alterada. A constatação desta forneceria embasamento para compreensão da função plaquetária durante o curso da infecção pelo HIV frente a complicações respiratórias, além do possível envolvimento das plaquetas na patogênese destas complicações.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Epidemiologia HIV e HIV/AIDS

A Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês: *Acquired Immunodeficiency Syndrome – AIDS*) é definida de acordo com o *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) como uma doença de carácter infecciosa que tem como agente o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), cuja principal característica é redução da contagem de células T CD4+ que por sua vez tornam seus portadores imunodeprimidos ou imunodeficientes. A imunossupressão que leva ao surgimento da AIDS geralmente aparece quando a contagem absoluta de células T CD4+ for $< 200 \text{ cel/mm}^3$ de sangue, ou o percentual de CD4 for $< 14\%$ (CASTRO et al., 1993).

O recente levantamento da *The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* (UNAIDS) apontou 1,8 milhão de novas infecções pelo HIV no mundo em 2016, alcançando um total de 36,7 milhões de pessoas vivendo com HIV (UNAIDS, 2018). Em contrapartida, as mortes por causas associadas à AIDS declinaram 48% desde 2005. Estima-se que, em 2016, cerca de 1 milhão de pessoas morreram em decorrência de causas associadas à AIDS em todo o mundo. Estes valores representam um avanço relevante visto que em 2010 e 2005 os índices eram de 1,5 e 1,9 milhão, respectivamente (WHO, 2018, UNAIDS, 2018).

A constante redução das taxas de mortalidade nesta população ainda tende ao declínio, uma vez que as pessoas que fazem o uso da terapia anti-retroviral (TARV) estão apresentando maiores índices de sobrevivência (MAARTENS et al., 2014). O efeito do advento da TARV pode ser observada no número dessas pessoas com acesso a terapia, que atingiu 20,9 milhões em 2017, enquanto que em 2015 era de 17,1 milhões (UNAIDS, 2018). O efeito também foi observado nos índices de novas infecções, com redução de 3,3 milhões para 2,3 milhões entre 2002 e 2012 (MAARTENS et al., 2014).

No Brasil, foram notificados pelo Sistema de Informações de Agravos de Notificação (Sinan) entre os anos de 2007 e 2017, 194.217 casos de infecção pelo HIV, sendo 131.969 em homens e 62.198 em mulheres (Figura 1). A região que apresentou maior número de casos foi a Sudeste, com 96.439 (49,7%), seguida pelo Sul com 40.297 (20,7%), Nordeste com 30.297 (15,6%), Norte com 14.275 (7,4%) e Centro-Oeste com 12.931 (6,7%) (BRASIL, 2017).

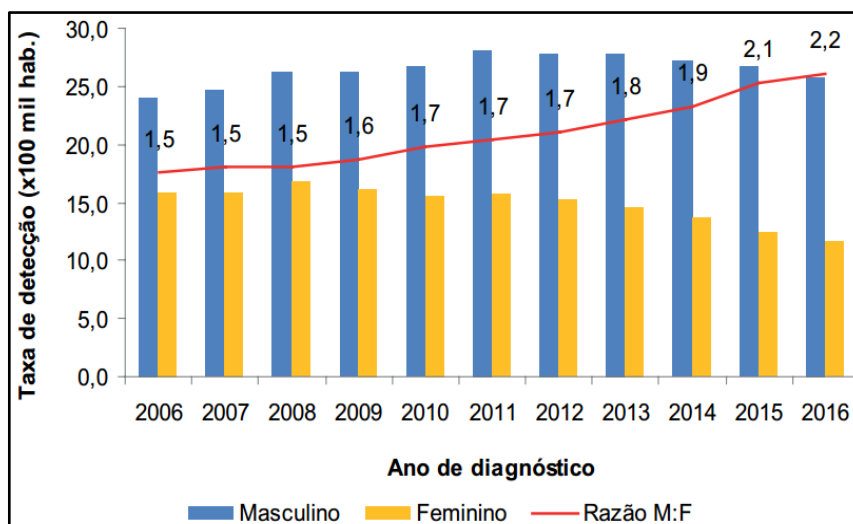


Figura 1: Taxa de detecção de AIDS (por 100 mil habitantes) segundo sexo e razão de sexos por ano de diagnóstico. Brasil, 2006 a 2015. Fonte: Boletim epidemiológico HIV-AIDS 2017.

Do início da epidemia de AIDS no Brasil em 1980 até junho de 2016, foram notificados no país 842.710 casos de AIDS, apresentando uma concentração nas regiões Sudeste e Sul, correspondendo cada qual a 53,2% e 20,1% do total de casos, as regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte correspondem a 15,4%, 6,1% e 6,0% do total dos casos, respectivamente (BRASIL, 2017).

Tem sido registrado no país, anualmente, uma média de 40 mil casos de AIDS nos últimos cinco anos. A região Norte apresentou uma média de 4,2 mil casos ao ano, o Nordeste, 8,8 mil, o Sudeste, 16,3 mil, o Sul, 8,5 mil e o Centro-Oeste, 2,8 mil (BRASIL, 2017). Apesar de nos últimos dez anos o Brasil ter apresentado uma estabilização na taxa de detecção de AIDS, com uma média de 20,7 casos a cada 100.000 habitantes, as regiões Norte e Nordeste apresentaram uma tendência linear de crescimento da taxa de detecção; em 2006 a taxa registrada foi de 14,9 (Norte) e 11,2 (Nordeste) casos/100 mil habitantes, enquanto no último ano a taxa foi de 24,8 (Norte) e 15,2 (Nordeste), representando um aumento de 66,4% (Norte) e 35,7% (Nordeste) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

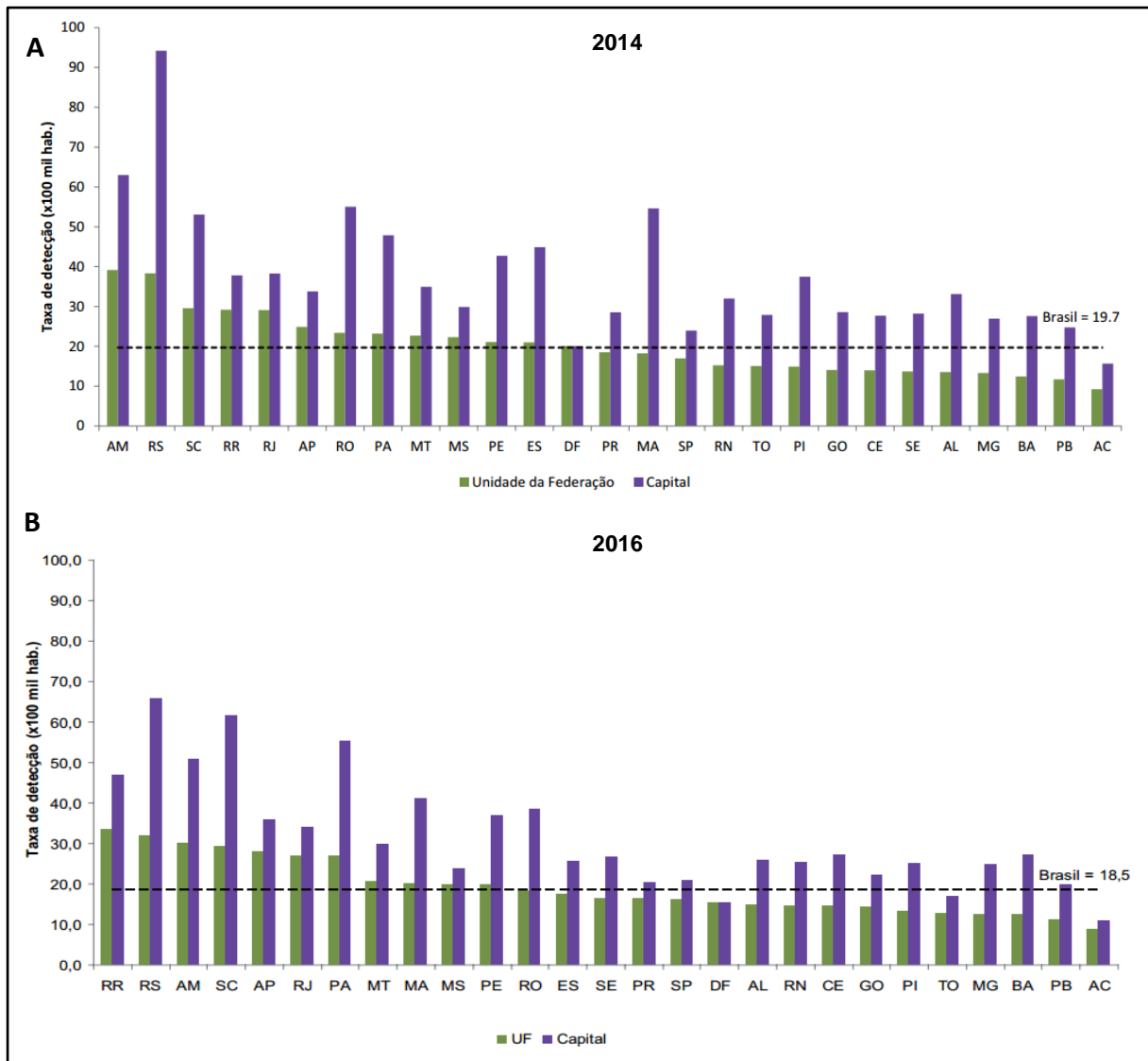


Figura 2: Taxa de detecção de AIDS (por 100 mil habitantes) segundo UF e capital de residência. A) Taxa de detecção de AIDS (por 100 mil habitantes) segundo UF e capital de residência. Brasil 2014. Fonte: Boletim epidemiológico HIV-AIDS 2015. B) Taxa de detecção de AIDS (por 100 mil habitantes) segundo UF e capital de residência. Brasil, 2016. Fonte: Boletim epidemiológico HIV-AIDS 2017.

Em 2014, o estado do Amazonas atingiu o patamar de segundo estado da federação em número de incidência de HIV/AIDS, ficando atrás apenas do Rio Grande do Sul (Figura 2A). Além disso, a capital Manaus também alcançou altos índices com 63 casos a cada 100 mil habitantes. Neste mesmo ano, foram registrados 294 óbitos por AIDS no estado (BRASIL, 2015). Em 2016, o Amazonas ainda se configurou entre os três principais estados do país com casos de HIV/AIDS, bem como sua capital, Manaus (Figura 2B). O pico maior de óbitos por AIDS foi em 2015 de 299 (BRASIL, 2017).

Um recente levantamento da situação epidemiológica de HIV/AIDS no Amazonas entre 2001 e 2012, observou que apesar de uma ligeira redução dos índices epidemiológicos associados a HIV/AIDS nos últimos anos, o quadro de epidemia no estado ainda está distante de uma estabilização, principalmente devido ao crescimento da incidência de AIDS, do índice de mortalidade e diagnósticos tardios (Figura 3) (OLIVEIRA et al., 2015).

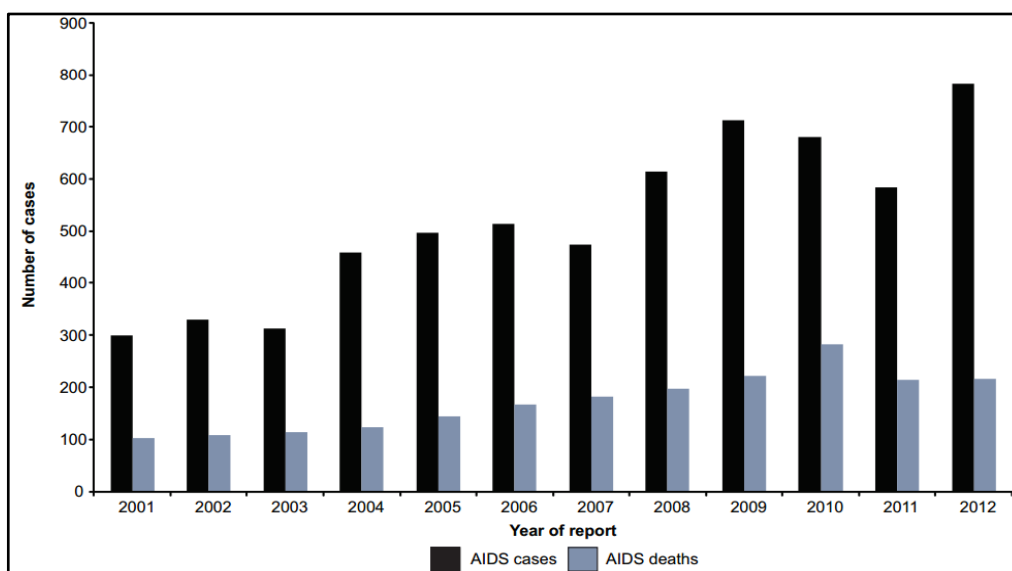


Figura 3: Casos de AIDS em adultos e mortes relacionadas com a AIDS no Estado do Amazonas, 2001-2012. Fonte: OLIVEIRA et al., 2015.

Este mesmo estudo também observou que questões como o isolamento geográfico, barreiras logísticas e a população cultural e eticamente diversificada, colaboraram com a disseminação da epidemia para o interior do estado, dificultando o seu controle (Figura 4) (OLIVEIRA et al., 2015).

Dados do boletim epidemiológico institucional da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) apontam que no ano de 2016 a instituição registrou 1067 casos de infecção pelo HIV, com 360 de AIDS e 278 óbitos (FMT-HVD, 2016).

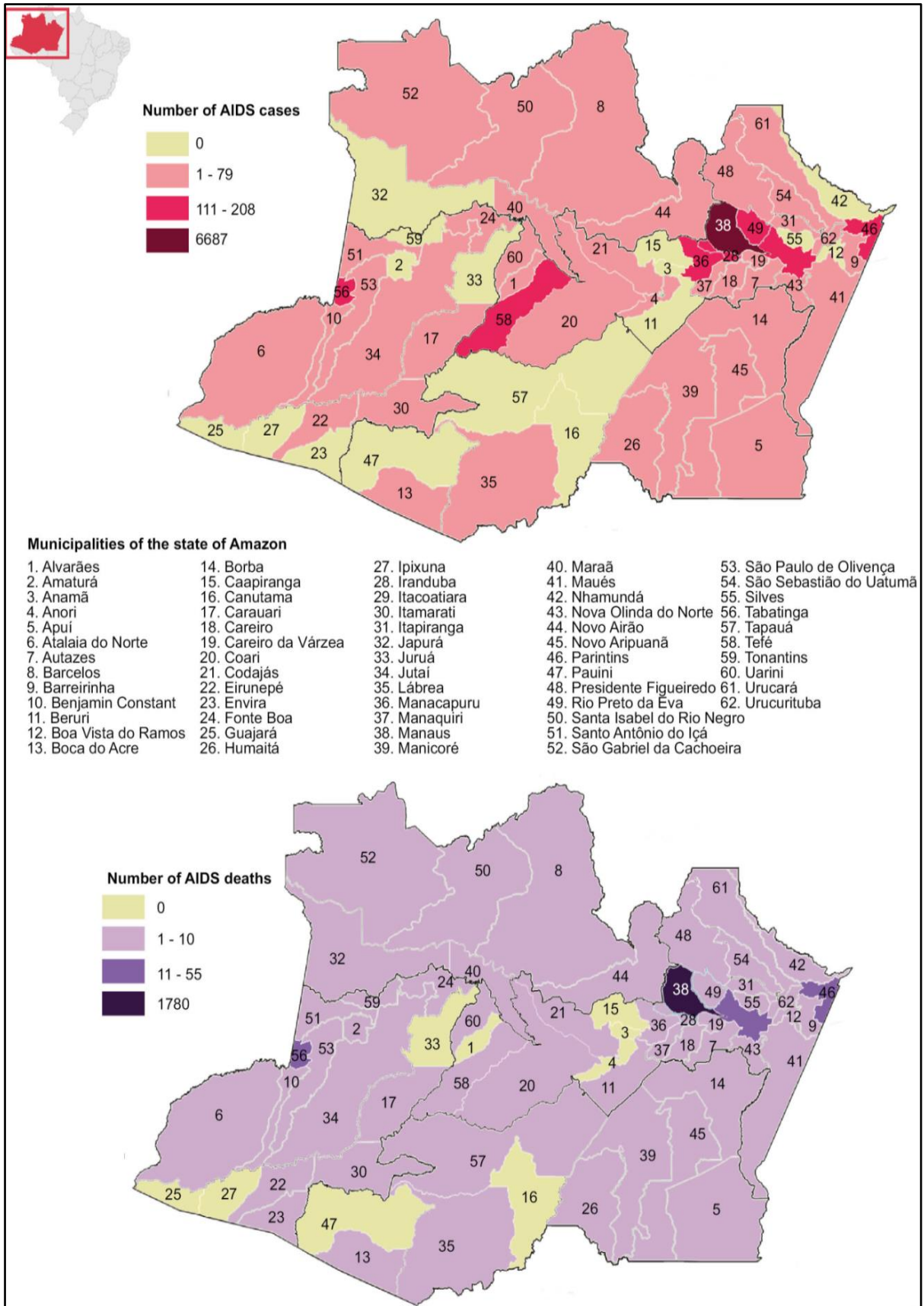


Figura 4: Casos de AIDS e mortes relacionadas com AIDS por município, Estado do Amazonas, 2001-2012 (OLIVEIRA et al., 2015).

2.2. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

2.2.1. Características biológicas, estruturais, genômica e ciclo de vida

O HIV é um retrovírus envelopado pertencente ao gênero *Lentivirus*. O envelope viral é formado por uma bicamada lipídica derivada da célula do hospedeiro, contendo as glicoproteínas gp120 e gp41, importantes para a entrada do vírus nas células do hospedeiro. Internamente, uma matriz proteica (p17) envolve o capsídeo viral (p24). No interior do capsídeo encontra-se o genoma viral, constituído de duas moléculas de RNA de fita simples, associado a três enzimas virais: transcriptase reversa, integrase e protease (Figura 5) (TEIXEIRA et al., 2011; RAJARAPU, 2014).

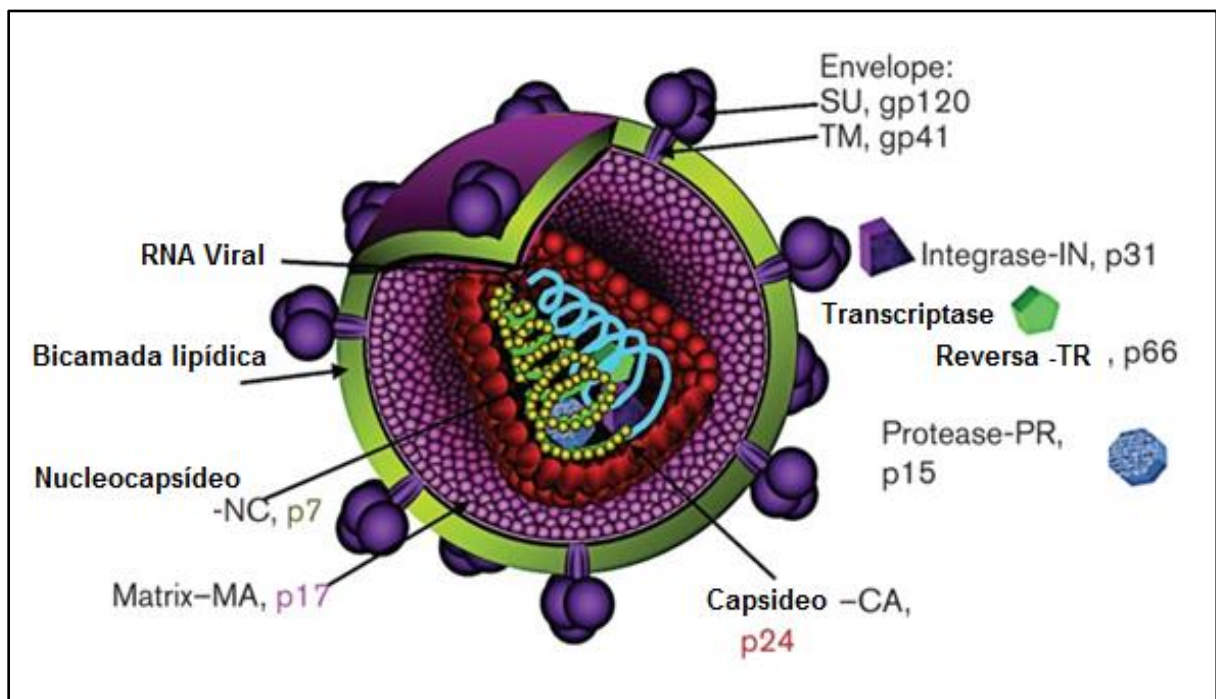


Figura 5: Estrutura do vírus HIV. Representação esquemática de uma partícula viral madura do vírus HIV (Adpatado de Steckbeck et al., 2013).

O genoma viral completo do HIV é constituído de nove genes flanqueados por longas sequencias terminais repetidas LTRs (do inglês *long terminal repeat*) (Figura 6). As LTRs atuam regulando a expressão dos genes virais, a integração viral no genoma do hospedeiro e a replicação viral. Os nove genes são responsáveis por codificar as proteínas

virais e podem ser estruturais (*env*, *gag* e *pol*) e funcionais (*tat*, *ver*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*) (SUNDQUIST et al., 2012; NAGATA et al., 2017).

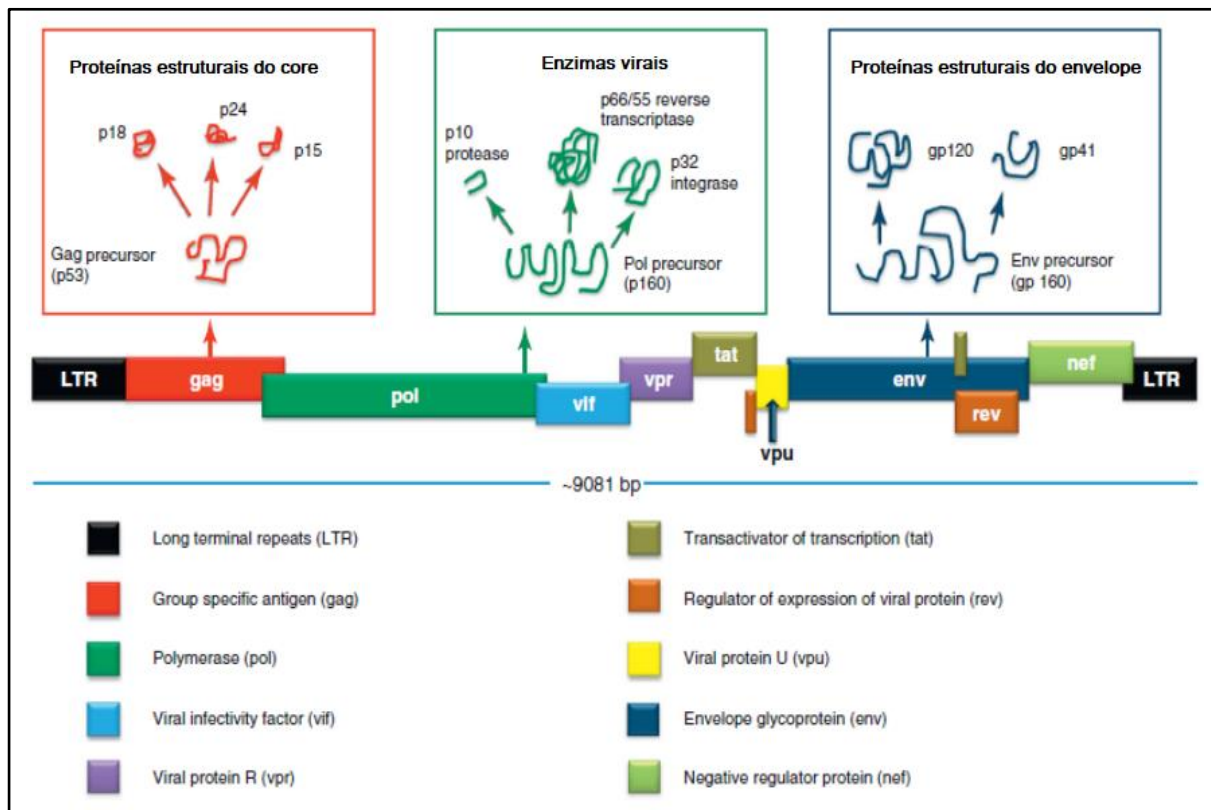


Figura 6: Organização genômica do vírus HIV. **LTR** – Transcrição do genoma viral; integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira; local de ligação para fatores de transcrição do hospedeiro. **Gag** – proteínas do centro do nucleocapsídeo e da matriz. **Pol** – Transcriptase reversa, protease, integrase e ribonuclease. **Env** – proteínas do envelope viral (gp120 e gp41). **Vif** – supera os efeitos inibidores das enzimas da célula hospedeira (APOBEC3G), promove a replicação viral. **Vpr** – aumenta a replicação viral; promove infecção dos macrófagos pelo HIV; bloqueia progressão do ciclo celular. **Tat** – necessária para alongamento dos transcritos virais. **Ver** – promove a exportação nuclear de RNAs virais incompletas. **Vpu** – regula de forma inibitória a expressão da célula CD4 do hospedeiro; acentua a liberação dos vírus das células; neutraliza o fator de restrição teterina do hospedeiro. **Nef** – regula de forma inibitória a expressão da célula CD4 do hospedeiro e do MHC-I do hospedeiro; acentua a sinalização intracelular para facilitar a replicação viral (Adaptado de Rajarapu, 2014).

O gene *gag* codifica proteínas estruturais do núcleo, como a da matriz (p17), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo (p7/p9) (CONNOR & HO, 1992; MURPHY, 2014). O gene *env* codifica as glicoproteínas gp120 e gp41, que não estão covalentemente associadas uma à outra e são importantes para a infecção das células (ARRILDT et al., 2012). O gene *pol* é responsável por codificar as enzimas virais transcriptase reversa, integrase e protease,

altamente relevantes à replicação viral (NAGATA et al., 2017). Dentre os três genes estruturais, o *env* é o que possui maior variabilidade genética. Variações nas sequências dos genes *gag* e *pol* podem induzir à geração de vírus inviáveis, porém, as sequências *env* aceitam um elevado número de substituições, que em sua maioria favorecem o escape do vírus aos mecanismos da imunidade do hospedeiro (CONNOR & HO, 1992). Além destes genes, comumente encontrados também em outros retrovírus, o genoma do HIV, como visto acima, possui outros seis genes funcionais ou reguladores, que são eles *tat*, *ver*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* (NAGATA et al., 2017) (Figura 2). Esses genes codificam proteínas que afetam a replicação viral e a infectividade de diversas maneiras (MURPHY, 2014).

Dois destes genes, *tat* e *rev*, desempenham funções regulatórias de essenciais para a replicação viral (BAGASHEV & SAWAYA, 2013; WILLIAMSON et al., 2015). Os outros quatro, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*, são essenciais para a eficiente produção do vírus *in vitro* (NAGATA et al., 2017). Mais detalhadamente, o gene *tat* regula a transcrição de LTRs pela ligação aos transcritos virais. O gene *rev* é responsável pela migração do RNA mensageiro (RNAm) do núcleo para o citoplasma para tradução de novas proteínas de *env*, *gag* e *pol*. O gene *nef* está envolvido na replicação do HIV-1 *in vivo*, além de inibir a expressão das células CD4 e do MHC de classe I do hospedeiro. O gene *vif* atua na fase de maturação viral mediante o desenvolvimento da estrutura cônica do capsídeo, que está envolvida na infectividade dos vírions em células não infectadas. Esse gene também pode interromper a atividade antiviral da enzima humana APOBEC (enzima citidina desaminase que muda ácidos nucleicos virais) por degradação proteossômica, inibindo sua entrada nos vírions. O gene *vpu* atua na liberação de vírions de células infectadas mediante o brotamento das partículas virais recém produzidas. O gene *vpr* atua aumentando a replicação viral em células que não estão em divisão, promove a infecção dos macrófagos pelo HIV e bloqueia a progressão do ciclo celular (MURPHY, 2014).

A infecção pelo HIV inicia através interação entre a gp120 e o receptor CD4 da célula alvo, que por sua vez interage com os coreceptores de quimiocina CCR5 ou CXCR4, como demonstrado na Figura 7 (MARTEENS et al., 2014). Ao ligar-se ao receptor CD4, a gp120 sofre alterações conformacionais e expõe os sítios de ligação para o correceptor. Após essas interações, a gp41 ancora o complexo gp120/gp41, ocasionando a fusão do envelope viral na membrana celular hospedeira e, em seguida, ocorre a liberação do capsídeo do vírus no citoplasma da célula e, por conseguinte, do RNA genômico viral e das enzimas virais no

citoplasma da célula do hospedeiro (BARRÉ-SINOUSI, 1996; FREED, 2001). Passado este processo, inicia-se às fases de transcrição do ácido ribonucleico (RNA) viral em ácido desoxirribonucleico (DNA) por meio da enzima transcriptase reversa e, posteriormente ocorre a duplicação do DNA viral, que em seguida será inserido no genoma do hospedeiro por intermédio da integrase, outra enzima do vírus (BARRÉ-SINOUSI, 1996).

Em seguida, os processos de transcrição e tradução das proteínas virais ocorrem em sequência, por ação da enzima protease. A etapa de montagem e liberação dos *vírions* da célula ocorrem pelo processo de brotamento sendo que, parte da membrana plasmática do hospedeiro originará à cápsula viral (FREED, 1998). Após liberação da partícula imatura, ocorre o processo de maturação no qual os vírus são formados. Ao final, além dos diversos efeitos citopáticos virais, os índices de replicação viral podem atingir níveis tão elevados que induzem à morte da célula (PIATAK et al., 1993; PEÇANHA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2009).

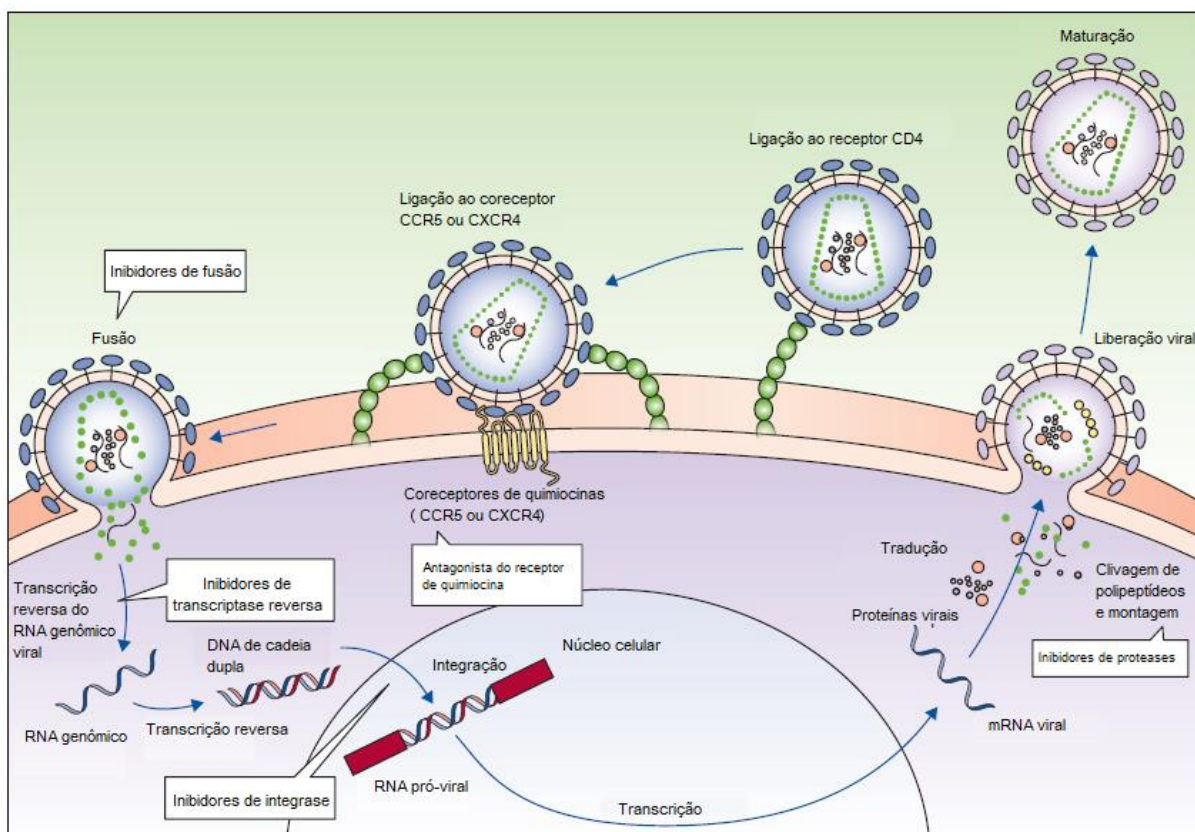


Figura 7: Ciclo de vida do vírus HIV (Adaptado de MARTEENS et al., 2014).

2.2.2. Patogênese da infecção pelo HIV

A infecção pelo HIV começa com uma fase aguda, que é em partes controlada pela resposta imune, e evolui para uma infecção progressiva crônica dos tecidos linfóides periféricos (KUMAR et al., 2010). O vírus tipicamente entra no organismo através do epitélio das mucosas. Os eventos patogênicos e manifestações clínicas após a infecção podem ser divididos em três fases: (1) infecção primária ou fase aguda: período de tempo a partir da infecção inicial pelo HIV-1 até o desenvolvimento da resposta de anticorpos (0-12 semanas); (2) fase assintomática ou de latência clínica (1-15 anos) e (3) fase sintomática ou AIDS, onde surgem as doenças que definem a AIDS (Figura 8). (STEVENSON, 2003; LETVIN & WALKER, 2003; KUMAR et al., 2010).

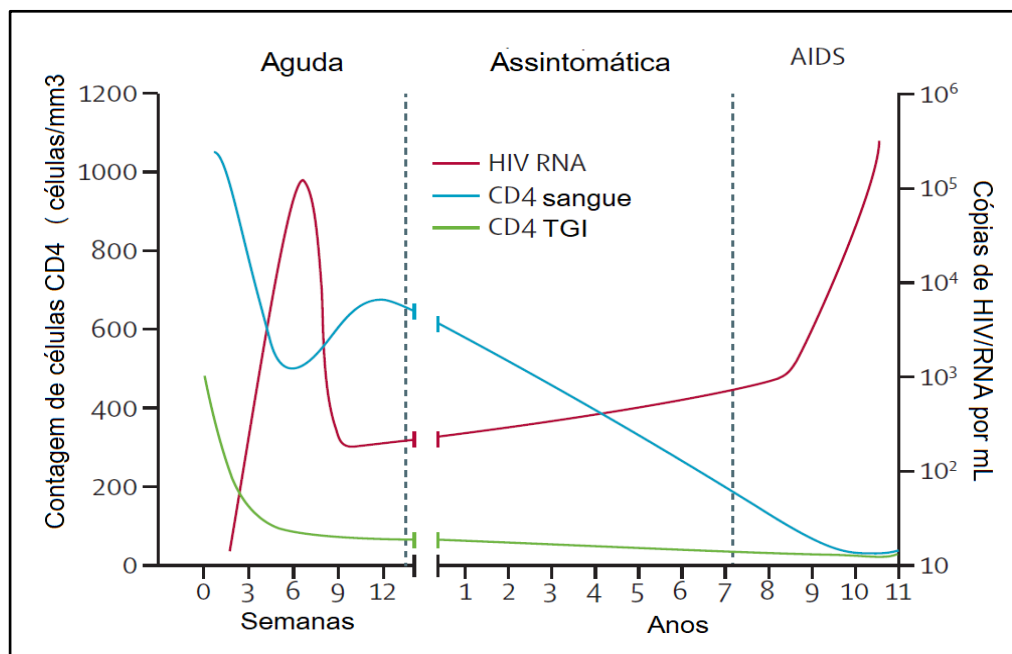


Figura 8: Evolução clínica da infecção pelo HIV. TGI: trato gastrointestinal (Adaptado de MARTEENS et al., 2014).

A infecção pelo HIV começa sem sintomas ou mal-estar e é acompanhada por pequenas mudanças no sistema imunológico. Esta fase pode-se estender até três meses após a infecção, que culmina na soroconversão com a detecção de anticorpos específicos para HIV, período conhecido como “janela imunológica” (NAIF, 2013).

A infecção primária ou aguda é caracterizada pela infecção dos linfócitos T CD4+ de memória nos tecidos linfoides das mucosas e pela morte de um grande número de células infectadas. Os tecidos das mucosas são grandes reservatórios de linfócitos e um importante local de residência de linfócitos T de memória, esta perda local causa uma exponencial depleção de linfócitos, tanto que, poucas células infectadas são detectáveis no sangue e outros tecidos (HAASE, 2005; BRENCHLEY et al., 2006a).

Após a infecção das mucosas ocorre a disseminação do vírus e o desenvolvimento de respostas imunes do hospedeiro, denominado viremia primária (KUMAR et al., 2010). As células dendríticas (DC – do inglês: *dendritic cells*) do epitélio capturam o vírus no local de entrada e migram para os linfonodos, onde elas disseminam o vírus para os linfócitos T CD4+ através de contato direto de célula à célula. Esse processo de replicação induz à viremia secundária, quando um alto número de partículas do vírus está presente no sangue. O vírus dissemina-se pelo corpo devido a infecção de linfócitos T CD4+, macrófagos e DC nos tecidos linfoides periféricos (KUMAR et al., 2010). Enquanto a infecção se dissemina, o indivíduo desenvolve respostas imunes humorais e celulares antivirais (GANDHI & WALKER, 2002). Estas respostas são evidenciadas pela soroconversão e pelo desenvolvimento de linfócitos citotóxicos CD8+ (T CD8+) para o vírus, contendo parcialmente a infecção e a produção viral (STAPRANS & FEINBERG, 2004, KUMAR et al., 2010).

Após a resolução do quadro de infecção primária e a soroconversão, o indivíduo entra na fase crônica, porém com poucas ou nenhuma manifestações clínicas, portanto, sendo esta fase assintomática, sendo conhecida como fase de latência clínica do HIV. Esta fase pode durar de vários meses a alguns anos. A replicação viral é mantida no baço e nos linfonodos, contudo, há um balanço entre a destruição das células T CD4+ e sua produção. Dessa forma, ocorre uma destruição lenta e gradativa de células T CD4+, macrófagos e DC (BARTLETT & MOORE 1999; GESKUS et al., 2007).

A fase final da infecção é a progressão para a AIDS, caracterizada por colapso das defesas do hospedeiro. Esse colapso leva a infecção a uma evolução para doença grave, caracterizada pelo aparecimento de comorbidades e co-infecções, que podem resultar ao óbito (KUMAR et al., 2010). Essa etapa é marcada pela intensa e progressiva depleção das células T CD4+ (FORSMAN & WEISS, 2008). Concordou-se que os indivíduos infectados

desenvolvem a AIDS quando a carga viral é alta e a contagem de T CD4+ é menor que 200 mm³ (NAIF, 2013). Essa depleção é intensificada pelo aumento de apoptose de linfócitos infectados e não infectados pelo HIV (FORSMAN & WEISS, 2008). Ocorrem a produção e/ou ativação de citocinas pro e anti-inflamatórias que refletem uma intensa replicação viral associada a uma imunossupressão que predispõe às infecções oportunistas e/ou neoplasias (GANDHI & WALKER, 2002).

2.2.3. Resposta imune na evolução da doença pelo HIV

Uma das principais características da patogênese do HIV é a incapacidade do sistema imune controlar e eliminar o vírus, e os eventos iniciais após a infecção viral tem recebido maior destaque, já que as respostas primárias em infecções virais comuns geralmente são suficientes para eliminar o vírus. Com o vírus HIV estas respostas não são eficientes, tão pouco na eliminação do patógeno, visto que se trata de um representante da família lentivirus. A resposta imune gerada em um primeiro momento é capaz de reduzir a carga viral, no entanto, não é anticorpo dependente como nos vírus comuns, visto que nesta fase inicial não há seroconversão. Tal evento dificulta até a detecção diagnóstica em alguns casos (MOGENSEN et al., 2010).

Na fase aguda da infecção pelo HIV, a resposta imune é caracterizada pelo reconhecimento inicial do vírus por DC's, que desempenham um papel importante na patogênese da doença, ocorrendo já nos estágios iniciais e permanecendo durante toda a infecção (TURVILLE et al., 2001). Isto ocorre porque estas células são os alvos primários do vírus após a exposição da mucosa, podendo também ser utilizadas como um reservatório viral (McMICHAEL et al., 2010).

O evento inicial para que o HIV infecte uma DC é a ligação ao receptor CD4, através da proteína gp120, e aos co-receptores CCR5 ou CXCR4. As DCs também são capazes de capturar o HIV através de receptores de lectina, em especial, o CD209, também chamado de DC-SIGN (*Dendritic cell – specific ICAM3 grabbing non-integrin*) (TURVILLE et al., 2002; MANCHES et al., 2014). A interação entre o HIV-1 e o receptor DC-SIGN induz a internalização do vírus, mantendo-o intacto no endossomo, e ao realizar o transporte do vírus para os linfonodos, as DC aumentam a probabilidade de infecção dos linfócitos T CD4+ e, e a subsequente e rápida disseminação do vírus nas células do hospedeiro (SABATTE et al., 2007; MARTIN-GAYO & YO, 2017).

Já foi demonstrado na infecção pelo HIV, que células dendríticas plasmocitoides (pDC) são capazes de gerar um estado anti viral caracterizado pela produção de grandes quantidades de IFN- α e outras quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias a partir do reconhecimento do RNA viral via TLR7 (MANCHES et al., 2014). Porém, estudos demonstraram que as pDC também podem induzir a diferenciação das células T reguladoras (T_{regs}) e secreção de IL-10 suprimindo a ativação de células T efetoras (MANCHES et al., 2008). Além disso, essa resposta é capaz de reduzir populações de células T_H17 durante a infecção, levando a perda da integridade intestinal e consequente translocação microbiana, favorecendo o rápido progresso para a AIDS (BRENCHLEY et al., 2006b; FAVRE et al., 2010).

A ativação das células *natural killer* (NK) também possui importante papel na infecção pelo HIV, configurando um importante mecanismo antiviral em estágios precoces da infecção, antes do desenvolvimento de respostas mediadas por linfócitos T e B (HENS et al., 2016). As principais ações efetoras das NK incluem a promoção do estado antiviral e antitumoral através da produção de de IFN- α e outras citocinas pró-inflamatórias e a modulação da resposta adaptativa (MAILLIARD et al. 2003; HENS et al., 2016).

Outra função no estado antiviral é a lise de células infectadas pela ação das enzimas perforinas, que criam poros na membrana das células-alvo, e granzimas, que penetram nas células, matando-as por apoptose (CRUVINEL et al., 2010). Os receptores expressados por estas células, se apresentam de forma similar às imunoglobulinas e são denominados de *Killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIRs) CD94 ou NKG2A e receptores de citotoxicidade natural (NCRs) (SCULLY & ALTER, 2016). Os receptores KIR, de modo particular, durante a fase aguda da infecção pelo HIV, demonstram possuir um importante papel no reconhecimento de peptídeos do HIV-1, cujo desfecho induziria a ativação de células NK (ALTER et al., 2007; SCULLY & ALTER, 2016). No entanto, defeitos na função dessas células podem induzir à progressão da doença. É conhecido que o HIV reduz a expressão do HLA, dessa forma as células NK ficam ativadas para a lise das células-alvo. Contudo, o vírus também reduz a expressão das moléculas HLA-A e B, mas pode manter a expressão do HLA-C, favorecendo a evasão do reconhecimento pelas NK (FLORES-VILLANUEVA et al., 2001; LEAL et al., 2017). Estudos envolvendo alelos HLA-B tem demonstrado associação com o baixo declínio de linfócitos T CD4+, células que possibilitam conhecer a progressão da infecção (MARTIN et al., 2002; JENNES et al., 2006). Outras alterações funcionais das NK,

como a diminuição do conteúdo de granzima A e perforina, refletem em uma maior infectividade do vírus e progressão da doença, por reduzirem a capacidade citolítica dessas células (PORTALES et al., 2003). A diminuição de receptores NCR também pode comprometer o *clearance* viral destas células durante a fase aguda da infecção (VIEILLARD et al., 2005; TERRA-JÚNIOR et al., 2016).

De modo geral, a resposta imune durante a fase aguda da infecção pelo HIV compreende o reconhecimento do vírus pelas DCs. Esta interação leva a ativação destas células, e uma vez ativadas secretam IL-12, IL-15, IL-18 e IFN- α que estimulam as células NK, que por sua vez secretam IFN- γ , que atua na maturação de DCs e estimula a resposta T_{H1}. Contudo, durante a infecção esta resposta pode ser prejudicada (ALTFELD et al., 2011).

Mas estes mecanismos de defesas primários, não são eficientes contra o HIV, o vírus passa a infectar as células T CD4+, apresentando um elevado potencial de replicação nestas células. As células T CD4+ ativadas são altamente passíveis à replicação viral, porém, as células T quiescentes não sustentam retrotranscrição, integração e expressão do genoma viral. Isso se dá a presença de baixos níveis de nucleotídeos, ATP e fatores de transcrição (COIRAS et al., 2009). Uma das principais formas com que o HIV mantém a sua replicação e infectividade viral nas células T CD4+ é a partir de mecanismos que promovem a imunomodulação destas células, principalmente via TCR (NERI et al., 2011). Contudo, ainda que ocorra a manutenção da infectividade viral em células T CD4+ ativadas ou quiescentes, a infecção direta pelo HIV-1, apoptose das células ativadas e a morte das células infectadas pelos linfócitos T CD8+ culminam na elevada depleção das células T CD4+ durante a infecção (HAZEMBERG et al., 2000).

Anormalidades funcionais nas células T CD4+, como falha na divisão celular, foram associadas à perda na resposta imunitária a antígenos de memória, aloantígenos e mitógenos (CLEIRICI et al., 1989). Defeitos de proliferação foram associados à expressão diminuída de IL-2 em células T CD4+ de indivíduos infectados (SIEG et al., 2001). Em contraste, a expressão de IFN- γ é frequentemente mantida, sugerindo que os defeitos na resposta não são consequentes da depleção de células reativas ao antígeno, mas sim de um defeito na capacidade destas células responderem após o reconhecimento via TCR (SIEG et al., 2001).

A expansão de células T CD8+ específicos para peptídeos do HIV é uma das formas da imunidade adaptativa responder à infecção pelo vírus, controlando-a na fase inicial, porém

torna-se ineficaz com a evolução da infecção devido o surgimento de mutantes virais (variantes com antígenos mutados) (STREECK & NIXON 2010). A ação citotóxica das células T CD8+ é essencial para o controle da infecção pelo HIV, visto que uma maior concentração de granzima B e perforina nos grânulos dessas células foi observada em indivíduos não progressores em comparação aos indivíduos progressores (MIGUELES et al., 2008).

Em modelos murinos de imunodeficiência adquirida com vírus da imunodeficiência símia (SIV), o aumento na frequência de células T_{regs} naturais no sangue periférico foi associado com a progressão da doença (BEILHARZ et al., 2004). Em humanos, estudos demonstram que a resposta imune contra HIV pode ser diminuída pelas T_{regs} naturais (AANDAHL et al., 2004; KINTER et al., 2004) e que a persistência viral induz à expansão de T_{regs}, culminando em uma tolerância imunológica aos antígenos do vírus (WEISS et al., 2004). Segundo esses estudos, as células T_{regs} durante a infecção pelo HIV podem contribuir para o crescimento da viremia, por diminuir respostas imunes específicas contra o vírus. A ação das T_{regs} também pode impedir a depleção das células T CD4+ e outras respostas inflamatórias (HUNT et al., 2011). Por outro lado, as T_{regs} podem controlar a imunopatogênese durante a infecção aguda pelo HIV, bem como contribuir para a progressão para a fase crônica da doença (NIXON et al., 2005; DAMOISEAUX, 2006; FÉVRIER et al., 2011).

A infecção pelo HIV também é controlada pela ação de anticorpos (imunidade humoral) que respondem a uma variedade de antígenos do vírus. Os primeiros anticorpos são gerados dentre 6 a 9 semanas após a infecção (ABBAS et al., 2016). A produção inicial de anticorpos anti-HIV-1 é principalmente direcionada para epítomos das glicoproteínas do envelope viral, porém não são neutralizantes, logo são fracos inibidores da infecciosidade viral (TOMARAS et al., 2008). Os principais anticorpos são gerados contra as proteínas gp120, gp41 e p24, bem como contra a transcriptase reversa e produtos de *gag* e *pol* (ABBAS et al., 2016).

Acredita-se que a produção de anticorpos anti-gp41 se dá ainda na fase aguda da infecção, entre 5 e 13 dias após o pico de viremia, podendo ser identificados níveis plasmáticos. Esses anticorpos podem ser IgM e IgG, desse modo sugere-se que o *switching* de classe ocorra de forma precoce na infecção pelo HIV (TOMARAS et al., 2008). Anticorpos anti-gp120 surgem aproximadamente 28 dias após o pico de viremia, mas mesmo

esses anticorpos não são capazes de conter o vírus, devido o vírus alterar rapidamente os epítomos mais imunodominantes das proteínas do seu envelope (PANTOPHLET & BURTON, 2006).

Os anticorpos capazes de neutralizar o vírus são desenvolvidos tardiamente, meses após a infecção (TOMARAS et al., 2008). Anticorpos amplamente neutralizantes são dirigidos contra o sítio de ligação ao CD4 e co-receptores, região que impede o vírus de sofrer mutações, sendo desta forma, eficazes na eliminação do vírus (LI et al., 2009). O fato desses anticorpos não controlarem a viremia e conseqüentemente não conferirem proteção contra a infecção afeta de forma direta e negativa a produção de vacinas eficazes baseadas na produção de anticorpos contra o HIV (RERKS-NGARM et al., 2009).

2.3. Alteração da dinâmica da doença com o advento TARV

A epidemiologia da infecção pelo HIV mudou acentuadamente com o acesso à terapia antirretroviral (TARV), com a diminuição da prevalência e a incidência global e uma significativa redução das taxas de mortalidade associadas à infecção pelo HIV (MAARTENS et al., 2014). Por outro lado, têm-se observado mortalidade atribuída a comorbidades não convencionais, tais como neoplasias, patologias hepáticas, respiratórias e cardiovasculares (MORLAT et al., 2014; SACKOFF et al., 2006; THE ANTIRETROVIRAL THERAPY COHORT COLLABORATION 2011; RODGER et al., 2013).

Morlat et al. (2014) encontraram resultados similares entre as causas de mortalidade na França de 2000 a 2010, mostrando que cada vez mais a morbidade e mortalidade dos pacientes HIV não eram causados pela imunodeficiência adquirida, mas por complicações maiores devido a uma inflamação crônica (MORLAT et al., 2014). Estas complicações foram responsáveis pela mortalidade em mais de 50% dos 1,2 milhões de mortes que ocorreram em 2014 (MAARTENS et al., 2014).

Sabe-se desde o início dos estudos sobre a AIDS, que a inflamação crônica exerce um papel crucial na progressão e patogênese da infecção pelo HIV quando não tratada (DEEKS et al., 2013). Em pacientes HIV os eventos decorrentes da inflamação tendem ser mais graves, visto que, a presença contínua do vírus mantém as células T CD4+ e T CD8+ em um estado de ativação constante (MUSWE et al., 2017).

Na infecção pelo HIV, o GALT (tecido linfoide associado ao intestino) configura o principal sítio de replicação contínua do vírus, dada a elevada concentração de células T CD4+ neste local, tornando-se um alvo ideal para infecção pelo HIV (THOMPSON et al., 2017). Por ser um dos primeiros tecidos a ser infectado após a exposição, ocorre uma maciça depleção de células T CD4+ associada à hiperativação generalizada de células T CD8+ e T CD4+ (HAZENBERG et al., 2003; MAVIGNER et al., 2012; MIEDEMA et al., 2013). Este processo tem sido descrito como um fator chave na indução da inflamação e degradação da mucosa intestinal mediada pelo HIV, levando à translocação de produtos microbianos intestinais para circulação sistêmica. Desse modo, o LPS oriundo da translocção aciona uma série de eventos que culminam na intensa produção de citocinas inflamatórias, estabelecendo assim um ambiente inflamatório constante (Figura 9) (BRENCHLEY et al., 2006b; D'ETTORRE et al., 2012; VASSALO et al., 2012).

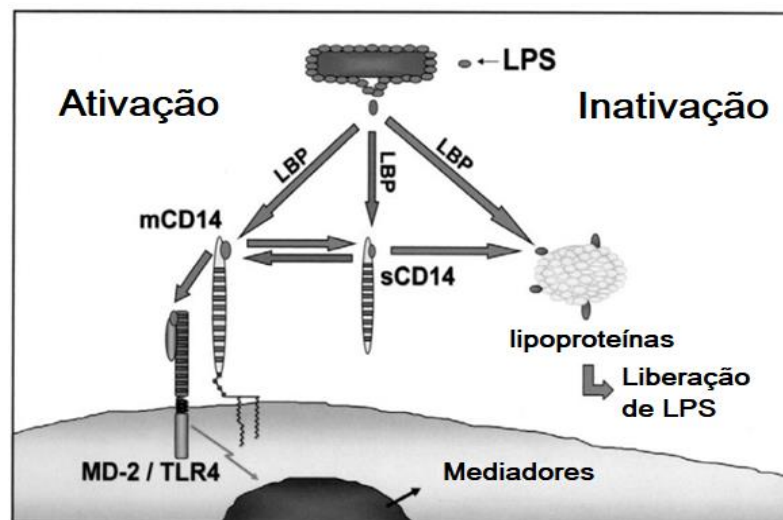


Figura 9: Ativação de LPS. O LPS induz um potente estado de ativação imunitária a partir da sua interação com a proteína de ligação a LPS (LBP), que transfere cataliticamente LPS para a membrana ou CD14 solúvel (sCD14), posteriormente interage com o complexo TLR4-MD2, no qual culmina com a ativação do fator de transcrição NF- κ B, produzindo intensamente mediadores inflamatórios como IL-6, IL-1 β , TNF e IFN do tipo I (Adaptado de Kitchens & Thompson, 2005).

2.4. Fatores associados à inflamação crônica

A partir da fase aguda da infecção pelo HIV ocorre uma intensa produção e liberação de citocinas, como o IFN- α , IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-15 (STACEY et al., 2009) (Figura

10). Em pacientes HIV na fase da imunodeficiência, os eventos decorrentes da inflamação tendem a ser mais graves, visto que, a presença contínua do vírus mantém as células T CD4+ e T CD8+ em um estado de ativação constante (MUSWE et al., 2017).

Tem sido demonstrado que a expressão e secreção de IL-6 por monócitos e macrófagos foram positivamente associados com os níveis de RNA viral e progressão da doença (BORGES et al., 2015; SHIVE et al., 2012; BAKER et al., 2012). Além disso, estudos apontam que níveis elevados desta citocina em indivíduos HIV estão associados ao risco de morte por complicações, principalmente hepáticas e cardiovasculares (FOSTER et al., 2000; BOULWARE et al., 2011; ROSE-JOHN, 2012). Outras implicações clínicas também foram associadas com IL-6 a longo prazo, tais como, anemia e câncer (RAJ, 2009; GRIVENNIKOV et al., 2011; BORGES et al., 2014).

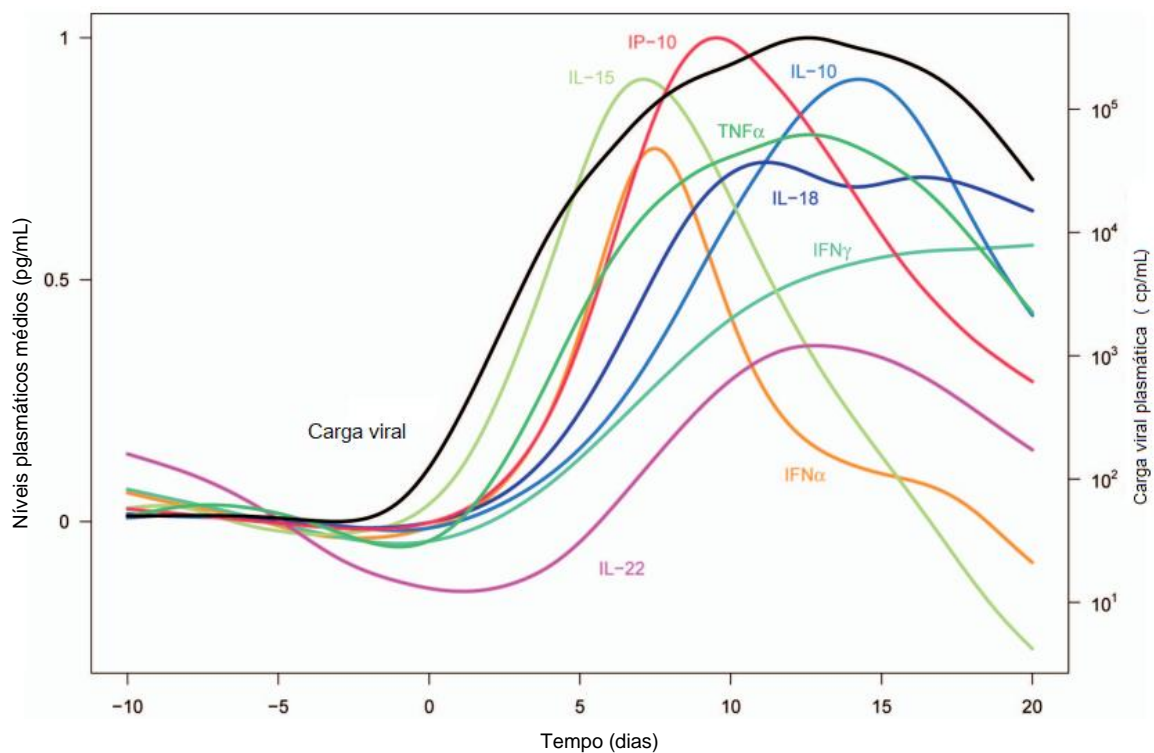


Figura 10: Produção de citocinas na infecção pelo HIV na fase aguda. (Adaptado de Stacey et al. 2009).

Por outro lado, aumento nos níveis plasmáticos elevados de IL-6 também foram vistos em pessoas infectadas com HIV com carga viral suprimida sob tratamento (NEUHAUS et al., 2010; ARMA et al., 2012; BORGES et al., 2014). A terapia anti-retroviral é capaz de

reverter parcialmente a maioria desses estímulos inflamatórios, porém o efeito é incompleto, e a inflamação persiste indefinidamente (DEEKS et al., 2013). Esta teoria é sustentada pelos descritos de Kalayjian et al. (2010), segundo o qual níveis elevados de marcadores inflamatórios como IL-6, sTNFR-1 (receptor de TNF solúvel), sCD27 (CD27 solúvel) e sCD40L (CD40L solúvel) foram observados mesmo semanas após o início da terapia, sugerindo que esta não é capaz de restaurar por completo os níveis homeostáticos inflamatórios do paciente (KALAYJIAN et al., 2010). Além disso, a terapia pode indiretamente desempenhar um papel na inflamação por meio de seus efeitos sobre o metabolismo, aumentando risco de dislipidemia (HATTAB et al., 2014; LIMSRENG et al., 2016).

A melhor caracterização da função imune por biomarcadores na infecção pelo HIV não tratada tem sido feita através da determinação do número absoluto células T CD4+ e frequência de células T ativadas, visto que esta população celular é o alvo principal de infecção do vírus. Porém, um número crescente de estudos tem se dedicado à inflamação relacionada a monócitos e macrófagos, principalmente em abordagens da infecção pelo HIV tratada (DEEKS et al., 2013). Nesse contexto, vários biomarcadores plasmáticos tem sido correlacionados com o desencadeamento do estado inflamatório na infecção pelo HIV, dentre eles o CD14 solúvel (sCD14), marcador de ativação de monócitos e macrófagos (NIXON & LANDAY, 2010). Ele é encontrado como uma proteína de membrana ancorada com glicosilfosfatidilinositolise (GPI) ou na forma solúvel (sCD14) gerada após a estimulação por lipopolissacarídeo (LPS) e outros produtos microbianos (SHIVE et al., 2015; UYSAL et al., 2016). Níveis crescentes de sCD14 durante a infecção pelo HIV foram demonstrados como resultantes da translocação microbiana (BRENCHLEY et al., 2006b; SANDLER et al., 2011). Em indivíduos infectados pelo HIV, altos níveis plasmáticos de sCD14 são um potente preditor de morbidade e mortalidade, uma vez que, estão altamente associados com o mau prognóstico desses pacientes (TENORIO et al., 2014; HUNT et al., 2014; UYSAL et al., 2016). Além da associação com a mortalidade, elevadas taxas de sCD14 também podem predispor à rápida progressão à doença e variados eventos clínicos em indivíduos HIV (LIEN et al., 1998; KRASTINOVA et al., 2015).

Outros marcadores inflamatórios também atuam no estabelecimento de um estado imune crônico na infecção pelo HIV (NIXON & LANDAY, 2010). Elevados níveis de TNF- α no plasma e tecidos de pacientes infectados pelo HIV estão estreitamente associados à

gravidade dos sintomas de indivíduos com AIDS (LAHDEVIRTA et al., 1988; KUMAR et al., 2016). Também foi visto que a exacerbação deste mediador contribui para uma maior depleção de células T CD4+, tanto pela morte direta destas quando infectadas, mas também quando não infectadas (HUANG et al., 2006). Contudo, dados já demonstram que elevados níveis desta citocina podem ser reduzidos frente ao uso da terapia antiretroviral (MUSWE et al., 2017).

O IFN- γ aumenta a replicação viral devido a ativação em células infectadas pelo HIV que, juntamente com outras citocinas inflamatórias, está envolvido no estabelecimento de uma ativação imunológica crônica e exacerbação da clínica associada à AIDS (KEATING et al., 2012). É descrito que esta citocina está consideravelmente elevada já na fase inicial da infecção pelo HIV, fato este decorrente do aumento do número de células produtoras de IFN- γ em decorrência da replicação viral (ROFF et al., 2013). Já o IFN- α atua limitando a replicação viral uma vez estabelecida a infecção sistêmica. Contudo também aumenta a ativação imune por facilitar a produção e o recrutamento de células T CD4+ alvo, sendo um preditor de progressão para AIDS (UTAY & DOUEK, 2016).

Outras citocinas pró-inflamatórias podem induzir diretamente a replicação do HIV devido a sua capacidade de ativar o fator de transcrição NF- κ B, como a IL1- β . Diversos mecanismos são ativados pelo próprio vírus visando estimular a expressão desta citocinas e consequentemente ativar a via do NF- κ β (HAIJ et al., 2013; GANGWANI & KUMAR, 2015; SHAH et al., 2011).

Por fim, as citocinas IL-2 e IL-4 podem aumentar a replicação viral devido seu papel de ativação em células infectadas pelo HIV devido o papel primário no suporte à expansão de células T antivirais e respostas de anticorpos (KEATING et al., 2012). Já IL-17 é capaz de bloquear a imunidade antiviral, permitindo assim a infecção viral sustentada (KORN et al., 2009). Porém, estudos demonstram que menores níveis desta citocina podem estar relacionados ao controle da viremia e à proteção ao HIV em indivíduos expostos não infectados (CHEGE et al., 2012; KHOWAWISETSUT et al., 2013).

2.5. Comorbidades respiratórias e HIV

Desde o surgimento da epidemia do HIV, têm-se observado uma grande predisposição a infecções, complicações e sintomas respiratórios em pessoas infectadas pelo

vírus (ALINAGHI et al., 2011; SHAH et al., 2017). Estima-se que pelo menos em dois terços dos pacientes HIV o acometimento pulmonar é a primeira manifestação clínica da síndrome, e a grande maioria tende a desenvolver complicações pulmonares no decorrer da doença associada com coinfeções oportunistas (ALINAGHI et al., 2011; LI, 2014).

As complicações respiratórias de origem infecciosa na infecção pelo HIV são historicamente uma das principais causas de mortalidade e morbidade nesta população (GINGO et al., 2013; LI, 2014). Dados revelam que mesmo pacientes que não evoluem a óbito após quadros de infecções respiratórias, há algum comprometimento da função pulmonar no transcorrer da infecção pelo HIV (BROWN et al., 2017a; STOFF et al., 2017). A etiologia dessas infecções é multifatorial, podendo ser ocasionadas por fungos, micobactérias, vírus, bactérias, e também variar em função de fatores demográficos, tais como distribuição geográfica e status socioeconômico (BENITO et al., 2012; LI, 2014).

Nos últimos anos, a tuberculose (TB) tem sido a principal causa de morte de pacientes HIV, representando cerca de uma a cada três mortes relacionadas à AIDS (ALINAGHI et al., 2011). Somente em 2015, havia aproximadamente 1,2 milhão de casos de TB em indivíduos HIV em todo mundo. Estima-se que 390.000 mortes associadas à TB nesta população tenham ocorrido neste mesmo ano (WHO, 2018). Este perfil se estende também no Amazonas, onde há um crescimento na frequência de doenças respiratórias em pessoas vivendo com HIV (PVHIV), especialmente co-infectadas com TB, sendo esta, responsável por grandes índices de mortalidade na população de PVHIV do estado (SOUZA et al., 2008).

Contudo, diversas manifestações clínicas e patologias pulmonares além da TB têm sido relatadas na população de pessoas infectadas pelo HIV. Alinagui et al. (2011) observaram em homens iranianos soropositivos (n=177) que quase 50% da população apresentou alguma manifestação respiratória, sendo mais comum tosse, expectoração, dispneia e hemoptise. Em relação às de cunho infeccioso, tuberculose pulmonar e pneumonia, foram as mais frequentes (ALINAGHI et al., 2011).

Shah et al. (2017) encontrou resultados similares e em pacientes HIV com tuberculose e com outras coinfeções, tais como a pneumonia bacteriana, incluindo pneumonia bacteriana recorrente, pneumonia por *Pneumocystis carinii*. As bactérias mais comuns foram *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella* sp (SHAH et al., 2017). Igualmente, Dias et al. (2018) ao estimar o perfil epidemiológico e clínico de

pacientes infectados pelo HIV na população brasileira, descreveu pneumonia como a principal infecção oportunista nestes pacientes, bem como elevada incidência de tuberculose (DIAS et al., 2018).

Pacientes HIV com baixa contagem de células CD4 são mais propensos ao aparecimento de comorbidades respiratórias. Peters et al. (2007) descreveu a presença de diversas manifestações respiratórias, tais como, tosse produtiva crônica, dor torácica, dispneia, consolidação pulmonar, linfadenopatia hilar, derrame pleural e fibrose pulmonar em pacientes com contagem de linfócitos CD4 menor que 200 células (média $174,8 \pm 5,4$ células) (PETERS et al., 2007). Recentemente, Toshiniwal et al. (2014) encontraram resultados congruentes com os anteriormente descritos. Neste estudo, casos de tuberculose pulmonar e pneumonia bacteriana ocorreram em todos os níveis de contagem de células T CD4+, contudo com maior incidência em baixas contagens destas (TOSHNIWAL et al., 2014).

Por sua vez, o uso da terapia antirretroviral não implica no desenvolvimento de comorbidades respiratórias em indivíduos HIV. Gingo et al. (2013) descreveram que indivíduos HIV apresentaram infecções respiratórias mesmo após uso de TARV e, assim, com risco aumentado de morte em comparação com aqueles sem infecções. Desse modo, os autores sugeriram que a infecção pelo HIV permanece sob o risco significativo de doenças respiratórias infecciosas mesmo após a introdução da TARV (GINGO et al., 2013). Brown et al. (2017) observou que pessoas infectadas pelo HIV e com supressão imunológica por TARV tinham um pior estado de saúde respiratória, conjuntamente com quadros de falta de ar. Tais resultados sugerem que mesmo com eficiência da TARV, a saúde respiratória de pacientes HIV encontra-se prejudicada, ocasionado um impacto significativo na qualidade de vida (BROWN et al., 2017b).

2.6. Plaquetas e HIV

O envolvimento das plaquetas na patogênese da infecção pelo HIV pode ser visualizado pela associação entre alterações na contagem de plaquetas ou dos seus marcadores de ativação com a progressão da doença (PATE & MANKOWSKI, 2011). Relatos apontam que a contagem de plaquetas é inversamente correlacionada com a carga viral de indivíduos não tratados, e que a redução do número de plaquetas prevê um declínio de células T CD4+ (MUNOZ et al., 1998; ALCANTARA et al., 2009).

As plaquetas possuem receptores que favorecem a sua infecção pelo HIV (Figura 11). Apesar de não expressarem CD4, como os megacariócitos, as plaquetas possuem co-receptores do HIV, tais como CXCR (1, 3 e 4) e CCR (1, 3 e 4) (CHABERT et al., 2015). O receptor DC-SIGN, um receptor de lectina tipo C presente em macrófagos e células dendríticas, também foi identificado em plaquetas, com a capacidade de se ligar ao HIV (CHABERT et al., 2015). O receptor lectina C tipo 2 (CLEC-2) também é expresso nas plaquetas. Chapain et al. (2006) descreveram que uma combinação de inibidores de DC-SIGN e CLEC-2 reduz fortemente a associação do HIV-1 com plaquetas, indicando que essas lectinas são necessárias para a ligação eficiente do HIV-1 às plaquetas (CHAPAIN et al., 2006).

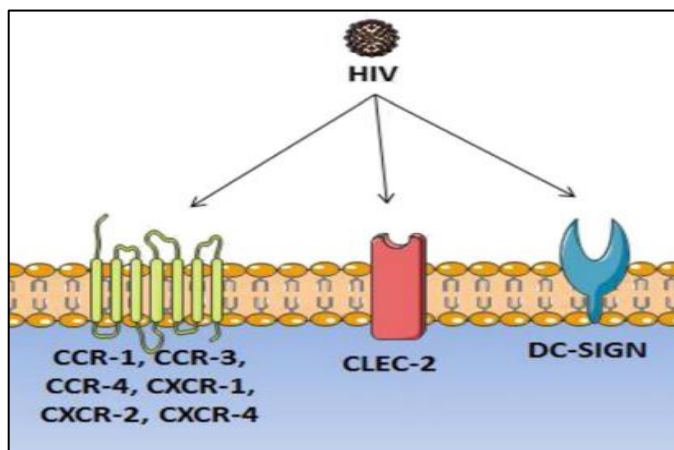


Figura 11: Receptores de plaquetas que reconhecem o HIV. Receptores de quimiocinas do tipo CXCR 1, 3 e 4 (CXCR1, CXCR3 e CXCR4). Receptores de quimiocinas do tipo CCR 1, 3 e 4 (CCR1, CCR2 e CCR4). Receptor transmembrana lectina C tipo II (CLEC-2). Receptor DC-SIGN. (Adptado de CHABERT et al., 2015).

O HIV pode ser internalizado em vesículas endossomais em plaquetas de indivíduos infectados. Estudos apontam que esta internalização induz a ativação de plaquetas (YOUSSEFIAN et al., 2002; BOUKOUR et al., 2006). Este processo também pode inativar o HIV, uma vez que a vesícula endocítica pode migrar próximo ao sistema canicular aberto, entrando em contato com o conteúdo dos grânulos- α . Contudo, não está bem estabelecido se a vesícula endossomal obedeça este trajeto a ponto de sofrer ação dos produtos dos grânulos- α . No entanto, desde as primeiras descrições das interações do HIV com as plaquetas, não houve indicação comprovada de replicação produtiva do vírus dentro das plaquetas e por extensão da chamada infecção plaquetária pelo HIV. Não há evidências de que o HIV induza o aumento

do apoptose nas plaquetas (YOUSSEFIAN et al., 2002). Neste caso, o vírus ficaria protegido do sistema imune (BOUKOUR et al., 2006).

2.7. Plaquetas e comorbidades respiratórias

Algumas doenças pulmonares, principalmente aquelas com quadros inflamatórios exacerbados, ocasionam o acúmulo de plaquetas no pulmão. Condições decorrentes desse tipo de infecção como lesões teciduais e sepse podem ativar plaquetas na circulação (BOZZA et al., 2009; BATTINELLI et al., 2011). Nesse contexto, as plaquetas podem exercer um papel emergente e relevante na clínica de comorbidades pulmonares de caráter inflamatório (KUEBLER, 2006).

Um exemplo de doença pulmonar com quadros inflamatórios é a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Na DPOC, a inflamação exerce um importante papel em sua patogênese e pode contribuir para ativação plaquetária (MUÑOZ-ESQUERRE et al., 2018). Maclay et al. (2012) mostraram aumento da ativação plaquetária e a presença de agregados plaquetas/monócitos em pacientes com DPOC em comparação com indivíduos não portadores de DPOC (MACLAY et al., 2012). Munhõz-Esquerre et al. (2018) descreveram uma reatividade plaquetária aumentada durante a DPOC. Além disso, o aumento da reatividade plaquetária pode estar associado a um incremento nos marcadores inflamatórios (MUÑOZ-ESQUERRE et al., 2018).

As plaquetas em doenças pulmonares inflamatórias também podem interagir com neutrófilos, capturando-os e formando agregados plaquetas-neutrófilos (ZARBOCK et al., 2006), contribuindo para exacerbação de quadros inflamatórios nestes casos. Um número considerável de agregados circulantes de leucócitos plaquetários pode ser encontrado, por exemplo, em pacientes com asma alérgica ou fibrose cística (PITCHFORD et al., 2003; O'SULLIVAN et al., 2005). Contudo, ainda não é claro o papel das plaquetas no desenvolvimento da inflamação em doenças pulmonares, bem como a contribuição de mediadores derivados de plaquetas neste processo (KUEBLER et al., 2006).

Uma vez que a infecção pelo HIV também está associada à inflamação e reatividade plaquetária aumentada (GURBEL et al., 2017), a co-existência com comorbidades respiratórias parece favorecer um ambiente propício para instauração de uma “síndrome inflamatória” (Figura 12), agravando o quadro clínico desses pacientes.

Pouco se tem descrito sobre o envolvimento de plaquetas em comorbidades respiratórias associadas à infecção pelo HIV. Em um dos poucos estudos com este enfoque, Kumar et al. (2016) demonstraram a ocorrência de trombocitopenia e manifestações pulmonares (tosse, hemoptise, falta de ar, dor torácica, derrame pleural, pneumotórax, fibrose pulmonar e infecções bacterianas) em uma mesma população de pacientes HIV. Embora houvesse uma tendência no MPV (volume plaquetário médio) nesta mesma população, esta não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (KUMAR et al., 2016). Apesar da escassez de informações nesta área, a ativação plaquetária tem sido reportada como um importante agente no desenvolvimento e progressão de doenças respiratórias (MALERBA et al., 2017).

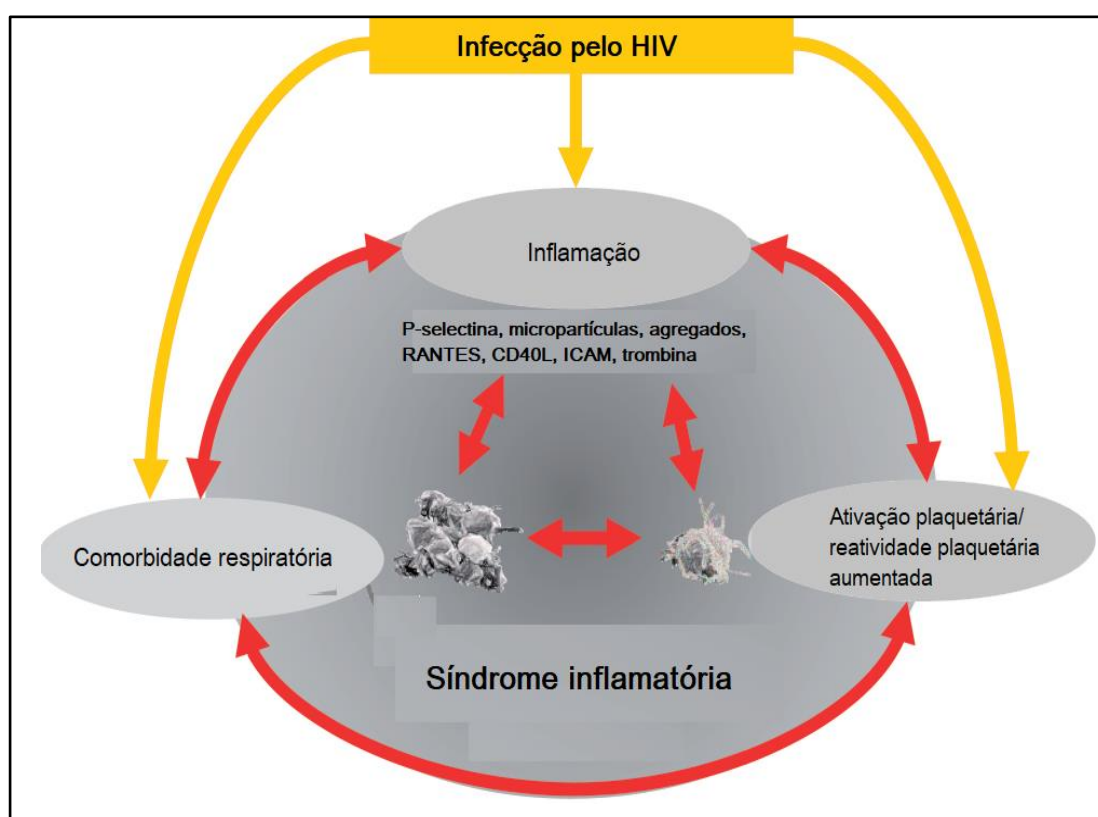


Figura 12: Representação esquemática de um possível mecanismo de indução de inflamação em pacientes HIV com comorbidade respiratória (Adaptado de Gurgel et al., 2017). A infecção pelo HIV está associada à inflamação e ativação plaquetária e elevada ocorrência de comorbidades respiratórias. As plaquetas ativadas fornecem uma série de fatores que induzem a inflamação, que por sua vez pode ser exacerbada frente à co-existência comorbidades respiratórias nestes pacientes que também induzem à inflamação. Essa interação levaria ao estabelecimento de uma síndrome inflamatória que estaria agravando o quadro clínico destes pacientes, e contribuindo para progressão da doença e aumento do risco de óbito.

2.8. Morfologia, formação e estrutura das plaquetas

As plaquetas são elementos celulares anucleados resultantes da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos (GARRAUD & COGNASSE, 2015; SUT et al., 2018), adquirindo uma morfologia discoide característica de aproximadamente 1 a 3 μm de diâmetro e com tempo médio de vida de 5 a 9 dias (MACHLUS & ITALIANO, 2013).

O processo de geração das plaquetas se dá a partir da fragmentação de pseudópodes da membrana citoplasmática dos megacariócitos, compreendendo duas etapas, a megacariopoiese e a trombopoiese. Na primeira os megacariócitos sofrem proliferação e maturação a partir da célula progenitora da medula óssea devido à multiplicação clonal, fatores de transcrição e por citocinas, principalmente trombopoietina, culminando na produção de megacariócitos maduros. No segundo a trombopoietina, responsável pelas modificações que ocorrem no citoplasma do megacariócito, medeia à liberação das plaquetas para a circulação. Estas são liberadas dos megacariócitos maduros diretamente no sangue por fragmentação citoplasmática ou pela constrição periódica de pseudópodes citoplasmático megacariocíticos (SZALAI et al., 2006).

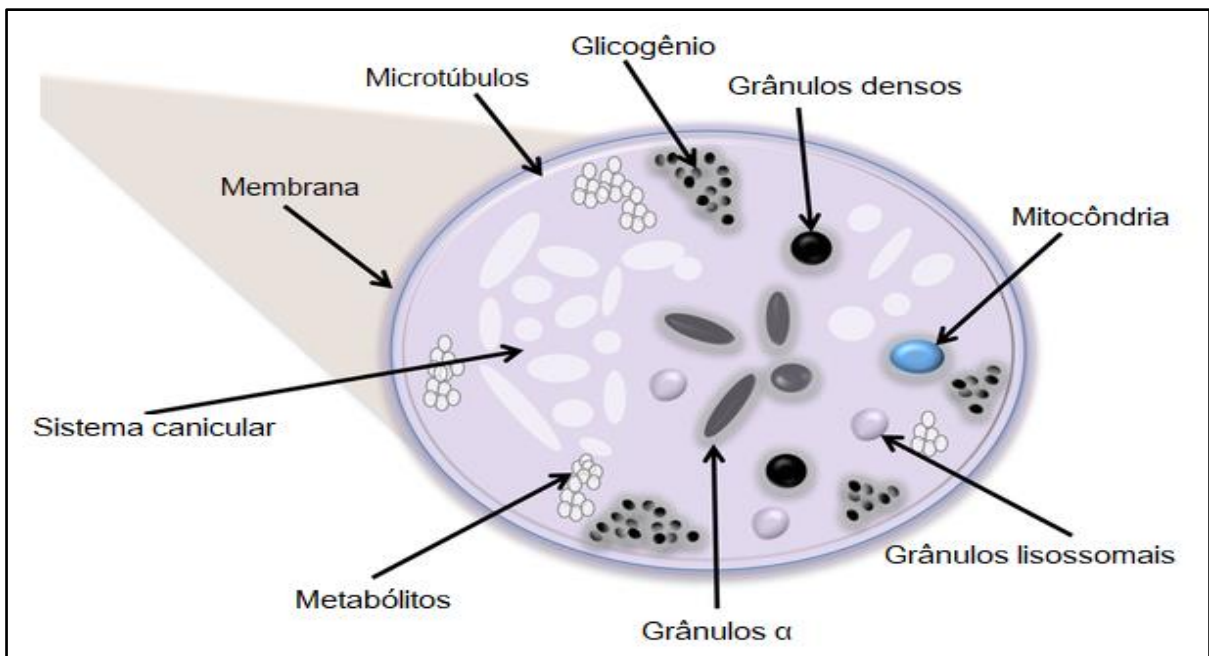


Figura 13: Estrutura das plaquetas. As plaquetas possuem em sua superfície, múltiplos receptores, um sistema canicular, microtúbulos, mitocôndrias, grânulos (lisossomal, alfa e denso) e pequenos depósitos de glicogênio (Adaptado de ZAPATA et al., 2014).

Estruturalmente (Figura 13), a membrana plasmática de plaquetas é composta de uma bicamada fosfolípídica, constituindo o local de expressão de diversos receptores de superfície que auxiliam na sinalização e no tráfego intracelular, como CD36, CD63, CD9, GPCR, IIBIIIa e GLUT-3 (GHOSHAL & BHATTACHARYYA, 2014). Esses receptores de superfície também desencadeiam a liberação de grânulos α que exercem influência sobre múltiplas funções, como coagulação, inflamação, aterosclerose, defesa do hospedeiro antimicrobiano, angiogênese, reparo de feridas e tumorigênese (BLAIR & LAUMENHAF, 2009).

Na parte interna da membrana plasmática estão presentes fosfatidiletanoaminas, fosfatidilserinas e fosfatidilinositol, que mantem a estabilidade da sua superfície durante o estado proagulante, enquanto que na parte externa é encontrada exclusivamente a esfingomiéline (MCNICOL & GERRARD, 1997; HEEMSKERK et al., 2002).

A membrana plasmática é envolta externamente por uma camada lipoproteica (glicocálix) que alberga importantes proteínas à função plaquetária, as glicoproteínas (GP) (Figura 14). Dentre estas, destacam-se os receptores das famílias das selectinas, como a P-selectina ou CD62P, das integrinas como as GP IIb e IIIa, dos receptores ricos em leucina tais como as GP Ib, V e IX e da superfamília das imunoglobulinas tais como a GP VI, bem como os receptores para agentes agonistas, como ADP (adenosina difosfato), colágeno, epinefrina e trombina (Figura 14) (KAMATH et al., 2001; LANDI & MARQUES-JÚNIOR, 2003).

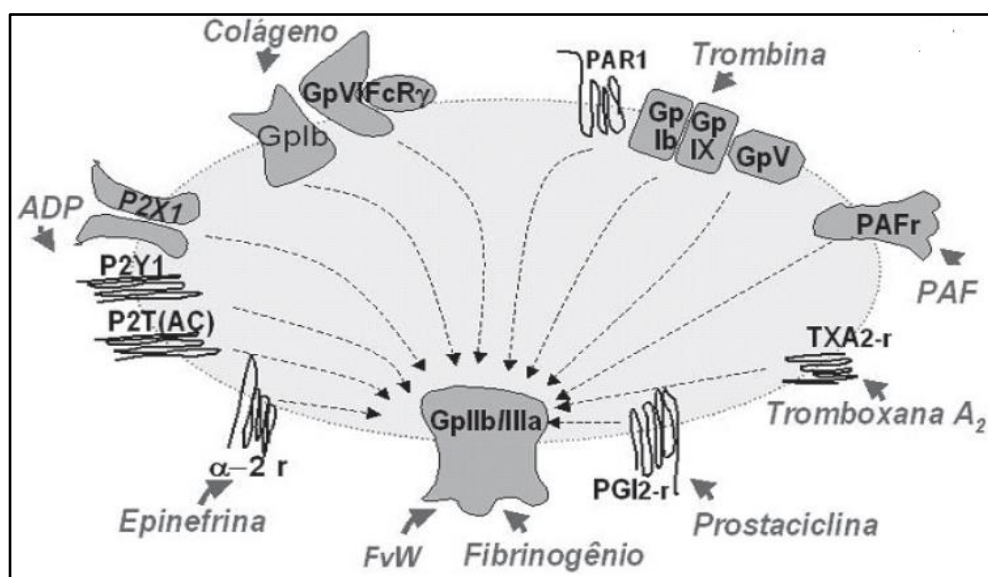


Figura 14: Receptores (preto) e agonistas (cinza) plaquetários (CASTRO et al., 2006).

A plaqueta também possui um citoesqueleto, uma rede tridimensional de microfilamentos, composto de actina e filamina, microtúbulos, em sua maioria compostos por tubulina e outros filamentos que englobam proteínas como vimentina ou laminina. Durante a sua ativação, o citoesqueleto contrai-se, conferindo uma morfologia esférica e emitindo pseudópodes (JANDROT-PERRUS & NURDEN, 2010).

Em seu interior, as plaquetas apresentam sistemas de membranas denominados sistema canicular aberto e sistema tubular denso (Figura 13). O primeiro é formado por invaginações da membrana plasmática, que constituem uma rede de acesso de moléculas plasmática para o interior das plaquetas, bem como uma reserva de membrana para emissão de pseudópodes durante a ativação plaquetária. É através deste sistema que a plaqueta ativada excreta seus produtos. O segundo é formado de restos do retículo endoplasmático que não se comunicam com o exterior, configurando o principal local de armazenamento de cálcio no interior das plaquetas (MCNICOL & GERRARD, 1997).

No citosol encontram-se numerosas organelas incluindo peroxissomos, lisossomos e mitocôndrias, além de grânulos específicos de variados tipos, como os alfa (α), densos e lisossomais (Figura 13). Os grânulos α , são os maiores em tamanho (aproximadamente 200-400nm) e mais frequentes (50 a 60 por plaquetas). Contêm o fator plaquetário 4 (PF4), selectina-P, trombospondina, β -tromboglobulina, fatores que intervêm na coagulação (factor V, XI, XIII, fibrinogênio, fator von Willebrand) e moléculas de adesão, como a fibronectina e a vitronectina (EVERTS et al., 2006; BADIMÓN et al., 2009; THON & ITALIANO, 2012). Os grânulos densos são menores, aproximadamente 150nm, e estão em menor frequência (3 a 8 por plaqueta). Contêm além de cálcio, ATP (adenosina trifosfato), ADP e serotonina. Devido sua elevada concentração de cálcio possuem forte densidade elétrica, daí seu nome (JANDROT-PERRUS & NURDEN, 2010). Os grânulos lisossomais possuem tamanho intermediário (aproximadamente 200 a 250nm) e contêm hidrolases ácidas e CD63 (JANDROT-PERRUS & NURDEN, 2010).

2.9. Função plaquetária

As plaquetas podem exercer diversas funções biológicas. Além de possuírem um importante papel na hemostasia, podem atuar na regulação do tônus vascular, na inflamação, no sistema imunológico e na trombose (BLAIR & FLAUMENHAFT, 2009). Em condições

fisiológicas normais, circulam sob o estado inativo, devido a secreção de fatores pelas células endoteliais (prostaglandina – PGE₁, óxido nítrico - NO e CD39/ADPase) que atuam inibindo a ativação plaquetária. Quando se encontram sob o estado de ativação, agregam e estimulam a formação do coágulo em resposta a processos hemorrágicos. (ANGIOLILLO et al., 2010; BRASS, 2010).

2.9.1. Agregação plaquetária

A agregação plaquetária ocorre em três etapas: iniciação, extensão e estabilização (BRASS, 2010). Na iniciação ocorre a formação de uma monocamada plaquetária, que suportará a subsequente agregação das plaquetas ativadas. Este processo é mediado pela interação das plaquetas com o colágeno, bem como a presença de trombina no local da lesão. Na extensão as plaquetas ativadas secretam agonistas como o tromboxano (TxA₂), ADP, serotonina, colágeno e trombina que estimulam a adesão de outras plaquetas. A secreção de TxA₂ e ADP além de induzirem o recrutamento de mais plaquetas, modificam a sua forma, bem como favorecem a expressão de moléculas pró-inflamatórias (P-selectina ou CD62P) e ativação do complexo GP IIb/IIIa, fundamental para o processo de agregação. Na fase de estabilização, ocorre a formação de pontes de fibrinogênio entre as plaquetas ativadas, garantido assim a estabilização estrutural do trombo plaquetário (BRASS, 2010).

Indutores da agregação plaquetária, tais como ADP e adrenalina (ADR) ou epinefrina, são potentes agonistas plaquetários. Possuem atividade pró-coagulante, gerando assim, uma exacerbação da amplificação das plaquetas, e conseqüentemente aumentando as chances do desenvolvimento de um processo trombótico (YEAMAN, 2014; CARESTIA et al., 2016). Por sua vez, os estimuladores antagonistas plaquetários, como o ácido acetilsalicílico (AAS) ou aspirina, atuam preservando a conformidade das plaquetas e principalmente inibindo o processo de agregação plaquetária (GRASSI & DO CARMO, 2016; FERREIRA et al., 2017).

Sabe-se que o vírus HIV também é capaz de promover ativação plaquetária, contudo a função plaquetária na infecção pelo HIV ainda não é clara (NKAMBULE et al., 2015a). Nkambule et al. (2015) ao estudar a função plaquetária em indivíduos HIV sem tratamento, observou que esta é retida em pacientes assintomáticos infectados pelo HIV e que há uma hiperatividade plaquetária frente a agonista endógenos nesta condição (NKAMBULE et al.,

2015a). Nesse contexto, avaliar a resposta de plaquetas frente a estímulos agonistas e antagonistas, pode auxiliar na elucidação sobre anormalidades funcionais e estruturais durante a infecção pelo HIV.

2.9.2. Inflamação e imunidade

A hemostase ainda continua sendo a principal e mais conhecida função biológica atribuída às plaquetas. Contudo, estas podem ainda estar envolvidas em outros processos, como inflamação, interação com células da resposta imune, bem como na progressão tumoral, angiogênese e metástase (OLIVEIRA et al., 2013).

No contexto inflamatório, as plaquetas possuem elevada capacidade pró-inflamatória, que pode ser potencializada a partir de sua interação com o endotélio e com leucócitos (SEMPLE & ITALIANO, 2011). Essa interação induz a expressão de moléculas de adesão (como a E-selectina) na superfície da parede dos vasos sanguíneos e em leucócitos presentes no fluxo sanguíneo. O início deste processo é realizado pela ligação da P-selectina e/ou E-selectina com PSGL-1 (ligante presente na superfície de leucócitos), resultando na adesão e rolamento de leucócitos pela superfície do endotélio, transmigrando-os até o local de inflamação, onde liberam mediadores inflamatórios após sinalização intercelular justácrina (WEYRICH et al., 2003).

As plaquetas podem ainda induzir respostas inflamatórias por expor o ligante CD40 (CD40L) a uma proteína de crescimento do tipo TNF- α , que é reconhecida pelo receptor CD40 expresso na superfície de células endoteliais (BOZZA et al., 2009; SEMPLE & ITALIANO, 2011). No mais, as plaquetas também podem alterar a ontogênese, função de macrófagos e células dendríticas (MASON et al., 2007; BOZZA et al., 2009).

Tsegaye et al. (2013) ao estudarem a ativação plaquetária no estágio inicial da infecção pelo HIV-1 descreveu que a ativação de plaquetas é capaz de suprimir a infecção de células T pelo vírus. As plaquetas contendo grânulos inibiram a propagação do HIV-1 nas células T mais eficientemente do que as plaquetas degranuladas, indicando que o conteúdo dos grânulos pode exercer atividade antiviral. Observaram ainda que a liberação de CXCL4 (um dos principais componentes dos grânulos de plaquetas) pelas plaquetas ativadas inibe a infecção pelo HIV-1 das células T adjacentes no estágio de entrada do vírus (TSEGAYE et al., 2013).

Em resumo, observa-se que as plaquetas podem influenciar através de seus sistemas moleculares e sinalização justácrina, tanto no desenvolvimento de processos inflamatórios, quanto em respostas imunes inatas e adquiridas (BOZZA et al., 2009; SEMPLE & ITALIANO, 2011).

3. JUSTIFICATIVA

O advento da TARV (terapia antirretroviral) fez com que a mortalidade em pessoas vivendo com HIV passasse a ser atribuída a fatores não convencionais decorrentes da inflamação crônica. O declínio das células T CD4+ e progressão para AIDS em conjunto com a inflamação crônica colaboram com o desencadeamento de várias comorbidades, e as respiratórias aparecem com grande expressividade.

Sabe-se que plaquetas estão alteradas nas comorbidades respiratórias, podendo ainda desempenhar um importante papel na patogênese destas. Na infecção pelo HIV, onde estas comorbidades possuem elevada prevalência, o processo de ativação plaquetária pode agravar os quadros clínicos de doenças respiratórias nestes pacientes, sejam elas de origem infecciosa ou crônica, contribuindo para progressão da doença e em casos extremos, ao óbito.

Sendo assim, a busca por respostas na comparação das alterações morfológicas das plaquetas em pacientes HIV/AIDS com ou sem comorbidade respiratória, pode fornecer dados importantes a respeito de sua participação na exacerbação da inflamação durante a infecção por HIV. E, além disso, essa avaliação contribui para o estabelecimento da participação das plaquetas na piora do quadro clínico de pacientes com comorbidade respiratória e com possível desfecho em óbito. Este estudo, não só identificou subpopulações de plaquetas e avaliou a sua resposta frente a estímulos agonistas, mas também avaliou o comportamento de marcadores imunológicos como preditores de agravamento da doença. Os resultados identificaram um possível mecanismo subjacente à degradação de plaquetas que pode estar contribuindo com a gravidade do quadro de insuficiência respiratória, o qual permitirá elaborar abordagens visando à intervenção médica nestes casos.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Avaliar aspectos morfológicos e funcionais das plaquetas de pacientes HIV/AIDS com comorbidades respiratórias.

4.2. Específicos

- Realizar uma análise retrospectiva das comorbidades apresentadas pelos pacientes HIV/AIDS internados nos últimos dois anos;
- Utilizar marcadores plaquetários para definição de subpopulações plaquetárias em pacientes HIV/AIDS com ou sem comorbidades respiratórias;
- Estimar os níveis de marcadores de ativação imune crônica (sCD14 e perfis de citocinas T_H1, T_H2 e T_H17);

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Considerações éticas

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) sob o número de parecer 1753402 e CAAE 57330116.6.40000.0005 (Anexo 1).

5.2. Tipo, população e local do estudo

A população alvo foi constituída de pacientes HIV/AIDS internados na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e a amostragem se deu por conveniência. Aspectos morfológicos e funcionais das plaquetas foram investigados em pacientes HIV/AIDS com comorbidades respiratórias, nerológicas e outros. Os participantes tiveram seus exames laboratoriais acompanhados da contagem CD4 e carga viral. Para o grupo controle foram recrutados indivíduos sadios que aceitaram participar do estudo.

Este estudo foi classificado em dois momentos distintos, mas complementares entre si. Em um primeiro momento o estudo se torna retrospectivo, por analisar as informações pgressas dos pacientes internados no último biênio (2016-2017), compilando informações sobre o estabelecimento e/ou desenvolvimento de comorbidades e da própria evolução da infecção por HIV, tratamentos e falhas terapêuticas. Já em um segundo momento, temos então, um estudo de caráter prospectivo no sentido de que as avaliações imunológicas observaram marcadores específicos, que são preditores de piora ou cronicidade de estado inflamatório, podendo assim, mesmo a partir de uma única análise, prospectar o futuro quadro de saúde dos pacientes participantes deste estudo.

5.2.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes HIV/AIDS internados na FMT-HVD nos anos de 2016-2017, na faixa etária entre 18-70 anos, de ambos os sexos, e que apresentaram sintomas e/ou sinais clínicos característicos de doenças respiratórias.

5.2.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo, pacientes com infecção pelo vírus das hepatites B e C, visto que estas co-infecções favorecem um pior prognóstico do paciente, bem como podem interferir nos resultados da terapêutica aplicada. Pacientes com sorologia positiva para o vírus linfotrópico humano (HTLV) também foram excluídos, já que a alta similaridade patogênica deste vírus com o vírus HIV poderia mimetizar os resultados encontrados. Foram excluídos também pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática e síndrome de Guillain-Barré, uma vez que a função plaquetária nestas patologias está naturalmente comprometida, bem como pacientes em uso de anti-hipertensivos, que tem ação direta na fisiologia plaquetária.

5.3. Análise retrospectiva

Foi realizada uma análise retrospectiva das comorbidades apresentadas pelos pacientes HIV/AIDS internados nos últimos dois anos na FMT-HVD. Um total de 200 pacientes foi incluído. Os dados clínicos destes pacientes foram acessados mediante a consulta no prontuário utilizando o sistema de prontuário eletrônico (*iDoctor*). Os dados inferidos foram tabulados no programa *Microsoft®Excel* e analisados no *GraphpadPrism 5.0*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%.

5.4. Abordagem dos pacientes

A abordagem foi realizada com o paciente ou com seu acompanhante responsável, durante o qual o objetivo da pesquisa foi esclarecido para solicitar o convite a participar do estudo. Em caso positivo, o paciente ou responsável preencheu uma ficha contendo informações pessoais e dados clínicos (Anexo 3), logo após o aceite através do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

5.5. Obtenção dos dados clínicos

No momento da abordagem dos pacientes coletamos dados sociodemográficos. Tais como, nome, idade, sexo, gênero, raça, uso de drogas, TARV. Por meio de acesso ao

prontuário médico dos pacientes, foram coletados os seguintes dados clínicos: estado de saúde geral, comorbidades, co-infecções, tratamento, manifestações clínicas (emagrecimento, diarreia, vômitos) e óbito. Este instrumento também forneceu dados laboratoriais: hemograma, sorologia (Citomegalovírus – CMV, Toxoplasmose, Epstein Baar – EBV, Herpes vírus, vírus da hepatite B – HBV), vírus da hepatite C – HCV), marcadores imunológicos (carga viral e contagem de células T CD4+ e T CD8+) e marcadores bioquímicos (bilirrubinas, creatinina, desidrogenase lática, gama GT, albumina, fosfatase alcalina, TGO e TGP).

5.6. Coleta das amostras biológicas

No mesmo dia da abordagem do paciente foram coletados 20 mL de sangue por venopunção à vácuo após entrevista e assinatura do TCLE. O volume foi distribuído em quatro tubos, seguindo a respectiva ordem: 1 contendo anticoagulante (tampa roxa), 1 tubo seco (tampa vermelha) e 2 tubos contendo citrato de sódio (tampa azul). O último tubo de citrato de sódio coletado foi designado para realização dos testes com plaquetas, visando o máximo de exclusão de ativadores plaquetários e micropartículas. Após a coleta as amostras foram acondicionadas em recipiente térmico à temperatura ambiente e transportadas para o Instituto Lêonidas e Maria Deane (ILMD/ Fiocruz Amazônia) para processamento e realização dos procedimentos descritos a seguir (Figura 15).

5.7. Obtenção do soro e armazenamento das amostras

As amostras coletadas em tubos seco foram centrifugadas a 3.500RPM durante 5 minutos a 25 °C para obtenção do soro e aliqüotadas (1mL) para análise de marcadores inflamatórios. O sangue total coletado em tubo com anticoagulante foi homogeneizado e aliqüotados (1mL) para armazenamento e análises futuras. Ambos foram armazenados a -80 °C.

5.8. Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP)

As amostras de sangue (5mL) coletadas em tubos contendo citrato foram centrifugadas a 800 x g durante 5 minutos à 25 °C. Os sobrenadantes obtidos foram

centrifugados novamente a 580 x g durante 20 minutos à 25 °C. O sobrenadante final obtido foi o plasma rico em plaquetas (PRP) (SHIGA et al., 2017).

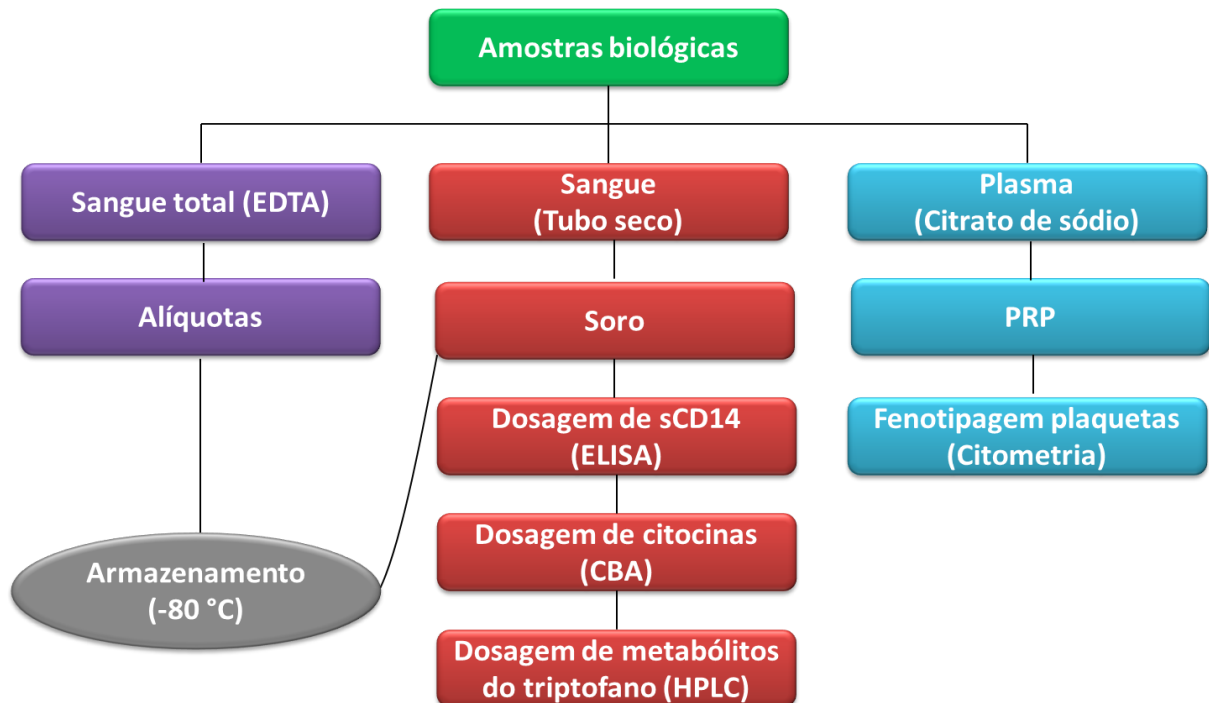


Figura 15: Fluxograma dos processos metodológicos de coleta e análise laboratorial. **EDTA:** etilenodiamino tetra-acético). **sCD14:** CD14 solúvel. **ELISA:** *Enzyme linked immunosorbent assay*. **CBA:** *Cytometric Bead Array*. **HPLC:** *High performance liquid chromatography*. **PRP:** Plasma rico em plaquetas.

5.9. Isolamento das plaquetas

Ao PRP foi acrescentado Prostaglandina E₁ (PGE₁) (*Prostaglandin E₁ 1mg; Cat. N°. P5515; Lot. #BCBT8985; Sigma*) para evitar a ativação plaquetária e centrifugado a 500 x g durante 20 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi desprezado e as plaquetas foram ressuspendidas em tampão PSG (5mM de PIPES, 145 mM de NaCl, 4mM de KCl, 50µM de Na₂HPO₄, 1mM de MgCl₂·6H₂O, 5,5mM de glicose; pH 6,8) e 300 nM de PGE₁. Foi realizada uma nova centrifugação a 500 x g durante 20 minutos a 25 °C e o sobrenadante descartado. As plaquetas foram ressuspendidas em PSG e 300nM de PGE₁ (tampão PSG/PGE₁). Foi realizada cuidadosamente a homogeneização até dissolução completa do pellet, contendo em um volume final de 2 mL de plaquetas, para as marcações plaquetárias com os anticorpos fluorescentes específicos (HAMBURGER & MCEVER, 1990) (Anexo 4).

5.10. Avaliação da resposta de plaquetas

A avaliação da resposta plaquetária foi realizada em um subgrupo de 25 pacientes. As plaquetas foram fenotipadas (Anexo 4) utilizando o anticorpo monoclonal anti-CD41 (*FITC Mouse Anti-Human CD41b*; Cat. N°. 555469; Lot. 5244691; *BD Pharmingen™*) (Figura 16B). O ácido nucleico das plaquetas foi marcado com dihidroetídeo – DHE (*Dihydroethidiu-Hydroethidine*; Cat. N°. D1168; *Thermo Fisher Scientific*) de modo a estimar seu nível de maturação e assim designar as subpopulações plaquetárias (Figura 16C). Estímulos agonistas (Adrenalina; *Hipolabor 1mg/mL*) juntamente com anti-CD41 e DHE também foram realizados. A capacidade responsiva foi determinada pela alteração nos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), que indicam respectivamente, agregação plaquetária e granulação.

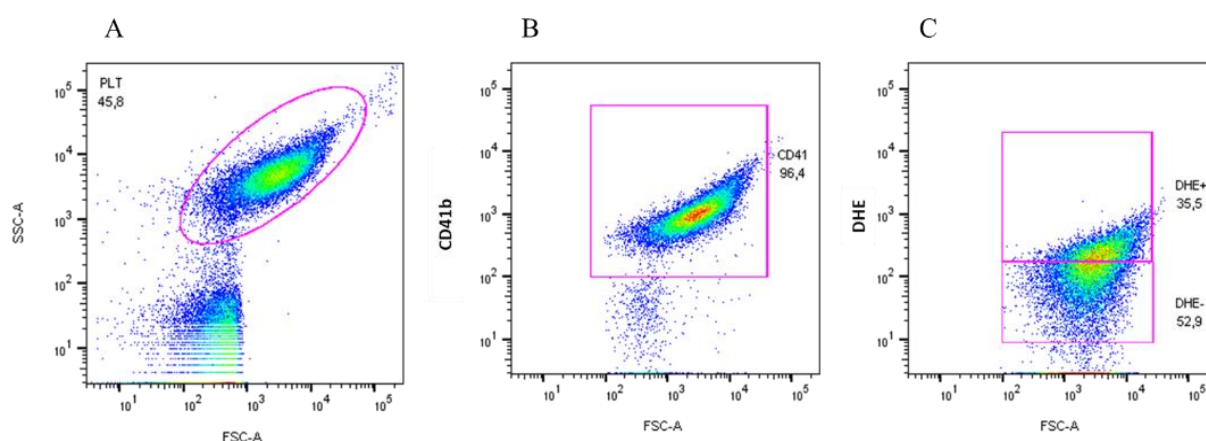


Figura 16: Caracterização das subpopulações de plaquetas pela duplamarcação. A) Painel de tamanho e granulosidade para seleção de plaquetas. Foram de cometa característico da distribuição de heterogeneidade de tamanho (seleção). B) A população total foi analisada no painel canal FL-1 (CD41+) e tamanho (quadrado indicou a seleção para avaliar presença ou não de resquílios de ácidos nucleicos). C) Definição das duas subpopulações paine FL-1 (CD41+) e FL-2 (DHE), em CD41+/DHE+ (quadro superior, definida como reticuladas) e CD41+/DHE- (quadro inferior, definida com plaquets maduras).

5.11. Dosagem de citocinas plasmáticas

A dosagem de citocinas das amostras de plasma dos pacientes e controles foi realizada pela técnica de Citometria de Fluxo CBA (*Cytometric Bead Array*) num subgrupo

de 100 pacientes, seguindo as recomendações descritas pelo fabricante, com o Kit BDTM Human T_H1/T_H2/T_H17 Cytokine (Cat. N° 560484, Lot.: 7184746, BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA), onde as citocinas quantificadas foram: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL17 e com o Kit BDTM Human Inflammatory Cytokine (Cat. N° 551811, Lot.: 7216799, BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA), onde as citocinas quantificadas foram: IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 TNF e IL-12. Para o cálculo das concentrações em pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada citocina foi utilizado o software FCAP-ArrayTM (v3.0.1).

5.12. Dosagem de CD14 solúvel (sCD14)

As concentrações plasmáticas de CD14 solúvel foram determinados por *Ezyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) em placas de 96 poços (*Cell Sciences e R & D Systems*). Inicialmente a placa foi sensibilizada com o anticorpo primário (*anti-human CD14 Antibody*; Cat. N°. MAB3833; Lot. AWI091610A; R&D Systems), diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M; pH 9,6). Após a sensibilização, foi feito o bloqueio com tampão PBS/BSA (PBS pH 7,4; albumina bovina a 3%). Em sequência os soros (diluídos a 0,5% em PBS/BSA), dos pacientes e dos controles e o anticorpo recombinante (*Recombinant Human CD14*; Cat. N°. 383-CD; Lot. BCS1716091; R&D Systems) foram adicionados em cada poço da placa. Na sequência adicionou-se o anticorpo secundário (*anti-human CD14 Biotinylated Antibody*; Cat N° BAF383; Lot. BAR0714031; R&D Systems). Após esta etapa foi adicionado estreptavidina e a reação foi revelada com tampão revelação (tampão citrato-fosfato + TMB + H₂O₂ 30%) e cessada com H₂SO₄ (2,0M). A leitura foi feita por meio colorimétrico (densidade óptica – DO), utilizando espectrofotômetro para leitora de placas de ELISA (*BIO-RAD Microplate Reader iMarkTM*) na absorvância de 450nm (Anexo 5).

5.13. Identificação e quantificação de Triptofano (TRP) e Quinurenina (KYU)

O soro de pacientes foi submetido ao tratamento com 8% de ácido perclórico, para a precipitação de proteínas e a extração de TRP e KYU. Essa mistura foi agitada em vórtex (até que se obtivesse um aspecto leitoso) e centrifugada a 5.000 RPM por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante para em seguida ser analisado em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Para tal, foram injetados 20 μ L em coluna de fase reversa Luna C-18 (N° 0. AJO-8368; Gemini-NX C18 4x3; Allcrom), o tempo de corrida foi de 20 min

com um fluxo de fase móvel (tampão de Acetonitrila, acetato de sódio com pH=4) de 1 mL/min. O triptofano e a quinurenina foram separados e analisados pelos detectores fluorescência e UV, respectivamente. Os picos foram identificados após adicionar o comprimento de onda no HPLC, sendo 360 nm para KYU e 278 nm para TRP. Para identificar os picos, as amostras foram comparadas aos tempos de retenção do padrão previamente analisado no HPLC em diferentes concentrações (100/10 μ M; 50/5 μ M; 25/2,5 μ M; 12,5/1,25 μ M; 6,25/0,625 μ M). E assim anotou-se a área para realizar o cálculo (equação gerada no GraphPadPrism a partir da concentração do padrão) e obter a concentração de TRP e KYU nas amostras analisadas.

5.14. Leitura e análise das amostras de CBA e plaquetas

Para a aquisição das amostras foi utilizado o Citômetro de Fluxo *FACSCanto II* (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) - Fiocruz Amazônia. As análises foram realizadas no programa *Flow-Jo*, para obtenção dos dados de citocinas e plaquetários.

5.15. Definições de morbidades abordadas no estudo

HIV: Indivíduos com sorologia positiva para o vírus HIV com confirmação laboratorial.

HIV/AIDS: Indivíduos com sorologia positiva para o vírus HIV internados na FMT-HVD com contagem de células T CD4+ igual ou inferior a 200 células/mm³ de sangue.

Comorbidade respiratória: Sinais e/ou sintomas característicos de doença respiratória, com origem infecciosa e não infecciosa, que apresentem ou não cronicidade.

Comorbidade neurológica: Sinais e/ou sintomas característicos de doença neurológica, com origem infecciosa e não infecciosa, que apresentem ou não cronicidade.

Comorbidade digestiva: Sinais e/ou sintomas característicos de doença digestiva/intestinal, com origem infecciosa e não infecciosa, que apresentem ou não cronicidade.

Insuficiência respiratória: Incapacidade reduzida ou total de respiração autônoma, desencadeada pela obstrução das vias respiratórias ou desenvolvida ao longo do tempo em decorrência de outras doenças.

Tuberculose: Doença diagnosticada por baciloscopia positiva para *M. tuberculosis*.

Plaquetopenia: Contagem de plaquetas inferiores a 150.00/ mm³ de sangue.

Plaquetocitose: Contagem de plaquetas superiores a 350.00/ mm³ de sangue.

5.16. Análise estatística

Os dados foram analisados no software *GraphPad Prism* versão 5. As distribuições foram calculadas por χ^2 . Quando a comparação foi realizada entre dois grupos usou-se o teste T não paramétrico de Mann Whitney. Quando a comparação envolveu três grupos, as comparações múltiplas foram realizadas pelo Anova com teste de Kruskal-Wallis. As diferenças encontradas nas comparações múltiplas foram diferenciadas em (a) ou (b). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%. Quando o grau de significância foi classificado na forma de asterisco, (*) indicou $p < 0,05$; (**) $p < 0,005$ e (***) $p < 0,0005$. Para todas as análises de comparações, os testes utilizados assumiram o desvio da hipótese nula num-só-sentido. Uma análise de correlação de Spearman foi utilizada para triar as variáveis que deram resultados significativos $p < 0,05$ para as análises de regressão linear.

6. RESULTADOS

A população estudada abrangeu 200 indivíduos, sendo esta dividida em duas sub-populações, HIV/AIDS e HIV/AIDS com comorbidade respiratória (HIV/AIDS+CR). No grupo HIV/AIDS (n=85), 75,29% (n=64) dos integrantes eram do sexo masculino e 24,71% (n=21) do sexo feminino. A média de idade deste foi de 38,68±12,09. Da mesma forma, no grupo HIV/AIDS+CR (n=115) houve maior frequência do sexo masculino, com 78,26% (n=90), o sexo feminino apresentou frequência de 21,74% (n=25). A média de idade deste grupo foi de 37,96±10,86 (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização geral da população estudada.

	HIV/AIDS (n=85)	HIV/AIDS+CR (n=115)	<i>p</i>
Idade (média±DP)	38,68±12,09	37,96±10,86	ns
Sexo			
Masculino	64 (75,29%)	90 (78,26%)	ns
Feminino	21 (24,71%)	25 (21,74%)	ns
TARV			
Sim	62 (72,94%)	89 (77,39%)	ns
Não	23 (27,06%)	26 (22,61%)	ns
Carga viral			
Indetectável	13 (15,29%)	22 (19,13%)	ns
>50	50 (58,82%)	76 (66,09%)	ns
Sem resultado	22 (25,89%)	17 (14,78%)	ns
CD4 (cel/μL)	135001,0±172308	12618,0±161,66	ns
Plaquetas (/mm ³)	276978,0±136134,24	283179,0±142233,2	ns
Plaquetopenia	18 (21,18%)	17 (14,78%)	ns
Plaquetocitose	6 (7,06%)	25 (21,74%)	0.004
MPV	7,94±2,78	7,90±2,54	ns
PDW	13,51±5,18	13,49±5,31	ns

TARV: terapia antirretroviral; CD4: linfócitos T CD4+; MPV: *Mean Platelet Volume*; PDW: *Platelet Distribution Width*.

Quanto ao uso de terapia antirretroviral (TARV) observou-se no grupo HIV/AIDS e HIV/AIDS+CR, respectivamente, que 72,94% (n=62) e 77,39 (n=89) estavam sob o uso desta. Na avaliação da carga viral (CV) destes pacientes, no grupo HIV/AIDS, 15,29% (n=13) apresentaram CV indetectável e 58,82% (n=50) CV acima de 50 cópias. Por sua vez, no grupo HIV/AIDS+CR, 19,13% (n=22) estavam com CV indetectável e 66,09% (n=79) com CV acima de 50 cópias. Os grupos apresentaram, respectivamente, média de células CD4 de $135001,0 \pm 172308$ e $12618,0 \pm 161,66$ (Tabela 1).

Na avaliação dos índices do plaquetograma, foi observada respectivamente nos grupos, uma média de $276978,0 \pm 136134,24$ e $283179,0 \pm 142233,2$ na contagem global de plaquetas. Pacientes HIV/AIDS+CR possuem maior frequência de plaquetocitose (21,74%; n=25) quando comparados com pacientes HIV/AIDS (7,06%; n=6) (p=0.004). A frequência de plaquetopenia foi de 14,78% (n=17) e 21,18% (n=18), nos grupos HIV/AIDS e HIV/AIDS+CR, respectivamente. O grupo HIV/AIDS apresentou média de MPV de $7,94 \pm 2,78$ e PDW de $13,51 \pm 5,18$. Por sua vez, o grupo HIV/AIDS+CR de $7,90 \pm 2,54$ e $13,49 \pm 5,31$, respectivamente (Tabela 1).

Os dados dos pacientes incluídos no estudo foram coletados através de consulta no sistema *iDoctor*. Foram levados em consideração os dados apresentados no momento da coleta de sangue para análise sorológica de citocinas. Todos os dados secundários obtidos no sistema levaram em consideração a dia da entrevista e coleta. Depois, os mesmos foram acompanhados pelo sistema para saber o desfecho óbito ou sobrevivência.

Um levantamento de dados clínicos dos pacientes HIV/AIDS foi realizado, considerando comorbidades, coinfeções e dados laboratoriais. Dentre os quais puderam ser definidos: tuberculose, comorbidades respiratórias, comorbidades neurológicas, comorbidades digestivas, anemia, manifestações clínicas (vômito, diarreia, emagrecimento) e estado geral (BEG e LOTE). Essas variáveis categóricas foram submetidas a teste de associação em função da variável desfecho: óbito. Desse modo, foi observado que tuberculose (p=0.001) e vômito (p=0.032) demonstraram associação com óbito nestes pacientes (Tabela 2).

Tabela 2: Comorbidades e manifestações clínicas e sua associação com óbito em pacientes HIV/AIDS.

	Óbito		
	Razão de Prevalência	χ^2	<i>p</i>
Tuberculose	3.44 (2.33-5.08)	10.337	0.001
Comorbidade respiratória	1.63 (1.34-1.99)	3.016	0.082
Comorbidade neurológica	0.52 (0.09-3.07)	0.692	0.405
Comorbidade digestiva	1.03 (0.17-6.41)	0.001	0.972
Anemia	0.71 (0.26-1.93)	0.698	0.403
Vômito	2.48 (1.41-4.37)	4.587	0.032
Diarreia	0.83 (0.14-5.04)	0.045	0.832
LOTE	0.48 (0.08-2.82)	0.925	0.336
Emagrecimento	1.50 (0.91-2.47)	1.341	0.247
BEG	1.24 (0.40-3.85)	0.126	0.723

BEG: bom estado geral; LOTE: Lúcido e orientado em tempo e espaço.

Para avaliar a associação de variáveis clínicas com aumento do risco de óbito em pacientes HIV/AIDS foi realizado teste de associação. Utilizando-se o modelo de regressão logística, foram identificados comorbidades infecciosas, comorbidades hematológicas e marcadores de avaliação imunológica, como fatores preditivos independentes para evolução a óbito. A razão de probabilidade (OR) indicou aumento do risco de evolução ao óbito em até 32% em pacientes com emagrecimento ($p=0.028$). A tuberculose por sua vez, foi a única coinfeção associada com o aumento de risco de óbito em até 37% ($p=0.013$). Entre os dados laboratoriais, as alterações na contagem de plaquetas aumentam em até 37,2% a chance de óbito ($p=0.011$) (Tabela 3).

Para ilustrar a análise multivariada as variáveis foram comparadas individualmente entre os pacientes que tiveram desfecho de óbito ou que sobreviveram (Tabela 3). O emagrecimento, a presença de coinfeções como tuberculose e alteração plaquetária (tanto plaquetopenia, quanto plaquetocitose) foram associados ao desfecho óbito. A insuficiência respiratória associada à coinfeção por tuberculose também foi frequentes no grupo que foi a óbito.

Tabela 3: Variáveis clínicas individualmente associadas com aumento do risco de óbito em pacientes HIV/AIDS.

		Óbito N=22	Vivo N=76	OR	IC 95%	p
<i>Estado geral</i>	Sexo	13	61	0,35	0.13 - 0.97	0,052
	Beg	10	36	1,08	0.41 - 2.80	0,874
	Lote	10	41	1,41	0.54 - 3.64	0,483
	Tratamento	15	56	1,31	0.46 - 3.66	0,611
	Emagrecimento	16	34	3,29	1.20 - 9.37	0,028
	Vômito	9	28	0,84	0.31 - 2.22	0,729
	Diarreia	4	27	2,48	0.71 - 8.07	0,123
	Anemia	16	48	0,64	0.22 - 1.83	0,406
<i>Comorbidades infecciosas</i>	Sistema respiratório	17	44	0,40	0.13 - 1.21	0,099
	Tuberculose (TB)	14	26	3,36	1.27 - 9.26	0,025
	Insuficiência respiratória + TB	14	25	3,57	1.34 - 9.86	0,013
	Sistema neurológico	10	30	0,78	0.30 - 2.03	0,615
	Sistema digestivo	9	16	0,39	0.13 - 1.06	0,060
	Sistema circulatório	2	4	0,56	0.09 - 3.2	0,510
<i>Outras coinfeções</i>	EPF	4	13	0,93	0.26 - 3.20	0,907
	CMV(IgG+)	16	60	1,41	0.47 - 4.17	0,538
	EBV(IgG+)	15	56	1,31	0.46 - 3.66	0,611
	Herpes(IgG+)	15	49	0,85	0.30 - 2.33	0,748
	HCV	2	4	0,56	0.09 - 3.25	0,510
<i>Marcadores imunológicos</i>	HIV-RNA>1000	15	43	0,61	0.22 - 1.66	0,330
	CD4 <200 células	14	47	0,93	0.34 - 2.47	0,879
	CD8 anormal	13	38	0,69	0.26 - 1.81	0,452
	CD4/CD8 <1,5	17	62	1,30	0.41 - 4.12	0,653
<i>Comorbidades hematológicas</i>	Anemia severa	5	10	0,52	0.15 - 1.70	0,272
	Alteração número de plaquetas	14	24	3,72	1.42 - 10.53	0,011
	Plaquetopenia	6	12	0,50	0.16 - 1.53	0,221
	Plaquetocitose	8	12	3,04	0.97 - 8.47	0,067

Para avaliar os dados laboratoriais de pacientes com comorbidade respiratória foram realizadas análises de comparações múltiplas com teste t de Mann Whitney. As diferenças encontradas nas comparações múltiplas foram diferenciada em (a) ou (b). A avaliação de dados laboratoriais destes pacientes apontou maior número absoluto de plaquetas em pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória em comparação aos pacientes sem comorbidade respiratória (p=0.009). A plaquetocitose apresentou uma tendência a ser a principal alteração relacionada à insuficiência respiratória associada à tuberculose, no entanto o valor p não apresentou significância devido ao baixo N amostral (Tabela 4).

Tabela 4: Dados laboratoriais de pacientes HIV/AIDS com insuficiência respiratória associada à tuberculose e pacientes HIV/AIDS sem insuficiência respiratória.

	IR+TB			Sem IR			p
	N	Média	SD	N	Média	SD	
HIV-RNA(cópia)	37	192758	100949,0	28	243953	64659,0	ns
CD4 (cel/μL)	37	142,3	25,6	28	162	41,5	ns
CD8 (cel/μL)	36	647,2	104,2	27	749,5	110,3	ns
CD4/CD8	35	0,262	0,0	26	0,2018	0,0	ns
CD14s (ng/μl)	33	3723	659,8	34	4008	679,6	ns
Triptofano (TRP)	24	20,48	3,0	20	21,94	3,0	ns
Quinurenina (KYU)	24	1,944	0,3	20	2,321	0,4	ns
KYU/TRP	24	0,1186	0,0	20	0,11	0,0	ns
Hemoglobina (g/dl)	38	10,63	0,4	36	9,98	0,4	ns
Leucócitos/mm ³	37	8396	3104,0	36	6814	1484,0	ns
Linfócitos (%)	38	23,78	1,4	36	25,48	2,5	ns
Eosinófilos (%)	38	6,124	1,4	36	5,683	0,8	ns
Plaquetas (/mm ³)	38	341215	25118,0 ^a	36	241560	23342,0 ^b	0,009
MPV	37	7,912	0,3	36	8,423	0,2	ns
PDW	37	13,91	0,8	36	14,76	0,8	ns
Bilirrubina (mg/dL)	36	1,091	0,4	36	2,753	1,3	ns
Creatinina (mg/dL)	36	1,011	0,2	37	2,258	1,2	ns
DHL (U/L)	36	405,1	27,5	35	532	136,5	ns
Gama GT (U/L)	37	161,3	26,5	37	262,9	61,9	ns
Albumina	34	3,438	0,2	36	3,175	0,3	ns
Fosfatase alcalina (U/L)	37	368,8	42,2	36	392,9	59,6	ns
TGO (U/L)	38	57,74	8,5	37	57,3	9,3	ns
TGP (U/L)	38	54,58	9,5	37	61	9,7	ns

CD4: linfócitos T CD4⁺; CD8: linfócitos T CD8⁺; MPV: *Mean Platelet Volume*; PDW: *Platelet Distribution Width*; DHL: desidrogenase láctica; Gama GT: gama glutamil transpeptidase; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica.

Para avaliar se os fatores solúveis da resposta imune (citocinas de perfil T_H1, T_H2, T_H17 e quimiocinas) possuíam associação com o desfecho morte (Tabela 5), estes foram dosados. As médias e desvios-padrões foram obtidos a partir da intensidade média de fluorescência (MFI). As variáveis contínuas obtidas foram submetidas a teste de associação em função da variável desfecho: óbito. Dentre as citocinas analisadas (Tabela 5), observou-se que pacientes HIV/AIDS que forma a óbito possuem níveis aumentados das citocinas inflamatórias IL-6 (p=0.028) e IL-8 (p=0.002), demonstrando associação negativa desses marcadores com óbito nestes pacientes.

Tabela 5: Níveis de citocinas de perfil T_H1, T_H2, T_H17 e quimiocinas e sua associação com óbito em pacientes HIV/AIDS.

	Controle	Óbito	Vivo	<i>P</i>
	Média (SD)	Média (SD)	Média (SD)	
IL-2	283,0 (16,31)	274,7 (4,49)	351,6 (42,61)	ns
IL-4	165,3 (8,22)	161,2 (4,99)	188,9 (20,76)	ns
IL-6	192,0 (28,42)	2308 (1219,0)	2324 (1441,0)	0.028
TNF	155,7 (22,28)	2308 (1219,0)	189 (40,87)	ns
IFN- γ	296,3 (140,60)	137 (3,68)	1826 (1609,0)	ns
IL-17	248,7 (109,0)	144 (21,67)	863 (720,0)	ns
IL-12	106,0 (10,72)	94,94 (3,20)	224,3 (91,07)	ns
IL-10	161,6 (12,96)	408,1 (119,80)	401,9 (123,1)	ns
IL-1 β	229,1 (42,12)	207,7 (9,10)	320,7 (90,31)	ns
IL-8	379,5 (18,37)	4656 (1264,0)	2073 (421,2)	0.002

Os níveis de citocinas também foram avaliados na presença e ausência de comorbidades respiratória, neurológica e digestiva (Tabela 6). A análise de associação não demonstrou relação dos níveis de citocinas em pacientes HIV/AIDS com comorbidades respiratórias quando comparada ao grupo com ausência destas. Contudo, em pacientes HIV/AIDS com comorbidade neurológicas foram observados níveis elevados das citocinas inflamatórias IL-1 β (p=0.0031) e IL-8 (p=0.0095) quando comparado ao grupo HIV/AIDS sem comorbidade neurológica. Do mesmo modo, pacientes HIV/AIDS com comorbidade digestiva, apresentaram elevados níveis de IL-10 quando comparados ao grupo sem essa comorbidade (p=0.003).

Os níveis de citocinas também foram avaliados com dados hematológicos em pacientes HIV/AIDS (Tabela 7). Neste caso, foram comparados os dados hematológicos próximos ao dia de coleta, ou seja, foram utilizados os dados em até dois dias depois da coleta de sangue. Foram incluídas nesta análise anemia, plaquetopenia e plaquetocitose, comorbidades deste perfil frequentemente encontradas em nossa população. Foi realizada uma análise de associação entre grupos para avaliar esta variável. Desse modo, observou-se que pacientes HIV/AIDS com anemia apresentam níveis elevados das citocinas IL-6 ($p=0.0094$) e IL-10 ($p=0.0059$) em comparação aos pacientes HIV/AIDS sem anemia. Do mesmo modo, pacientes HIV/AIDS com plaquetopenia também apresentaram aumento da concentração de IL-6 ($p=0.0109$). Contraditoriamente, em pacientes HIV/AIDS com plaquetocitose foram observados níveis reduzidos desta citocina ($p=0.022$).

Tabela 6: Níveis de citocinas em pacientes HIV/AIDS com e sem comorbidade respiratória, neurológica e digestiva.

	Respiratória	Ausente	<i>P</i>	Neurológica	Ausente	<i>P</i>	Digestiva	Ausente	<i>P</i>
	Média (SD)	Média (SD)		Média (SD)	Média (SD)		Média (SD)	Média (SD)	
IL-2	342,2 (48,85)	284,9 (6,78)	ns	357,5 (77,88)	304,9 (11,75)	ns	424,5 (132,0)	294,3 (7,97)	ns
IL-4	196,4 (25,86)	168,9 (4,96)	ns	206,8 (40,38)	178,1 (8,02)	ns	232 (68,47)	174,5 (5,71)	ns
IL-6	862,9 (183,7)	671,8 (176,7)	ns	729,3 (168,08)	911,5 (191,8)	ns	900,5 (251,1)	830,7 (143,0)	ns
TNF	375,1 (63,54)	257 (19,43)	ns	328,6 (72,08)	336,9 (46,91)	ns	499,3 (117,10)	290,3 (31,37)	ns
IFN- γ	206 (51,57)	140,1 (6,37)	ns	225,7 (82,14)	167,9 (14,8)	ns	293,7 (139,0)	154,8 (10,13)	ns
IL-17	210,2 (52,15)	195,2 (54,07)	ns	293,9 (93,69)	189,7 (31,0)	ns	275,3 (112,0)	207,8 (34,39)	ns
IL-12	134,1 (12,35)	159,4 (33,11)	ns	170 (33,59)	145 (15,67)	ns	125,6 (12,86)	154,3 (16,63)	ns
IL-10	221 (110,9)	100,8 (8,4)	ns	272,8 (177,8)	138,5 (23,79)	ns	385,4 (48,31)	263,2 (24,83)	***
IL-1 β	346,2 (114,8)	215,3 (11,48)	ns	201,0 (14,14)	243,6 (17,11)	**	520,7 (310,5)	234,3 (16,82)	ns
IL-8	2294 (402,4)	3194 (973,2)	ns	1509,0 (302,3)	2599 (380,8)	**	1965 (512,2)	2405 (435,6)	ns

Tabela 7: Níveis de citocinas em pacientes HIV/AIDS com manifestações hematológicas.

	Anemia	Sem anemia		Plaquetopenia	Plaquetas normais		Plaquetocitose	Plaquetas normais	
	Média (SD)	Média (SD)	<i>p</i>	Média (SD)	Média (SD)	<i>p</i>	Média (SD)	Média (SD)	<i>p</i>
IL-2	290,9 (12,72)	343,7 (52,51)	ns	290,9 (12,72)	343,7 (52,51)	ns	292 (16,0)	343,7 (52,51)	ns
IL-4	163,0 (4,19)	203,5 (27,86)	ns	163 (4,19)	203,5 (27,86)	ns	163,2 (4,0)	203,5 (27,86)	ns
IL-6	1141,0 (197,4)	543,6 (171,2)	**	1368 (418,4)	850,1 (180,8)	*	1154 (408,3)	824,2 (159,6)	*
TNF	303,9 (42,63)	323,4 (51,45)	ns	303,9 (42,63)	323,4 (51,45)	ns	420,3 (139,0)	323,4 (51,45)	ns
IFN- γ	149 (9,31)	212 (55,56)	ns	149 (9,31)	212 (55,56)	ns	134,4 (8,79)	212 (55,56)	ns
IL-17	149,1 (35,16)	239,1 (63,43)	ns	149,1 (35,16)	239,1 (63,43)	ns	174,5 (33,02)	239,1 (63,43)	ns
IL-12	108,6 (7,06)	152,7 (23,15)	ns	108,6 (7,06)	152,7 (23,15)	ns	146,4 (22,66)	152,7 (23,15)	ns
IL-10	304,3 (29,0)	248,2 (32,65)	**	104,8 (17,41)	232,9 (119,5)	ns	94,38 (2,65)	232,9 (119,5)	ns
IL-1 β	223,5 (17,41)	334 (122,1)	ns	223,5 917,41)	334 (122,1)	ns	278,6 (69,07)	334 (122,1)	ns
IL-8	2678 (1121,0)	2080 (444,5)	ns	2678 (121,0)	2080 (444,5)	ns	3867 (1447,0)	2080 (444,5)	ns

Por fim, os níveis de citocinas foram comparados em relação a imunossupressão destes pacientes, a partir da contagem de células T CD4+ e da carga viral dos pacientes HIV/AIDS (Tabela 8). A análise de comparação entre grupos demonstrou níveis elevados da citocina inflamatória IL-6 em pacientes com contagem de células T CD4+ menor que 200 células (929,0±173,7; p=0.0105). Nestes mesmos pacientes, também foram observado níveis elevados de IL-10 (206,0±93,89; p=0.0031). No mais, não foi observada associação dos níveis destes marcadores com a carga viral destes pacientes.

Tabela 8: Associação dos níveis de citocinas com a contagem de células T CD4+ e carga viral de pacientes HIV/AIDS.

	CD4<200	CD4>200		Carga viral >500	Carga viral<500	
	Média (SD)	Média (SD)	<i>P</i>	Média (SD)	Média (SD)	<i>P</i>
IL-2	329,9 (41,08)	268,7 (3,97)	ns	290,6 (8,54)	278,7 (5,59)	ns
IL-4	188,2 (21,21)	160,0 (8,04)	ns	169,5 (3,97)	158,7 (4,85)	ns
IL-6	1092 (185,6)	629,3 (162,8)	*	937,3 (207,1)	884,9 (370,08)	ns
TNF	373,3 (53,85)	186,9 (12,1)	ns	332,9 (48,37)	324,6 (103,09)	ns
IFN- γ	193,5 (43,51)	134,8 (4,97)	ns	153,9 (11,67)	144,7 (13,82)	ns
IL-17	238,5 (50,68)	104,5 (4,49)	ns	216 (47,27)	124,3 (23,09)	ns
IL-12	153,6 (18,9)	114,5 (13,65)	ns	155,4 (23,29)	120,1 (10,93)	ns
IL-10	206,0 (93,89)	281,6 (51,81)	**	113 (18,03)	92,79 (5,09)	ns
IL-1 β	241,4 (16,25)	193,3 (7,63)	ns	237,7 (24,41)	198,6 (14,43)	ns
IL-8	2037 (354,7)	3667 (1824,0)	ns	2524 (531,20)	1775 (527,40)	ns

O desfecho de óbito foi associado com coinfeção por tuberculose associada com insuficiência respiratória. Este desfecho, também foi associado com dois fatores de resposta imune, tais como, alteração plaquetária e aumento de IL-6.

Com intuito de avaliar a frequência e o aspecto funcional das plaquetas, estas foram marcadas para CD41b (GPIIb) (Figura 17B), uma importante glicoproteína de superfície utilizada na identificação fenotípica desta população celular.

Duas subpopulações de plaquetas puderam ser evidenciadas com a utilização de um marcador de ácido nucleico (RNA/DNA), o dihidroetídio (DHE). Deste modo, foram caracterizadas populações CD41+DHE-, aqui denominadas como plaquetas maduras e CD41+DHE+, aquelas com resquícios de ácido nucleico, denominadas como plaquetas reticuladas (Figura 16C).

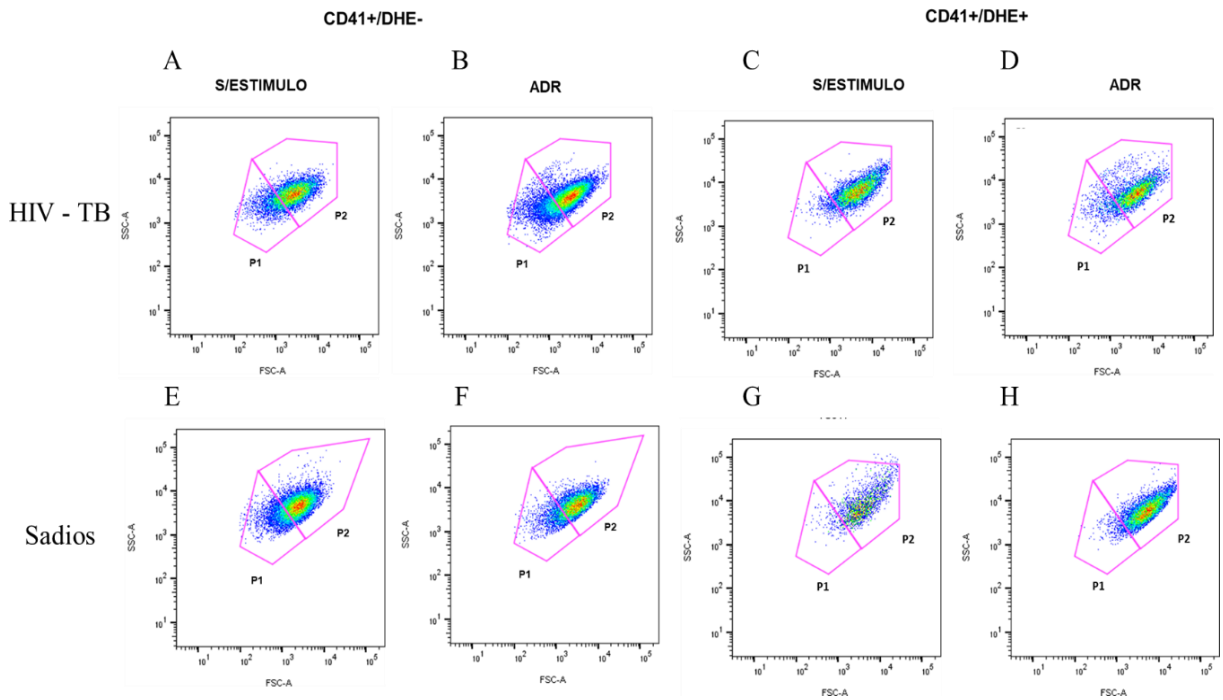


Figura 17: Comportamento das subpopulações de plaquetas com estímulo de adrenalina. As subpopulações de plaquetas foram caracterizadas de acordo com a marcação CD41 e DHE (ver métodos). A população total de plaquetas foi definida pelo painel FL-1 (CD41+) e FL-2 (DHE), em duas subpopulações: CD41+/DHE- e CD41+/DHE+. Painéis A, B, E e F indicam a subpopulação CD41+/DHE-, definida aqui com plaquetas maduras. Os painéis C, D, G e H indicam a subpopulação CD41+/DHE+, seriam as plaquetas reticuladas em razão de ácidos nucleicos remanescentes. As seleções P1 e P2 foram caracterizadas pelo tamanho no canal FSC. A-B) As plaquetas maduras dos pacientes HIV-TB sem estímulo e após estímulo com ADR, respectivamente. E-F) As plaquetas maduras dos indivíduos sadios sem estímulo e após estímulo com ADR, respectivamente. C-D) As plaquetas reticuladas dos pacientes HIV-TB sem estímulo e com estímulo com ADR, respectivamente. G-H) As plaquetas reticuladas dos indivíduos sadios sem estímulo e com estímulo com ADR, respectivamente.

A população total de plaquetas foi definida pelo painel FL-1 (CD41+) e FL-2 (DHE), em duas subpopulações: CD41+/DHE- e CD41+/DHE+. Os painéis A, B, E e F indicaram a subpopulação CD41+/DHE-, definida aqui com plaquetas maduras. Os painéis C, D, G e H indicam a subpopulação CD41+/DHE+, seriam as plaquetas reticuladas em razão de ácidos

nucleicos remanescentes. As seleções P1 e P2 foram caracterizadas pelo tamanho no canal FSC. As plaquetas maduras dos pacientes HIV-TB mostraram deslocamento após estimulação com ADR, aumentando a população de plaquetas na seleção P1, o que indica diminuição de tamanho (Figura 17A-B). Em contra partida, nos indivíduos sadios essa subpopulação de plaquetas maduras deslocam para P2 indicando aumento de tamanho (Figura 18E-F). Em relação às plaquetas reticuladas dos pacientes HIV-TB não ficou claro um deslocamento (Figura 17C-D). Essa população nos sadios foi bem deslocada para P2 indicando aumento do tamanho que indica agregação plaquetária (Figura 17G-H).

Quando as análises foram reunidas e realizadas em grupo, observamos uma maior frequência de plaquetas totais CD41+ tanto em pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória quanto em pacientes HIV/AIDS. A frequência de plaquetas totais CD41+ foi avaliada sob a ação da adrenalina. Observou-se uma redução de plaquetas tanto em pacientes HIV/AIDS quanto em pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória quanto comparados aos grupos sem estímulo (Figura 18).

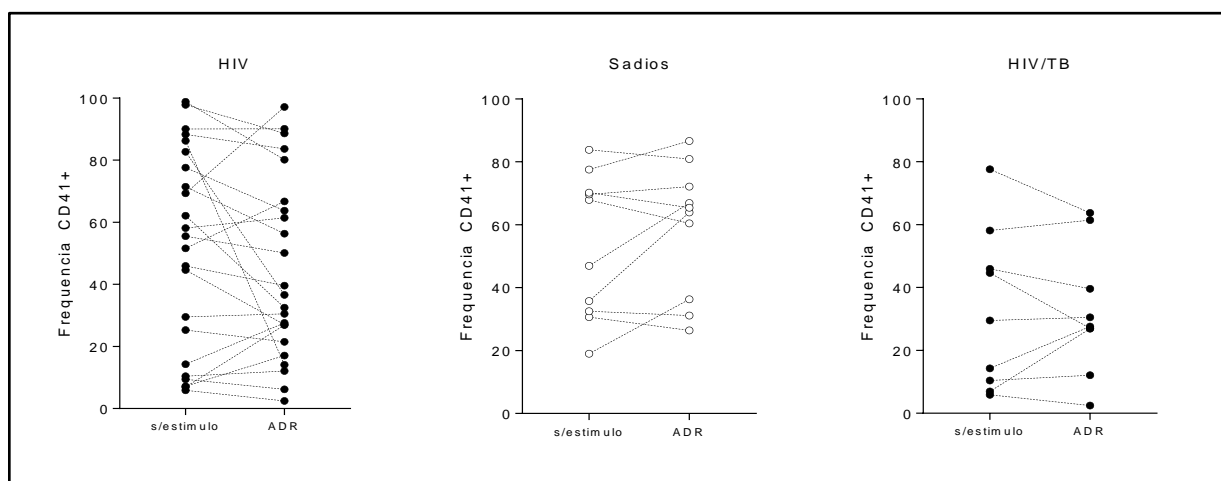


Figura 18: Frequência de plaquetas (CD41+) em pacientes HIV/AIDS, pacientes sadios e pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória na ausência e presença de estímulo.

Para avaliar a atividade funcional, as subpopulações de plaquetas foram submetidas a estímulos com adrenalina (Figuras 19 e 20). O comportamento das plaquetas reticuladas quando todos os pacientes HIV foram analisados não apresentou um padrão. A estimulação com adrenalina induziu aumento na frequência de plaquetas reticuladas em alguns pacientes e diminuição em outros (Figura 19A). A subpopulação reticulada dos indivíduos sadios apresentou um padrão peculiar representado pelo aumento da frequência desta (Figura 19B),

como se ocorresse uma fragmentação dessa população. Em contrapartida nos paciente co-infectados com tuberculose a adrenalina provocou uma redução no número de plaquetas reticuladas, como se houvesse agregação (Figura 19C). Esse aumento do número de plaquetas reticuladas nos indivíduos sadios foi estatisticamente diferente de todos os pacientes HIV, como também aqueles co-infectados com tuberculose (Figura 19D).

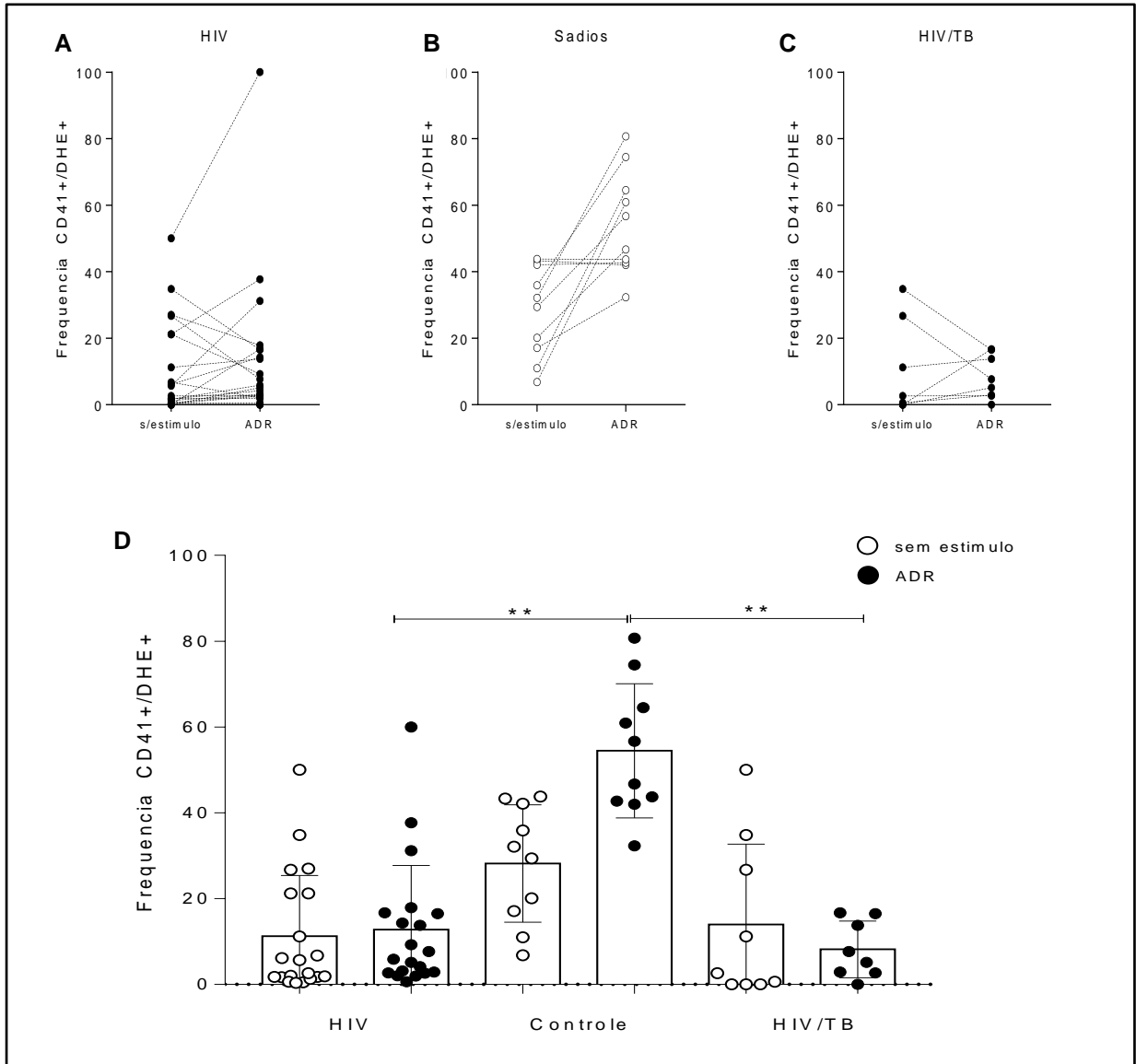


Figura 19: Avaliação da responsividade da subpopulação de plaquetas reticuladas (CD41+DHE+). A) Plaquetas de pacientes HIV/AIDS sob a ausência e presença de estímulo; B) Plaquetas de pacientes controles sob a ausência e presença de estímulo; C) Plaquetas de pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória (CR) sob a ausência e presença de estímulo; D) Comparação entre os grupos HIV/AIDS, controles, HIV/AIDS+CR na presença e ausência de estímulo.

Curiosamente, as subpopulações de plaquetas CD41+DHE- tiveram comportamento diferente nos indivíduos controle (Figura 20B). Da mesma forma que as reticuladas, as plaquetas maduras não apresentaram um padrão quando todos os pacientes HIV foram reunidos (Figura 20A). Essa população nos sadios diminuiu indicando agregação, e nos indivíduos coinfectados HIV/TB houve uma tendência, não significativa, de aumento no número de plaquetas (Figura 20C). No entanto, o número amostral não evidenciou essa tendência. Quando o número de plaquetas maduras foi comparado entre os grupos, a única diferença foi o número inicial reduzido no grupo contendo todos os pacientes HIV em relação aos controles (Figura 20D).

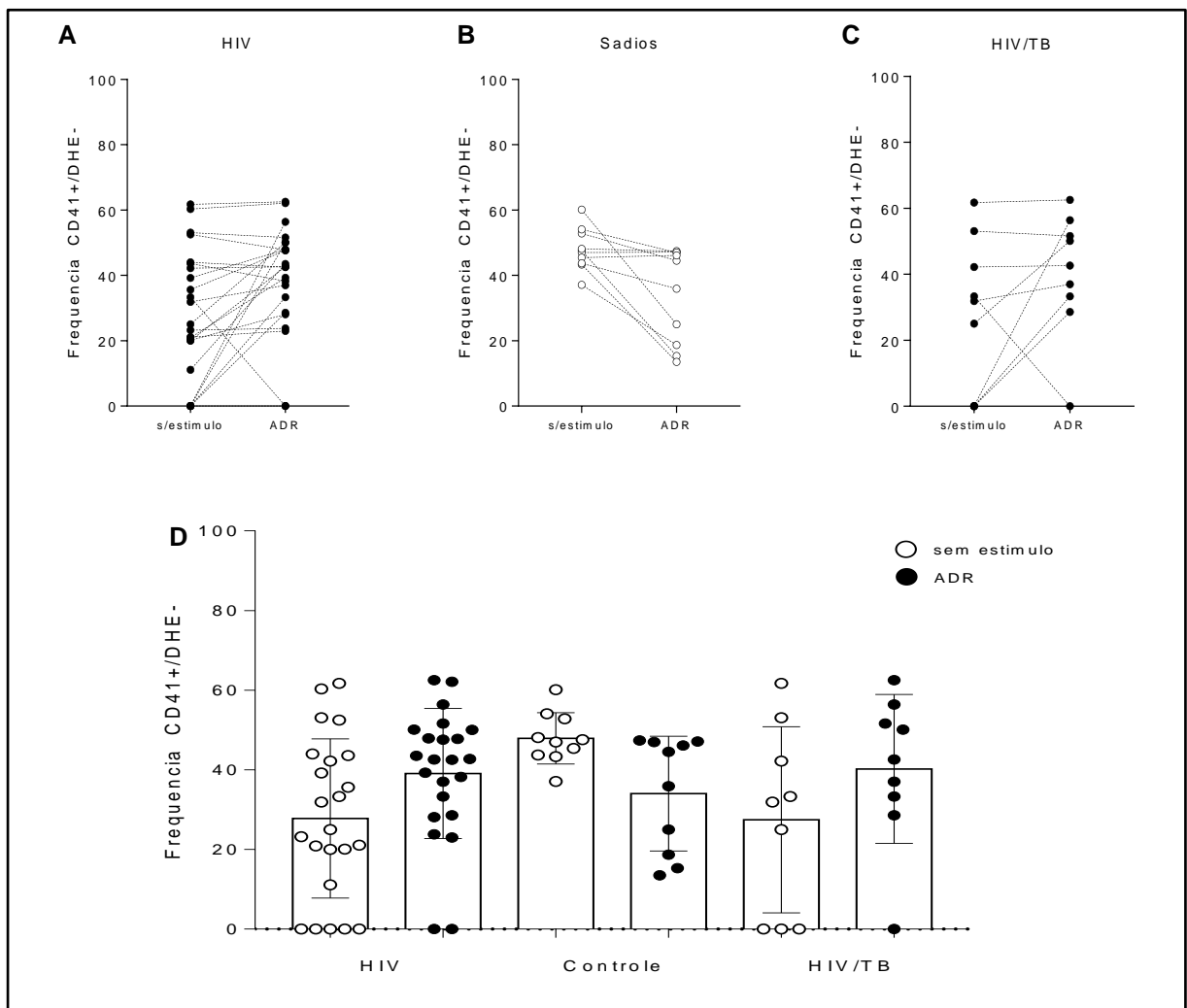


Figura 20: Avaliação da responsividade da subpopulação de plaquetas maduras (CD41+DHE-). A) Plaquetas de pacientes HIV/AIDS sob a ausência e presença de estímulo; B) Plaquetas de pacientes controles sob a ausência e presença de estímulo; C) Plaquetas de pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória (CR) sob a ausência e presença de estímulo; D) Comparação entre os grupos HIV/AIDS, controles, HIV/AIDS+CR na presença e ausência de estímulo.

7. DISCUSSÃO

As complicações respiratórias na infecção pelo HIV comumente representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade, sendo a tuberculose a coinfeção mais frequentemente associada com alterações nas contagens de plaquetas e aumento de IL-6, o que predispõe estes pacientes ao óbito (FERREIRA, 2015). O envolvimento das plaquetas na patogênese da infecção pelo HIV pode ser visualizado através da associação entre alterações na contagem de plaquetas, ou dos seus marcadores de ativação com a progressão da doença.

Neste estudo, avaliamos características clínicas e laboratoriais de pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória, bem como avaliamos alterações morfológicas e funcionais de plaquetas e marcadores inflamatórios nestes pacientes. Os dados apresentados mostram de modo geral que pacientes HIV/AIDS que apresentam comorbidade respiratória possuem maior risco de evoluir a óbito e que alterações na responsividade de plaquetas podem agravar este quadro.

Em acréscimo, IL-6 parece exercer uma ação anômala na patogênese das complicações associadas à infecção, contribuindo para piora do quadro clínico, além de configurar como um preditor de óbito nesta população. De fato, a IL-6 é uma citocina que atua regulando vários processos fisiológicos (TANAKA & KISHIMOTO, 2014). Contudo, apesar do fato de que o aumento das concentrações plasmáticas de IL-6 contribui para a progressão da doença pelo HIV, ainda não está claro o que estaria desencadeando este processo (SHIVE et al., 2012). Desse modo, nossos resultados apontam que o aumento de IL-6 é concomitante ao estado inflamatório na infecção pelo HIV, podendo ser determinados por múltiplos fatores. Sugerimos que a interação sinérgica e prejudicial de complicações relacionadas e não relacionadas ao HIV seriam um destes fatores.

Desde as primeiras descrições do HIV/AIDS, as complicações pulmonares têm sido relatadas com grande frequência, principalmente aquelas de etiologia infecciosa (DAVIS et al., 2008). Atualmente, as comorbidades respiratórias, não apenas infecções oportunistas, mas também àquelas de caráter crônico, continuam sendo uma das principais causas do aumento da mortalidade entre as pessoas infectadas pelo HIV e a primeira causa de internação hospitalar mesmo na era HAART (BENITO et al., 2012). De fato, a tuberculose é a complicação de maior frequência mundial e nacional dentre diversas patologias respiratórias, como, pneumonias e infecções fúngicas (SHAH et al., 2017). O mesmo foi observado no Rio

de Janeiro, que representa a área onde as duas infecções são endêmicas (SARACENI et al., 2015). Nossos resultados apontaram a tuberculose como a principal infecção do sistema respiratório em pacientes HIV/AIDS, com a prevalência de 98,7%, achado este que segue a tendência do padrão mundial, onde se é observado à alta frequência desta infecção em pessoas infectadas pelo HIV. E ainda, a presença de tuberculose e insuficiência respiratória aumentaram a chance de óbito destes pacientes em até 32% e 35%, em consonância com os dados já descritos na literatura (BARBIER et al., 2009; LIN et al., 2009; SARKAR & RASHEED, 2013; MABUNDA et al., 2014; PODLEKAREVA et al., 2014; DA SILVA ESCADA et al., 2017).

Em nosso estudo a associação de fatores solúveis da resposta imune foram avaliados frente ao desfecho de óbito. Durante a infecção pelo HIV ocorre um complexo conjunto de interações entre fatores virais e do hospedeiro, que levam a um estado crônico de ativação imune. Este estado por sua vez induz produção de vários mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas. A inflamação sistêmica persistente tem sido associada à progressão da doença pelo HIV (PAIADIRNI & MÜLLER-TRUTWUIN, 2013) e mortalidade em pacientes infectados pelo vírus (HART et al., 2018). Nossos resultados apontaram que o aumento dos níveis dos marcadores inflamatórios IL-6 e IL-8 estão associados ao óbito nestes pacientes.

Diversos autores também verificaram níveis plasmáticos aumentados de IL-6 associados a um maior risco de mortalidade em pacientes HIV (NIXON & LANDAY, 2010; BOULWARE et al., 2011; WADA et al., 2016; HSU et al., 2017) estando congruentes com nossos achados. Vários fatores podem induzir o aumento de IL-6 durante a infecção pelo HIV. Borges et al. (2015) ao investigar fatores associados (demográficos, clínico-laboratoriais e comorbidades) aos níveis de IL-6 no plasma de indivíduos (n=9864) infectados pelo HIV, observaram que níveis mais altos de IL-6 estão associados com idade avançada, replicação do vírus, baixo número de células T CD4+, menores níveis séricos de lipídeos, uso de inibidores de protease e comorbidades (doença cardiovascular, diabetes mellitus, HBV e HCV) (BORGES et al., 2015). Desse modo, os achados anteriormente relatados em conjunto com os nossos evidenciam que diversos fatores podem ser determinantes para a exacerbação da produção de IL-6 durante a infecção pelo HIV, contribuindo para perpetuação da inflamação. Além disso, nossos resultados apontam a necessidade de abordar a IL-6 como um biomarcador de desfecho clínico em pacientes HIV/AIDS.

A elevação dos níveis de IL-8 em pacientes HIV/AIDS como um preditor potencial de risco de óbito por nós descrito, também já foi relatada em outros estudos (NIXON & LANDAY, 2010; OSUNKALU et al., 2015; PANANGHAT et al., 2016). Os níveis de IL-8 em crianças infectadas pelo HIV apontaram que a elevação nos níveis dessa citocinas estão fortemente associadas à progressão da doença (PANANGHAT et al., 2016). Por outro lado, os níveis plasmáticos dessa citocina em adultos infectados pelo HIV tendem a mostrar uma redução sob uso da terapia antirretroviral (HAISSMAN et al., 2009). Aqui, muitos pacientes indicavam estar sob tratamento, mas a contagem de células T CD4+ menores que 200 cel/ μ L e os elevados níveis de carga viral associados à elevação de IL-8 alertam para um grande problema que é a falha terapêutica, no qual os pacientes não aderem a um tratamento efetivo.

Com o advento da terapia antirretroviral, a replicação do vírus pôde ser controlada, surgindo um novo panorama clínico da AIDS, no qual as complicações não relacionadas estão prevalecendo. Essas comorbidades são variadas podendo ser de origem respiratória, neurológica, digestiva, cardiovascular, hepática e oncológica. Contudo, todas possuem como mecanismo indutório a inflamação crônica induzida na infecção pelo HIV (PANDREA et al., 2015). Também avaliamos os níveis de citocinas na presença e ausência de comorbidades respiratórias, neurológica e digestiva em pacientes HIV/AIDS. E nesse contexto, demonstramos a associação do aumento de IL-1 β e IL-8 em pacientes HIV/AIDS com comorbidade neurológica e de IL-10 naqueles com comorbidade digestiva.

Complicações neurológicas são bastante frequentes em pacientes HIV/AIDS (NOGUI et al., 2009; ULDRICK et al., 2014), pois a infiltração do sistema nervoso central por vírus livres, monócitos/macrófagos ativados e células T infectadas pelo HIV desencadeia o processo de neuroinflamação, resultando no aumento de mediadores solúveis (HONG & BANCKS, 2015). Nossos resultados apontaram um aumento de IL-1 β e IL-8 em pacientes acometidos por comorbidade neurológica. Estudos já realizados corroboram com este achado, onde descrevem níveis elevados de citocinas e quimiocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β e IL-8 em complicações neurológicas tanto no sangue, quanto no líquido cefalorraquidiano (LCR) de indivíduos soropositivos (MEHLA et al., 2012; VERA et al., 2016).

No mais, na avaliação das comorbidades neurológicas na nossa população de pacientes, a neurotoxoplasmose foi a infecção mais frequente (48,45%). Essa elevada incidência também já foi verificada por diversos autores (NOGUI et al., 2009; ARAÚJO et al., 2012; XAVIER et al., 2013; BENSON et al., 2018). Tal panorama reforça o fato de que o

estado de imunossupressão durante a infecção pelo HIV propicia um ambiente favorável para o desenvolvimento desta coinfeção, onde o não estabelecimento de uma resposta imune efetiva auxilia na cronificação da infecção pelo *Toxoplasma gondii*, agravando o quadro clínico dos pacientes, causando complicações severas que podem levar ao óbito (NOGUI et al., 2009; ARAÚJO et al., 2012; XAVIER et al., 2013; BENSON et al., 2018).

Desde os primeiros casos descritos da AIDS as alterações clínicas relacionadas ao trato gastrointestinal (TGI) tem apresentado alta prevalência (PUPULIN et al., 2009). Sabe-se que o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é um dos principais alvos de replicação do HIV, sendo de grande importância na depleção de células T CD4+ (VAN MARLE et al., 2013; FERNANDES et al., 2018) onde ocorre uma intensa hiperativação imune que culmina na quebra da permeabilidade intestinal desencadeando o processo de translocação microbiana, que por sua vez age como estímulo para desencadear a inflamação (DILLON et al., 2014). Ao avaliar marcadores inflamatórios em comorbidade digestivas, observamos associação de altos níveis de IL-10 em pacientes HIV/AIDS que apresentaram estas comorbidades, como corroborados em outros estudos (SAID et al., 2010; DUTERTRE et al., 2012). Em acréscimo em nosso estudo, a diarreia foi a principal manifestação digestiva encontrada (42,5%), estando de acordo com dados descritos na literatura (ELFSTRAND & FLORÉN, 2010; LOGAN et al., 2016).

A associação dos níveis de citocinas com dados hematológicos também foi realizada, onde observamos associação da alteração de níveis de IL-6 com anemia, plaquetopenia e plaquetocitose em pacientes HIV/AIDS. A anemia é uma complicação comumente encontrada (MAKUBI et al., 2015), e a inflamação crônica colabora para o desenvolvimento deste quadro, dessa forma os marcadores de inflamação também estão alterados nesta condição (SHIVAKOTI et al., 2015). Descrevemos a associação do aumento dos níveis de IL-6 e IL-10 com anemia, corroborando com estudos já realizados, e associando-a ainda com a maior probabilidade de mortalidade, validando assim os achados por nós descritos (BORGES et al., 2014b; QUIROZ-ROLDAN et al., 2017). Níveis elevados de IL-10 também já foram descritos, sendo ainda associados com hepcidina, hormônio hepático que interfere na absorção de ferro, induzindo à anemia em indivíduos infectados pelo HIV (ARMITAGE et al., 2014).

Descrevemos também a associação de níveis elevados de IL-6 com quadros de plaquetopenia e níveis reduzidos com plaquetocitose. Miguez et al. (2005) ao avaliar a relação da IL-6 e fatores crescimento plaquetário, com contagem de plaquetas, carga viral, contagem

de CD4 e tratamento anti-retroviral em 75 pacientes infectados pelo HIV, observou que a produção média de IL-6 foi significativamente maior em pacientes plaquetopênicos do que em indivíduos não plaquetopênicos, estando ainda associada com carga viral alta e baixa contagem de CD4, justificando os resultados por nós encontrados (MIGUEZ et al., 2005). Tais resultados nos levam a concluir que existem duas categorias de alterações da contagem de plaquetas associadas ao HIV, uma acompanhada da redução de IL-6 e outra com elevações compensatórias de IL-6. Em acréscimo, encontramos uma maior frequência de plaquetocitose (21,74%) em indivíduos HIV/AIDS+CR, contrariando os relatos já descritos na literatura onde há maior prevalência de plaquetopenia durante a infecção pelo HIV (LEITE, 2010; NASCIMENTO & TANAKA, 2012).

Ambas as alterações plaquetárias, acima descritas, na infecção pelo HIV podem surgir através de desregulação do balanço do aumento ou diminuição da produção de plaquetas. Contudo, o aumento da destruição de plaquetas mediada por anticorpos anti-plaquetários miméticos do HIV, o aumento do uso de plaquetas ativadas (METCALF PATE & MAKOWSKI, 2011), e a ocorrência de distúrbios hematopoiéticos e infecções oportunistas (NASCIMENTO & TANAKA, 2012) favorecem a estabelecimento de plaquetopenia associada ao HIV.

A associação dos níveis de citocinas com a contagem de células T CD4+ e carga viral também foi realizada. Observamos que pacientes com baixa contagem de células T CD4+ (>200 cel/ μ L) possuem níveis elevados de IL-6. Há muito tempo é demonstrado que a infecção pelo vírus HIV induz a expressão e a secreção de IL-6 por monócitos e macrófagos (NAKAJIMA et al., 1989; BREEN et al., 1990). Recentemente, evidências têm demonstrado além do aumento de IL-6, uma associação da elevação dos níveis dessa citocina com a baixa contagem de células T CD4+, assim como por nós descritos (ARMAH et al., 2012; SALTER et al., 2014). Contudo, dados apontam que IL-6 também pode estar elevada mesmo em indivíduos com alta contagem de T CD4+ (BORGES et al., 2015). Este perfil sugere que a intensa depleção de células T CD4+ durante a infecção pelo HIV e constante replicação viral são maiores indutores de inflamação do que a própria imunodeficiência, apesar de diversos fatores afetarem a inflamação na infecção. Desse modo, além de apontarmos a IL-6 como preditor de mortalidade, sugerimos esta citocina como um potencial biomarcador de progressão da doença.

No presente estudo não encontramos nenhuma associação de marcadores inflamatórios com a carga viral. Diferentemente, aos achados descritos por outros autores, onde o aumento de diversas citocinas, como TNF, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 e IFN- γ foi associado com aumento da carga viral (SHEBL et al., 2012; VAIDYA et al., 2014; BORGES et al., 2015; IKETLENG et al., 2016). Desse modo, nossos resultados apontam que a inflamação não está associada aos níveis de replicação viral.

Também observamos que alterações no número de plaquetas, com tendência a plaquetocitose a ser a principal alteração relacionada, conferem maiores chances de óbito em pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória. Dados consistentes com nossos achados apontam que alterações na contagem de plaquetas estão associadas com a progressão da doença pelo HIV e morte, sustentando o papel das plaquetas na patogênese da infecção. Contudo, os autores descrevem a plaquetopenia como principal alteração, diferentemente de nossos achados (RIEG et al., 2007; METCALF PATE & MANKOWSKI, 2011; TSEGAYE et al., 2013).

Na avaliação do aspecto funcional das plaquetas na infecção pelo HIV, observamos uma maior frequência de plaquetas tanto em pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória quanto em pacientes HIV/AIDS sem comorbidades respiratórias. Um estudo recente onde a monitoração da produção de plaquetas foi feita por citometria de fluxo na infecção pelo HIV em modelo experimental com macacos, foi descrito um aumento no número de plaquetas (METCALF PATE et al., 2013). Tais dados são similares aos nossos achados, mas os autores utilizaram para fenotipagem plaquetária o marcador de superfície CD-62P, que além de identificar a população, estima também a ativação plaquetária, o que o CD41 (marcador fenotípico utilizado em nossas análises) sozinho, não possibilita. Logo, os resultados descritos por eles, refletem o aumento do número de plaquetas ativadas, enquanto os nossos refletem o aumento do número absoluto de plaquetas totais (CD41+) encontrado nesses pacientes.

Evidências já apontam que a inflamação exacerbada pode ocasionar um intenso acúmulo de plaquetas nos pulmões, bem como ativar plaquetas na circulação de indivíduos acometidos por doença respiratória (BOZZA et al., 2009; BATTINELLI et al., 2011). Na tuberculose, a principal comorbidade respiratória encontrada em nossa população, dados já demonstram que o aumento do número de plaquetas e de índices plaquetários, estariam

associados à maior intensidade inflamatória nesta infecção (TOZKOPARAN et al., 2007; DANIEL & DUNN, 2013; LEE et al., 2016).

Contudo, observamos redução da subpopulação de plaquetas reticuladas em pacientes com TB quando estimuladas com adrenalina, sugerindo agregação. Satchell et al. (2010) ao avaliar a função plaquetária na infecção pelo HIV, observou que plaquetas de pacientes HIV de fato são mais reativas à adrenalina, conseqüentemente sofrem maior agregação na presença desta (SATCHELL et al., 2010), corroborando com nossos achados. No mais, as plaquetas também são alvo de infecção para o HIV, e que, além disso, o vírus podem ativar as plaquetas infectadas, bem como não infectadas próximas, e essa ativação pode levar também ao aumento da formação de agregados em resposta aos estímulos desencadeados pela interação direta do vírus com as plaquetas (CHABERT et al., 2015; HOTTZ et al., 2018).

Também descrevemos um aumento da subpopulação de plaquetas maduras em pacientes com TB quando estimuladas com adrenalina, sugerindo fragmentação. Estudos tem demonstrado que a presença de anticorpos (GPIIIa49-66) contra um epítipo imunodominante da integrina $\beta 3$ (glicoproteína IIIa – GPIIIa) induz a fragmentação das plaquetas (LI et al., 2005; LI et al., 2007; WANG et al., 2011). Porém, sugerimos que esta fragmentação poderia ser decorrente da geração de micropartículas de plaquetas. O aumento da produção e ativação de micropartículas na infecção pelo HIV já foi descrito (BODE et al., 1991; MAYNE et al., 2012), além disso, podem ser formadas prontamente após ativação com agonistas (ITALIANO et al., 2010). Desse modo, nossos achados apontam no sentido de que a fragmentação das plaquetas maduras na infecção pelo HIV possa exacerbar o estado inflamatório da infecção associada á complicações respiratórias. Portanto, nosso estudo serviu para abrir a discussão no sentido de induzir estudos mais aprofundados para melhor elucidar este processo, e tentar diminuir a exacerbação da insuficiência respiratória no contexto do HIV.

8. LIMITAÇÕES

Durante a realização deste estudo, algumas limitações e vieses foram percebidos como fatores importantes a serem considerados para as próximas interações ou estudos. Dentre as quais podem ser citadas, o pequeno número amostral nos testes de avaliação da resposta de plaquetas (n=20), a falta de avaliação sobre a relevância do uso de terapia anti-retroviral em nossos resultados, baixa adesão ao estudo por parte dos participantes convidados, estado debilitante dos pacientes para a aquisição da amostra sanguínea e a logística envolvida no transporte das amostras, visto que as plaquetas podem ser ativadas facilmente, e devido à distância entre as instituições envolvidas, requereu maiores precauções por parte de nossa equipe.

Mesmo assim, o mérito do trabalho não foi afetado, e nos trouxe a possibilidade de vários desdobramentos interessantes, além da possibilidade de continuação do trabalho, pois a técnica utilizada para a avaliação das plaquetas é de simples manufatura, alta eficiência e de fácil reprodução. Podendo esta ferramenta ser empregada na avaliação de outra comorbidade como a doença cardiovascular, ampliando assim a possibilidade diagnóstica e prognóstica para estes pacientes.

9. CONCLUSÕES

- A partir dos testes de associação realizados, comprovou-se que pacientes HIV/AIDS com comorbidade respiratória e alteração plaquetária possuem maior risco de óbito;
- IL-6 quando em níveis elevados está associada com comorbidades (neurológicas e digestivas) nestes pacientes, manifestações hematológicas (anemia, plaquetocitose e plaquetopenia) e baixas contagens de células T CD4+. Estabelecendo assim os níveis aumentados desta citocina como fator preditor de agravamento da doença com desfecho em óbito;
- Na avaliação da imunofenotipagem de plaquetas isoladas desses pacientes, constatamos elevada frequência da população de plaquetas totais (CD41+), o que antagoniza a literatura corrente, onde se destaca o inverso de nossos resultados (plaquetopenia).
- O comportamento plaquetário (células totais) nos pacientes estudados, quando sob o estímulo agonista, apresentou diminuição populacional, comprovando sua funcionalidade celular através da agregação plaquetária, conforme o esperado.
- Na população de plaquetas reticuladas o estímulo provocou diminuição, e na população de plaquetas maduras, ocorreu aumento, sugerindo fragmentação. O que possivelmente pode estar incrementando o estado inflamatório crônico nestes pacientes, através da produção de micropartículas de plaquetas.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da incidência de complicações não relacionadas à AIDS, dentre elas as comorbidades respiratórias, estão cada vez mais associadas à progressão da infecção pelo HIV e óbito. Apesar de não estar claro o mecanismo envolvido nestas complicações, a inflamação e alterações nas respostas de plaquetas parecem ser importantes fatores indutores. Desse modo, nossos resultados fornecem não só, o estabelecimento de preditores de agravamento de doença, mas também a visualização de relações desfavoráveis destes componentes imunológico em relação ao desenvolvimento inflamatório, além das perspectivas para a compreensão totalitária das funções plaquetárias durante o curso da infecção pelo HIV frente às complicações respiratórias, considerando sempre seu envolvimento na patogênese destas complicações.

11. PERSPECTIVAS

- Aumentar o grupo amostral para avaliação da resposta de plaquetas;
- Avaliar a resposta de plaquetas na ausência e presença da terapia anti-retroviral;
- Investigar os níveis de ativação plaquetária em plaquetas isoladas destes pacientes;
- Associar os níveis de ativação plaquetária com marcadores inflamatórios;
- Investigar a produção de micropartículas derivadas de plaquetas nestes pacientes.

12. REFERÊNCIAS

- Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J. Virol.* 2004; 78: 2454-2459.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai SHIV. *Imunologia celular e molecular*. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- Alcantara S, Reece J, Amarasena T, Rose RD, Manitta J, Amin J, Kent SJ. Thrombocytopenia is strongly associated with simian AIDS in pigtail macaques. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009; 51(4):374–379.
- Alinaghi SAS, Vaghari B, Roham M, Badie BM, Jam S, Foroughi M, Djavid GE, Hajiabdolbaghi M, Hosseini M, Mohraz M, McFarland W. Respiratory Complications in Iranian Hospitalized Patients with HIV/AIDS. *Tanaffos.* 2011; 10(3): 49-54.
- Alter G, Martin MP, Teigen N, Carr WH, Suscovich TJ, Schneidewind A, Streeck H, Waring M, Meier A, Brander C, Lifson J D, Allen TM, Carrington M, Altfeld M. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J.Exp.Med.* 2007; 204: 3027-3036.
- Altfeld M, Fadda L, Frleta D, Bhardwaj N. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat.Rev.Immunol.* 2011; 11: 176-186.
- Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S. Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circulation Journal.* 2010; 74(4):597-607.
- Araújo TM, Barros LM, Caetano JÁ, Moreira RAN, Frotas NM, Feitosa ACL, Said BA, Saldanha CA. Neurotoxoplasmosis boarding in patients with HIV/AIDS in intensive care unit. *JONUOL.* 2012 May;6(5):1046-52.
- Armah KA, McGinnis K, Baker J, Gibert C, Butt AA, Bryant KJ, Goetz M, Tracy R, Oursler KK, Rimland D, et al. HIV status, burden of comorbid disease, and biomarkers of inflammation, altered coagulation, and monocyte activation. *Clin Infect Dis.* 2012 Jul;55(1):126-36.
- Armitage AE, Stacey AR, Giannoulatou E, Marshall E, Sturges P, Chatha K, Smith NM, Huang X, et al. Distinct patterns of hepcidin and iron regulation during HIV-1, HBV, and HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Aug 19;111(33):12187-92.
- Arrildt KT, Joseph SB, Swanstrom R. The HIV-1 Env Protein: A Coat of Many Colors. *Current HIV/AIDS reports.* 2012;9(1):52-63.
- Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis. *Ver EspCardiol.* 2009; 62(10): 1161-78.
- Bagashev A, Sawaya BE. Roles and functions of HIV-1 Tat protein in the CNS: an overview. *Virology Journal.* 2013;10:358.

- Baker JV, Neuhaus J, Duprez D, Kuller LH, Tracy R, Belloso WH, De Wit S, Drummond F, Lane HC, Ledergerber B, Lundgren J, Nixon DE, Paton NI, Neaton JD. Changes in Inflammatory and Coagulation Biomarkers: A Randomized Comparison of Immediate Versus Deferred Antiretroviral Therapy in Patients with HIV Infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2012; 56(1), 36–43.
- Barbier F , Coquet I , Legriél S , Pavie J , Darmon M , Mayaux J , Molina JM , Schlemmer B , Azoulay E. Etiologies and outcome of acute respiratory failure in HIV-infected patients. *Intensive Care Med*. 2009 Oct;35(10):1678-86.
- Barré-Sinoussi F. HIV as the cause of AIDS. *Lancet*. 1996; 348(9019): 31-35.
- Bartlett JG, Moore R. A comprehensive plan for managed care of patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis*.1999; 29(1):50-55.
- Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE Jr. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood*. 2011;118(5):1359-69.
- Beilharz MW, Sammels LM, Paun A, Shaw K, van Eeden P, Watson MW, Ashdown ML. Timed ablation of regulatory CD4+ T cells can prevent murine AIDS progression. *J. Immunol*. 2004; 172; 4917-4925.
- Benito N, Moreno A, Miro JM, Torres A. Pulmonary infections in HIV-infected patients: an update in the 21st century. *Eur Respir J*. 2012; 39: 730–745.
- Benson JC, Cervantes G, Baron TR, Tyan AE, Flanagan S, Lucato LT, McKinney AM, Ott F. Imaging features of neurotoxoplasmosis: A multiparametric approach, with emphasis on susceptibility-weighted imaging. *Eur J Radiol Open*. 2018 Mar 17;5:45-51.
- Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews* 2009 Jul;23(4):177-89.
- Bode AP, Orton SM, Frye MJ, Udis BJ. Vesiculation of platelets during in vitro aging. *Blood*. 1991 Feb 15;77(4):887-95.
- Borges AH, O'Connor J, Phillips NA, Rönsholt F, Pett S, Vjecha MJ, French MA, Lundgren JD. Determinants of IL-6 levels during HIV infection. *Journal of the international AIDS society*. 2014; 17(3):19482.
- Borges AH, O'Connor JL, Phillips NA, Rönsholt FF, Pett S, Vjecha MJ, French MA, Lundgren JD. Factors associated with plasm IL-6 livels during HIV infection. *JID*. 2015; 212, 585-595.
- Borges ÁH, Weitz JI, Collins G, Baker JV, Lévy Y, Davey RT Jr, Phillips AN, Neaton JD, Lundgren JD, Deeks SG. Markers of inflammation and activation of coagulation are associated with anaemia in antiretroviral-treated HIV disease. *AIDS*. 2014b;28(12):1791-6.

- Boukour S, Massé JM, Bénit L, Dubart-Kupperschmitt A, Cramer EM. Lentivirus degradation and DC-SIGN expression by human platelets and megakaryocytes. *J Tromb Haemost.* 2006; 4:426–35.
- Boulware DR, Hullsiek KH, Puroton CE, Rupert A, Baker JV, French MA, Bohjanen PR, Novak RM, Neaton JD, Sereti I. Higher levels of CRP, D-dimer, IL-6, and hyaluronic acid before initiation of antiretroviral therapy (ART) are associated with increased risk of AIDS or death. *J Infect Dis.* 2011; 203:1637–1646.
- Bozza FA, Shah AM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Amicus or adversary: platelets in lung biology, acute injury, and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40(2):123-34.
- Brass L. Understanding and evaluating platelet function. Hematology American Society Hematology Education Program. 2010:387-96.
- Breen EC, Rezai AR, Nakajima K, Beall GN, Mitsuyasu RT, Hirano T, Kishimoto T, Martinez-Maza O. Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. *J Immunol.* 1990;144(2):480-4.
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006b; 12: 1365-1371.
- Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol.* 2006a; 7: 235.
- Brown J, McGowan JA, Chouial H, Capocci S, Smith C, Ivens D, Johnson M, Sathia L, Shah R, Lampe FC, Rodger A, Lipman M. Respiratory health status is impaired in UK HIV-positive adults with virologically suppressed HIV infection. *HIV Medicine,* 2017b: 18, 604-612.
- Brown J, Roy A, Harris R, Filson S, Johnson M, Abubakar I, Lipman M. Respiratory symptoms in people living with HIV and the effect of antiretroviral therapy: a systematic review and meta-analysis. *Thorax.* 2017a;72:355–366.
- Bruchfeld J, Correia-Neves M, Ilenius GK. Tuberculosis and HIV Coinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5:a017871.
- Carestia A, Kaufman T, Schattner M. Platelets: new bricks in the building of neutrophil extracellular traps. *Frontiers in immunology.* 2016; 7.
- Castro GC, Ward JW, Slutsker L, Buehler JW, Jaffe HW, Berkelman RL, Curran JW. Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. Centers for Disease Control and Prevention (National Center for Infectious Diseases Division of HIV/AIDS). 1993; 17(4):802-810.

- Chabert A, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, Cognasse F, Schattner M, Gomez RM, Garraud O. Human platelets and their capacity of binding viruses: meaning and challenges? *BMC Immunology*. 2015;16:26.
- Chaipan C, Soilleux EJ, Simpson P, Hofmann H, Gramberg T, Marzi A, et al. DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *J Virol*. 2006;80(18):8951–60.
- Chege D, Chai Y, Huibner S, Kain T, Wachih C, Kimani M, Barasa S, McKinnon LR, Muriuki FK, Kariri A, Jaoko W, Anzala O, Kimani J, Ball TB, Plummer FA, Kaul R. Blunted IL17/IL22 and Pro-Inflammatory Cytokine Responses in the Genital Tract and Blood of HIV-Exposed, Seronegative Female Sex Workers in Kenya. *PloS One*. 2012; 7 (8):e43670.
- Cleirici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Lucey DR, Via CS, Shearer GM. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic human immunodeficiency virus-seropositive patients independent of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J. Clin. Invest*. 1989; 84: 1892-9.
- Coiras M, Lopez-Huertas MR, Perez-Olmeda M, Alcami J. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat.Rev.Microbiol*. 2009; 7: 798-812.
- Connor RI, Ho DD. Etiology of AIDS: biology of human retroviruses. In: Devita VT. editor. *AIDS etiology, diagnosis, treatment and prevention*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company. 1992; 13-85.
- Cruvinel WM, Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, Andrade LEC. Sistema imunitário - Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50(4): 434-61.
- Da Silva Escada RO, Velasque L, Ribeiro SR, et al. Mortality in patients with HIV-1 and tuberculosis co-infection in Rio de Janeiro, Brazil - associated factors and causes of death. *BMC Infectious Diseases*. 2017;17:373.
- Damoiseaux J. Regulatory T cells: back to the future. *The Netherlands journal of medicine*. 2006; 64:1-9.
- Daniel K, Dunn R. Comparison of platelet count in tuberculosis spine to other spine pathology. *European Spine Journal*. 2013;22(12):2810-2814.
- Davis JL, Fei M, Huang L. Respiratory infection complicating HIV infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21(2):184-90.
- Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity*. 2013 Oct 17;39(4):633-45.
- D'Ettoire G, Douek D, Paiardini M, Ceccarelli G, Vullo V. Microbial translocation and infectious diseases: What is the link? *Int. J. Microbiol*, 2012, Article ID 356981, 2.

- Dias RFG, Bento LO, Tavares C, Filho HR, Silva MAC, Moraes LC, Freitas-Vilela AA, Moreli ML, Cardoso LPV. Epidemiological and clinical profile of HIV-infected patients from Southwestern Goiás State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2018;60:e34.
- Dillon SM, Lee EJ, Kotter CV, Austin GL, Dong Z, Hecht DK, Gianella S, Siewe B, Smith DM, Landay AL, Robertson CE, Frank DN, Wilson CC. An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunol*. 2014 Jul;7(4):983-94.
- Drummond MB, Kirk GD. HIV-associated obstructive lung diseases: insights and implications for the clinician. *Lancet Respir Med* 2014; 2: 583–592.
- Drummond MB, Kirk GD. HIV-associated obstructive lung diseases: insights and implications for the clinician. *The lancet Respiratory medicine*. 2014;2(7):583-592.
- Dutertre CA, Amraoui S, DeRosa A, Jourdain JP, Vimeux L, Goguet M, Degrelle S, Feuillet V, Liovat AS, Müller-Trutwin M, Decroix N, Deveau C, Meyer L, Goujard C, Loulergue P, Launay O, Richard Y, Hosmalin A. Pivotal role of M-DC8⁺ monocytes from viremic HIV-infected patients in TNF α overproduction in response to microbial products. *Blood*. 2012 Sep 13;120(11):2259-68.
- Elfstrand L, Florén C-H. Management of chronic diarrhea in HIV-infected patients: current treatment options, challenges and future directions. *HIV/AIDS (Auckland, NZ)*. 2010;2:219-224.
- Everts PAM, Knape TAJ, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP, Box HA, van Zundert A. Platelet rich plasma and platelet gel. A review. *J Extra Corpor Techn*. 2006, 38: 174-187.
- Favre D, Lederer S, Kanwar B, Ma ZM, Proll S, Kasakow Z, Mold J, Swainson L, Barbour JD, Baskin CR, Palermo R, Pandrea I, Miller CJ, Katze MG, McCune JM. Critical Loss of the Balance between Th17 and T Regulatory Cell populations in Pathogenic SIV Infection. *Plos Phatogens* 2009; 2(5): e1000295. 2A:693-9.
- Feldman C. Pneumonia associated with HIV infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2005 Apr;18(2):165-70.
- Fernandes SM, Pires AR, Matoso P, Ferreira C, Nunes-Cabaço H, Correia L, Valadas E, Poças J, Pacheco P, Veiga-Fernandes H, Foxall RB, Sousa AE. HIV-2 infection is associated with preserved GALT homeostasis and epithelial integrity despite ongoing mucosal viral replication. *Mucosal Immunol*. 2018 Jan;11(1):236-248.
- Ferreira FLB, Colella MP, Medina SS, Costa-Lima C, Fiusa MML, Costa LNG, Orsi FA, Annichino-Bizzacchi JM, Fertrin KY, Gilberti MFP, Ozelo MC, De Paula EV. Evaluation of the immature platelet fraction contribute to the differential diagnosis of hereditary, immune and other acquired thrombocytopenia. *Scientific reports*. 2017; 7(1): 3355.

- Ferreira MD da S. Tuberculose em unidade de terapia intensiva: análise descritiva em um hospital de referência HIV/AIDS na Amazônia brasileira [Internet]. Universidade do Estado do Amazonas; 2015. Available from:<http://tede.uea.edu.br/jspui/handle/tede/231>.
- Fettig J, Swaminathan M, Murrill CS, Kaplan JE. Global epidemiology of HIV. *Infect Dis Clin North Am* 2014; 28: 323-337.
- Février M, Dorgham K, Rebollo A. CD4+ T cell depletion in Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection: Role of apoptosis. *Viruses*. 2011; 3: 586-612.
- Flores–Villanueva PO, Yunis EJ, Delgado JC, Vittinghoff E, Buchbinder S, Leung JY. Control of HIV–1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA–Bw4 homozygosity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:5140–5.
- FMT-HVD. Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado. Boletim epidemiológico. 2016.
- Forsman A, Weiss RA. Why is HIV a pathogen? *Trends Microbiol*. 2008; 16(12): 555-60.
- Foster CB, Lehrnbecher T, Samuels S, Stein S, Mol F, Metcalf JA, Wyvill K, Steinberg SM, Kovacs J, Blauvelt A, Yarchoan R, Chanock SJ. An IL6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. *Blood*. 2000; 96 (7), 2562–7.
- Freed EO. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*. 1998; 251(1): 1-15.
- Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet*, New York. 2001; 26(1-6): 13- 33, 2001.
- Gallant J, Hsue PY, Shreay S, Meyer N. Comorbidities Among US Patients With Prevalent HIV Infection-A Trend Analysis. *JID*. 2017; 216(19): 1525–1533.
- Gandhi RT, Walker BD. Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med*. 2002; 53: 149.
- Gangwani MR, Kumar A. Multiple Protein Kinases via Activation of Transcription Factors NF- κ B, AP-1 and C/EBP- δ Regulate the IL-6/IL-8 Production by HIV-1 Vpr in Astrocytes. *PlosOne*. 2015; 10 (8), e0135633.
- Garraud O, Cognasse F. Are platelets cells? And if yes, are they imune cells? *Front Immunol*. 2015; 6: 70.
- Geskus RB, Prins M, Hubert JB, Miedema F, Berkhout B, Rouzioux C, Delfraissy J F Meyer L. The HIV RNA setpoint theory revisited. *Retrovirology*. 2007; 4:65.
- Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal*. 2014:1-16.
- Gingo MR, Balasubramani GK, Kingsley L, Rinaldo CR Jr, Alden CB, Detels R, Greenblatt RM, Hessel NA, Holman S, Huang L, Kleerup EC, Phair J, Sutton

SH, Seaberg EC, Margolick JB, Wisniewski SR, Morris A. The impact of HAART on the respiratory complications of HIV infection: longitudinal trends in the MACS and WIHS cohorts. *PLoS One*. 2013;8(3):e58812.

- Grassi EA, Do Carmo AM. Anti-agregantes plaquetários: ampliando conhecimento. *Disciplinarum Scientia Saúde*. 2016; 13(1):131-143.
- Grivennikov SI, Karin M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:104–8.
- Gurbel PA, deFilippi CR, Bliden KP, Tantry US. HIV infection, ACS, PCI and high platelet reactivity: ingredients for a perfect thrombotic storm. *European Heart Journal*. 2017; 38(21):1687-1689.
- Haase AT. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 783.
- Haij NB, Leghmari K, Planès R, Thieblemont N, Bahraoui E. HIV-1 Tat protein binds to TLR4-MD2 and signals to induce TNF- α and IL-10. *Retrovirology*. 2013; 10, 123.
- Haissman JM, Vestergaard LS, Sembuche S, Erikstrup C, Mmbando B, Mtullu S, Lemnge MM, Gerstoft J, Ullum H. Plasma cytokine levels in Tanzanian HIV-1-infected adults and the effect of antiretroviral treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 Dec 1;52(4):493-7.
- Hamburger AS, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood*. 1990 Feb 1;75(3):550-4.
- Hart BB, Nordell AD, Okulicz JF, Palfreeman A, Horban A, Kedem E, Neuhaus J, Jacobs DR Jr, Duprez DA, Neaton JD. Inflammation-Related Morbidity and Mortality Among HIV-Positive Adults: How Extensive Is It? *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2018 Jan 1;77(1):1-7.
- Hattab, S.; Guihot, A.; Guiguet, M.; Fourati, S.; Carcelain, G.; Caby, F.; Marcelin, A-G.; Autran, B.; Costagliola, D.; Katlama, C. Comparative impact of antiretroviral drugs on markers of inflammation and immune activation during the first two years of effective therapy for HIV-1 infection: An observational study. *BMC Infect. Dis.*, 2014, 14, 122.
- Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, Verschuren MC, Borleffs JC, Boucher CA, Coutinho RA, Lange JM, Rinke de Wit TF, Tsegaye A, van Dongen JJ, Hamann D, de Boer RJ, Miedema F. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat.Med*. 2000; 6: 1036-1042.
- Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, Hamann D, Prins M, Miedema F. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS (London, England)*. 2003; 17(13): 1881– 1888.
- Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 2002 Aug;88(2):186-93.

- Hens J, Jennes W, Kestens L. The role of NK cells in HIV-1 protection: autologous, allogeneic or both? *AIDS Research and Therapy*. 2016;13:15.
- Hong S, Banks WA. Role of the Immune System in HIV-associated Neuroinflammation and Neurocognitive Implications. *Brain, behavior, and immunity*. 2015;0:1-12.
- Hottz ED, Bozza FA, Bozza PT. Platelets in Immune Response to Virus and Immunopathology of Viral Infections. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Apr 30;5:121.
- Hsu DC, Ma YF, Hur S, Li D, Rupert A, Scherzer R, Kalapus SC, Deeks S, Sereti I, Hsue PY. Plasma IL-6 levels are independently associated with atherosclerosis and mortality in HIV-infected individuals on suppressive antiretroviral therapy. *AIDS*. 2017 Aug 24;30(13):2065-74.
- Huang Y, Erdmann N, Peng H, Herek S, Davis JS, Luo X, Ikezu T, Zheng J. TRAIL-Mediated Apoptosis in HIV-1-Infected Macrophages Is Dependent on the Inhibition of Akt-1 Phosphorylation. *J Immunol*. 2006 Aug 15; 177(4): 2304–2313.
- Hunt PW, Landay AL, Sinclair E, Martinson JA, Hatano H, Emu B, Norris PJ. A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers. *PLoS. One*. 2011; 6(1): e15924.
- Hunt PW, Sinclair E, Rodriguez B, Shive C, Clagett B, Funderburg N, Robinson J, Huang Y, Epling L, Martin JN, Deeks SG, Meinert CL, Van Natta ML, Jabs DA, Lederman MM. Gut Epithelial Barrier Dysfunction and Innate Immune Activation Predict Mortality in Treated HIV Infection. *J Infect Dis*. 2014; 15;210(8):1228-38.
- Iketleng T, Moyo S, Gaseitsiwe S, Nyombi B, Mitchell RM, MakhHEMA J, et al. Plasma Cytokine Levels in Chronic Asymptomatic HIV-1 Subtype C Infection as an Indicator of Disease Progression in Botswana: A Retrospective Case Control Study. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2016;32(4):364-369.
- Italiano JE, Mairuhu ATA, Flaumenhaft R. Clinical Relevance of Microparticles from Platelets and Megakaryocytes. *Current opinion in hematology*. 2010;17(6):578-584.
- Jandrot-Perrus, Nurden P. From platelet functions to therapy. *La Revue de médecine interne*. 2010; 31S: S319–S323.
- Jennes W, Verheyden S, Demanet C, Adjé–Touré C, Vuylsteke B, Nkengasong JN, et al. Cutting edge: resistance to HIV–1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J Immunol*. 2006; 177:6588–92.
- Kalayjian RC, Machekano RN, Rizk N, Robbins GK, Gandhi RT, Rodriguez BA, Pollard RB, Lederman MM, Landay A. Pretreatment levels of soluble cellular receptors and interleukin-6 are associated with HIV disease progression in subjects treated with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2010;201(12):1796-805.
- Kamath S, Blann AD, Lip GY. Platelet activation: assessment and quantification. *European Heart Journal* 2001 Sep;22(17):1561-71.

- Keating SM, Jacobs ES, Norris PJ. Soluble mediators of inflammation in HIV and their implications for therapeutics and vaccine development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012 Aug-Oct;23(4-5):193-206.
- Khowawisetsut L, Pattanapanyasat K, Onlamoon N, Mayne AE, Little DM, Villinger F, Ansari A. Relationships between IL-17(+) subsets, Tregs and pDCs that distinguish among SIV infected elite controllers, low, medium and high viral load rhesus macaques. *PlosOne.* 2013; 8 (4), e61264.
- Kiebala M, Singh MV, Piepenbrink MS, Qiu X, Kobie JJ, Maggirwar SB. Platelet Activation in Human Immunodeficiency Virus Type-1 Patients Is Not Altered with Cocaine Abuse. *Plos One.* 2015; 1-15.
- Kinter AL, Hennessey M, Bell A, Kern S, Lin Y, Daucher M, et al. CD25+CD4+ regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4+ and CD8+ HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J. Exp. Med.* 2004; 200:331-343.
- Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS host cells interactions. *J End Res.* 2005; 11(4):225-229.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology.* 2009; 27:485–517.
- Krastinova E, Lecuroux C, Leroy C, Seng R, Cabie A, Rami A, Venet A, Meyer L, Goujard C. High Soluble CD14 Levels at Primary HIV-1 Infection Predict More Rapid Disease Progression. *JID* 2015;212 (15 September) 909-913.
- Kuebler WM. Selectins revisited: the emerging role of platelets in inflammatory lung disease. *The Journal of Clinical Investigation.* 2006; 116(12):3106-3108.
- Kumar R. Comparison Between CD4 Count, Haematological Manifestations and Respiratory Tract Infections in HIV Seropositive Individuals. *International Journal of Contemporary Medical Research.* 2016; 3(5).
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Robbins & Cotran: Patologia, bases patológicas das doenças. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- Lahdevirta, J., Maury, C.P.J., Teppo, A.M., Repo, H. Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *The American Journal of Medicine,* 1988; 85 (3), 289–291.
- Landi EP, Maques-Júnior JFC. Flow cytometric characterization of platelet activation in platelet concentrates. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2003;25(1):39-46.
- Leal FE, Premeaux TA, Abdel-Mohsen M, Ndhlovu LC. Role of Natural Killer Cells in HIV-Associated Malignancies. *Frontiers in Immunology.* 2017;8:315.
- Lee MY, Kim YJ, Lee HJ, Cho SY, Park TS. Mean Platelet Volume in Mycobacterium tuberculosis Infection. *BioMed Research International.* 2016;2016:7508763.

- Leite OHM. Alterações hematológicas associadas à infecção pelo HIV, ainda um problema? *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2010;32(1):3-4.
- Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS viurs infections. *Nat Med.* 2003; 9:861.
- Li H. HIV/AIDS related respiratory disease. In: Li H (eds) *Radiology of HIV/AIDS.* Springer, Dordrencht. 2014.
- Li J, Chen X, Huang J, Jiang S, Chen YH. Identification of critical antibodybinding sites in the HIV-1 gp41 six-helix bundle core as potential targets for HIV-1 fusion inhibitors. *Immunobiology.* 2009; 214(1):51-60.
- Li Z, Nardi MA, Karpatkin S. Role of molecular mimicry to HIV-1 peptides in HIV-1–related immunologic thrombocytopenia. *Blood.* 2005;106(2):572-576.
- Li Z, Nardi MA, Wu J, Pan R, Zhang W, Karpatkin S. *J Biol Chem.* Platelet fragmentation requires a specific structural conformation of human monoclonal antibody against beta3 integrin. 2008 Feb 8;283(6):3224-30.
- Lien E, Aukrust P, Sundan A, Iler FM, Froland SS, Espevik T. Elevated Levels of Serum-Soluble CD14 in Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Infection: Correlation to Disease Progression and Clinical Events. *Blood.* 1998; 92: 2084-2092.
- Limsreng S, Marcy O, Ly S, Ouk V, Chanroeur H, Thavary S, Boroath B, Canestri A, Viretto G, Delfraissy JF, Ségéral O. Dyslipidemias and elevated cardiovascular risk on lopinavir-based antiretroviral therapy in Cambodia. *PLoS One,* 2016.
- Lin SM, Wang TY, Liu WT, Chang CC, Lin HC, Liu CY, Wang CH, Huang CD, Lee KY, Kuo HP. Predictive factors for mortality among non-HIV-infected patients with pulmonary tuberculosis and respiratory failure. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009 Mar;13(3):335-40.
- Logan C, Beadsworth MB, Beeching NJ. HIV and diarrhoea: what is new? *Curr Opin Infect Dis.* 2016 Oct;29(5):486-94.
- Lorenc A, Ananthavarathan P, Lorigan J, Jowata M, Brook G, Banarsee R. The prevalence of comorbidities among people living with HIV in Brent: a diverse London Borough. *London J Prim Care (Abingdon).* 2014;6(4):84-90.
- Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet.* 2014; 384(9939), pp.258–271.
- Mabunda TE, Ramalivhana NJ, Dambisya YM. Mortality associated with tuberculosis/HIV co-infection among patients on TB treatment in the Limpopo province, South Africa. *African Health Sciences.* 2014;14(4):849-854.
- Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *JCB Home.* 2013; 201(6): 785.

- Maclay JD, McAllister DA, Johnston S, Raftis J, McGuinnes C, Deans A, Newby DE, Mills NL, MacNee W. Increased platelet activation in patients with stable and acute exacerbation of COPD. *Thorax* 2011;66:769e774.
- Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, Coates PT, Giermasz A, Morel PA, Storkus WJ, Kalinski P. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: twosignal requirement for the induction of NK cell helper function. *J.Immunol.* 2003; 171: 2366-2373.
- Makubi A, Okuma J, Spiegelman D, Hawkins C, Darling AM, Jackson E, Mugusi F, Chalamilla G, Fawzi W. Burden and Determinants of Severe Anemia among HIV-Infected Adults: Results from a Large Urban HIV Program in Tanzania, East Africa. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care.* 2015;14(2):148-155.
- Malerba M, Nardin M, Radaeli A, Montuschi P, Carpagnano G, Clini E. The potential role of endothelial dysfunction and platelet activation in the development of thrombotic risk in COPD patients. *Expert Review of Hematology.* 2017; 10(9).
- Manches O, Frleta D, Bhardwaj N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends in immunology.* 2014;35(3):114-122.
- Manches O, Munn D, Fallahi A, Lifson J, Chaperot L, Plumas J, Bhardwaj N. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J.Clin.Invest.* 2008; 118:3431-3439.
- Marincu I, Popovici E, Frent S, Bertic Ni, Mihaicuta S. The impact of smoking on respiratory infections in HIV-infected patients. *European Respiratory Journal.* 2015; 46.
- Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet.* 2002; 31:429.
- Martin-Gayo E, Yu XG. Dendritic Cell Immune Responses in HIV-1 Controllers. *Current HIV/AIDS reports.* 2017;14(1):1-7.
- Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JJ, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell.* 2007;128(6):1173-86.
- Mavigner M, Cazabat M, Dubois M, L'Faqihi FE, Requena M, Pasquier C, Klopp P, Amar J, Alric L, Barange K, Vinel JP, Marchou B, Massip P, Izopet J, Delobel P. Altered Cd4 T Cell Homing To the Gut Impairs Mucosal Immune Reconstitution in Treated Hiv Infected Individuals. *The Journal of Clinical Investigation,* 2012; 122(1): 62–69.
- Mayne E, Funderburg NT, Sieg SF, Asaad R, Kalinowska M, Rodriguez B, Schmaier AH, Stevens W, Lederman MM. Increased platelet and microparticle activation in HIV infection: upregulation of P-selectin and tissue factor expression. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012; 59(4):340-6.

- McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(1):11-23.
- McNicol A, Gerrard JM. Platelet morphology, aggregation, and secretion. *Adv. In Mol. And Cell Biol*. 1997; 18:1-29.
- Mehla R, Bivalkar-Mehla S, Nagarkatti M, Chauhan A. Programming of neurotoxic cofactor CXCL-10 in HIV-1-associated dementia: abrogation of CXCL-10-induced neuroglial toxicity in vitro by PKC activator. *J Neuroinflammation*. 2012 Oct 18;9:239.
- Metcalf Pate KA, Mankowski JL. HIV and SIV Associated Thrombocytopenia: An Expanding Role for Platelets in the Pathogenesis of HIV. *Drug discovery today Disease mechanisms*. 2011;8(1-2):e25-e32.
- Metcalf Pate KA, Lyons CE, Dorsey JL, Shirk EN, Queen SE, Adams RJ, Gama L, Morrell CN, Mankowski JL. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation contribute to decreased platelet count during acute simian immunodeficiency virus infection in pig-tailed macaques. *J Infect Dis*. 2013 Sep;208(6):874-83.
- Miedema F, Hazenberg MD, Tesselaar K, van Baarle D, de Boer RJ, Borghans JA. Immune activation and collateral damage in AIDS pathogenesis. *Frontiers in Immunology*. 2013; 4(SEP): 1–14.
- Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, Rood JE, Berkley AM, X Sacha JB, Cogliano-Shutta NA, Lloyd M, Roby G, Kwan R, McLaughlin M, Stallings S, Rehm C, O’Shea MA, Mican J, Packard BZ, Komoriya A, Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Coffin JM, Mellors JW, X Hallahan CW, Follman DA, Connors M. Lytic Granule Loading of CD8+ T Cells Is Required for HIV Infected Cell Elimination Associated with Immune Control. *Immunity*. 2008; 29(6): 1009–1021.
- Miguez MJ, Rodríguez A, Hadrigan S, Asthana D, Burbano X, Fletcher MA. Interleukin-6 and platelet protagonists in T lymphocyte and virological response. *Platelets*. 2005 Aug;16(5):281-6.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico – AIDS e DST. Brasília: DF; 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico – AIDS e DST. Brasília: DF; 2015.
- Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*. 2010; 7:54.
- Möller M, Hoal EG. Current findings, challenges and novel approaches in human genetic susceptibility to tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2010;90(2):71-83.
- Morlat P, Roussillon C, Henard S, Salmon D, Bonnet F, Cacoub P, Georget A, Aouba A, Rosenthal E, May T, Chauveau M, Diallo B, Costagliola D, Chene G. Causes of death

among HIV-infected patients in France in 2010 (national survey): trends since 2000. *Aids*. 2014; 28(8), pp.1181–1191.

- Munoz A, Carey V, Saah AJ, Phair JP, Kingsley LA, Fahey JL, Ginzburg HM, Polk BF. Predictors of decline in CD4 lymphocytes in a cohort of homosexual men infected with human immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1988; 1(4):396–404.
- Muñoz-Esquerre M, Ferreiro JL, Huertas D, Marcano AL, López-Sánchez M, Roura G, Gómez-Hospital JÁ, Dorca J, Cequier A, Santos S. Impact of acute exacerbations on platelet reactivity in chronic obstructive pulmonary disease patients. *International Journal of COPD*. 2018:13.
- Murphy K. *Imunobiologia de Janeway*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- Muswe R, Oktedalen O, Zhou DT, Zinyando E, Shwarira-Bote S, Stray-Pedersen B, Siziba A, Gomo ZAR. Inflammatory Markers and Plasma Lipids in HIV Patients: A Correlation Analysis Study. *Open Biochem J*. 2017; Dec 28;11:105-118.
- Nagata S, Imai J, Makino G, Tomita M, Kanai A. Evolutionary Analysis of HIV-1 Pol Proteins Reveals Representative Residues for Viral Subtype Differentiation. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2151.
- Naif HM. Pathogenesis HIV infection. *Infectious Disease Reports*. 2013; 5:s1e6.
- Nakajima K, Martínez-Maza O, Hirano T, Breen EC, Nishanian PG, Salazar-Gonzalez JF, Fahey JL, Kishimoto T. Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor-2/IFN-beta 2) production by HIV. *J Immunol*. 1989;142(2):531-6.
- Nascimento FG, Tanaka PY. Thrombocytopenia in HIV-Infected Patients. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2012; 28(2):109–111.
- Nasser M, Dailey FE, Al Juboori A, Samiullah S, Tahan V. Epidemiology, determinants, and management of AIDS cholangiopathy: A review. *World J Gastroenterol*. 2018 Feb 21; 24(7): 767–774.
- Neri F, Giolo G, Potesta M, Petrini S, Doria M. CD4 downregulation by the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is dispensable for optimal output and functionality of viral particles in primary T cells. *J Gen Virol*. 2011; 92:141-150.
- Neuhaus J, Jacobs DR, Jr, Baker JV. Os marcadores de inflamação, coagulação, e função renal são elevados em indivíduos com infecção pelo HIV . *J Infect Dis* 2010; 201 : 1788-1795.
- Nixon DE, Landay AL Biomarkers of immune dysfunction in HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010 Nov;5(6):498-503.
- Nixon DF, Aandahl EM, Michaelsson J. CD4+CD25+ regulatory T cells in HIV infection. *Microbes and Infection*. 2005; 7: 1063-1065.

- Nkambule BB, Davison GM, Ipp H. The evaluation of platelet function in HIV infected, asymptomatic treatment naïve individuals using flow cytometry. *Thrombosis Research*. 2015a; 135(6): 1131-1139.
- Nkambule BB, Davison GM, Ipp H. The evaluation of platelet indices and markers of inflammation, coagulation and disease progression in treatment-naïve, asymptomatic HIV-infected individuals. *Int J Lab Hematol*. 2015b Aug;37(4):450-8.
- Nogui FLN, Mattas S, Júnior GT, Lewi DS. Neurotoxoplasmosis diagnosis for HIV-1 patients by real-time PCR of cerebrospinal fluid. *Braz J Infect Dis*. 2009; 13(1).
- O’Sullivan BP, Linden MD, Frelinger AL, Barnard MR, Spencer-Manzon M, Morri JE, Salem RO, Laposata M, Michelson AD. Platelet activation in cystic fibrosis. *Blood*. 2005; 105:4635–4641.
- Oliveira AJ, Osti NM, Parise Filho R, Chorilli M. Novas abordagens no desenvolvimento de fármacos antirretrovirais. *Rev de La Organización de Farmacéuticos Ibero-Latino americanos*. 2009; 19(1): 42-56.
- Oliveira I, Girão MJBC, Sampaio UM, Oliva MLV, Andrade SS. Platelets: Traditional and notraditional roles in hemostasis, inflammation and câncer. *ABCS Health Sci*. 2013; 38(3):153-161.
- Oliveira RDSM, Benzaken AS, Saraceni V, Saradó M. HIV/AIDS epidemic in the state of Amazonas: Characteristics and trends from 2001 to 2012. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015; 48: 70–78.
- Osunkalu VO, Adewumi A, Onwuzuluigbo C, Olowoselu OF. Interleukin-8 A Marker of Disease Progression and Therapeutic Response in HIV Infection. *AJOL*. 2015; 15(1-3).
- Paiardini M, Müller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol Rev*. 2013 Jul;254(1):78-101.
- Pananghat AN, Aggarwal H, Prakash SS, Makhdoomi MA, Singh R, Lodha R, Ali S, Srinivas M, Das BK, Pandey RM, Kabra SK, Luthra K. IL-8 Alterations in HIV-1 Infected Children With Disease Progression. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(21):e3734.
- Pandrea I, Landay A, Wilson C, Stock J, Tracy R, Apetrei C. Using the pathogenic and nonpathogenic nonhuman primate model for studying non-AIDS comorbidities. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2015 Mar;12(1):54-67.
- Pantophlet R, Burton DR. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:739-69.
- Pate KAM, Mankowski JL. HIV and SIV Associated Thrombocytopenia: An Expanding Role for Platelets in the Pathogenesis of HIV. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2011; 8(1-2): e25–e32.

- Patel NR, Zhu J, Tachado SD, Zhang J, Wan Z, Saukkonen J, Koziel H. HIV impairs TNF- α mediated macrophage apoptotic response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2007; 15;179(10):6973-80.
- Pawlowski A, Jansson M, Sköld M, Rottenberg ME, Källenius G. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathog*. 2012; 8(2):e1002464.
- Peçanha EP, Antunes OAC, Tanuri A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Química Nova*. 2002; 25(6b): 1108-16.
- Peters EJ, Essien OE, Immananagha KK, Inah GA, Phillip-Ephraim EE, Agbulu RE. CD4 count levels and pattern of respiratory complications in hiv seropositive patients in Calabar, Nigeria. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*. 2007; 22 (1-2): 93-97.
- Piatak M Jr, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*. 1993; 259(5102): 1749–54.
- Pitchford SC, Yano H, Lever R, Riffo-Vasquez Y, Ciferri S, Rose MJ, Giannini S, Momi S, Spina D, O'connor B, Gresele P, Page CP. Platelets are essential for leukocyte recruitment in allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2003; 112:109–118.
- Podlekareva DN, Pantelev AM, Grint D, Post FA, Miro JM, Bruyand M, Furrer H, Obel N, et al. Short- and long-term mortality and causes of death in HIV/tuberculosis patients in Europe. *European Respiratory Journal* 2014 43: 166-177.
- Portales P, Reynes J, Pinet V, Rouzier-Panis R, Baillat V, Clot J, Corbeau P. Interferon- α restores HIV-induced alteration of natural killer cell perforin expression in vivo. *AIDS*. 2003; 17: 495-504.
- Pupulin ART, Carvalho PG, Nishi L, Nakamura CV, Guilherme ALF. Enteropatógenos relacionados à diarreia em pacientes HIV que fazem o uso de terapia anti-retroviral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009; 42(5): 551-555.
- Quiros-Roldan E, Castelli F, Lanza P, Pezzoli C, Vezzoli M, Basiotto G, Zanella I. The impact of antiretroviral therapy on iron homeostasis and inflammation markers in HIV-infected patients with mild anemia. *Journal of Translational Medicine*. 2017;15:256.
- Raj DS. Role of interleukin-6 in the anemia of chronic disease. *Semin Arthritis Rheum* 2009; 38:382–8.
- Rajapuru G. Genes and genome of HIV-1. *Phylogenetics & Evolutionary Biology*. 2014; 2(1): 2329-9002.
- Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Prensri N. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med*. 2009; 361(23): 2209-2220.

- Rieg G, Yeaman M, Lail AE, Donfield SM, Gomperts ED, Daar ES. Platelet count is associated with plasma HIV type 1 RNA and disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Oct;23(10):1257-61.
- Rodger AJ, Lodwick R, Schechter M, Deeks S, Amin J, Gilson R, et al. Mortality in well controlled HIV in the continuous antiretroviral therapy arms of the SMART and ESPRIT trials compared with the general population. *AIDS*. 2013 Mar 27; 27(6):973–979.
- Roff SR, Noo-Song E, Yamamoto JK. The Significance of Interferon- γ in HIV-1 Pathogenesis, Therapy, and Prophylaxis. *Front Immunol*. 2013; 4: 498.
- Rose-John S. Il-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences*. 2012; 8 (9), 1237–1247.
- Sabatte J, Ceballos A, Raiden S, Vermeulen M, Nahmod K, Maggini J, Salamone G, Salomon H, Amigorena S, Geffner J. Human seminal plasma abrogates the capture and transmission of human immunodeficiency virus type 1 to CD4+ T cells mediated by DC-SIGN. *J.Virol*. 2007; 81:13723-13734.
- Sackoff J, Hanna DB, Pfeiffer MR, Torian LV. Causes of death among persons with AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy: New York City. *Annals of Internal Medicine*. 2006; 145(6), p.397–406.
- Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, Hill BJ, Noto A, Ancuta P, Peretz Y, Fonseca SG, Van Grevenynghe J, Boulassel MR, Bruneau J, Shoukry NH, Routy JP, Douek DC, Haddad EK, Sekaly RP. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med*. 2010 Apr;16(4):452-9.
- Salter ML, Lau B, Mehta SH, Go VF, Leng S, Kirk GD. Correlates of elevated interleukin-6 and C-reactive protein in persons with or at high-risk for HCV and HIV infections. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* . 2013;64(5):10.
- Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, Pedersen C, Ruxrungtham K, Lewin SR, Emery S, Neaton JD, Brenchley JM, Deeks SG, Sereti I, Douek DC. Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection. *JID* 2011:203 (15 March) 780-790.
- Saraceni V, Cohn S, Cavalcante SC, Pacheco AG, Moulton LH, Chaisson RE, Durovni B, Golub JE. Prevalent tuberculosis at HIV diagnosis in Rio de Janeiro, Brazil: the TB/HIV in Rio (THRio) Cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014; 1;67(1):98-101.
- Sarkar P, Rasheed HF. Clinical review: Respiratory failure in HIV-infected patients - a changing picture. *Critical Care*. 2013;17(3):228.
- Sarkar P, Rasheed HF. Clinical review: Respiratory failure in HIV-infected patients--a changing picture. *Crit Care*. 2013 Jun 14;17(3):228.

- Satchell CS, Cotter AG, O'Connor EF, Paz AJ, Tedesco AF, Clare A, JS Lambert, Sheehan GJ, Kenny D, Mallon PW. Platelet function and HIV: a case-control study. *AIDS*. 2010 Mar 13;24(5):649-57.
- Scully E, Alter G. NK Cells in HIV Disease. *Current HIV/AIDS Reports*. 2016;13:85-94.
- Semple JW, Italiano JE Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(4):264-74.
- Shah A, Verma AS, Patel KH, Noel R, Rivera-Amill V, Silverstein PS, Chaudhary S, Bhat HK, Stamatatos L, Singh DP, Buch S, Kumar A. HIV-1 gp120 induces expression of IL-6 through a nuclear factor-kappa B-dependent mechanism: suppression by gp120 specific small interfering RNA. *PLoS One*. 2011; 6(6):e21261.
- Shah H, Bhatt P, Vaghani B, Patel K. HIV-AIDS patients with respiratory manifestation: study at tertiary care center. *Int J Adv Med*. 2017 Feb;4(1):270-274.
- Shebl FM, Yu K, Landgren O, Goedert JJ, Rabkin CS. Increased Levels of Circulating Cytokines with HIV-Related Immunosuppression. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2012;28(8):809-815.
- Shiga Y, Kubota G, Orita S, Kazuhide Inage, Hiroto Kamoda, Masaomi Yamashita, Toru Iseki, Michihiro Ito, Kazuyo Yamauchi et al. Freeze-Dried Human Platelet-Rich Plasma Retains Activation and Growth Factor Expression after an Eight-Week Preservation Period. *Asian Spine Journal*. 2017;11(3):329-336.
- Shivakoti R, Yang WT, Gupte N, Berendes S, Rosa AL, Cardoso SW, Mwelase N, Kanyama C, et al. Concurrent Anemia and Elevated C-Reactive Protein Predicts HIV Clinical Treatment Failure, Including Tuberculosis, After Antiretroviral Therapy Initiation. *Clin Infect Dis*. 2015 Jul 1;61(1):102-10.
- Shive CL, Biancotto A, NT Funderburg, HA Pilch-Cooper, Valdez H, Margolis L, SF Sieg, McComsey GA, Rodriguez B, MM Lederman. O HIV-1 não é um dos principais impulsionadores do aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 na doença crônica pelo HIV-1. *J Acquir Imune Defic Syndr*. 2012; 61(2): 145-52.
- Shive CL, Jiang W, Anthony DD, Lederman MM. Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS*. 2015 June 19; 29(10): 1263–1265.
- Sieg SF, Bazdar DA, Harding CV, Lederman MM. Differential expression of interleukin-2 and gamma interferon in human immunodeficiency virus disease. *J. Virol*. 2001; 75:9983-5.
- Souza SLS, Feitoza PVS, Araújo JR, Andrade RV, Ferreira LCL. Causes of death among patients with acquired immunodeficiency syndrome autopsied at the Tropical Medicine Foundation of Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008; 1(3):247-251.
- Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, Lebedeva M, DeCamp A, Li D, Grove D, et al. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak

viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol.* 2009; 83:3719–3733.

- Staprans SI, Feinberg MB. The roles of nonhuman primates in the preclinical evaluation of candidate AIDS vaccines. *Expert. Rev. Vaccines.* 2004; 3(4) Suppl:S5-32.
- Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med.* 2003; 74: 736.
- Stoff DM, Goodkin K, Jeste D, Marquine M. Redefining Aging in HIV Infection Using Phenotypes. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2017; 14:184–199.
- Streeck H, Nixon DF. T cell immunity in acute HIV-1 infection. *J.Infect.Dis.* 2010; 202 Suppl 2:S302-S308.
- Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(7).
- Szalai G, Larue AC, Watson DK. Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2006; 63:2460-2476.
- Tanaka T, Kishimoto T. The Biology and Medical Implications of Interleukin-6. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2(4): 288-294.
- Teixeira C, Gomes JRB, Gomes P, Maurel F. Viral surface glycoprotein, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: Brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first anti-retroviral drug. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2011; 46: 979-992.
- Tenorio AR, Zheng Y, Bosch RJ. Soluble markers of inflammation and coagulation but not Tcell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment. *J Infect Dis.* 2014.
- Terra Junior ON, Maldonado G de C, Alfradique GR, et al. Study of Natural Cytotoxicity Receptors in Patients with HIV/AIDS and Cancer: A Cross-Sectional Study. *The Scientific World Journal.* 2016; 2085871.
- The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Causes of Death in HIV-1- Infected Patients Treated with Antiretroviral Therapy, 1996-2006: Collaborative Analysis of 13 HIV Cohort Studies. 2011; 50(February 2009), pp.1387–1396.
- Thompson CG, Gay CL, Kashuba ADM. HIV Persistence in Gut Associated Lymphoid Tissues: Pharmacological Challenges and Opportunities. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2017; 33(6).
- Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol.* 2012; 210: 3-22.
- Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, Decamp AC. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-

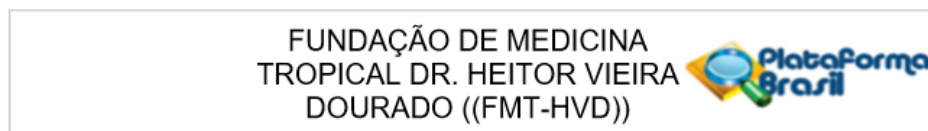
binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J. Virol.* 2008; 82 (24):12449-12463.

- Toshniwal SP, Mathapati SM, Kabara MV. Respiratory Complications in Human Immunodeficiency Virus Seropositive Patients in Correlation to CD4 Count: An Observational Cross-Sectional Study. *International Journal of Scientific Study.* 2014; 2(6).
- Tozkoparan E, Deniz O, Ucar E, Bilgic H, Ekiz K. Changes in platelet count and indices in pulmonary tuberculosis. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(8):1009-13.
- Tsegaye TS, Gnirb K, Rache-Meyer N, Kiene M, Kramer-Kuhl A, Behrens G, Munch J, Pohlmann S. Platelet activation suppress HIV-1 infection of T cells. *Retrovirology.* 2013; 10:48.
- Turville SG, Cameron PU, Arthos J, MacDonald K, Clark G, Hart D, Cunningham AL. Bitter-sweet symphony: defining the role of dendritic cell gp120 receptors in HIV infection. *J.Clin.Virol.* 2001; 22:229-239.
- Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pöhlmann S, Doms RW, Cunningham AL. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol.* 2002; 3(10): 975-983.
- Uldrick TS, Pipkin S, Scheer S, Hessel NA. Factors associated with survival among patients with AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *AIDS (London, England).* 2014;28(3):397-405.
- UNAIDS. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Global AIDS update. 2018.
- Utay NS, Douek DC. Interferons and HIV Infection: The Good, the Bad, and the Ugly. *Pathog Immun.* 2016; 1(1): 107–116.
- Uysal HK, Sohrabi P, Habip Z, Saribas S, Kocazeybeck E, Seyhan F, Caliskan R, Bonabi E, Yuksel P, Birinci I, Uysal O, Kocazeybek B. Neopterin and Soluble CD14 Levels as Indicators of Immune Activation in Cases with Indeterminate Pattern and True Positive HIV-1 Infection. *PLoS One.* 2016; 11(3): e0152258.
- Vaidya SA, Korner C, Sirignano MN, Amero M, Bazner S, Rychert J, Allem TM et al. Tumor Necrosis Factor α Is Associated With Viral Control and Early Disease Progression in Patients With HIV Type 1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases.* 2014;210(7):1042-1046.
- Van Marle G, Sharkey KA, Gill MJ, Church DL. Gastrointestinal Viral Load and Enteroendocrine Cell Number Are Associated with Altered Survival in HIV-1 Infected Individuals. Sandberg JK, ed. *PLoS ONE.* 2013;8(10):e75967.
- Vassallo M, Mercié P, Cottalorda J, Ticchioni M, Dellamonica P. The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review. *Virology Journal.* 2012; 9:174.

- Vera JH, Guo Q, Cole JH, Boasso A, Greathead L, Kelleher P, Rabiner EA, Kalk N, Bishop C, Gunn RN, Matthews PM, Winston A. Neuroinflammation in treated HIV-positive individuals: A TSPO PET study. *Neurology*. 2016;86(15):1425-1432.
- Vieillard V, Strominger JL, Debre P. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an Nkp44 ligand. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2005; 102: 10981-10986.
- Wada NI, Bream JH, Martínez-Maza O, Macatangay B, Galvin SR, Margolick JB, Jacobson LP. Inflammatory Biomarkers and Mortality Risk Among HIV-Suppressed Men: A Multisite Prospective Cohort Study. *Clin Infect Dis*. 2016 Oct 1;63(7):984-990.
- Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, Casey DC, Charlson FJ, Chen AZ, Coates MM, Coggeshall M, Dandona L, Dicker DJ, Erskine HE, Ferrari AJ, Fitzmaurice C, Foreman K, Forouzanfar MH, Fraser MS, Fullman N, et al.. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016; 388: 1459-1544.
- Wang J, Zhang W, Nardi MA, Li Z. HIV-1 Tat induced-platelet activation and release of CD154 contribute to HIV-1 associated autoimmune thrombocytopenia. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011; 9(3):562-573.
- Weiss L, Donkova-Petrini V, Caccavelli L, Balbo M, Carbonneil C, Levy Y. human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells which suppress HIV-specific CD4 T cell responses in HIV-infected patients. *Blood*. 2004; 104:3249-3256.
- Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in Inflammation. *J Thromb Haemost*. 2003;1(9):1897-905.
- WHO. World Health Organization. HIV/AIDS. Global statistics. 2018.
- Williamson JR. Really exasperating viral protein from HIV. *eLife*. 2015;4:e05169.
- Xavier GA, Cademartori BG, Filho NAC, Farias NAR. Evaluation of seroepidemiological toxoplasmosis in HIV/AIDS patients in the south of Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 2013; 55(1).
- Yeaman MR, Bayer AS. Antimicrobial host defense. In: *Platelets (Third Edition)*. 2013: 767-801.
- Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer EM. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood*. 2002;99(11):4021-9.
- Zapata JC, Cox D, Salvato MS. The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jun 12;8(6):e2858.
- Zarbock A, Singbartl K, Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J. Clin. Invest*. 2006; 116:3211–3219.

13. ANEXOS

Anexo 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Etiologia da diarreia e avaliação da inflamação sistêmica em pacientes HIV e HIV-AIDS na Amazônia ocidental.

Pesquisador: Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57330116.6.0000.0005

Instituição Proponente: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

Patrocinador Principal: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.753.402

SMJ

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_700157.pdf	27/08/2016 17:05:03		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCompleto.docx	27/08/2016 17:04:38	Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodef.doc	27/08/2016 16:55:44	Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira	Aceito
Folha de Rosto	Plataforma.pdf	07/06/2016 11:36:59	Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaFMT.pdf	05/06/2016 11:51:04	Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira	Aceito
Outros	anuenciaFMT2.pdf	05/06/2016	Patricia Puccinelli	Aceito

Outros	anuenciaFMT2.pdf	11:50:38	Orlandi Nogueira	Aceito
Declaração do Patrocinador	anuenciaFiocruz.pdf	05/06/2016 11:49:44	Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 22 de Setembro de 2016

Assinado por:
Maria das Graças Gomes Saraiva
(Coordenador)

Anexo 2



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) (Paciente Participante)



Convidamos o(a) Sr(a) para participar da pesquisa *“Diarreia em pacientes HIV e HIV-AIDS na Amazônia ocidental: Avaliação da etiologia dos enteropatógenos e dos mediadores inflamatórios associados a inflamação sistêmica”*, sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi.

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A pesquisa se justifica pela epidemia HIV-AIDS no Amazonas, Junto com a presença de diarreia vista em muitos pacientes que são HIV, muitas vezes com origem em infecções sem diagnóstico, e a falta de saneamento básico na região, que pode aumentar a quantidade de vírus, bactérias e parasitas transmitidos por contaminação fecal-oral. Essa pesquisa pretende identificar nos pacientes HIV e HIV-AIDS de Manaus, se existe a presença desses micro-organismos que causam a diarreia; relacionando as informações de saneamento e moradia e o estado clínico destes pacientes, para identificar as possíveis causas dessas infecções e micro-organismos mais comuns. Esta abordagem epidemiológica é de suma importância, visto que não há nenhum trabalho anterior que tenha investigado a prevalência a origem e diversidade de vírus e bactérias causadores de diarreia em pacientes HIV e HIV-AIDS nesta região, que apresentam características únicas. Vale ressaltar que essa proposta não somente identificará os possíveis causadores de diarreia presentes nesses pacientes, como possibilitará o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico ao SUS que sejam eficientes para identificar esses micro-organismos que circulam na região; além de permitir a elaboração de medidas de controle e prevenção, o que deverá contribuir para a redução do agravamento da doença e dos custos ao SUS provocados por essas infecções.

Um outro ponto alto da proposta é a caracterização do perfil de resistência aos antibióticos das bactérias circulantes nestes pacientes, permitindo o auxílio na conduta de tratamento a ser administrada, reduzindo a o adoecimento por diarreia nos pacientes HIV.

OBJETIVOS DA PESQUISA

Investigar os micro-organismos causadores de diarreia em pacientes com HIV e HIV-AIDS e determinar associações com a situação da imunidade e da progressão da doença.

PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NA PESQUISA

Para participar, você deve responder, ou auxiliar o paciente participante a responder uma entrevista e a fornecer amostras biológicas (sangue e fezes). Durante a entrevista o Sr.(a) será questionado sobre os dados pessoais do paciente (nome completo, data de nascimento, endereço, contato de telefone, grau de instrução, renda familiar, quantas pessoas residem com o paciente e informações clínicas (vistas no prontuário), qual foi o motivo da internação, se há presença de sintomas, se o paciente está usando algum medicamento) e outras informações que forem importantes para a pesquisa. Caso o Sr.(a) não saiba de alguma dessas informações, os seus familiares ou o prontuário do paciente será consultado.

As amostras serão coletadas quando o médico responsável solicitar exames que envolvam as amostras relacionadas. A coleta desses materiais sempre será realizada por profissionais do Hospital de Medicina Tropical, devidamente treinados e capacitados.

Para que a amostra seja suficiente para a realização do exame e do projeto de pesquisa será necessário colher um volume maior de amostra. Mas só será colhido um volume maior de amostra se o médico e o responsável da coleta julgar que seja necessário e que não irá trazer nenhum dano ou desconforto a mais para o Sr.(a). Mas senão for necessário, o laboratório do hospital fornecerá uma pequena parte para a pesquisa e dessa forma a realização do exame que o médico solicitou não será prejudicada.

No caso do paciente não autônomo se tratar de uma criança, um médico pediatra estará à frente da solicitação dos exames e coleta de amostras, além do atendimento e auxílio no esclarecimento de quaisquer dúvidas que possam surgir durante a realização desta pesquisa.

Coleta de Sangue: A coleta de sangue poderá ser realizada de maneiras distintas, o que irá depender do uso de cateter venoso:

- Caso o Sr/a. não utilize cateter será colhido 1(uma) amostra de sangue, a partir de punção venosa, utilizando agulha e seringa ou escalpe descartáveis.

- Caso o Sr/a use cateter venoso, será colhida 1(uma) amostra de sangue, através do cateter.

De preferência será colhido 10 mL de sangue, que será fracionado igualmente entre o laboratório do hospital e o projeto de pesquisa. Se não for possível obter esse volume, deverá ser colhido no mínimo de 4 a 5 mL, que então será encaminhado ao laboratório do hospital, que então fornecerá uma alíquota suficiente para a pesquisa.

Coleta de Fezes: O coletor vai ser fornecido pelo hospital ou pela equipe de pesquisa. Na amostra não pode conter urina ou água. Esta amostra deve ser entregue em no máximo 3 horas, senão acondicionar na geladeira por no máximo 24 horas.

ARMAZENAMENTO E DISPOSIÇÃO FINAL DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As suas amostras biológicas serão armazenadas durante o período de realização deste projeto. Podendo ser necessário o armazenamento das mesmas por um período mais longo, para a pesquisa de novos enteropatógenos.

ARMAZENAMENTO DE DADOS PESSOAIS, INFORMAÇÕES CLÍNICAS E DE CEPAS BACTERIANAS

Como esse projeto de pesquisa pretende relatar as infecções por vírus, bactérias, fungos e por parasitas intestinais, pretendemos identificar todas estas e guarda-los sob refrigeração em freezers a -80°C. Sendo assim, o Sr.(a) está de acordo com o armazenamento dos dados pessoais do paciente, das suas informações clínicas, do seu sangue e fezes e dos microorganismos encontrados para estudos e divulgações posteriores?

SIM NAO

Caso o Sr.(a) esteja de acordo, declaramos que quando formos realizar esses estudos, o projeto será novamente submetido para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). E ainda, garantimos que o Sr.(a) como responsável legal do paciente participante, será informado(a) sobre todo andamento desses outros estudos, onde a qualquer momento o(a) Sr.(a) poderá desistir ou recusar-se a prosseguir com sua participação nessas pesquisas. E ainda garantimos que todos os seus dados e do paciente sempre serão mantidos em em segurança e sigilo.

BENEFICIOS DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO DA PESQUISA

O paciente participante será beneficiado pelo retorno dos resultados das análises da pesquisa, pois será indicado a equipe médica o melhor remédio a ser utilizado, resultando em um tratamento médico mais adequado. Além disso, o Sr.(a) estará contribuindo para geração de conhecimento para entender, prevenir ou aliviar as infecções correlacionadas, assim como possibilitará a adoção de novas medidas de controle das infecções e possivelmente até mesmo gerar novas condutas terapêuticas.

DESCONFORTOS E RISCOS DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO DA PESQUISA

Os riscos decorrentes da participação nesta pesquisa são basicamente o desconforto durante a coleta, onde algumas vezes, durante ou após colher o sangue do braço, ele pode doer um pouco na região da picada da agulha e pode ficar com uma mancha roxa no local (hematoma), ou pode ocorrer punção acidental de uma artéria ou infecção. As condições da coleta de fezes podem gerar desconforto e até mesmo um certo constrangimento.

MEDIDAS DE SEGURANÇA PARA EVITAR DANOS

Os riscos que envolvem dor, formação de hematomas, punção em local errado poderão ser reduzidos ou evitados pela execução correta dos procedimentos de coleta, que sempre será realizada por profissional capacitado, que fará todos os procedimentos com muita cautela e seguindo-se corretamente todas as etapas.

Os riscos relacionados a aquisição de infecção no momento da coleta serão evitados pela correta assepsia do local, que será realizado utilizando-se etanol ou isopropanol a 70%, clorexidina ou solução de iodo, além da utilização de material descartável.

As situações constrangedoras serão minimizadas através de orientações para tranquilizar o paciente. As amostras serão coletadas, preferencialmente em locais isolados e com privacidade, caso não seja possível serão utilizados recursos como uso de vestimentas (bata) para não expor o paciente durante a coleta.

PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

O Sr.(a) tem autonomia de recusar-se a participar do projeto de pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma, sendo garantido que não haverá nenhum tipo de prejuízo, seja pessoal ou em relação a atendimento na unidade de saúde.

SIGILO E PRIVACIDADE DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo durante e depois de todas as fases da pesquisa.

DESPESAS E REMUNERAÇÃO DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

O(a) Sr(a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração.

ASSISTÊNCIA E INDENIZAÇÃO

É garantido ao (à) Sr.(a) direito de assistência integral e gratuita devido a danos diretos ou indiretos e imediatos ou tardios decorrentes da participação no estudo, pelo tempo que for necessário. Também é garantindo indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Caso ocorra algum tipo de prejuízo a saúde do paciente ao qual o Sr. (Sra) é responsável, seja físico ou psicológico durante a coleta das amostras, ou dos outros procedimentos da pesquisa. O (a) Sr. (Sra.), será ressarcido ou compensado da forma que for mais conveniente, seja através de compensação material, financeira ou de transporte e alimentação, tanto para quem participa da pesquisa, como para seus acompanhantes ou responsáveis legais.

ACOMPANHAMENTO APÓS ENCERRAMENTO DA PESQUISA

Após o encerramento da pesquisa, o Sr.(a) receberá informações quanto as descobertas realizadas através do projeto de pesquisa, assim como os benefícios gerados a partir da sua participação. A qualquer momento o Sr.(a) também poderá entrar em contato para informações relativas ao projeto de pesquisa.

Como esse projeto de pesquisa pretende relatar as infecções por vírus, bactérias, fungos e por parasitas intestinais, pretendemos identificar todas estas e guarda-los sob refrigeração em freezers a -80°C. Sendo assim, o Sr.(a) está de acordo com o armazenamento dos dados pessoais do paciente, das suas informações clínicas, do seu sangue e fezes e dos microrganismos encontrados para estudos e divulgações posteriores?

SIM

NAO

Caso o Sr.(a) esteja de acordo, declaramos que quando formos realizar esses estudos, o projeto será novamente submetido para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). E ainda, garantimos que o Sr.(a) como responsável legal do paciente participante, será informado(a) sobre todo andamento desses outros estudos, onde a qualquer momento o(a) Sr.(a) poderá desistir ou recusar-se a prosseguir com sua participação nessas pesquisas. E ainda garantimos que todos os seus dados e do paciente sempre serão mantidos em em segurança e sigilo.

BENEFICIOS DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO DA PESQUISA

O paciente participante será beneficiado pelo retorno dos resultados das análises da pesquisa, pois será indicado a equipe médica o melhor remédio a ser utilizado, resultando em um tratamento médico mais adequado. Além disso, o Sr.(a) estará contribuindo para geração de conhecimento para entender, prevenir ou aliviar as infecções correlacionadas, assim como possibilitará a adoção de novas medidas de controle das infecções e possivelmente até mesmo gerar novas condutas terapêuticas.

DESCONFORTOS E RISCOS DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO DA PESQUISA

Os riscos decorrentes da participação nesta pesquisa são basicamente o desconforto durante a coleta, onde algumas vezes, durante ou após colher o sangue do braço, ele pode doer um pouco na região da picada da agulha e pode ficar com uma mancha roxa no local (hematoma), ou pode ocorrer punção acidental de uma artéria ou infecção. As condições da coleta de fezes podem gerar desconforto e até mesmo um certo constrangimento.

MEDIDAS DE SEGURANÇA PARA EVITAR DANOS

Os riscos que envolvem dor, formação de hematomas, punção em local errado poderão ser reduzidos ou evitados pela execução correta dos procedimentos de coleta, que sempre será realizada por profissional capacitado, que fará todos os procedimentos com muita cautela e seguindo-se corretamente todas as etapas.

Os riscos relacionados a aquisição de infecção no momento da coleta serão evitados pela correta assepsia do local, que será realizado utilizando-se etanol ou isopropanol a 70%, clorexidina ou solução de iodo, além da utilização de material descartável.

As situações constrangedoras serão minimizadas através de orientações para tranquilizar o paciente. As amostras serão coletadas, preferencialmente em locais isolados e com privacidade, caso não seja possível serão utilizados recursos como uso de vestimentas (bata) para não expor o paciente durante a coleta.

PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

O Sr.(a) tem autonomia de recusar-se a participar do projeto de pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma, sendo garantido que não haverá nenhum tipo de prejuízo, seja pessoal ou em relação a atendimento na unidade de saúde.

SIGILO E PRIVACIDADE DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo durante e depois de todas as fases da pesquisa.

DESPESAS E REMUNERAÇÃO DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

O(a) Sr(a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração.

ASSISTÊNCIA E INDENIZAÇÃO

É garantido ao (à) Sr.(a) direito de assistência integral e gratuita devido a danos diretos ou indiretos e imediatos ou tardios decorrentes da participação no estudo, pelo tempo que for necessário. Também é garantindo indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Caso ocorra algum tipo de prejuízo a saúde do paciente ao qual o Sr. (Sra) é responsável, seja físico ou psicológico durante a coleta das amostras, ou dos outros procedimentos da pesquisa. O (a) Sr. (Sra.), será ressarcido ou compensado da forma que for mais conveniente, seja através de compensação material, financeira ou de transporte e alimentação, tanto para quem participa da pesquisa, como para seus acompanhantes ou responsáveis legais.

ACOMPANHAMENTO APÓS ENCERRAMENTO DA PESQUISA

Após o encerramento da pesquisa, o Sr.(a) receberá informações quanto as descobertas realizadas através do projeto de pesquisa, assim como os benefícios gerados a partir da sua participação. A qualquer momento o Sr.(a) também poderá entrar em contato para informações relativas ao projeto de pesquisa.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Para qualquer outra informação o(a) Sr(a) poderá entrar em contato com a pesquisadora ou com o CEP/UFAM:

<p>PESQUISADORA RESPONSÁVEL Nome: Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Telefone: (92) 992256037 ou 3621-2334 E-mail: patricia_orlandi@amazonia.fiocruz.br Endereço: Rua Teresina, 476, Adrianópolis Manaus/AM - CEP: 69.057-070 Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz/Amazônia)</p> <p>MÉDICA PEDIATRA Nome: Dra. Fernanda Matias da Silva – CRM/AM 4852 Telefone: (92) 991162966 E-mail: depog@fmt.am.gov.br / depecen@fmt.am.gov.br Endereço: Av. Pedro Teixeira, nº 25 – Dom Pedro Manaus – AM – CEP 69.040-000 Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV)</p>	<p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – FMT Telefone: (92) 2127-3555</p> <p>E-mail: cep@fmt.am.gov.br Endereço: Av. Pedro Teixeira, nº 25 – Dom Pedro Manaus – AM – CEP 69.040-000 Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV)</p>
---	---

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Toda pesquisa que envolve seres humanos é previamente submetida à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), que é um colegiado criado para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde).

O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. As atribuições do CEP são de papel consultivo e educativo, visando contribuir para qualidade das pesquisas, bem como a valorização do pesquisador, que recebe o reconhecimento de que sua proposta é eticamente adequada.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha autorização, para que o paciente _____ participe desta pesquisa, e entendi a explicação.

Por isso, eu concordo em participar do projeto, de forma autônoma, consciente, livre e esclarecida, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser, em qualquer fase da pesquisa, que não haverá nenhum tipo de prejuízo, seja pessoal ou em relação ao atendimento na unidade de saúde.

Ainda declaro que estou ciente e de acordo que irei participar dessa pesquisa através de entrevista para o fornecimento de dados e informações importantes para o projeto de pesquisa e pelo fornecimento das amostras biológicas (sangue e fezes), do paciente ao qual eu sou responsável legalmente.

Estou ciente que essas amostras só serão coletadas quando houver solicitação médica de exames, que serão colhidas por profissionais do setor e então fracionadas entre o laboratório do hospital e o projeto de pesquisa.

Também declaro estar ciente que os dados resultantes desse estudo serão divulgados, mas a minha identidade será mantida em sigilo durante e depois a execução desse projeto.

Ainda reafirmo que a minha resposta quanto ao armazenamento dos dados pessoais, das informações clínicas do paciente ao qual eu sou responsável legalmente, dos microorganismos detectados e identificados nesse estudo, para serem posteriormente estudadas detalhadamente sobre a mesma problemática e divulgadas em estudos posteriores, sendo mantido em sigilo tanto a minha identidade, quanto a do paciente ao qual eu sou legalmente responsável foi:

Sim Não.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ___/___/___

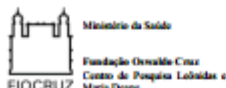
Assinatura do pesquisador responsável ou membro da equipe de pesquisa

Assinatura participante ou responsável

Impressão do dedo polegar do participante ou responsável

Anexo 3

ANEXO 1



QUESTIONÁRIO PARA ESTUDO DE DI-HIV



Código: _____ nº _____

Critério de Inclusão: Pacientes HIV e/ou HIV/AIDS com idade a partir de 12 anos - 70 anos com ou sem diarreia e que, por solicitação médica, serão submetidos à coleta de sangue e fezes para realização de exames.

A) - DADOS PESSOAIS

Nome: _____

Idade: _____ Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: F () M ()

Endereço: _____

Bairro _____ Tel.: Residencial: _____ Celular: _____

B) - DADOS DO RESPONSÁVEL*

*Pacientes não autônomos, que não possam responder ao questionário serão representados por um responsável, mediante permissão prévia do próprio paciente ou responsável.

Nome: _____

Idade: _____ Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: F () M ()

Endereço: _____

Complemento _____ Tel.: Residencial: _____ Celular: _____

Grau de parentesco com o paciente: _____

C) - DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Grau de instrução: _____ Renda familiar: _____ Situação

empregatória: _____ Situação Conjugal: _____ Nº de

Filhos: _____ Sorpositividade na Família: () Sim () Não Parentesco: _____

Orientação Sexual: () Transsexual () Travesti () Homossexual () Bissexual ()

Heterossexual _____ Início da atividade sexual (anos): _____ Nº

parceiros (anos): _____ Forma de Contágio: () sexual () sangue

() outra: _____ Utiliza algum tipo de droga () Sim () Não Quais: _____

O paciente foi hospitalizado nos últimos 30 dias que antecederam esta coleta: Sim () Não ()

Desconhece (). Há em casa outra pessoa não hospitalizada que teve diarreia nas duas semanas antes

desta coleta? Sim () Não () Desconhece ()

Qual o tipo de abastecimento de água: () poço () Cachimba () Encanada () Outro: _____

Qual o tipo de água utilizado para beber: () sem tratamento () Fervida () Clorada () Filtrada

() Coadá () Mineral () Chuva () Rio () Igarapé () Outra: _____

Qual o tipo de casa: () Alvenaria () Palafita () Mista () Outra: _____

Quantos cômodos tem a casa: _____ Quantas pessoas residem no mesmo local _____

Qual o tipo de instalação sanitária: () Fossa séptica () Fossa asséptica () Rede de esgoto

Após você usar o sanitário você lava as suas mãos? Sempre () habitualmente () as vezes ()
nunca () desconhece ().

Antes de preparar os alimentos você lava as mãos? Sempre () habitualmente () as vezes ()
nunca () desconhece ().

D) - INFORMAÇÕES CLÍNICAS/LABORATÓRIAS*

*Essas informações poderão ser obtidas através da consulta dos profissionais responsáveis ou através da consulta de prontuário do paciente mediante prévia autorização.

Tipo de Paciente: () Ambulatorial () Internação () UTI

Ano de conhecimento do Diagnóstico: _____

Número de Internações anteriores associadas ao HIV: _____ Diagnóstico: _____

Doenças infecciosas Oportunistas anteriores () Sim () Não Quais: _____

Faz uso de Medicação anti-retroviral () Sim () Não Qual esquema utilizado:

Fez interrupção por conta própria da terapia anti-retroviral () Sim () Não Motivo: _____

Toma algum medicamento além dos que são preconizados pela terapia anti-retroviral () Sim () Não
Quais: _____

Possui efeito colateral à terapia anti-retroviral () Sim () Não Quais: _____

Teve episódios de diarreia após o diagnóstico de HIV: () Sim () Não Quantos: _____

Está com diarreia atualmente: () Sim () Não. Há quanto tempo: _____

Presença de sinais clínicos

Sintomas sim () não () Quais: _____

Febre sim () não () Quanto: _____

Vômito sim () não () Quantas vezes por dia: _____

Desidratação sim () não ()

Presença de sangue nas fezes sim () não ()

Presença de parasitas visíveis () Sim () Não

Dor abdominal () Sim () Não

Uso de Dispositivos invasivos? () Não () Sim

() Cateter Urinário/Vesical Quanto tempo? _____

() Cateter Central (acesso venoso) Quanto tempo? _____
() Ventilação Mecânica (Respirador) Quanto tempo? _____

Hemograma:

Contagem de LT-CD4: _____

Contagem da carga viral do HIV: _____


Tem outras doenças associadas ao HIV: () Sim () Não Quais: _____

Outras informações pertinentes:

Data: __/__/__

Assinatura do participante
ou responsável

ou


Impressão do dedo polegar
do participante ou responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável
ou membro da equipe

Assinatura do profissional responsável pelo
Fornecimento de dados clínicos/laboratoriais

Anexo 4

IMUNOFENOTIPAGEM DE PLAQUETAS

1. Preparo das soluções

1.1. Tampão PSG/PGE

- O tampão PSG/PGE deve ser preparado na cabine de fluxo laminar;
- Adiciona-se 10 µL de PGE₁ em 10 mL de PSG (isso para cada 5 amostras);
- Caso reste algum volume deste após o experimento, este deve ser desprezado.

1.2. DHE

- O DHE deve ser preparado diluindo-o na concentração de 1:500 (Ex.: adicionar 1 µL de DHE em 500 µL de PSG).

2. Marcação celular

- Centrifugar a amostra a 0,5 rcf durante 20 minutos a 25°C;
- Após a centrifugação, adicionar em um *falcon* de 15 mL, 2 mL de PSG/PGE e 3 mL da amostra (soro);
- Centrifugar o *falcon* a 0,5 rcf durante 20 minutos a 25°C;
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 1 mL de PSG/PGE.
- Realizar a marcação em tubos de citometria seguindo o painel abaixo: (Obs.: Adicionar a amostra por último)

Tubo	Descrição
1	10 µL amostra + 90 µL de PSG/PGE (Controle Negativo)
2	10 µL amostra + 10 µL CD41 + 10 µL DHE + 80 µL PSG/PGE
2	10 µL amostra + 10 µL CD41 + 10 µL DHE + 60 µL adrenalina
4	10 µL amostra + 10 µL CD41 + 10 µL DHE + 60 µL AAS

Anexo 5

ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) - sCD14

1) Preparar o tampão de sensibilização (Tampão carbonato-bicarbonato 0,05M);

- O tampão carbonato-bicarbonato 0,05M é preparado diluindo a solução C em 1/4:
5 mL de solução C para 15 mL de H₂O destilada.

Tampão carbonato-bicarbonato 0,2M							
Solução A	Carbonato de Sódio 0,2M (Na ₂ CO ₃)			1,1 g em 50 mL			
Solução B	Bicarbonato de Sódio 0,2M (NaHCO ₃)			0,8 g em 50 mL			
Solução C	50 mL	40 mL	30 mL	20 mL	15 mL	10 mL	5 mL
Solução A	16 mL	12,8 mL	9,6 mL	6,4 mL	4,8 mL	3,2 mL	1,6 mL
Solução B	34 mL	27,2 mL	20,4 mL	13,6 mL	10,2 mL	6,8 mL	3,4 mL

2) Sensibilizar a placa com 50µL de tampão carbonato-bicarbonato contendo o anticorpo de captura em cada *well* (poço);

3) Incubar *over night* a 4 °C;

4) Remover o anticorpo de captura e realizar o bloqueio com 300µL de tampão PBS+BSA 3% em cada *well*. Incubar a 37°C por 2 horas;

PBS+BSA 3%	
BSA	1,5 g
PBS 1X	50 mL

5) Adicionar 50µL do plasma ou o anticorpo recombinante diluído em tampão PBS+BSA 3% em cada *well*. Incubar a 37°C por 1 hora;

6) Lavar 7 vezes com 300µL de PBS *tween* 20 (0,05%) em cada *well*;

PBS <i>tween</i> 20 (0,05%)				
	1000 mL	800 mL	600 mL	200 mL
Tween 20	0,5 mL (500 µL)	0,4 mL (400 µL)	0,3 mL (300 µL)	0,1 mL (100 µL)
PBS 1X	1000 mL	800 mL	600 mL	200 mL

7) Adicionar 50µL anticorpo secundário diluído em tampão PBS+BSA 3% em cada *well*. Incubar a 37°C por 1 hora;

- 8) Lavar 7 vezes com 300µL de PBS *tween* 20 (0,05%) em cada *well*;
 9) Adicionar 50µL de estreptavidina diluída em tampão PBS+BSA 3% em cada *well*. Incubar a 37°C por 1 hora;

Estreptavidina	
Estreptavidina	1,0 µL
PBS+BSA 3%	5,0 mL

- 10) Lavar 7 vezes com 300µL de PBS *tween* 20 (0,05%) em cada *well*;
 11) Revelar com 50µL tampão de revelação (tampão citrato-fosfato + TMB + H₂O₂ 30%);
 ➤ O tampão de revelação é preparado seguindo as concentrações das soluções abaixo:

Tampão de revelação (tampão citrato-fosfato + TMB + H ₂ O ₂ 30%)	
Solução C	5,0 mL
TMB	0,555 µL
Peróxido de hidrogênio 30% (H ₂ O ₂)	2,0 µL

- Para fazer a solução C, seguir as seguintes recomendações:

Tampão citrato-fosfato		
Solução A	Fosfato de Sódio 0,083M (Na ₂ HPO ₄)	0,58 g em 50 mL
Solução B	Ácido Cítrico 0,036M (H ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	0,34 g em 50 mL

Obs.: A solução C é obtida misturando-se as soluções A e B nas concentrações abaixo e deve ter pH entre 4,9 a 5,2.

Solução C	4 mL	8 mL	12 mL
Solução A	2,4 mL	4,8 mL	7,2 mL
Solução B	1,6 mL	3,2 mL	4,8 mL

- 12) Esperar reagir por aproximadamente 5 minutos (caso a reação ainda permaneça fraca, deixar reagir por mais tempo);
 13) Cessar a reação adicionando 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2,0M em cada *well*;
 14) Fazer a leitura logo em seguida sob absorvância de 450nm;

