

# O MONITORAMENTO DE CÉLULAS CD4+ E CD8+ ATRAVÉS DA CITOMETRIA DE FLUXO NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

## CD4 + AND CD8 + CELLS MONITORING THROUGH FLUX CYTOMETRY IN HUMAN IMMUNODEFICIENCY (HIV) VIRUS INFECTION

<sup>1</sup>MAGNONI, Mariana Sartori; <sup>2</sup>PINHATA, André <sup>3</sup>GATTI, Luciano Lobo

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Farmácia das FIO, Mestre em Biotecnologia Médica pela Universidade Estadual Paulista – UNESP.

<sup>2</sup>Farmacêutico Hospitalar – Hospital Jesus Maria e José – Bernardino de Campos/SP.

<sup>3</sup>Docente Orientador – Professor Doutor do Curso de Farmácia – Faculdades Integradas de Ourinhos - FIO/FEMM.

### RESUMO

Citometria de Fluxo é uma recente tecnologia que permite avaliar múltiplos parâmetros de partículas geralmente células suspensas em meio fluido, a medida em que a mesma passa por um feixe de luz. Para que essa avaliação ocorra as células devem estar marcadas com anticorpos monoclonais acopladas à um fluorocromo. Atualmente, a citometria de fluxo tem sido muito aplicada tanto na pesquisa quanto na prática clínica, permitindo a análise de amostras diversificadas como sangue, medula óssea, fluidos de cavidades serosas, líquido cefalorraquidiano, urina e até tecidos sólidos. Também utiliza-se a citometria na observação e avaliação de características celulares, conteúdo de DNA e RNA e na investigação de uma grande variedade de receptores e proteínas ligadas a membrana além da identificação de parasitas e microrganismos. O monitoramento imunológico dos pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) por citometria de fluxo é padronizado pelo Ministério da Saúde. Ao longo do curso da infecção, o HIV destrói linfócitos T CD4+ de forma contínua e progressiva permitindo dessa forma, o acompanhamento da quantidade dessas células durante o tratamento com a terapia de antirretrovirais (TARV). A quantidade dessas células na circulação é obtida da combinação dos anticorpos monoclonais anti-CD45/CD3/CD4/CD8. Paralelo é realizado a quantificação da carga viral como um teste complementar no monitoramento da doença e esta é inversamente proporcional à taxa de linfócitos T CD4+.

**Palavras-chave:** Citometria de Fluxo. HIV. Linfócitos T CD4+. Anticorpos Monoclonais.

### ABSTRACT

Flow cytometry is a recent technology that allows to evaluate multiple parameters of particles usually cells suspended in fluid medium, as it passes through a beam of light. For this evaluation to occur the cells must be labeled with monoclonal antibodies coupled to a fluorochrome. Currently, flow cytometry has been widely applied both in research and in clinical practice, allowing the analysis of diversified samples such as blood, bone marrow, serous fluid fluids, cerebrospinal fluid, urine and even solid tissues. Cytometry is also used in the observation and evaluation of cellular characteristics, DNA and RNA contents and in the investigation of a wide variety of membrane-bound receptors and proteins in addition to the identification of parasites and microorganisms. Immunological monitoring of patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) by flow cytometry is standardized by the Ministry of Health. Throughout the course of the infection, HIV destroys CD4+ T lymphocytes in a continuous and progressive way, allowing the Of these cells during treatment with antiretroviral therapy (ART). The amount of these cells in the circulation is obtained from the combination of the anti-CD45 / CD3 / CD4 / CD8 monoclonal antibodies. Parallel is performed quantification of viral load as a complementary test in the monitoring of the disease and this is inversely proportional to the rate of CD4+ T lymphocytes.

**Keywords:** Flow Cytometry. HIV. Lymphocytes T CD4+. Monoclonal Antibodies.

### INTRODUÇÃO

A Citometria de Fluxo é uma forma de assessoramento clínico em diversas áreas como Imunologia, Hematologia, Doenças Neoplásicas, e introduziu uma nova era dentro dos laboratórios de patologia. Essa área resulta da aplicação do

conhecimento de muitas outras áreas como ciência da computação, tecnologia laser, engenharia elétrica, matemática, medicina, biologia, biotecnologia, biologia molecular, produção de anticorpos monoclonais, química orgânica (fluorocrômica) e física. (BERTHO et. al., 2002).

Através da técnica de Citometria de Fluxo, características físicas e imunológicas das células, como expressão de antígenos de superfície da membrana quanto antígenos no interior das células e em diversos tecidos é permitido para auxiliar no diagnóstico de diversas doenças, principalmente em doenças neoplásicas (SANCHES JUNIOR, 2006).

A marcação prévia de células com anticorpos monoclonais fluorescentes permite análise de um tipo celular com uma determinada característica física e/ou química mesmo em amostras heterogêneas de células, e com isso permitido o emprego desta metodologia em várias áreas da hematologia, notadamente na onco-hematologia, na caracterização de marcadores relacionados a processos leucêmicos, em condições de diagnóstico, prognóstico, monitoramento terapêutico, nos transplantes de medula óssea e principalmente na avaliação do conteúdo de células tronco e outras áreas (VIEIRA, et. al., 2003).

O objetivo do presente trabalho é compreender que atualmente a Citometria de Fluxo tem ganhado cada vez mais espaço na prática clínica, tornando-se uma metodologia de grande aplicação em diversas áreas, sendo classificada como padrão ouro no monitoramento imunológico de pacientes HIV positivo.

## **METODOLOGIA**

Este trabalho caracteriza-se como um estudo exploratório, realizado por meio de uma pesquisa bibliográfica. Os artigos científicos utilizados foram acessados na base de dados Scielo e Pubmed publicados nos últimos 10 anos (2006 a 2016), e todos eles internacionais, disponíveis online em texto completo. Como palavras chaves para localização dos mesmos foram utilizadas as seguintes palavras: *contagem de CD4+*, *Citometria de Fluxo*, *Citometria de Fluxo e CD4+*, *Protocolo de Citometria de Fluxo em pacientes infectados com HIV*.

A coleta de dados foi realizada por meio da leitura observatória, e a análise e interpretação dos resultados foram realizadas com base na leitura analítica dos artigos e conteúdos presentes nos livros selecionados, como forma de obter respostas ao problema proposto no trabalho.

## DESENVOLVIMENTO

### **A infecção pelo Vírus HIV-Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS):**

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), é caracterizada por severa imunossupressão do hospedeiro, causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), manifestando-se uma grande variedade de sinais e sintomas (CAVASSANI et. al., 2002).

O HIV ataca células do sistema imunológico responsável por defender o organismo de doenças, as células atingidas são linfócitos T CD4+. O vírus altera o DNA dessa célula e o HIV faz cópia de si mesmo, depois de se multiplicar ele rompe essas células em busca de outros locais pra continuar a infecção. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015)

Refere-se a um retrovírus que pertence à família Lentiviridae e como característica dessa família possui infecção latente a longo prazo das doenças das células e de efeitos citopáticos a curto prazo, produzindo doenças fatais. Dois tipos de HIV foram identificados até hoje o HIV-1 e o HIV-2, sendo o tipo 1 mais comum causador da AIDS (ABBAS et. al., 2011).

As enzimas virais desempenham um papel importante na reprodução do vírus. A transcriptase reversa tem papel fundamental onde a sua função é traduzir o RNA viral em cDNA para que este possa entrar no núcleo das células e iniciar a fabricação das proteínas necessárias para formar outros vírus. Outras duas enzimas também tem papel importante, uma é a integrase responsável pela entrada do vírus na célula e a outra é a protease e sua função é o amadurecimento do vírus após sua saída na célula (ABBAS, 2011).

A atuação do vírus no hospedeiro é caracterizada pela destruição gradual das funções do sistema imune, nitidamente sobre os linfócitos T auxiliares, cuja membrana externa apresenta a proteína CD4+. O processo de replicação do vírus depende da fixação e fusão entre o envoltório externo (gp120) e a membrana celular de linfócitos T auxiliares, macrófagos e células relacionadas do sistema imunológico que possuam em sua superfície a proteína CD4+ (SAVI; SOUZA, 1999).

O período entre a exposição do vírus é estimada de três a seis semanas e pode apresentar febre e mal-estar sintomas típicos de uma infecção aguda qualquer. Após esse período cerca de 8 a 12 semanas, inicia-se a produção de anticorpos (MUNIZ et al., 2008).

No período de latência do vírus o indivíduo infectado não possui qualquer sintoma e é marcado pela forte interação entre o sistema imune e as constantes e rápidas mutações do vírus. Desenvolve-se a seleção natural da mutação viral e os vírus tornam-se mais resistentes ao sistema imune. Amostras de pacientes HIV positivos em estágios avançados de AIDS parecem mais virulentas e infectam mais células do que no início da infecção e estão propensos à doenças oportunistas. Na fase final a redução crítica de linfócitos T CD4<sup>+</sup> estão abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> de sangue, sendo que adultos saudáveis possuem de 800 a 1200 células e surgem então os sintomas típicos da AIDS como diarreia persistente, dores de cabeça, contrações abdominais, febre, falta de coordenação, náuseas, vômitos, fadiga extrema, perda de peso, câncer (MUNIZ et. al., 2008).

A infecção acontece quando uma glicoproteína de uma partícula viral liga-se tanto a célula T CD4<sup>+</sup> quanto a um co-receptor que é um membro da família de receptor de quimiocinas. As partículas virais estão no sangue, no sêmen ou em outros fluidos corporais de um indivíduo e são introduzidas em outro indivíduo por contato sexual, picadas de agulhas ou passagem transplacentária (ABBAS, 2011).

O gene Env do HIV é um complexo composto de uma subunidade gp41 transmembrânica e de uma subunidade gp120 externa e associada sem covalência. Esse complexo medeia um processo de múltiplas etapas de fusão do envelope do vírion com a membrana da célula-alvo. A primeira etapa desse processo é ligação da gp120 com a célula CD4<sup>+</sup>, que induz uma mudança de conformação que promove ligação secundária de gp120 com um co-receptor de quimiocina. A ligação do co-receptor induz uma mudança de conformação em gp41 que expõe uma região hidrofóbica chamada de peptídeo de fusão, que permite a ligação da membrana do vírus com a membrana da célula a ser infectada (ABBAS, 2011).

O complexo gp120/gp41 são expressos na membrana plasmática de células infectadas antes de o vírus ser liberado, podem mediar a fusão célula-célula com uma célula expressora de CD4 e co-receptor não-infectado e os genomas do HIV podem, assim se ser passados diretamente entre as células fundidas (ABBAS, 2011).

Em muitos indivíduos infectados pelo HIV há uma evolução da produção de vírus que usa o CCR5 no começo da doença para o vírus que se liga a CXCR4 em estágios mais avançados da doença (ABBAS, 2011).

A importância do CCR5 na infecção pelo HIV in vivo é apoiada pelo achado de que indivíduos que não expressam este receptor, devido a mutações genéticas são resistentes à infecção pelo HIV.

Uma vez que o vírion do HIV penetra em uma célula, as enzimas dentro do complexo de nucleoproteína tornam-se ativas e iniciam o ciclo de replicação. O centro de nucleoproteína do vírus é perturbado, o genoma de RNA do HIV é transcrito para uma forma de DNA de dois cordões pela transcriptase reversa do vírus, e o DNA viral penetra o núcleo. A integrase viral também penetra o núcleo e catalisa a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira. O DNA integrado do HIV é chamado de pró-vírus e este pode permanecer inativo, em termos de transcrição durante meses ou anos com pouca ou nenhuma produção de novas proteínas virais ou vírions e assim a infecção por HIV de um indivíduo pode ser latente (ABBAS, 2011).

O início da transcrição do gene de HIV nas células T está ligado à ativação fisiológica de células T por antígenos ou citocinas (ABBAS, 2011).

A transcrição de genes pró-vírus de DNA integrado é regulada pela LTR à corrente dos genes estruturais dos vírus e citocinas ou outros estímulos para células T e macrófagos aumentam a transcrição genética do vírus (ABBAS, 2011).

A estimulação de TCR e citocina da transcrição do gene de HIV provavelmente envolve a ativação de NK- $\kappa\beta$  a sua ligação à seqüências de LTR, e esse fenômeno é importante para a patogênese da AIDS, porque a resposta normal de uma célula T com infecção latente a um microrganismo pode ser via para o termino da latência e o período de produção de vírus e a infecção de células adicionais (ABBAS, 2011).

A síntese de partículas virais maduras e infecciosas inicia-se depois que transcrições completas de RNA viral são produzidas e os genes expressos como proteínas. Os mRNAs que codificam as varias proteínas do HIV derivam de uma única transcrição completa de todo o genoma, por eventos diferenciais de junção. A expressão do gene do HIV pode ser dividida em um estágio inicial durante o qual os genes reguladores são expressos e um estágio final no qual os genes estruturais são expressos e genomas virais completos são acumulados (ABBAS, 2011)

Após a transcrição de vários genes do vírus, as proteínas virais são sintetizadas no citoplasma. A montagem das partículas virais começa pelo acúmulo de transcrições completas de RNA no genoma pró-viral, dentro de um complexo de nucleoproteínas que inclui varias proteínas e esse complexo a seguir é envolto por um

envelope de membrana e liberado da célula por um processo de brotação a partir da membrana plasmática. A taxa de produção de vírus pode alcançar níveis suficientemente altos para causar a morte celular (ABBAS, 2011).

### **Transmissão do HIV e Epidemiologia da Aids.**

Os modos de transmissão do HIV são de um para outro indivíduo são as principais características da epidemiologia da AIDS. A transmissão do vírus se dá por três vias principais e uma delas é o contato sexual íntimo entre casais heterossexuais ou entre homossexuais masculinos. A segunda via é a inoculação de um recipiente com sangue infectado ou produtos sanguíneos, agulhas compartilhadas. E a terceira via é a transmissão de mãe pra filho e é a maioria dos casos pediátricos de AIDS. Esse tipo de transmissão ocorre mais frequentemente intraútero, embora a transmissão pelo leite materno também seja possível (MACHADO et. al., 1992).

Alguns grupos importantes e de risco para o desenvolvimento da AIDS nos EUA incluem homens homossexuais, bissexuais, viciados em drogas endovenosas, parceiros heterossexuais de membros de outros grupos de risco e bebês nascidos de mães infectadas. Profissionais da saúde tem um aumento no risco de infecção. Na África o maior índice de infecção é de um parceiro pra outro em casais heterossexuais (SILVA et. al., 2006).

### **Citometria de Fluxo**

Conceitua-se Citometria de Fluxo como metodologia que mede e analisa simultaneamente múltiplos parâmetros de partículas individuais, geralmente células suspensas em meio fluido, a medida que a mesma passa por um feixe de luz. Dessa forma células da amostra em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos que permitem a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência (BACAL; FALHAUBER, 2003; VIEIRA et al., 2003; NAKAGE et al., 2005).

A Citometria de Fluxo permite evidenciar e caracterizar eventos como antígenos fixados em superfície de células, ou partículas quando tratadas com anticorpo monoclonal acoplados com fluorocromo (GOLIM et al., 2007).

Atualmente, a citometria de fluxo tem sido muito aplicada tanto na pesquisa quanto na prática clínica, permitindo a análise de amostras diversificadas como sangue, medula óssea, fluidos de cavidades serosas, líquido cefalorraquidiano, urina

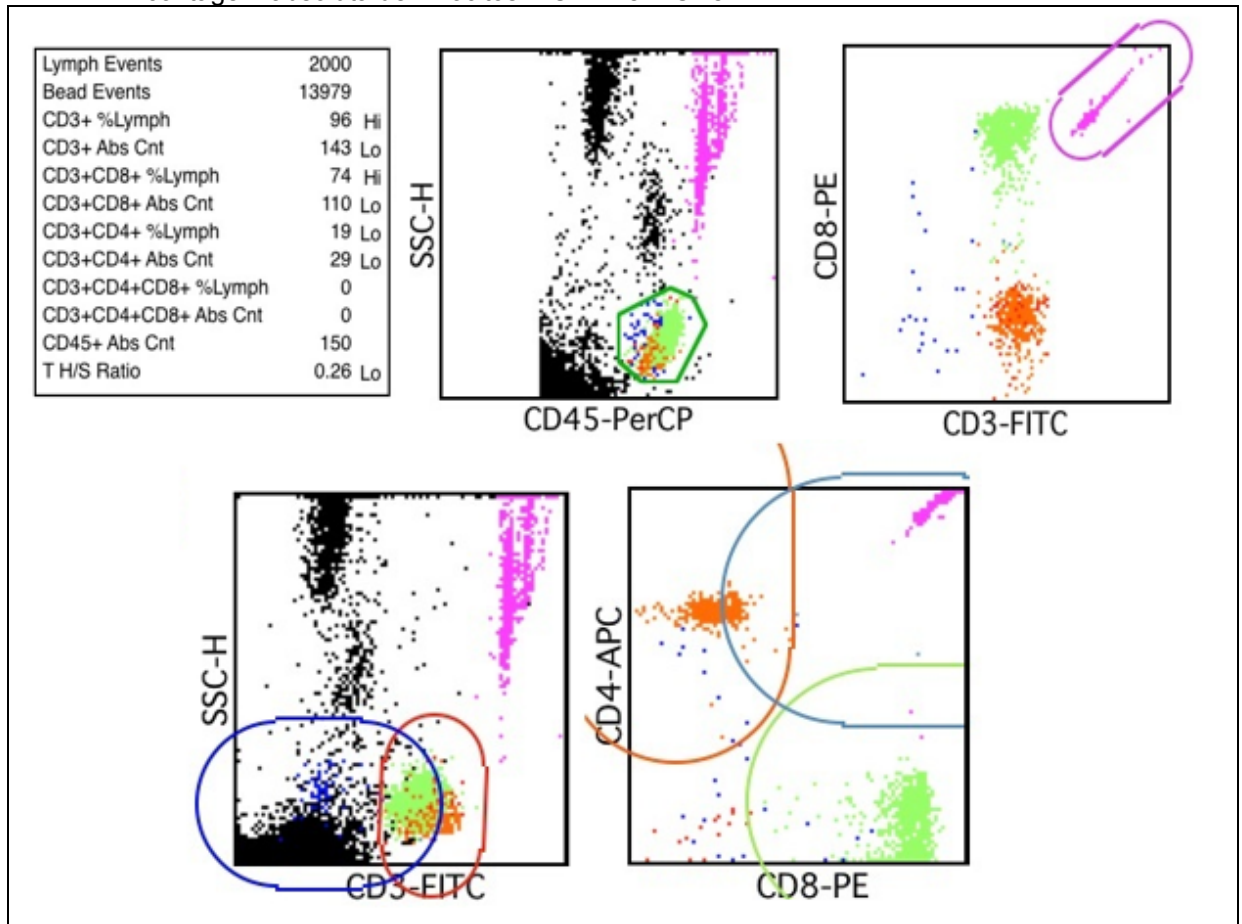
e até tecidos sólidos. Também utiliza-se a citometria na observação e avaliação de características celulares, conteúdo de DNA e RNA e na investigação de uma grande variedade de receptores e proteínas ligadas a membrana além da identificação de parasitas e microrganismos (SANTOS et al., 2014).

### **Contagem de Linfócitos de T CD4+ e a Terapia Antirretroviral para pacientes infectados com HIV**

O monitoramento imunológico dos pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) por citometria de fluxo é padronizado pelo Ministério da Saúde. Ao longo do curso da infecção, o HIV destrói linfócitos T CD4+ de forma contínua e progressiva permitindo dessa forma, o acompanhamento da quantidade dessas células durante o tratamento com a terapia de antirretrovirais (TARV). A quantidade dessas células na circulação é obtida da combinação dos anticorpos monoclonais anti-CD45/CD3/CD4/CD8. Paralelo é realizado a quantificação da carga viral como um teste complementar no monitoramento da doença e esta é inversamente proporcional à taxa de linfócitos T CD4+ (SANTOS et al., 2014).

A quantificação de linfócitos T CD4+ e T CD8+ é realizada em Citômetro de Fluxo modelo FACSCalibur® (BD Bioscience) 4 cores, com anticorpos monoclonais acoplados aos seguintes fluorocromos: CD45-PerCP, CD3-FITC, CD4-APC e CD8-PE. O software de leitura das amostras é o Multiset®, onde as análises são realizadas e liberadas em valores absolutos e em percentuais (BRAZ-ROSSO, 2013) (Figura 1).

**Figura 1.** Quantificação de Linfócitos T CD4+ e T CD8+ por Citometria de Fluxo. As populações celulares evidenciadas nas cores laranja e verde são populações de linfócitos. Populações evidenciadas em rosa são beads de poliestireno utilizadas na metodologia para realizar a contagem absoluta de linfócitos T CD4+ e T CD8+.



FONTE: Arquivo Pessoal

### Contagem de Linfócitos de T CD4+ e a Terapia Antirretroviral para pacientes infectados com HIV

A instituição da terapia antiretroviral (TARV) tem por objetivo diminuir a morbidade e mortalidade, melhorando a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes e não erradicar a infecção pelo HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Segundo dados presentes nas Diretrizes terapêuticas do Ministério da Saúde (2013), pacientes com CD4+ abaixo ou igual a 500 células/mm<sup>3</sup> devem iniciar a TARV, e quanto mais próxima a contagem de 200 células/mm<sup>3</sup>, maior risco de progressão para AIDS. É salutar evidenciar que um dos maiores problemas continua sendo o diagnóstico tardio da infecção pelo HIV, onde no Brasil, dados mostram que cerca de 30% dos indivíduos se apresentam com primeiro CD4 abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). A contagem de linfócitos T CD4+ torna-se importante em algumas situações: Na co-infecção tuberculose e HIV, para definir a



urgência do tratamento antirretroviral, que deve se iniciar em até duas semanas para pacientes com CD4 abaixo de 50 células/mm<sup>3</sup>; No contexto das hepatites virais crônicas, principalmente hepatite C e decisões terapêuticas; Para definir a necessidade de infecções oportunistas; Para pacientes com baixa adesão, que interrompem o tratamento, abandonam e retornam ao sistema de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Diretrizes internacionais recentes salientam que pacientes que alcançaram a supressão viral e recuperação imunológica, podem optar pelo benefício de dispensar o monitoramento de CD4, porém não sua extinção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com base no levantamento bibliográfico, foi possível compreender a importante contribuição de novas metodologias no cenário clínico. A Citometria de Fluxo há anos é utilizada como metodologia na contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+, porém atualmente, a mesma vem sendo aplicada em outras áreas não somente na infectologia, mas também das análises clínicas, hematologia, medicina veterinária, não perdendo seu espaço privilegiado na pesquisa acadêmica.

### **REFERÊNCIAS**

- ABBAS A.K., LICHTMAN A.H. *Imunologia Celular e Molecular*. 7ª edição. Elsevier. Rio de Janeiro. 2011, 549 p.
- BACAL, N. S.; FAULHABER, M. H. W.; **Aplicação prática em Citometria de Fluxo**, 1ª Ed, São Paulo: Atheneu, p. 94, 2003.
- BRAZ-ROSSO, A. M. M. et al. **Teste de SIA no Monitoramento de Pacientes HIV+**. Encontro Nacional de Biomedicina. Botucatu. 2013.
- CAVASSANI, V. G. S. et. al. Candidíase oral como marcador prognóstico em pacientes portadores do HIV. **Rev Bra Otorrinolaringol**. v.68, n.5, p.630-4, 2002.
- GOLIM, M. A. et. al. Conjugação e validação de controle isotópico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. v.29, n.4, p.361-68, 2007.
- MACHADO, A. A. et. al. Risco de Infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em profissionais da saúde. **Rev. Saúde Publ**. v.26, n.1, p.54-6, 1992.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo hiv em adultos: 2013**. Brasília/DF. 2015, 227p.

MUNIZ J. N. et al. Aspectos epidemiológicos da co-infecção tuberculose e vírus da imunodeficiência humana em Ribeirão Preto (SP) de 1998 a 2003. **J Bras Pneumol**, v.32, p.529-34, 2006.

NAKAGE, A. P. M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**. v.35, n.4, p.966-73, 2005.

SANCHES JÚNIOR, J. A. **Avaliação morfológica e imunofenotípica de linfócitos no sangue periférico de doentes com eritrodermia: pesquisa de perfil indicativo para diagnóstico de micose fungóide**. 2006. 105p. Tese para Livre docência. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006.

SANTOS, A. M. et al. **Citometria de fluxo: imunofenotipagem e avaliação de células citotóxicas na resposta a patógenos**. Rio de Janeiro, 2014. 98p. (Curso de Verão).

SAVI, M.A., SOUZA, T.R.A. Dinâmica e Interação entre o sistema imunológico e o vírus HIV. **Rev. Mil Cien Tecn.** v.16, n.3., p.15-26, 1999.

SILVA, R. M., ROSA, L., LEMOS, R. N. Alterações radiográficas em pacientes com a co-infecção vírus da imunodeficiência humana/tuberculose: relação com a contagem de células T CD4+. **J Bras Pneumol**, v.32, n.1, p.228-33, 2006.

VIEIRA, L.M.; DUSSE, L. M. S.; FILHO, O. A. M.; CARVALHO, M. G. Otimização da técnica de Citometria de Fluxo para análise do fator tissular em monócitos de sangue periférico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.25, p. 141-147, 2003.