



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

CLAUDEIR DIAS DA SILVA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE PESSOAS VIVENDO COM
HIV/AIDS (PVHIV) SUBMETIDOS A TRATAMENTO ANTIRETROVIRAL (TARV)
INCLUINDO O DOLUTEGRAVIR**

**RECIFE-PE
2020**

CLAUDEIR DIAS DA SILVA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE PESSOAS VIVENDO COM
HIV/AIDS (PVHIV) SUBMETIDOS A TRATAMENTO ANTIRETROVIRAL (TARV)
INCLUINDO O DOLUTEGRAVIR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: Profa. Dra. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Co-orientador: Profa. Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

Recife
2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586a Silva Júnior, Claudeir Dias da.
 Avaliação da resposta imunológica de pessoas vivendo com
 HIV/AIDS submetidos a tratamento antiretroviral incluindo o dolutegravir /
 Claudeir Dias da Silva Júnior. – 2020.
 52 f.: il.; tab.; 30 cm.

 Orientadora: Líbia Cristina Rocha Vilela Moura.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
 CCS, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2020.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. HIV. 2. Citocinas. 3. Linfócitos. 4. Fármacos Anti-HIV. I. Moura,
 Líbia Cristina Rocha Vilela (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2020-104)

CLAUDEIR DIAS DA SILVA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE PESSOAS VIVENDO COM
HIV/AIDS SUBMETIDOS A TRATAMENTO ANTIRETROVIRAL INCLUINDO O
DOLUTEGRAVIR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em: 18/02/2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Marina Cadena da Matta (Examinadora Externa)
Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP)

Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

À Deus e aos meus orixás
Meu pai **Oxaguiã** e a Minha mãe **Oxum**,
E ao meu marido, **Ítalo de Oliveira**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu bom e amado **Deus**, que me deu a oportunidade de recomeçar, fazer diferente, mais consciente e comprometido com todas etapas desse trabalho.

À minha mãe, **Penha Campos**, e a minha avó, **Severina Paz**, por estarem ao meu lado, por serem a razão da minha vida e sempre me incentivarem a buscar os meus sonhos, com todo carinho e amor.

As minhas orientadoras, **Líbia Moura**, pela ideia e que por meio de suas observações clínica dos pacientes percebeu, fornecendo nosso objetivo principal na construção e aplicação desse projeto; e **Virginia Lorena**, que foi mãe, amiga, irmã, parceira, orientadora, e com seu abraço fraterno me fez acreditar que poderia fazer mais e melhor.

À dois anjos que a vida me deu: **Kamila Kássia** que sempre este presente, escutou minha reclamações, chateações e me fez acreditar em mim, no meu potencial e onde eu poderia chegar; e **Juliana Prado**, que no primeiro dia já correu atrás de orientador, é uma super parceira que a monitoria me deu. Com amor e carinho, levarei ambas no meu coração.

À duas amigas que sempre estiveram ali, de braço abertos, ouvidos atentos e um coração cheio de carinho a ofertar: **Leyllane** e **Michelle Barros**.

Aos meus companheiros e amigos do laboratório que estiveram comigo nessa jornada: **Amanda, Ana Carla, Cintia, Diego, Mineo, Gabriella, Isabela** e, em especial, **Michele Rabelo** pela porta que abriu, me levando para o Correia Picanço e contribuindo de forma significativa para execução desse trabalho.

À minha família adotiva: **Adriana & Alice**, e **Severina** que sempre está comigo ajudando e dividido comigo todas as risadas e aflições.

Aos amigos da UFRPE: **Renata, Lucas e Rafael** pela amizade, carinho, ajuda nesse período em que fiz mestrado e outra graduação ao mesmo tempo. Meu coração sempre será grato pela ajuda valiosa

Aos amigos/vizinhos que tenho a felicidade conviver todos os dias: **Fernanda e Leonardo Aquino, Isabela e Wellington, Michele, “Lene”, Alisson & Bianca**, e **Allan** que sempre me aguentam e são minha fuga desses dias exaustivos e intensos.

Às **pessoas que vivem com HIV**, objeto de estudo de nosso projeto, e que gentilmente aceitaram nosso convite em participar desse estudo, que pode ser mais um a contribuir para o entendimento dessa doença tão estigmatizante, que tem levado a óbito poucos, porém ainda é sinônimo de preconceito e exclusão social.

À **Roque** do Servidos de Doenças Infecto Parasitárias do Hospital das Clínicas – UFPE, que me auxiliou na organização dos pacientes, muito prestativo e atencioso.

Às **técnicas, farmacêuticas e biomédicas** do Laboratório de Análises Clínica do HC-UFPE, por terem me recebido tão bem, me auxiliando na captação de pacientes, além de ser um ambiente muito acolhedor e receptivo à pesquisa.

À **Adriana**, enfermeira chefe do setor de IST/AIDS do Hospital Correia Picanço que me orientou e auxiliou na captação de pacientes, bem como em pontos cruciais da pesquisa.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Correia Picanço, em especial **Erica**, que me acolheu tão bem, super atenciosa, prestativa, um anjo; e **Faby, Carla e Lusitânia**, que ajudam muito na captação dos pacientes e no bom humor nos dias mais intensos.

Aos professores pelos ensinamentos, e aos companheiros de jornada da pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco que encaramos com força e coragem essa etapa, com dedicação e empenho para contribuir com a ciência e tecnologia do nosso país.

Ao Conselho nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao projeto.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo

RESUMO

O Ministério da Saúde do Brasil incorporou, em fevereiro de 2017, um novo inibidor de integrase no tratamento da infecção pelo HIV-1, o dolutegravir (DTG), passando a ser utilizado na terapia inicial para pacientes recém-diagnosticados. Contudo, apesar do sucesso da terapia antirretroviral (TARV) como observado na prática clínica, principalmente com redução rápida da carga viral, existem poucos estudos na literatura sobre a repercussão do DTG sobre o sistema imune no contexto dos níveis de citocinas e sua repercussão no sistema imune. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a expressão de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e os níveis de citocinas de pessoas que vivem com HIV (PVHIV) em tratamento antirretroviral. Foi realizado um estudo exploratório, no período de outubro de 2019 a janeiro de 2020. Foram incluídos 57 indivíduos com diagnósticos confirmados para o HIV e em tratamento antirretroviral iniciado nos últimos 2 anos. A coleta da amostra foi realizada no momento da realização dos exames de acompanhamento periódicos e foi realizada a Imunofenotipagem de linfócito T CD4⁺ e T CD8⁺ por meio de citometria de fluxo. As concentrações de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF α foram determinadas por meio do kit *Human Th1/Th2 Cytokines Kit II* (BD Bioscience). Para análises estatísticas foi utilizado o teste T de Mann-Whitney para dois grupos e teste de Pearson para análise de correlações. Na análise das populações de linfócitos foi observado que PVHIV em tratamento antirretroviral com o esquema preferencial que inclui o DTG possuem níveis absolutos de linfócitos T CD8⁺ elevados ($p=0,01$) e aumento no número absoluto de células que expressam CD45 ($p=0,003$). Em relação às concentrações de citocinas, indivíduos que estão utilizando o esquema TDF/3TC/DTG como preferencial, apresentaram níveis elevados de todas as citocinas IFN γ ($p=0,005$), TNF α ($p=0,0009$), IL6 ($p=0,007$), IL4 ($p<0,0001$), IL10 ($p=0,002$) e IL2 ($p=0,0001$) quando comparados a indivíduos em tratamento. Dessa forma, correlacionando os níveis séricos com as populações de linfócitos ocorre uma correlação negativa dos LTCD8⁺ circulantes em relação aos níveis séricos de IFN γ ($p=0,04$; $r= -0.40$). Observa-se que o dolutegravir atua em vias metabólicas no âmbito do sistema imune, alterando de maneira significativa a produção de citocinas e, consequentemente, o tipo de resposta frente ao vírus. Porém o presente estudo possui limitações e para que possa compreender melhor a dinâmica desse medicamento nos PVHIV se faz necessário novos estudos, principalmente no decorrer do primeiro ano de tratamento, em busca de ampliar o conhecimento no âmbito da resposta imune desses indivíduos.

Palavras-chave: HIV. Citocinas. Linfócitos. Fármacos Anti-HIV.

ABSTRACT

In February 2017, the Ministry of Health of Brazil incorporated a new integrase inhibitor in the treatment of HIV-1 infection, dolutegravir (DTG), starting to be used in the initial therapy for newly diagnosed patients. However, despite the success of antiretroviral therapy (ART) as observed in clinical practice, mainly with a rapid reduction in viral load, there are few studies in the literature on the repercussion of DTG on the immune system in the context of cytokine levels and its repercussion in the system immune. In this context, the present study aimed to investigate the expression of T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes and the levels of cytokines of people living with HIV (PLHIV) undergoing antiretroviral treatment. An exploratory study was carried out, from October 2019 to January 2020. 57 individuals with confirmed HIV diagnoses and on antiretroviral treatment initiated in the last 2 years were included. Sample collection was performed at the time of the periodic follow-up exams and T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocyte immunophenotyping was performed using flow cytometry. The concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF α were determined using the Human Th1 / Th2 Cytokines Kit II kit (BD Bioscience). For statistical analyzes, the Mann-Whitney t test was used for two groups and the Pearson test for correlation analysis. In the analysis of lymphocyte populations, it was observed that PLHIV undergoing antiretroviral treatment with the preferential regimen that includes DTG have elevated absolute levels of CD8⁺ T lymphocytes ($p = 0.01$) and an increase in the absolute number of cells that express CD45 ($p = 0.003$). Regarding cytokine concentrations, individuals who are using the TDF / 3TC / DTG scheme as preferential, had high levels of all cytokines IFN γ ($p = 0.005$), TNF α ($p = 0.0009$), IL6 ($p = 0.007$), IL4 ($p < 0.0001$), IL10 ($p = 0.002$) and IL2 ($p = 0.0001$) when comparing treatment naives. Thus, correlating the serious levels with the lymphocyte populations, there is a negative correlation of circulating LTCD8⁺ in relation to the serum levels of IFN γ ($p = 0.04$; $r = -0.40$). It is observed that dolutegravir acts in metabolic pathways within the immune system, significantly altering the production of cytokines and, consequently, the type of response to the virus. However, the present study has limitations and, in order to better understand the dynamics of this drug in PLHIV, further studies are necessary, especially during the first year of treatment, in order to expand knowledge in the context of the immune response of these individuals.

Keywords: HIV. Cytokines. Lymphocytes. Anti-HIV Agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Prevalência de pessoas vivendo com HIV (PVHIV).....	16
Figura 2 - Representação esquemática dos diferentes alvos das diferentes classes de medicamentos antirretrovirais.....	23
Figura 1 - Detecção dos níveis séricos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α em pessoas que vivem com HIV (PVHIV) em tratamento.....	42
Figura 2 - Correlação dos níveis séricos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α com as populações de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ em indivíduos tratados com TDF/3TC/DTG.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antirretrovirais disponíveis no Brasil.....	24
Tabela 2 - Características gerais do PVHIV.....	41

LISTA DE SIGLAS ABREVIATURAS

3TC	Lamivudina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Antirretrovirais
AZT	Zidovudina
CCR	C-C recetor quimiocinas
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CTL	Linfócito T citotóxico
DC	Células Dendríticas
DDAHAV	Departamento de DST, AIDS e hepatites virais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTG	Dolutegravir
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFZ	Efavirenz
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IE	Inibidores de Entrada
IFN γ	Interferony
IL	Interleucina
IN	Integrase
INI	Inibidor de integrase
INNTR	Inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa
INTR	Inibidor nucleosídeos da transcriptase reversa
IP	Inibidores de Proteases
IST	Infecções Sexual Transmissíveis
mAb	Anticorpos monoclonais
MS	Ministério da Saúde
NK	<i>Natural Killer</i>

nm	Nanômetros
pb	Pares de Bases
PBMC	Células Mononucleares
PHA	Fitohemaglutinina
PVHA	Pessoas Vivendo com HIV/AIDS
RNA	Acido Ribonucleico
RT	Transcriptase Reversa
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TARV	Tratamento Antirretroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDF	Tenofovir
Th	T <i>helper</i>
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
USP	<i>Ubiquitin-specific protease</i>
VEGFR	Fator de Crescimento Endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO DO HIV/AIDS.....	17
2.2	O HIV.....	16
2.3	IMUNOPATOGENESE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS HIV.....	18
2.4	SISTEMA IMUNE.....	19
2.5	TRATAMENTO DO HIV/AIDS.....	22
3	JUSTIFICATIVA.....	26
4	PERGUNTA DA PESQUISA.....	27
5	OBJETIVOS.....	28
5.1	OBJETIVO GERAL.....	28
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
6	MÉTODOS.....	29
6.1	DESENHO DO ESTUDO.....	29
6.2	LOCAL E POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	29
6.3	CRITÉRIOS E PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO DOS PACIENTES.....	29
6.3.1	Critério de inclusão.....	29
6.3.2	Crítérios de exclusão.....	30
6.4	CAPTAÇÃO DE PACIENTES E DE PROCEDIMENTOS.....	30
6.5	TÉCNICA DE COLETA, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	30
6.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS.....	30
6.7	CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	31
6.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
7	RESULTADOS.....	
	OS RESULTADOS SERÃO APRESENTADOS NA SEÇÃO 7.1 EM FORMATO DE ARTIGO QUE SERÁ SUBMETIDO À REVISTA VIROLOGY.....	33
7.1	DOLUTEGRAVIR MODULA CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD8⁺ E CITOCINAS SÉRICAS PESSOAS QUE VIVEM COM HIV	33

	(PVHIV).....	
8	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS.....	45
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E	
	ESCLARECIDO.....	48
	ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM	
	PESQUISA.....	50

1 INTRODUÇÃO

O Ministério da Saúde do Brasil incorporou, em fevereiro de 2017, um novo inibidor de integrase, o dolutegravir (DTG), ao tratamento da infecção pelo HIV-1 passando a ser utilizado na terapia de indivíduos recém-diagnosticados. Contudo, apesar do sucesso dessa terapia antirretroviral (TARV) como observado na prática clínica, principalmente com redução rápida da carga viral, existem poucos estudos na literatura sobre a repercussão do DTG sobre o sistema imune do hospedeiro.

Os efeitos na resposta imunológica induzidos pela TARV foram avaliados por diversos estudos, porém, o DTG ainda não havia sido introduzido. Dessa forma, Gay, et al., 2011, observaram que a terapêutica com antirretrovirais não induziu modificações importantes no contexto dos níveis de citocinas e quimiocinas em 16 e 24 semanas de tratamento (GAY et al. 2011). Em contraponto, outro estudo observou uma diminuição de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-12, após seis meses de tratamento sugerindo que há uma recuperação da resposta imune (SACHDEVA, et al. 2010). Além disso, outros estudos analisaram o impacto da TARV após 4 meses de seu início e observaram redução, principalmente, nos níveis de TNF- α e IL-6.

No âmbito dos poucos estudos com tratamento com DTG, não foram observadas alteração nas populações de linfócitos T CD4⁺ e a produção de IL-6, mesmo sendo observado na prática clínica que ocorre uma recuperação dos níveis de linfócitos T CD4⁺ mesmo que lenta, não sendo inversamente proporcional à rápida redução da carga viral (RASMUSSEN, et al. 2018). Em estudo associando DTG com rifampicina, em indivíduos saudáveis, Brooks e col, 2018, demonstraram uma elevação nos níveis de IFN γ e CXCL10 (BROOKS et al., 2018), porém o trabalho não deixa claro qual droga possui o efeito no sistema imune. Outro estudo analisou dois inibidores de integrase, o Raltegravir e o Dolutegravir, e observaram que apenas o DTG atua de forma a redução da inflamação, exercendo esse efeito por meio de atuação na via SIRT-1 e NF κ B (AFONSO, et al., 2017), contudo esse estudo não relaciona essas alterações a desordens imunológicas, apenas a perfil lipídico e fisiologia do endotélio

Assim, esse trabalho tem por objetivo avaliar os níveis de citocinas e as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em paciente vivendo com HIV/AIDS (PVHIV), submetidos à diferentes TARV, com foco nos casos que usaram o dolutegravir, uma vez que é onde está a maior lacuna.

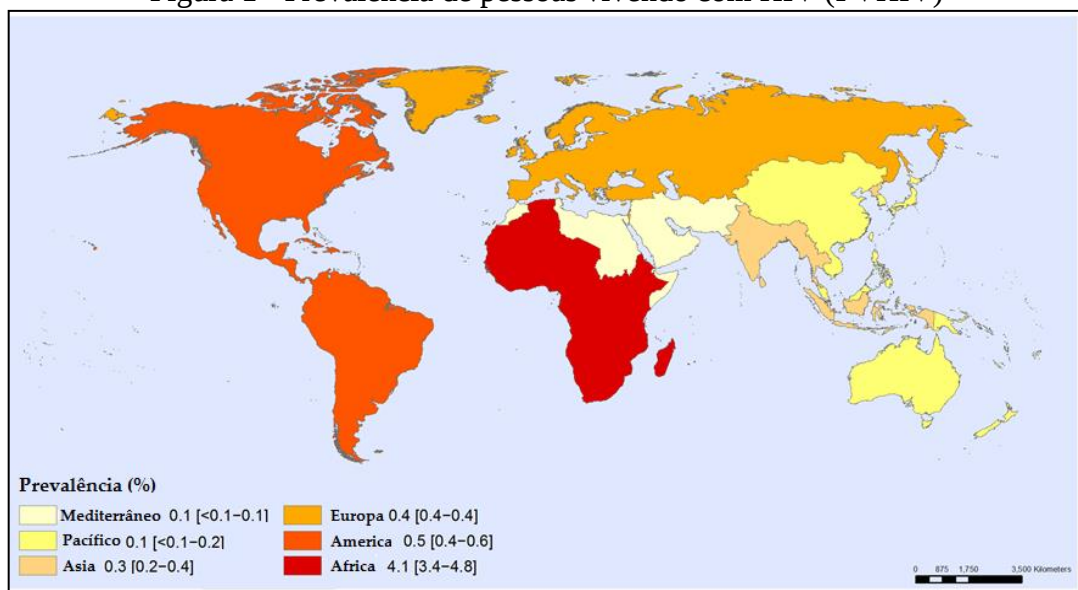
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cenário Epidemiológico do HIV/AIDS

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico responsável pela principal infecção sexualmente transmissível (IST), a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, AIDS), e após quase três décadas da identificação desse vírus, a pandemia ainda continua sendo um dos grandes problemas de saúde pública em todo o mundo. Por outro lado, a qualidade de vida das pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHIV), tem sido amplamente beneficiada pela crescente disponibilidade e adesão a terapias antirretrovirais (UNAIDS, 2018).

Com base em dados do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), com referência o ano de 2018, havia 37,9 milhões de pessoas portadoras do vírus em todo o mundo e foram diagnosticados 1,7 milhões de novas infecções por HIV. Como apresentado na figura 1, estima-se que no mundo 0,8% pessoas com faixa etária entre 15 a 45 anos estejam vivendo com HIV, embora as características epidemiológicas variem de região para região, como é o caso da África Subsaariana em que um em cada 25 adultos (4,1%) estão infectados pelo HIV, representando 70% das PVHIV em todo o mundo (UNAIDS, 2018).

Figura 1 - Prevalência de pessoas vivendo com HIV (PVHIV)



Fonte: Adaptado Organização Mundial da Saúde, 2018.

No Brasil, a aids é uma doença de notificação compulsória e, desde junho de 2014, a infecção pelo HIV após a confirmação do diagnóstico passou também a integrar a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças. As estimativas sobre a epidemiologia destes agravos de saúde no país é oriundo da integração das informações provenientes do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) e o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), o Sistema de Informação de Exames Laboratoriais (SISCEL) e o Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (Siclom), uma vez que existe uma subnotificação no Sinan, que registra cerca de 75% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018)

Até o final de 2018, foram notificados 43.941 novos casos de infecção pelo HIV e 37.161 casos de aids e estima-se que desde o início da epidemia até junho de 2019, um total de 966.058 casos de aids já foram detectados no país, e desde o ano de 2012, observa-se uma diminuição na taxa de detecção de aids no Brasil, que passou de 21,4/100.000 habitantes (2012) para 17,8/100.000 habitantes em 2018, configurando um decréscimo de 16,8%; essa redução na taxa de detecção tem sido mais acentuada desde a recomendação do “tratamento para todos”, implementada em dezembro de 2013. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

2.2 O HIV

O HIV é um retrovírus e é, portanto, capaz de integrar seu DNA no genoma do hospedeiro; isso faz o vírus ser extremamente difícil de erradicar com terapias atuais. O vírus possui um número pequeno de proteínas, porém são extremamente eficientes no que se propõe (DEEKS, et al. 2015). Apresentam dois tipos, HIV-1, considerado o mais virulento e de alta prevalência e o HIV-2, com menor virulência e transmissibilidade. Estruturalmente se apresenta na forma esférica, com diâmetro variando entre 80 a 130 nanômetros (nm), possui um nucleocapsídeo é circundado por uma camada lipídica proveniente da membrana plasmática do hospedeiro e que contém duas glicoproteínas que determinam o tropismo do vírus pelo receptor CD4 presente em macrófagos e linfócitos – a gp120 e a gp41. Em seu interior, observam-se as duas fitas de ácido ribonucleico (RNA) idênticas com 9200 pares de bases (pb) cada, juntamente com as proteínas virais necessárias no processo de replicação. Este material inclui três genes principais responsáveis por codificar as enzimas e as proteínas estruturais do vírus – os genes *gag*, *env* e *pol*. Este último gene - *pol* - codifica as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease, essenciais para a replicação e ativação das partículas virais. (BURGER & POLES, et al, 2003).

A exposição ao HIV pode ocorrer por via sexual, sendo a principal via de transmissão; transfusão de sangue contaminado; via intravenosa no caso de usuários de drogas injetáveis; ou acidente com material perfuro cortante; e transmissão materno-fetal (intraútero, durante o parto ou amamentação). A transmissão está relacionada à quantidade de partículas virais presente no fluido corporal infectado ou pelo número de vezes que o indivíduo é exposto. A transmissão do vírus depende: I) dos fatores virais (virulência e infecciosidade), II) fatores do hospedeiro (imunológicos e genéticos) e III) fatores ambientais (sociais, culturais e políticos). (GALVIN & COHEN, 2004)

A transmissão sexual ocorre quando há exposição do epitélio das regiões genitais ou do ânus à fluidos como sêmen ou secreções da mucosa vaginal e a eficiência na transmissibilidade está relacionada a quantidade de vírus que esses fluidos possuem (DEEKS, et al. 2015). O vírus pode atravessar a barreira epitelial de diferentes maneiras e possuem tropismo por células que expressão CD4, tais como linfócitos T, monócitos, macrófagos e células dendríticas. O HIV também requer um co-receptor para conseguir entrar na célula hospedeira, tipicamente os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4. Esses receptores são expressos em diferentes subpopulações de linfócitos T, isto é, o receptor CCR5 é mais expresso em linfócitos T de memória, mas não em linfócitos T naïves, enquanto o CXCR4 é expresso nos dois. O receptor CCR5 também é expresso em macrófagos e células dendríticas. (WU & KEWALRAMANI, 2006; DEEKS, et al. 2015).

No citoplasma celular, o RNA viral será transcrito em ácido desoxirribonucleico (DNA) por ação da enzima transcriptase reversa (RT) e em seguida duplicado. A dupla fita de DNA será incorporada ao material genético da célula hospedeira, por meio da atuação da enzima integrase (IN), após essa interação, o DNA viral pode permanecer latente por tempo indeterminado (DESIMMIE, et al. 2013) Porém, para que o material genético viral, agora incorporado o DNA células seja traduzidos, serão necessários estímulos como ativação das células por citocina, tais como: fator de necrose tumoral *alpha* (TNF- α), interleucina 1, 2 e 6 (IL-1, IL-2, IL-6) (ZAITSEVA, et al. 2000)

2.3 Imunopatogênese da Infecção pelo HIV

Após a exposição ao HIV, a infecção é caracterizada por três fases clínicas:

Fase aguda – Pode ser assintomática, oligossintomática ou manifestar-se como a síndrome retroviral aguda, iniciada por volta da 2ª a 6ª semana após a infecção, caracterizada principalmente por febre, astenia, cefaleia, mialgia, adenopatia, faringite e *rash*

maculopapular; reflexos da intensa replicação viral e o aumento no pico de viremia (WU & KEWALRAMANI, 2006). No sangue periférico é observada uma diminuição dos linfócitos TCD4⁺, seguida da redução dos linfócitos TCD8⁺ e linfócitos B. Ao término da fase aguda e início da fase crônica, observam-se a queda brusca da carga viral (12 a 20 semanas após pico virêmico) e uma recuperação lenta e parcial dos níveis de linfócitos T CD4⁺ e reestabelecimento nos níveis de linfócitos TCD8⁺ (ZENG, et al. 2012).

Fase crônica – é caracterizada pela ausência de sinais e sintomas (período de latência) e balanço entre a replicação viral e a resposta imune do hospedeiro. No entanto, nesse período, ocorre a depleção progressiva dos linfócitos TCD4⁺, principalmente no tecido linfoide associado à mucosa intestinal ou GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) e nos gânglios linfáticos, o que leva a um comprometimento da estrutura e função desses órgãos. Essa depleção também leva a uma translocação dos produtos bacterianos presentes no lúmen intestinal para circulação, o que contribui para ativação imune sistêmica (LEDERMAN, et al. 2008; ZENG, et al. 2012)

Fase sintomática e AIDS – com a depleção progressiva dos linfócitos T CD4⁺, devido ao aumento do apoptose celular dos linfócitos infectados e não infectados, refletindo na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, levando a aumento da replicação viral, surgem às infecções oportunistas ou neoplasias definidoras de AIDS (ZENG, et al. 2012).

No decorrer do curso clínico da infecção pelo HIV, ocorre uma diminuição gradativa da capacidade de responder imunologicamente ao vírus. Os estudos levam a compreensão de que múltiplos fatores estejam envolvidos na progressão da doença e o desenvolvimento da AIDS, entretanto não estão completamente compreendidos.

2.4 Sistema imune

A resistência à infecção por HIV quanto a progressão da doença depende do sistema imune do hospedeiro em suas principais linhas de defesa: imunidade inata, que reconhece os PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) associados ao vírus por meio dos TLRs (*Toll like-receptors*) presentes em células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células NK, células NKT, células T gamma delta ($\gamma\delta$); enquanto que na imunidade adquirida ocorre o reconhecimento de antígenos proteicos por meio do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) do tipo I e II (resposta células) com consequente produção e liberação de citocinas, quimiocinas e substâncias citotóxicas como perforina e granzima (resposta humoral).

No contexto da imunidade inata, as células NK são a primeira linha de defesa, atuando na destruição das células infectadas pelo vírus através de sua atividade citotóxica com produção e liberação de citocinas, perforina e granzimas. As células NK são caracterizadas fenotipicamente por meio da ausência do marcador de superfície CD3 e pela expressão de CD56, uma isoforma do *neural cell adhesion molecule* (NCAM), e CD16 (FcγR3) um receptor para a porção Fc de Imunoglobulinas G (Fc-IgG). (OSTAPCHUK, et. al., 2015; LITTWITZ-SALOMON, et. al. 2016) Por meio da expressão dos receptores CD56, as células NK podem ser divididas em CD56^{dim}, com papel citotóxico com a liberação de granzima e perforina; e CD56^{bright}, com perfil imunomodulatório com produção e liberação de interleucina (IL)-10 interferon (IFN)γ, fator de transformação do crescimento (*transforming growth factor* – TGF)β e outras citocinas. (BEZIAT, et. al., 2011; CALIGIURI, 2008)

As células NK apresentam receptores KIR, que são uma família de glicoproteínas transmembranas que possuem papel fundamental na ativação e tolerância de células NK. Esses receptores reconhecem grupos de alelos do MHC de classe I, moléculas expressas em células nucleadas. Portanto, a diminuição de MHC de classe I interrompe os sinais inibitórios, permitindo a ativação das células NK e destruição das células (PEGRAM, et al., 2011). O HIV evade a resposta das células NK do hospedeiro via *down-regulation* das moléculas de MHC-I sob a superfície das células infectadas levando a uma desregulação da produção de citocinas que ativam as funções efectoras das células NK diminuindo assim, os níveis de perforina e granzima, além da produção de IFNγ (JIANG, et al. 2013).

A resposta imune adaptativa celular é mediada por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, sendo as células TCD8⁺ responsáveis pela eliminação principalmente de patógenos intracelulares facultativos e/ou obrigatórios e de células tumorais (SANT & MCMICHAEL, 2012). Após ativação dos linfócitos T CD8⁺, estas células se expandem e tornam-se citotóxicos (CTLs) respondendo à peptídeos específicos do HIV possuindo ação citotóxica caracterizada pela presença e liberação de perforinas e granzimas. Estes CTLs controlam a infecção na fase aguda, mas terminam sendo ineficazes devido ao surgimento de mutações que leva ao escape viral (LEVY, et. al. 2010).

Durante a fase aguda da doença, os CTLs possuem grande atividade, reconhecendo e atuando destruindo as células infectadas por meio de lise celular (ação direta) ou por meio da produção de citocinas e quimiocinas que aumentam a imunidade viral e suprimem a infecção, sendo assim cruciais no declínio da viremia, entretanto na fase crônica ocorre uma diminuição da resposta citotóxica (MCDERMOTT & KOUP, 2012). A importância da resposta T CD8⁺ no controle da replicação viral tem sido também evidenciado em estudos com indivíduos

controladores de elite do HIV, ou seja, naqueles em que a viremia se mantém indetectável na ausência de TARV. Esses indivíduos apresentam células T CD8⁺ polifuncionais, com capacidade para produzir múltiplas quimiocinas e citocinas, tais como, IFN- γ , TNF- α e IL-2 e também, para sofrerem degranulação após um estímulo específico pelo HIV. Apesar disso, nem todos os controladores de elite apresentam respostas T CD8⁺ potentes o que sugere o envolvimento de outros mecanismos de controle da infecção pelo indivíduo (BETTS, et. al. 2006).

Os linfócitos T CD4⁺ exercem um papel central na resposta imune auxiliando na indução e/ou manutenção da resposta de linfócitos T CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos) linfócitos B e macrófagos, bem como por meio da produção de citocinas e representam o alvo preferencial da infecção pelo HIV. (SOGHOIAN, et al. 2012). As células T auxiliares (T *helper* - Th), que são os linfócitos T CD4⁺ ativados, foram inicialmente caracterizadas em dois subtipos: Th1 e Th2 com diferentes padrões de perfis de citocinas, porém estudos recentes buscam caracterizar os demais subtipos de Th tais como células T reguladoras (Tregs), Th17, Th9 e Th22 na infecção pelo HIV. (ZHU, 2010)

As células Th1 são caracterizados pela produção e secreção de IL-2, IL-12 e IFN- γ e estão associadas a uma resposta protetora, de característica inflamatória. Por outro lado, as citocinas Th2 específicas, ou seja, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 estão associadas à progressão da doença, por ser uma resposta anti-inflamatória, e são associadas à progressão da infecção pelo HIV para a AIDS (KLEIN, 1997). Assim, é observado que ativação imune crônica associada ao HIV é caracteriza por altos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tais como IFN γ , IL-6, TGF- β , IL-8, IL-1 α , IL-1 β , MIP-1 α , MIP- 1p e RANTES. (APPAY & SAUCE, et al. 2008).

As citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β 1 também mostraram estar aumentadas no plasma durante a infecção aguda, porém são relatadas como preditivas para cronicidade da doença (BOURGARIT, et al. 2006) Assim, esse aumento significativo de citocinas, caracteriza a infecção aguda e crônica pelo HIV contribuem para ativação imunológica e a depleção das células T CD4⁺. Outra característica importante é que a ativação imune persistente também impede o estabelecimento de linfócitos T CD8⁺ e TCD4⁺ com produção de IL-2, e isso tem efeitos deletérios sobre a imunidade de células T CD4⁺ específicas para o HIV (YOUNES, et al. 2003).

Subramanyam et al. (2004), demonstraram que a produção elevada de IL-4 com diminuição na produção de IL-2 estava associada à progressão do indivíduo para a AIDS (SUBRAMANYAM, et al. 2004). Outros estudos analisaram a concentração sérica de

citocinas no início da infecção, mesmo antes da positividade sorológica e observaram elevados níveis de IFN- γ e IL-15, com subsequente aumento nos níveis séricos de IL-18, IL-6 e IL-10 já na fase aguda da doença (KULLER, et al., 2008; STACEY, et al. 2009). No balanço entre citocinas que possuem características que contribuem para a multiplicação do vírus, indutoras virais, como IL-6, IL-15, IL-1 β e TNF- α e as que apresentam características supressoras como o IFN do tipo I (IFN α e IFN β), certamente ocorre um ponto de equilíbrio que é determinante para o prognóstico da AIDS (SACHDEVA, et al. 2010).

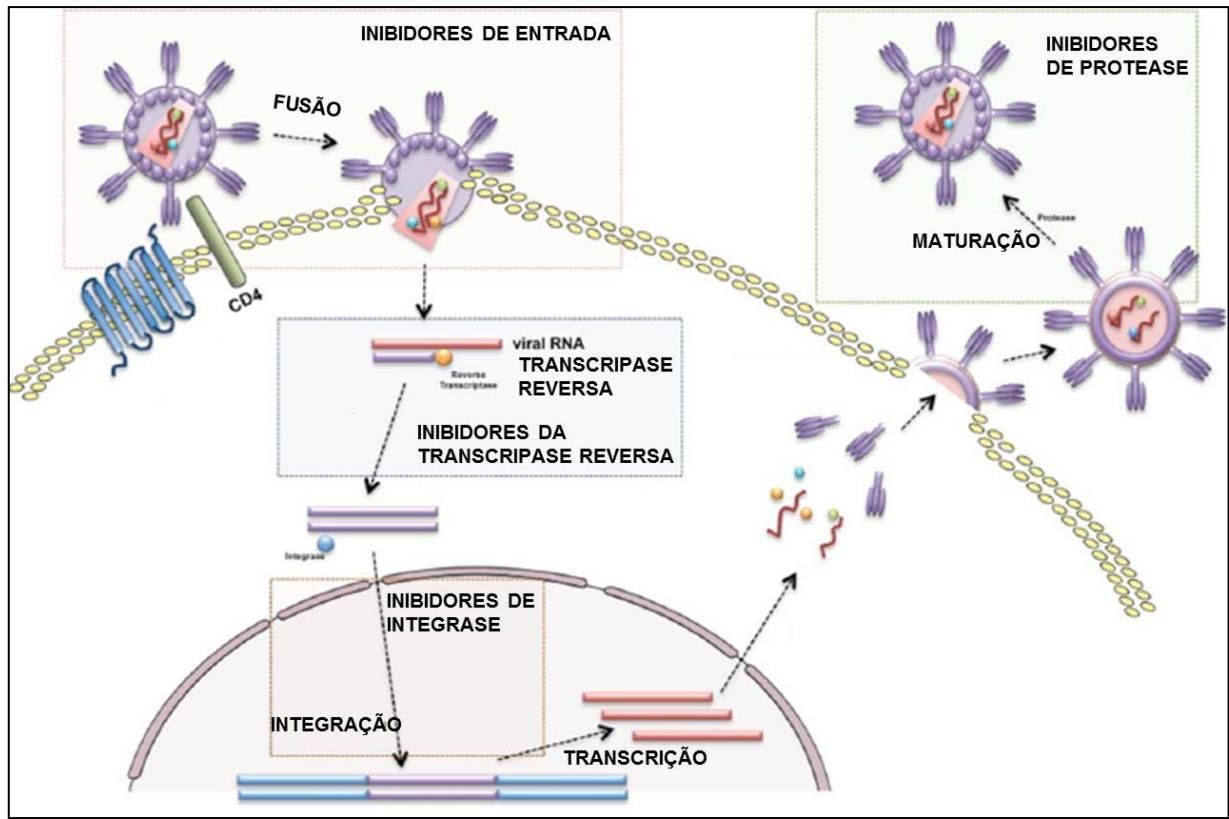
2.5 Tratamento do HIV/AIDS

Os medicamentos antirretrovirais começaram a serem utilizados nos anos 80 com o advento da Zidovudina (AZT) pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), tendo como objetivos diminuir a mortalidade e morbidade das PVHIV, aumentar a expectativa de vida dos pacientes, prevenir a transmissão do vírus e retardar a progressão da doença (LANGEBEEK, et al. 2014). Em meados da década de 1990, com a descoberta dos inibidores de protease, houve uma revolução no tratamento de PVHIV, devido à introdução de pelo menos três drogas no tratamento do HIV (LANGEBEEK, et al. 2014).

No Brasil, esta associação de drogas é distribuída gratuitamente pelo Ministério da Saúde no Brasil para todos os indivíduos que tenham indicação do tratamento, como parte da política de assistência a pessoas que vivem com HIV desde 1996 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

O tratamento antirretroviral (TARV) é composto por uma associação de drogas com objetivo de reduzir a carga viral bloqueando o ciclo replicativo do vírus, através de mecanismos de ação que atuam sobre pontos específicos, a fim de evitar a formação de novas partículas virais e infecção de novas células, prolongando a vida do indivíduo e evitar a imunossupressão (MENÉNDEZ-ARIAS, et al. 2013). Existem cinco classes de antirretrovirais (ARV): os inibidores nucleosídeos e nucleotídeos da transcriptase reversa (INTR), os inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa (INNTR), os inibidores de proteases (IP), inibidores de entradas (IE) e os inibidores da integrase (INI) (MAARTENS, et al., 2014).

Figura 2 - Representação esquemática dos diferentes alvos das diferentes classes de medicamentos antirretrovirais.



Fonte: Adaptado Chereshev, et. al., 2013.

Os esquemas atuais de TARV promovem maior eficácia e diminuem os riscos de resistência medicamentosa. Segundo recomendações do Ministério da Saúde do Brasil, a partir de fevereiro de 2017 (Nota Informativa nº 096, de 2016/DDAHV/SVS/MS), o tratamento de pacientes recém-diagnosticados deve incluir a combinação de três drogas, preferencialmente, contendo tenofovir (TDF), primeira escolha, ambos em associação com lamivudina (3TC) e dolutegravir (DTG), que entrou no esquema inicial, substituindo o efavirenz (EFZ) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O dolutegravir foi adicionado ao esquema inicial devido a sua alta potência, alta barreira genética, administração em dose única, taxa significativamente mais lenta de dissociação, capacidade de apresentar pequenas mudanças conformacionais em seu sítio ativo (OSTERHOLZER & GOLDMAN, 2014; RIBERA & PODZAMCZER, 2015)

Tabela 1: Antirretrovirais disponíveis no Brasil

INTR	INNTR	IP	IE	INI
Abacavir	Efavirenz	Atazanavir	Enfuvirtida	Raltegravir
Lamivudina	Etravirina	Darunavir	Maraviroque	Dolutegravir
Tenofovir	Nevirapina	Lopinavir		
Zidovudina		Ritonavir		

Fonte: o Autor. Legenda: INTR: inibidores nucleosídeos e nucleotídeos da transcriptase reversa; INNTR: inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa, IP: os inibidores de proteases; IE: inibidores de entradas; INI: inibidores da integrase.

Além de inibir significativamente a replicação viral, a TARV diminui a ativação do sistema imune celular e produção de citocinas inflamatórias. Assim, entender o controle viral mediado pelo sistema imune pode fornecer melhorias às terapias antirretrovirais, servindo de embasamento para tratamentos mais específicos e desenvolvimento de vacinas. Os estudos relacionados à resposta imune frente ao vírus HIV sob o novo esquema de tratamento ainda são escassos, porém baseado no antigo esquema antirretroviral (combinação de lamivudina, tenofovir e efavirenz) podemos observar resultado conflitantes.

Yao, et al. (2013), analisaram um grupo de indivíduos em tratamento com TARV (esquema: zidovudina, lamivudina e nevirapina) e observaram níveis aumentados de IL-12 e IFN- γ e redução nos níveis de IP-10 após 12 meses de tratamento quando comparados a antes do tratamento. Nesse mesmo estudo foi analisada a relação dessas citocinas e o perfil celular nesses pacientes e observaram que a IL-12 está correlacionada negativamente com células T CD8⁺ citotóxicas (YAO, et al., 2013). Outro estudo avaliou um painel de 87 citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, fatores de crescimento e receptores solúveis e observaram aumento nos níveis de CCL21, CXCL13, CCL19, CXCL10/IP10, CXCL11 e Fator de Crescimento Endotelial (VEGFR)-1 em indivíduos em tratamento antirretroviral em comparação com indivíduos sem tratamento (JACOB, et al. 2017).

Sachdeva et al. (2010) evidenciaram diminuição dos níveis séricos de IL-1 β , IL6, TNF- α , IFN- γ e IL-12 após seis meses de tratamento, porém quando comparados com indivíduos saudáveis esses níveis continuavam elevados (SACHDEVA, et al. 2010). Outro estudo que analisou o perfil de citocinas em dois momentos da infecção: primeiro pico que ocorreu durante a infecção aguda da doença outro pico que ocorreu durante a terapia antirretroviral e quando comparados, observaram níveis elevados de IFN- γ , TNF- α e IL-10 na infecção aguda (BARQASHO, et al. 2009). Nos estudos com a terapia incluindo o DTG, Rasmussem et al. (2018), analisaram populações de linfócitos T CD4⁺ e a produção de IL-6,

em indivíduos portadores do vírus HIV tratados com DTG e demonstraram não haver diferença quando comparados com o grupo de indivíduos que não recebia tratamento com DTG (RASMUSSEN, et al. 2018), porém esse estudo tem várias limitações na seleção da amostra e não contempla todo o contexto dos pacientes portadores do HIV. Em outro estudo associando DTG com rifampicina, em indivíduos saudáveis, os autores, demonstraram uma elevação nos níveis de IFN- γ e IP10 (BROOKS, et al. 2018), porém o trabalho não deixa claro qual droga possui o efeito no sistema imune.

Dessa forma, o tratamento do HIV com o esquema que traz o dolutegravir como componente, tem aumentado a taxa de sobrevivência dos pacientes, principalmente quando iniciada mais cedo e quando há uma taxa de aderência satisfatória à terapêutica, bem como é observado na prática clínica uma redução mais rápida da carga viral para níveis indetectáveis, quando comparado com esquemas anteriores. Porém, não existe um consenso sobre a restauração e funcionalidade das células NK e subpopulações, bem como não há um reestabelecimento satisfatório dos níveis de linfócitos T CD4⁺ proporcionalmente à diminuição da carga viral, isso tem impacto nos níveis dos linfócitos T CD8⁺ e na resposta humoral mediada por citocinas e quimiocinas. Portanto, diante da importância do tratamento em PVHVA e o reflexo na resposta imune, além dos poucos dados na literatura científica, fazem-se necessários estudos que possam ampliar a compreensão do envolvimento do DTG no esquema de tratamento do HIV.

3 JUSTIFICATIVA

A adição do dolutegravir ao esquema de tratamento antirretroviral no Brasil tornou mais eficaz o tratamento devido a diminuição rápida da carga viral em PVHVA, além disso, até então tem sido observada pouca resistência aos medicamentos e não muitos efeitos colaterais, melhorando a qualidade de vida dos indivíduos.

Porém, são poucos estudos até o presente momento que busquem compreender o contexto imunológico da utilização do DTG no tratamento contra o HIV e sua relação com a diminuição da carga viral e manutenção desses índices a níveis indetectáveis. As análises limitam-se a relação CD4:CD8, não aprofundando o contexto da complexa rede do sistema imune, principalmente sendo esta uma infecção que acomete os linfócitos T CD4+, células de extrema importância no contexto da resposta imune.

Diante da importância da atuação que o sistema imune pode exercer no estabelecimento e progressão da doença através de fatores solúveis secretados, uma avaliação sobre citocinas séricas em PVHVA em tratamento com DTG, pode levar ao entendimento quanto ao balanço que ocorre entre os perfis Th1 e Th2 induzido pelo tratamento e sua correlação com morbimortalidade associado à doença.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Existem diferenças nos valores absolutos e no percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, níveis de citocinas no sangue periférico de pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHIV) submetidos a diferentes tipos de tratamento antirretroviral (TARV)?

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Investigar a frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e os níveis de citocinas séricas de pessoas que vivem com HIV (PVHIV) em tratamento antirretroviral utilizando o DTG e comparar com indivíduos com outros esquemas e pacientes que ainda não iniciaram o tratamento.

5.2 Objetivos específicos

- Comparar a frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ em pacientes que vivem com HIV (PVHIV) que fazem uso de tratamento antirretroviral que contém dolutegravir com pacientes que utilizam outros esquemas de tratamento, bem como em indivíduos que ainda não tinham iniciado o tratamento.
- Comparar os níveis séricos de citocinas Th1, Th2 em pacientes que vivem com HIV (PVHIV) que fazem uso de tratamento antirretroviral que contém dolutegravir com pacientes que utilizam outros esquemas de tratamento, bem como em indivíduos que ainda não tinham iniciado o tratamento.
- Correlacionar a frequência de células T CD4 e T CD8 com as citocinas séricas em pacientes que vivem com HIV (PVHIV) que fazem uso de tratamento antirretroviral incluindo dolutegravir.

6 MÉTODOS

6.1 Desenho do Estudo

Estudo do tipo analítico-experimental com grupo de comparações internos, onde o soro de pessoas vivendo com o HIV foi avaliado por citometria de fluxo para mensuração de citocinas. Os indivíduos desse estudo foram selecionados e incluídos, no período de outubro de 2019 a janeiro de 2020.

6.2 Local e População do estudo

O estudo compreendeu um total de 57 indivíduos vivendo com o HIV, maiores de 18 anos, de ambos os sexos, em acompanhamento médico durante nos últimos 36 meses. O estudo foi realizado no serviço de Doenças Infecto-parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e no Hospital Correia Picanço – Secretaria de Saúde de Pernambuco. O processamento das amostras e detecção das citocinas foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ). A imunofenotipagem de TCD4⁺ e TCD8⁺ e quantificação da carga viral foram realizados pelo Laboratório Central de Pernambuco (Lacen-PE) e esses resultados foram posteriormente lançados no Sistema de Controle de Exames Laboratoriais de CD4⁺/CD8⁺ e Carga Viral do HIV (SISCEL). Dessa forma, aos valores absolutos (células/mm³) e relativos de linfócitos (%), carga viral, esquema terapêutico, tempo de tratamento, idade e sexo foram obtidas por meio de acesso a esse sistema.

6.3 Critérios e procedimentos para seleção dos pacientes

6.3.1 Critério de Inclusão

Indivíduos com idade acima de 18 anos, vivendo com o HIV que estavam em tratamento antirretroviral iniciado nos últimos 36 meses e para grupo controle de comparação, indivíduos que ainda não haviam iniciado o tratamento.

6.3.2 Critérios de exclusão

Pacientes que durante a avaliação clínica foram identificados com algum distúrbio psiquiátrico ou desorientação que os impediram de participar da pesquisa; Uso de medicamentos imunossupressores; Tratamento prévio de quimioterapia; Vírus linfotrópico humano 1 e 2 (HTLV 1 e 2); Tuberculose; Sífilis; Hepatites virais; Doença autoimune; Gestante.

6.4 Captação de pacientes e de procedimentos

Os pacientes foram selecionados de acordo com sorologia positiva para HIV e tendo iniciado o tratamento nos últimos 36 meses que antecede o período da pesquisa, e foram avaliados quanto ao preenchimento dos critérios de inclusão e exclusão. A partir da identificação dos pacientes elegíveis, foi explicado o objetivo e a metodologia da pesquisa, e os pacientes que aceitarem participar do estudo foram convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Uma amostra de sangue periférico dos participantes foi colhida.

6.5 Técnica de coleta, processamento e armazenamento das amostras de sangue.

A amostra de sangue foi coletada no Hospital das Clínicas – UFPE e Hospital Correia Picanço – SES-PE imediatamente após inclusão do indivíduo no estudo. Sempre que possível, a coleta de sangue foi realizada aproveitando o momento da coleta de exames solicitados pela equipe médica, a fim de evitar repetições de punções. Um volume de 4 mL de sangue foi colhido em tubo seco, isto é, sem anticoagulante para dosagem de citocinas. Após retração do coágulo, o tubo foi centrifugado para obtenção do soro, alíquotado no volume de 300 µL e armazenado em microtubos a -20° C para posterior análise das citocinas.

6.6 Determinação da concentração de citocinas séricas.

A concentração das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α foram determinadas nas amostras de soro. A determinação foi realizada pela técnica *Cytometric Bead Array* (CBA) por citometria de fluxo, utilizando BD CBA – *Human Th1/Th2 Cytokines Kit II*, seguindo instruções do fabricante com algumas modificações. Inicialmente, 15µl de

soro foram adicionados a um tubo de citometria (BD Systems™- 5mL) contendo 15µl de uma mistura de *beads* de captura (microesferas com diferentes intensidades de fluorescências-FL4) recobertas por anticorpos monoclonais (anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IFN-γ e anti-TNF). Em seguida, foram adicionados 15µl do reagente de detecção (mistura de anticorpos anti-citocinas conjugados a um fluorocromo (FL2)). Os tubos foram incubados por 3h a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Ao término da incubação, as amostras foram lavadas com *buffer wash*, centrifugadas a 200 xg por 5 minutos. Em seguida, as *beads* foram ressuspensas em 250µl de *buffer wash* e 1800 eventos foram adquiridas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT)/IAM/Fiocruz, através do citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickson Immunocytometry Systems), com o software Cell Quest Pro (Beckton Dickson). A análise das concentrações das citocinas foi realizada no FCAP Array software v. 3.1 (BD BIOSCIENCES, CA) e expressas em pg/mL.

6.7 Categorização das variáveis

Variável	Definição	Categorização
Linfócitos T	Imunofenotipagem de linfócitos T totais baseado na expressão de marcadores de superfície CD3.	variável numérica contínua expressa em percentual (%) e valores absolutos (células/mm ³)
Linfócitos TCD4 ⁺	Imunofenotipagem de linfócitos T totais baseado na expressão de marcadores de superfície CD3 e CD4.	variável numérica contínua expressa em percentual (%) e valores absolutos (células/mm ³)
Linfócitos TCD8 ⁺	Imunofenotipagem de linfócitos T totais baseado na expressão de marcadores de superfície CD3 e CD8.	variável numérica contínua expressa em percentual (%) e valores absolutos (células/mm ³)
IL-2	Níveis de IL-2 sérico e em sobrenadante de cultura de células	variável numérica contínua expressa em picograma por mililitro (pg/mL)
IL-4	Níveis de IL-4 sérico e em sobrenadante de cultura de	variável numérica contínua expressa em picograma por

	células	mililitro (pg/mL)
IL-6	Níveis de IL-6 sérico e em sobrenadante de cultura de células	variável numérica contínua expressa em picograma por mililitro (pg/mL)
IL-10	Níveis de IL-10 sérico e em sobrenadante de cultura de células	variável numérica contínua expressa em picograma por mililitro (pg/mL)
IFN- γ	Níveis de IFN- γ sérico e em sobrenadante de cultura de células	variável numérica contínua expressa em picograma por mililitro (pg/mL)
TNF- α	Níveis de TNF- α sérico e em sobrenadante de cultura de células	variável numérica contínua expressa em picograma por mililitro (pg/mL)

6.8 Análises estatísticas

Para a análise da associação dos níveis de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF nos grupos de comparação do estudo foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para correlação dos níveis séricos de citocinas e linfócito T CD4⁺ e CD8⁺ foi utilizado o teste Spearman. Em todas as análises utilizou-se $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95% como significativo. As análises estatísticas foram realizadas no *GraphPad Prism software* v 6.07.

7 RESULTADO

Artigo que será submetido à Revista *Virology*: Dolutegravir modula contagem de linfócitos T CD8⁺ e citocinas séricas em pessoas que vivem com HIV (PVHIV)

INTRODUÇÃO

O tratamento para o HIV, além do objetivo principal de reduzir a carga viral, permite que pessoas que vivem com HIV (PVHIV) tenham uma vida mais longa e saudável, e com isso uma melhora na expectativa de vida quase normal. No Brasil desde 2017, o tratamento preferencial do HIV é instituído de dois inibidores nucleosídeos e da transcriptase reversa (ITRN): Tenofovir (TDF), Lamivudina (3TC), e um inibidor de integrase (INI): o Dolutegravir (DTG). O DTG foi adicionado ao esquema inicial devido a sua alta potência, administração em dose única, taxa significativamente mais lenta de dissociação, e capacidade de apresentar pequenas mudanças conformacionais em seu sítio ativo (Osterholzer; Goldman, 2014; Ribera; Podzamczar, 2015).

No entanto, o tratamento antirretroviral (TAVR) não recompõe completamente as populações celulares e ativação imune crônica e a inflamação persisti em indivíduos em tratamento. O quadro inflamatório e de ativação imune persistentes são descritos como preditores de eventos clínicos e mortalidade em pacientes infectados pelo HIV, porém não há um consenso a respeito de qual marcador inflamatório está envolvido nesse quadro clínico. Além disso, há poucas informações disponíveis sobre o impacto dos vários esquemas de TARV na inflamação e imunoativação. (Wada et al. 2015; Quiros-Roldan et al., 2017)

Após o início da TARV, a maioria das PVHIV alcançam o nível indetectável de carga viral e uma restauração dos níveis parciais de linfócitos T CD4⁺. Por outro lado, a maioria não apresentava falha na normalização dos níveis de linfócitos T CD8⁺, mesmo em indivíduos com TARV a longo prazo, e essa resiliência de altas contagens de células T CD8⁺ já foi associada a mortalidade por doenças não relacionadas a AIDS (Wolbers et al. 2007; Tassiopoulos, et al., 2012). A natureza dos medicamentos antirretrovirais escolhidos para o esquema de TARV interfere na recuperação de CD4, enquanto o impacto dessa escolha na dinâmica dos LTCD8⁺ permanece indescritível. (Helleberg et al., 2015)

Portanto, este trabalho buscou explorar o impacto do esquema TDF/3TC/DTG em citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em pacientes tratados com carga viral indetectável após período de tratamento de 36 meses.

MÉTODOS

População de estudo

Foram avaliadas 57 pessoas que vivem com HIV (PVHIV) diagnosticados nos últimos 36 meses e que estavam em tratamento antirretroviral. Destes, 40 indivíduos recebiam o esquema preferencial de tratamento disponível pelo Ministério da Saúde do Brasil desde fevereiro de 2017 (Grupo TDF/3TC/DTG) que consiste em associação de três medicamentos: Lamivudina (3TC), Tenofovir (TDF) e Dolutegravir (DTG); outros 17 indivíduos recebiam outros esquemas de tratamento (Grupo TARV). Também foram avaliados 12 indivíduos que tiveram seu diagnóstico confirmado e não haviam iniciado o tratamento até o momento da coleta (Grupo NAIVE). Todos os PVHIV eram acompanhados no serviço de referência para doenças infecciosas e parasitárias do Hospital das Clínicas vinculado à Universidade Federal de Pernambuco e no Serviço de Referência para DTS/AIDS do Hospital Correia Picão vinculado à Secretaria Estadual de Saúde – Pernambuco.

O recrutamento dos pacientes ocorreu no período de outubro de 2019 a janeiro de 2020. As características gerais tais como idade, valores absolutos (células/mm³) e relativos de linfócitos (%) T CD4⁺ e TCD8⁺, e carga viral foram obtidos a partir Sistema de Controle de Exames Laboratoriais de CD4⁺/CD8⁺ e Carga Viral do HIV (SISCEL). Os ensaios para detecção de citocinas foram realizados no Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-PE). O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em pesquisa do IAM/Fiocruz e HC/UFPE sob o número do protocolo CAEE: 12152919.4.3001.8807.

Determinação da concentração de citocinas séricas.

A concentração das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α foram determinadas nas amostras de soro. A determinação foi realizada pela técnica *Cytometric Bead Array* (CBA) por citometria de fluxo, utilizando BD CBA – *Human Th1/Th2 Cytokines Kit II*, seguindo instruções do fabricante com algumas modificações. Inicialmente, 15 μ L de soro foram adicionados a um tubo de citometria (BD Systems™- 5mL) contendo 15 μ L de uma mistura de *beads* de captura (microesferas com diferentes intensidades de fluorescências-FL4) recobertas por anticorpos monoclonais (anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IFN- γ e anti-TNF). Em seguida, foram adicionados 15 μ L do reagente de detecção (mistura de anticorpos anti-citocinas conjugados a um fluorocromo (FL2)). Os tubos foram incubados por 3h a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Ao término da incubação, as amostras foram lavadas com *buffer wash*, centrifugadas a 200 xg por 5 minutos. Em seguida, as *beads* foram ressuspensas em 250 μ L de *buffer wash* e 1800 eventos foram adquiridas no

Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT)/IAM/Fiocruz, através do citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickson Immunocytometry Systems), com o software Cell Quest Pro (Beckton Dickson).. A análise das concentrações das citocinas foi realizada no FCAP Array software v. 3.1 (BD BIOSCIENCES, CA) e expressas em pg/mL.

Análises Estatísticas

A associação dos níveis de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α nos grupos de comparação do estudo foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para correlação dos níveis séricos de citocinas e linfócito T CD4⁺ e CD8⁺ foi utilizado o teste Spearman. Em todas as análises foi utilizado $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no *GraphPad Prism software* v 6.07.

RESULTADOS

A população do estudo, em sua grande maioria é foi de homens, a minoria apresentaram carga viral detectável, uma vez que o estudo foi desenvolvido em PVHIV em tratamento nos últimos 36 meses (Tabela 1).

No âmbito das populações celulares, não foi observada diferença em relação aos linfócitos T CD4⁺, bem como não há diferença na razão CD4:CD8 em PVHIV que estão realizando tratamento. Porém, PVHIV que estão em tratamento antirretroviral com o esquema preferencial que inclui o DTG (Grupo DTG) apresentam níveis absolutos de linfócitos T CD8⁺ elevados ($p=0,01$) e aumento no número absoluto de células que expressam CD45 ($p=0,003$), quando comparados aos indivíduos que não estão realizando tratamento com dolutegravir (Grupo TARV). Porém não é possível atribuir a qual população de linfócitos a expressão de CD45 está relacionada (Tabela 1).

Tabela 1: Características gerais do PVHIV

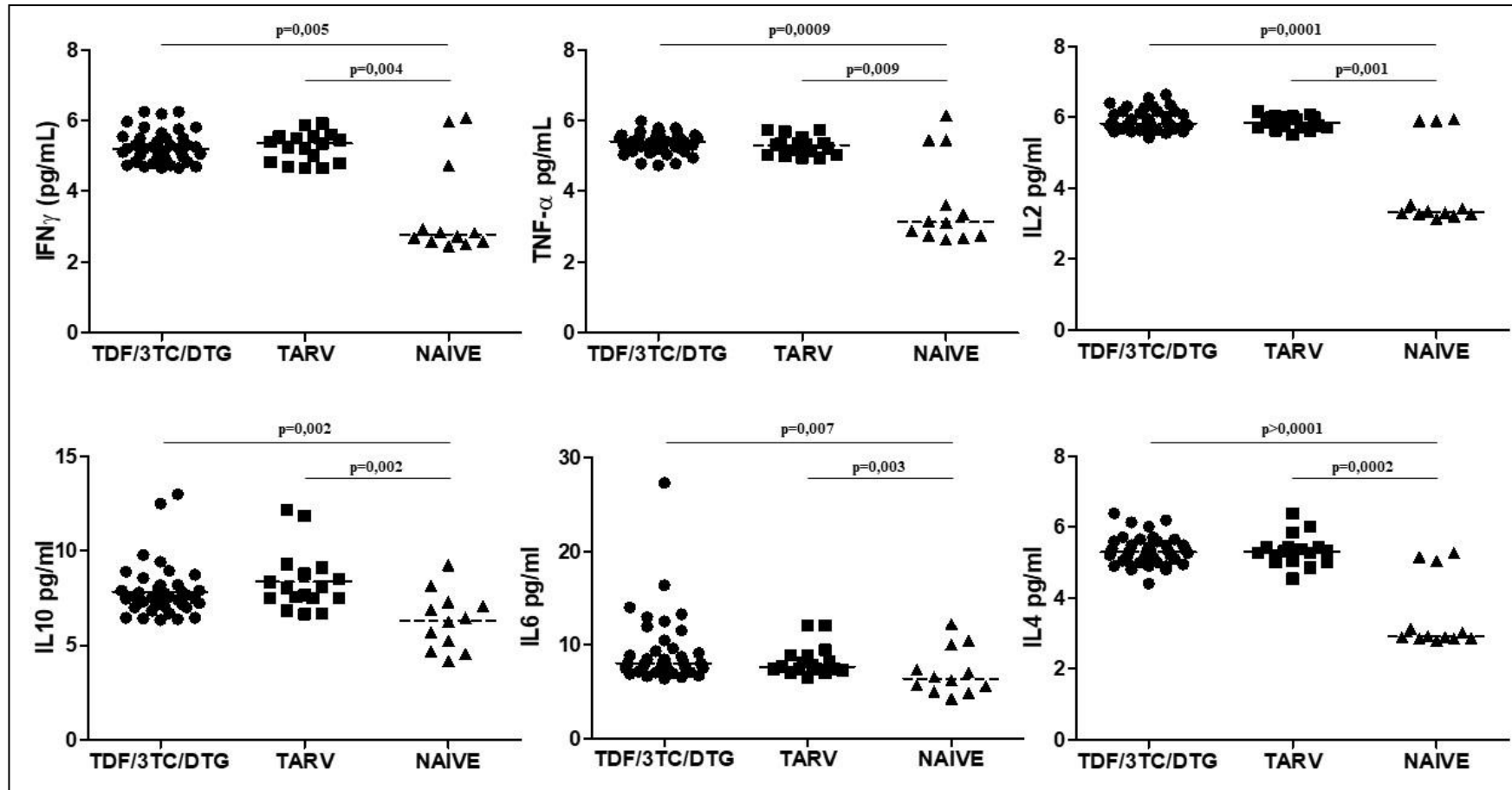
VARIÁVEIS	TDF/3TC/DTG	TARV	p
N	40	17	
Idade (SD)	37,3 ($\pm 9,2$)	35,4 ($\pm 9,9$)	
Sexo			
Feminino	10 (25%)	9 (52,9%)	
Masculino	30 (75%)	8 (47,1%)	
Carga Viral			
Não detectado	29 (72,5%)	10 (58,8%)	
< L. Mínimo	6 (15%)	4 (23,6%)	
Detectado	5 (12,5%)	3 (17,6%)	
CD4			
1ª Contagem	322 (8 - 806)	356 (13 - 802)	0,9861
Última Contagem	569 (53 - 1228)	566 (70 - 1551)	0,6947
CD8			
1ª Contagem	853 (184 - 2104)	851 (304 - 2217)	0,7802
Última Contagem	942 (112 - 3705)	684 (379 - 1179)	*0,01
CD45			
Células/ μ l	2403 (1890 – 2925)	1924 (1556 – 2061)	**0,003
CD4/CD8	0,57 (0,28 – 0,91)	0,65 (0,43 – 1,17)	0,2952

Fonte: o autor; **Legenda:** CD: *Cluster of differentiation*; TDF/3TC/DTG – Esquema tenofovir, lamivudina e dolutegravir; TARV – demais tratamentos antirretrovirais; Análise estatística: Teste de Mann Whitney, considerando $p \leq 0,05$

Quando comparamos as citocinas entre os grupos, observamos que o grupo NAIVE apresentou concentrações menores quando comparados com o grupo TDF/3TC/DTG [$\text{IFN}\gamma$ ($p=0,005$), $\text{TNF}\alpha$ ($p=0,0009$), IL6 ($p=0,007$), IL4 ($p<0,0001$), IL10 ($p=0,002$) e IL2 ($p=0,0001$)]; e quando compara-se com o grupo TARV [$\text{IFN}\gamma$ ($p=0,004$), $\text{TNF}\alpha$ ($p=0,009$), IL6 ($p=0,003$), IL4 ($p=0,002$), IL10 ($p=0,002$) e IL2 ($p=0,001$)]; porém não observamos diferença na comparação do grupo TDF/3TC/DTG com TARV, sugerindo que, independente do esquema terapêutico, pode ocorrer uma melhora na resposta imune frente ao vírus, ou bem como uma característica da própria infecção (Figura 1).

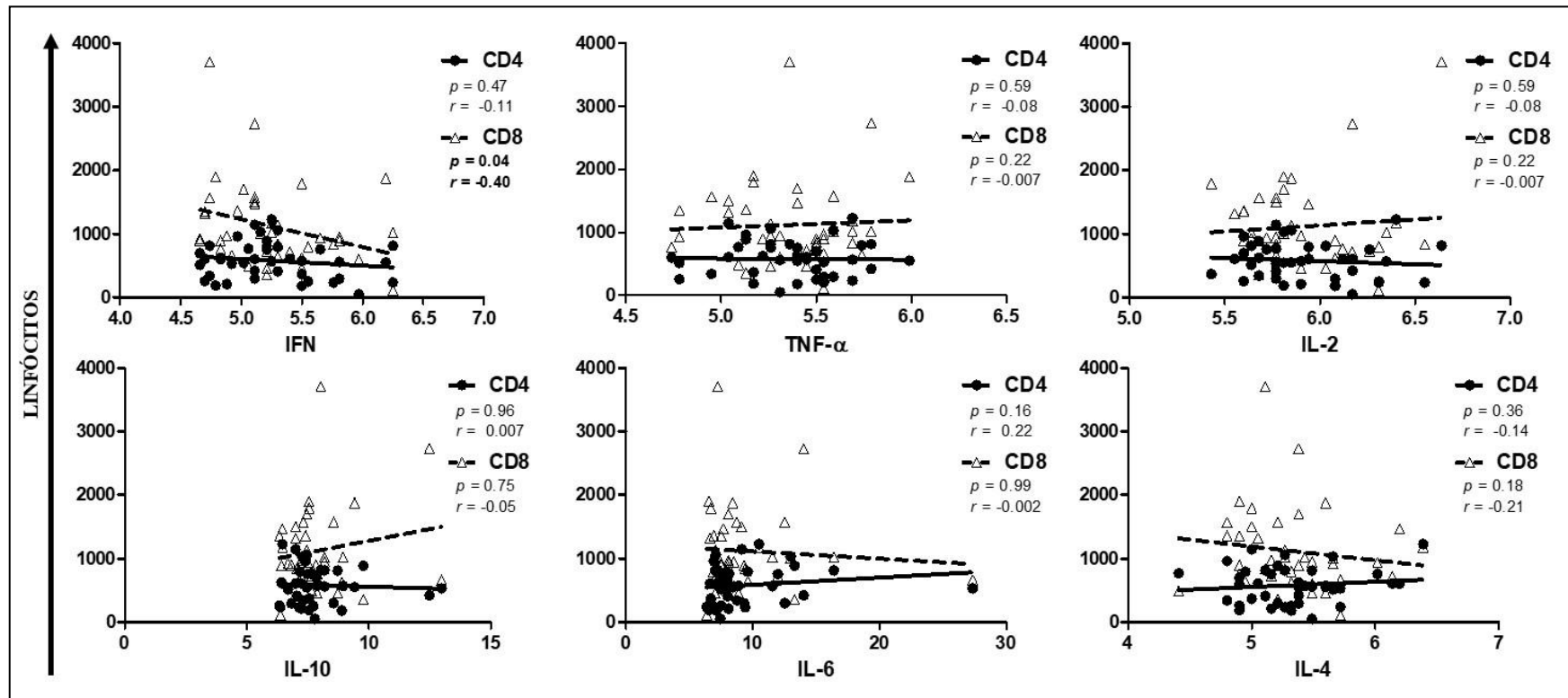
Todavia, quando analisamos a correlação existente entre os níveis de citocinas em PVHIV em tratamento TDF/3TC/DTG com o níveis de linfócitos T CD4^+ e CD8^+ , observamos que ocorre uma correlação negativa dos LTCD8^+ circulantes em relação aos níveis séricos de $\text{IFN}\gamma$ ($p=0,04$; $r = -0.40$) (Figura 2), característica que não ocorre em PVHIV que esteja em outro esquema de TARV (dados não mostrados).

Figura 1 - Detecção dos níveis séricos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α em pessoas que vivem com HIV (PVHIV) em tratamento.



Legenda: TDF/3TC/DTG – Esquema tenofovir, lamivudina e dolutegravir; TARV – demais tratamentos antirretrovirais; NAIVE – indivíduos virgens de tratamento com diagnóstico positivo para o HIV. Análise estatística: Teste de Mann Whitney, considerando $p \leq 0,05$

Figura 2 - Correlação dos níveis séricos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α com as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em indivíduos tratados com TDF/3TC/DTG



Legenda: TDF/3TC/DTG – Esquema tenofovir, lamivudina e dolutegravir; Análise estatística: Teste de Pearson, considerando $p \leq 0,05$

DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado que em PVHIV que receberam terapia antirretroviral TDF/3TC/DTG, apresentam um número elevado de linfócitos T CD8⁺, quando comparados com pacientes que estavam em uso de outro esquema de tratamento. No estudo de Poizot-Martin, et al. (2016), foi avaliado retrospectivamente o impacto dos diferentes esquemas terapêuticos quanto aos níveis de linfócitos TCD8⁺ que mantiveram carga viral indetectável por 24 meses. Os pacientes foram submetidos à TARV de primeira linha com dois ITRN + um inibidor de protease associado à ritonavir, dois ITRN + um ITRNN ou três ITRN e observaram que apesar do controle da viremia, o número das células T CD8⁺ permaneceu reduzido naqueles indivíduos que utilizaram a associação de três ITRN após 24 meses de tratamento (Poizot-Martin et al. 2016). Desta forma, o presente estudo analisou a ação de 2 ITRN e um INI, podendo esta combinação elevar os níveis de LTCD8⁺ quando comparados ao demais tipos de tratamentos.

Outra questão a ser observada é que os indivíduos em tratamento com TDF/3TC/DTG além de apresentar maior frequência de células TCD8⁺, apresentaram carga viral indetectável. Esse achado corrobora com o estudo de Poizot-Martin et al., 2016, que não observaram diferença na comparação entre os nível de carga viral e a contagem de linfócito T CD8⁺, isto é, a quantidade de cópias virias circulantes não afeta o níveis de LTCD8⁺ circulantes, e não seria um estímulo a essa população de linfócito, uma vez que pacientes com carga viral indetectável apresentam níveis elevados de LTCD8⁺. (Poizot-Martin et al. 2016) Em nosso estudo, acreditamos que os níveis elevados de LTCD8⁺ em indivíduos que fazem uso da terapia com DTG, podem estar relacionados à distribuição e penetração da droga no organismo dos pacientes uma vez que tecidos linfoides com baixa penetração da droga, podem ser reservatórios para replicação viral e consequentemente manter os níveis de LTCD8⁺ elevados (Massanella, et al. 2013). Assim, uma análise da biodisponibilidade do dolutegravir no organismo desses indivíduos, principalmente quanto aos tecidos linfoides associados ao trato gastrointestinal se torna necessária para melhor entender os mecanismos de ação do fármaco.

Em relação aos níveis séricos de citocinas, no presente estudo foi observado níveis mais elevados das citocinas IFN γ , TNF α , IL6, IL4, IL10 e IL2, independente do esquema de tratamento, quando comparados a indivíduos HIV⁺ sem tratamento. Logo quando correlacionamos os níveis de citocinas e linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em indivíduos em tratamento TDF/3TC/DTG, apenas foi observada correlação negativa entre os níveis de IFN γ e linfócitos T CD8⁺. Sugere-se que essa resposta pode estar na via de sinalização da

Ubiquitin-specific protease (USP) 18 (também conhecida como UBP43) que é fortemente induzida por interferons do tipo I e III, pelo tipo *Toll-like receptor* (TLR) que reconhece lipopolissacarídeos (LPS) (Kim et al., 2005; MacParland et al., 2016) e por TNF α . O nível dessa proteína se encontra elevado em células após infecção viral ou bacteriana. Seu mecanismo de ação pode ser observado em estudo com camundongos nocaute para proteína USP18 e que foram tratados com vírus da estomatite vesicular (VSV), onde foi observado um aumento na replicação viral na medula espinhal e no cérebro, levando os camundongos a óbito em 1 semana, enquanto camundongos selvagens sobreviveram à infecção (Honke et al., 2011).

No contexto da regulação da USP18, essa proteína reduz a ligação de IFN α à superfície celular e interfere na capacidade do IFNAR2 de recrutar o IFNAR1, resultando na perda de complexos de sinalização na membrana plasmática. Além disso, Liu et al. (2013) relataram que o USP18 regula a ativação de células T e está envolvido na diferenciação de células Th17. Neste estudo, o USP18 regulou negativamente a sinalização do fator nuclear κ B (NF- κ B) nas células T por ligação ao complexo quinase/proteína de ligação a TAK ativada por TGF β (TAB1/TAK1) (Liu et al., 2013). Além disso, o USP18 foi descrito como regulador negativo da sinalização de NF- κ B mediada por TLR. Além disso, o USP18 interage com USP20 e a recruta para estimulador dos genes do interferon (STING). STING está ativado por cGAS (GMP-AMP sintase cíclica) que reconhece o dsDNA no citoplasma após a infecção por um vírus de DNA (ZHANG et al. 2016). Isso sugere um papel de USP18 na regulação positiva da expressão de IFNs do tipo I e citocinas pró-inflamatórias após infecção por vírus de DNA.

Dessa forma, em estudo *in vitro* a atuação de três classes de antirretrovirais na cascata de inflamação em células endoteliais foi observada onde foi proposto que o dolutegravir está envolvido na regulação da proteína USP18, que por sua vez regula a via de NF- κ B (Auclair et al., 2020), logo hipotetizamos que uma das vias de regulação negativa de INF γ esteja relacionada a dinâmica do DTG no organismo dos PVHIV em tratamento, acarretando diminuição na produção dessa citocina por linfócitos T CD8⁺. Porém, esse estudo possui limitações e não apresenta uma análise mais completa desses pacientes em tratamento, sendo a literatura carente sobre o efeito do DTG nas vias metabólicas com repercussão no sistema imune para elucidar a inflamação e senescências das populações de células em PVHIV.

As limitações de nosso estudo devem ser reconhecidas. Primeiro, a natureza exploratória do estudo não permite a generalização dos resultados; o tamanho limitado da amostra e o fato de que não houve randomização dos pacientes incluídos neste estudo, e,

portanto, não se pode descartar que os resultados podem ter sido afetados por variáveis de confusão não mensuradas. Os resultados, sobretudo àqueles que se relacionam aos linfócitos T CD8 e seus subtipos, devem ser melhor investigados em uma população maior de indivíduos, por um período definido e de maneira prospectiva a fim de estabelecer marcadores virológicos, metabólicos e imunológicos que melhor definem o tratamento com TDF/3TC/DTG, com foco no inibidor de integrase e se os mesmos têm impactos diferentes na inflamação.

REFERÊNCIAS

- Auclair, M., Gue'nantin, A-C., Fellahi, S., Garcia, M., Capeau, J., 2020. HIV antiretroviral drugs, dolutegravir, maraviroc and ritonavir-boosted atazanavir use different pathways to affect inflammation, senescence and insulin sensitivity in human coronary endothelial cells. PLoS ONE, 15, e0226924. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226924>.
- Helleberg, M., Kronborg, G., Ullum, H., et al. 2015. Course and clinical significance of CD8+ T-cell counts in a large cohort of HIV-infected individuals. J Infect Dis, 211, 1726–34.
- Honke, N., Shaabani, N., Cadeddu, G., Sorg, U., Zhang, D., Trilling, M., et al., 2011. Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus. Nat. Immunol. 13, 51–57.
- Kim, K., Malakhova, O., Hoebe, K., Yan, M., Beutler., B., Zhang, D., 2005. Enhanced antibacterial potential in UBP43-deficient mice against Salmonella typhimurium infection by up-regulating type I IFN signaling. J. Immunol. 175, 847–854.
- Liu, X., Li, H., Zhong, B., Blonska, M., Gorjestani, S., Yan, M., et al., 2013. USP18 inhibits NF- κ B and NFAT activation during Th17 differentiation by deubiquitinating the TAK1-TAB1 complex. J. Exp. Med., 210, 1575–1590.
- MacParland, S., Ma, X., Chen, L., Khattar, R., Cherepanov, V., Selzner, M., Feld, J., Selzner, N., McGilvray, I., 2016. Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha inhibit interferon signaling in hepatocytes by increasing ubiquitin-like protease 18 (USP18) expression. J. Virol., 90, 5549–5560.
- Massanella, M., Esteve, A., Buzon, M., Llibre, J., Puertas, M., Gatell, J., et al. 2013. Dynamics of CD8 T-cell activation after discontinuation of HIV treatment intensification. J Acquir Immune Defic Syndr. 63, 152–60.

Osterholzer, D. A., Goldman, M. 2014. Dolutegravir: A next-generation integrase inhibitor for treatment of HIV infection. *Clinical Infectious Diseases*. 59, 265– 271.

Poizot-Martin, i., Allavena, C., Delpierre, C., Duvivier, C., Obry-Roguet, V., Cano, C. 2016. First-line cART regimen impacts the course of CD8+ T-cell counts in HIV-infected patients that achieve sustained undetectable viral load. *Medicine*, 95, 41.

Quiros-Roldan, E., Castelli, F., Lanza, P., Pezzoli, C., Vezzoli, M. 2017. Inflammation in HIV Study Group, G. Biasiotto, I. Zanella, The impact of antiretroviral therapy on iron homeostasis and inflammation markers in HIV-infected patients with mild anemia, *J. Transl. Med.* 15, 256.

Rasmussen, T., McMahon, J., Chang, J., Audsley, J., Rhodes, A., Tennakoon, S., et al. 2018. Effect of antiretroviral intensification with dolutegravir on residual virus replication in HIV-infected individuals: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *The Lancet*. [http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3018\(18\)30040-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3018(18)30040-7).

Ribera, E., Podzamczar, D. 2015. Mecanismo de acción, farmacología e interacciones de dolutegravir. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 33, 2-8.

Tassiopoulos, K., Landay, A., Collier, A., et al. 2012 CD28-negative CD4+ and CD8+ T cells in antiretroviral therapy-naïve HIV-infected adults enrolled in adult clinical trials group studies. *J Infect Dis*, 205, 1730–8.

Wada, N. Jacobson, L., Margolick, J., Breen, E., Macatangay, B., Penugonda, S., et al. 2015. The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation. *AIDS*. 463–471.

Wolbers, M., Battegay, M., Hirschel, B., et al. 2007. CD4+ T-cell count increase in HIV-1-infected patients with suppressed viral load within 1 year after start of antiretroviral therapy. *Antivir Ther.* 12, 889–97.

Zhang, M., Zhang, M., Zhang, Q., Zhu, G., Yuan, L., Zhang, D., et al. 2016. USP18 recruits USP20 to promote innate antiviral response through deubiquitinating STING/MITA. *Cell Res.* 26, 1302–1319.

8 CONCLUSÃO

- O tratamento a longo prazo em PVHIV acarreta alterações nos níveis séricos de citocinas independente do tratamento que o indivíduo esteja sendo submetido.
- Os linfócitos T CD8⁺ em PVHIV em tratamento com TDF/3TC/DTG exibem níveis sérico diminuídos de IFN- γ .

REFERÊNCIAS

- AFONSO, P.; AUCLAIR, M.; CARON-DEBARLE, M.; CAPEAU, J. Impact of CCR5, integrase and protease inhibitors on human endothelial cell function, stress, inflammation and senescence. **Antiviral Therapy**. v. 22, p. 645–57, 2017.
- APPAY, V.; SAUCE, D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. **The Journal of Pathology**. v. 214, n. 2, p. 231-41, 2008.
- BARQASHO, B. et al. Kinetics of plasma cytokines and chemokines during primary HIV- 1 infection and after analytical treatment interruption. **British HIV Association HIV Medicine**, v. 10, p. 94–102, 2009.
- BARRÉ-SINOUSSE, F.; ROSS, A. L.; DELFRAISSY, J. F. Past, present and future: 30 years of HIV research. **Nature Reviews**, v. 13, 2013.
- BETTS, M.; NASON, M.; WEST, S.; DE ROSA, S.; MIGUELES, S.; ABRAHAM, J; et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. **Blood**. v. 107, n. 12, p. 4781–9, 2006.
- BÉZIAT, V.; DUFFY, D.; QUOC, S.; LE GARFF-TAVERNIER, M.; DECOCQ, J.; COMBADIÈRE, B.; et al. CD56^{bright}CD16⁺ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. **Journal Immunology**. v. 186, p. 6753-61, 2011.
- BOURGARIT, A.; CARCELAIN, G.; MARTINEZ, V.; et al. Explosion of tuberculin-specific Th1-responses induces immune restoration syndrome in tuberculosis and HIV co-infected patients. **AIDS**, v. 20, n. 2, p. F1–7, 2006.
- BROOKS, K. M. et al. Cytokine-Mediated Systemic Adverse Drug Reactions in a Drug-Drug Interaction Study of Dolutegravir with Once-Weekly Isoniazid and Rifapentine. **The Infectious Diseases Society of America**, 2018.
- BURGER, S.; POLES, M. A. Natural history and pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **Seminars Liver Disease**, v. 23, n. 2, p. 115-24, 2003.
- CALIGURI, M. Human natural killer cells. **Blood**. v. 112, n. 3, p. 461-9, 2008.
- CHERESHNEV, V.A. et al. Pathogenesis and treatment of HIV infection: the cellular, the immune system and the neuroendocrine systems perspective. **International Reviews of Immunology**. v. 32, n. 3, p. 282-306, Jun 2013.
- DEEKS, S. G. et al. HIV infection. **Nature Reviews**. v. 1, p. 1–22, 2015.
- DESIMMIE, B. A. et al. Multiple APOBEC3 Restriction Factors for HIV-1 and One Vif to Rule Them All. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 6, p. 1220–1245, 2013.
- FORSMAN, A.; WEISS RA. Why is HIV a pathogen? **Trends Microbiology**. v. 16, n. 12, p. 555-60, 2000.

GALVIN S. R.; COHEN, M. S. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 33–42. 2004.

GANDHI RT, WALKER BD. Immunogenic control of HIV-1. **Annual Reviews Medicine**. v. 53, p. 149-72, 2002.

GAY, C.; DIBBEN, O; ANDERSON, J.; STACEY, A.; MAYO, A.; NORRIS, P. et al. Cross-Sectional Detection of Acute HIV Infection: Timing of Transmission, inflammation and Antiretroviral Therapy. **Plos One**. v. 6, n. 5, p. e19617, 2011.

JACOBS, E. S. Cytokines Elevated in HIV Elite Controllers Reduce HIV Replication in vitro and Modulate HIV Restriction Factor Expression. *Journal of Virology*, 2017.

JIANG, Y.; ZHOU, F.; TIAN, Y.; et al. Higher NK cell IFN-gamma production is associated with delayed HIV disease progression in LTNPs. **Journal of Clinical Immunology**. v. 33, n. 8, p. 1376–85, 2013.

KLEIN, S.; DOBMEYER, J.; DOBMEYER, T.; PAPE, M.; OTTMANN, O.; et al. Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. **AIDS**. v. 11, p. 1111-8, 1997.

KULLER, L. H. et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. **PLOS Medicine**, v. 5, p. 1496–98, 2008.

KULLER, L.; TRACY, R.; BELLOSO, W.; DE WIT, S.; DRUMMOND, F.; et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. **PLOS Medicine**. v. 5, p. e203, 2008.

LANGEBEEK, N. et al. Predictors and correlates of adherence to combination antiretroviral therapy (ART) for chronic HIV infection: a meta-analysis. **BMC Medicine**. v. 12, n. 142, 2014.

LEDERMAN, M.M.; MARGOLIS, L. The lymph node in HIV pathogenesis. **Seminars in Immunology**. v. 20, n. 3, p. 187-95, 2008.

LEVY, E.; ROBERTI, M.; MORDOH, J. Natural Killer Cells in Human Cancer: From Biological Functions to Clinical applications. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2011.

LEVY, J. A. HIV e a Patogenia da Aids. 2010

LITTWITZ-SALOMON, E.; DITTMER, U.; SUTTER, K. Insufficient natural killer cell responses against retroviruses: how to improve NK cell killing of retrovirus-infected cells. **Retrovirology**. v. 13, n. 77, 2016.

MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **The Lancet**, v. 384, n. 9939, p. 258–271, 2014.

MCDERMOTT, A. B.; KOUP, R. A. CD8(+) T cells in preventing HIV infection and disease. **Aids**, v. 26, p. 1281–1292, 2012.

MENÉNDEZ-ARIAS, L. Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: overview and recent developments. **Antiviral Research**, v. 98, n. 1, p. 93–120, 2013

MINISTÉRIO DA SAÚDE - DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS. **Atualização dos esquemas antirretrovirais para pessoas vivendo com HIV/aids (PVHIV) e indicações de uso ampliado de dolutegravir (DTG) e darunavir (DRV) para composição de esquemas**. Nota informativa nº 096, de 2016/DDAHV/SVS/MS

MINISTÉRIO DA SAÚDE - DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS. **Boletim Epidemiológico: AIDS e DST**. 2018

OSTAPCHUK, Y.; CETIN, E.; PERFILYEVA, Y.; et al. Peripheral blood NK cells expressing HLA-G, IL-10 and TGF-beta in healthy donors and breast cancer patients. **Cell Immunology**. v. 298, n. 1–2, p. 37–46, 2015.

OSTERHOLZER, D. A.; GOLDMAN, M. Dolutegravir: A next-generation integrase inhibitor for treatment of HIV infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 2, p. 265– 271, 2014.
PEGHAM, H.; ANDREWS, D.; SMYTH, M.; DARCY, P.; KERSHAW, M. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. **Immunology Cell Biology**. v. 89, p. 216-24, 2011.

RASMUSSEN, T.; MCMAHON, J.; CHANG, J.; AUDSLEY, J.; RHODES, A.; TENNAKOON, S.; et al. effect of antiretroviral intensification with dolutegravir on residual virus replication in HIV-infected individuals: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. **The Lancet**, 2018.

RIBERA, E.; PODZAMCZER, D. Mecanismo de acción, farmacología e interacciones de dolutegravir. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 33, p. 2-8, 2015.

SACHDEVA, R. K. et al. Effect of Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors on Cytokine, Chemokine, and Immunoglobulin Profiles in Serum and Genital Secretions of HIV-Infected Women. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 30, n. 5, 2010.

SANT, A.; MCMICHAEL, A. Revealing the role of CD4+ T cells in viral immunity. **Journal of Experimental Medicine**. v. 209, n. 8, p. 1391-95, 2012.

SOGHOIAN, D.Z. et al. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. **Science Translational Medicine**. v. 4, n. 123, p. 123ra25, 2012.

STACEY, A. R.; NORRIS, P. J.; QIN, L. 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. **Journal of Virology**, v. 83, p. 3719–33, 2009.

STALTER R. M. et al. Transitioning to Second-Line Antiretroviral Therapy Among Adolescents in Copper belt Province Zambia: Predictors of Treatment Switching and Adherence to Second-Line Regimens. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 2017.

SUBRAMANYAM, S. et al. HIV alters plasma and M. tuberculosis-induced cytokine production in patients with tuberculosis. **Journal of Interferon & Cytokine research**, v. 24, n. 2, p. 101–6, 2004.

TURK G. et al. Early Gag immunodominance of the HIV-specific T-cell response during acute/early infection is associated with higher CD8⁺ T-cell antiviral activity and correlates with preservation of the CD4⁺ T-cell compartment. **Journal of Virology**, v. 87, p. 7445–7462, 2013

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **HIV/AIDS Historical Time line 1981-1990**. [Acesso em 06 dez 2018] Disponível em: <http://www.fda.gov/forpatients/illness/hiv aids/history/ucm151074.htm> [Acesso 05 dez 2018]

UNAIDS/WHO [Internet]. **Global HIV/Aids response: Epidemic Update and health sector progress towards Universal**. Geneva: UNAIDS/WHO; 2018 [Acesso 05 dez 2018]

WU, L.; KEWALRAMANI, V. N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 859–68. 2006.

YAO, Y. et al. The effect of a year of highly active antiretroviral therapy on immune reconstruction and cytokines in HIV/AIDS patients. **Aids Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 4, 2013.

YOUNES, S. A. et al. 2003. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4⁺ T cells endowed with proliferative capacity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, p. 1909–1922, 2003.

ZAITSEVA, M. et al. Interferon gamma and interleukin 6 modulate the susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 3109-17, 2000.

ZENG, M. et al. Lymphoid tissue damage in HIV-1 infection depletes naive T cells and limits T cell reconstitution after antiretroviral therapy. **PLoS Pathology**, v. 8, p. e1002437, 2012.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 445–489, 2010.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Grupo Dolutegravir e Grupo Controle

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa **Avaliação da resposta imunológica de pessoas vivendo com HIV/aids submetidos a tratamento antirretroviral incluindo o dolutegravir**, sob a responsabilidade da pesquisadora Virginia Lorena do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Essa pesquisa pretende entender como pessoas vivendo com HIV respondem ao tratamento antirretroviral contendo a droga Dolutegravir.

Sua participação é muito importante, pois, como portador do HIV, o (a) Sr (a) possui células que reconhecem o HIV (resposta imune). Sua participação neste trabalho é voluntária e se dará através de:

(1) permitir a coleta de até 3 (tres) colheres de chá de sangue (cerca de 15 ml) através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha vermelha (hematoma). O sangue será utilizado para estudar as células da imunidade e seus produtos secretados (quimiocinas e citocinas).

(2) cuidar da sua saúde, ao tomar a medicação conforme recomendação do seu médico respeitando as dosagens e horários pré-estabelecidos;

(3) retornar às consultas médicas conforme instruções do seu médico ou quando sentir qualquer desconforto.

É importante você saber que um pouco da amostra de sangue será guardada e armazenada a -70°C para utilizações em pesquisas futuras. Essas amostras serão utilizadas nas pesquisas futuras com objetivos de: realizar novos estudos que complementem os objetivos aqui propostos a fim de fechar as "lacunas" no entendimento das respostas imunológicas de pessoas vivendo com HIV. Desta forma, se no futuro, sua amostra armazenada for utilizada para outra pesquisa, poderemos entrar em contato para preenchimento de outro TCLE. Informações sobre o andamento e resultados das pesquisas podem ser fornecidas para o (a) Sr (a), quando desejar através das formas de contato conosco, disponibilizadas ao final deste documento.

Garantiremos a confidencialidade das informações prestadas, assim como o anonimato de todos que participarem da pesquisa. Se o(a) Sr(a) aceitar participar, estará contribuindo para a geração de conhecimento sobre o tratamento e resposta imune do HIV/Aids. Caso o(a) Sr(a) não aceite participar da pesquisa o seu atendimento no ambulatório continuará acontecendo normalmente.

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato através do endereço Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Campus da UFPE, Av. Moraes Rego, s/n, pelo telefone (81) 2101-2563 com a pesquisadora Dra Virginia Lorena, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/IAM/FIOCRUZ, telefone (81) 2101-2639.



Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair do projeto quando quiser.

Eu autorizo a utilização dessas amostras estocadas em projetos futuros quando o objetivo do estudo for o mesmo para o qual eu cedi meu sangue: () com a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE; () dispenso a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE.

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 participante

ou

Impressão do dedo polegar

A handwritten signature in black ink, reading "Virginia M. Barros de Lorena".



Virginia Maria Barros de Lorena
CPqAM/Fiocruz
Pesquisadora Responsável
Telefone IAM/Fiocruz: (81) 2101-2563
E-mail: lorena@cpqam.fiocruz.br

ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -
HC/UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da resposta imunológica de pessoas vivendo com HIV/aids submetidos a tratamento antirretroviral incluindo o dolutegravir

Pesquisador: Virginia Maria Barros de Lorena

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 12152919.4.3001.8807

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.608.980

Apresentação do Projeto:

Apresentado de maneira clara e objetiva. Trata-se de projeto de pesquisa que pretende avaliar citocinas e quimiocinas, e as populações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ na resposta imunológica em paciente vivendo com HIV/AIDS (PVHA), submetidos à TARV que incluem o dolutegravir.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o perfil celular e os níveis de citocinas e quimiocinas de pessoas que vivem com HIV (PVHA) em tratamento antirretroviral contendo dolutegravir.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A descrição dos possíveis riscos e benefícios a que serão eventualmente submetidos os participantes voluntários desse projeto, é feita de forma esclarecedora, acessível.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para esclarecer e descrever o papel de terapias antiretrovirais que incluam dolutegravir sobre o sistema imunológico humano, de pacientes com AIDS.

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-901

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-3743

E-mail: cephufpe@gmail.com

**UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -
HC/UFPE**



Continuação do Parecer: 3.608.980

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados em sua integralidade.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO APROVADO PELO CEP

O Protocolo foi avaliado e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Caso a pesquisa seja realizada no âmbito do Hospital das Clínicas, o pesquisador principal deve comparecer ao NAP e solicitar a Carta de Encaminhamento. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP HC/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil. Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP HC/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)	
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.670-901
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-3743	E-mail: cephcupe@gmail.com

**UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -
HC/UFPE**



Continuação do Parecer: 3.608.980

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1431684.pdf	18/09/2019 10:56:01		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinatura_HC.pdf	18/09/2019 10:53:58	Virginia Maria Barros de Lorena	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Formulario_repositorio_dolutegravir.pdf	08/08/2019 21:19:11	Virginia Maria Barros de Lorena	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Grupo_Dolutegravir_Seguimento_convertido.pdf	02/08/2019 12:37:07	Virginia Maria Barros de Lorena	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Grupo_Dolutegravir_controle_convertido.pdf	02/08/2019 12:36:54	Virginia Maria Barros de Lorena	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pos_pendencias.pdf	02/08/2019 12:31:47	Virginia Maria Barros de Lorena	Aceito
Outros	Formulario_EBSERH.pdf	12/04/2019 18:42:40	Virginia Maria Barros de Lorena	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 30 de Setembro de 2019

**Assinado por:
José Ângelo Rizzo
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-3743 **E-mail:** cephcupe@gmail.com