Boletim Epidemiológico Paulista

10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

Relato de experiência

# Desafios e contribuição do Laboratório de Imunologia Celular do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo nos primeiros anos da epidemia de AIDS no Brasil

Challenges and contribution of the Cellular Immunology Laboratory of the Instituto Adolfo Lutz of São Paulo in the early years of the AIDS epidemic in Brazil

Adele Caterino-de-Araujo

Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, São Paulo, Brasil

**Autor para correspondência**
Adele Caterino-de-Araujo
E-mail: adele.caterino@ial.sp.gov.br
Instituição: Instituto Adolfo Lutz (IAL)
Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355, 11º andar, CEP: 01246-902. São Paulo-SP, Brasil

**Como citar**
Caterino-de-Araujo A. Desafios e contribuição do Laboratório de Imunologia Celular do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo nos primeiros anos da epidemia de AIDS no Brasil. BEPA, Bol. epidemiol. paul. 2023; 20: e39498. doi: https://doi.org/10.57148/bepa.2023.v.20.39498

Primeira submissão: 04/08/2023 • Aceito para publicação: 09/08/2023 • Publicação: 10/08/2023

Editora-chefe: Regiane Cardoso de Paula



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

## Resumo

No ano em que se comemora 40 anos da implantação do primeiro Programa de AIDS em São Paulo, não poderia deixar de relatar os desafios e a contribuição concedida pelo Laboratório de Imunologia Celular do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, no período que antecedeu a identificação e o isolamento do HIV; portanto, quando não havia testes disponíveis no mercado nacional e internacional para o diagnóstico laboratorial sorológico e molecular desta infecção/doença. O perfil imunológico celular dos 111 primeiros casos suspeitos de AIDS de São Paulo foi avaliado pela contagem de linfócitos T e B, subpopulações de linfócitos T (T4 e T8), cálculo da razão T4/T8, e teste de proliferação de linfócitos (cultura de linfócitos) após estímulo com mitógenos e antígeno PPD. Os resultados obtidos mostraram um perfil imunológico celular característico dos casos de AIDS: leucopenia, linfopenia, diminuição do número de linfócitos T4 e aumento de T8, inversão da relação T4/T8, e resposta diminuída de proliferação de linfócitos frente à mitógenos e PPD, corroborando resultados laboratoriais dos casos de AIDS publicados pelo CDC de Atlanta, EUA. Posteriormente, o laboratório dedicou-se ao diagnóstico de infecção perinatal pelo HIV, padronizando a técnica de secreção induzida de anticorpos *in vitro* (IVIAP), capaz de detectar anticorpos anti-HIV produzidos por linfócitos B de crianças infectadas, diferenciando-os daqueles passivamente adquiridos da mãe durante a gestação. A IVIAP mostrou alta sensibilidade e especificidade, podendo ser usada no diagnóstico de infecção pelo HIV em crianças com mais de dois meses de idade.

**Palavras-Chave:** HIV, AIDS, resposta imune celular, diagnóstico, grupos de risco, transmissão vertical.

## Abstract

In the year of the 40th anniversary of the implementation of the first AIDS Program in São Paulo, I could not miss the occasion to report the challenges and contribution of the Cellular Immunology Laboratory of the Instituto Adolfo Lutz (IAL) of São Paulo, in the phase that preceded the identification and isolation of HIV; therefore, when there were no laboratorial serological and molecular tests in national and international market for the diagnosis of this infection/disease. The cellular immunological profile of the first 111 AIDS suspected cases from São Paulo was evaluated by counting T and B lymphocyte, subpopulations of T lymphocytes (T4 and T8), T4/T8 ratio calculation, and lymphocytes proliferation analysis (lymphocytes culture) after stimulation with mitogens and PPD antigen. The obtained results disclosed an immunological profile characteristic of AIDS cases: leukopenia, lymphopenia, decrease in the number of T4 and increase in the number of T8 lymphocytes, inversion of the T4/T8 ratio, and reduced lymphocytes proliferation response to mitogens and PPD, corroborating laboratorial findings description of AIDS cases published by the CDC, Atlanta, USA. Subsequently, the laboratory conducted studies on the diagnosis of perinatal HIV infection, standardizing an *in vitro* induced antibody secretion (IVIAP) technique, capable of detecting anti-HIV antibodies produced by B lymphocytes from infected children, and differentiating them from those passively acquired from the mother during pregnancy. IVIAP showed high sensitivity and specificity and could be used in the diagnosis of HIV infection in children older than two months of age.

**Keywords:** HIV, AIDS, cellular immune response, diagnosis, risk groups, vertical transmission.



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

## Histórico

No ano de 1981 foram descritos casos de imunodeficiência grave, com perda acentuada de linfócitos T auxiliadores/indutores (à época denominados T4 ou OKT4, e posteriormente, T CD4+) e falha de resposta imune celular *in vivo* e *in vitro* em homens homossexuais que apresentaram pneumocistose e/ou sarcoma de Kaposi, e em seguida, em homens heterossexuais usuários de heroína injetável.[1,2] Em 1982, foram registrados casos da nova doença em Haitianos do sexo masculino e feminino[3] e em hemofílicos,[4] e pelo seu caráter universal ela recebeu o nome de *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS).[5] Vários vírus foram tentativamente apontados como possíveis causas da AIDS (*Citomegalovirus*, CMV; *Eptein-Barr virus*, EBV; e *Human T-cell leukemia virus,* HTLV); no entanto, estes eram apenas vírus oportunistas associados à nova doença.

Em 1983, na França, Barré-Sinoussi e colaboradores liderados pelo Prof. Luc Montaigner, isolaram um retrovírus de linfonodo de um caso de linfadenopatia generalizada (*lymphadenopathy syndrome*, LAS), que na época caracterizava a fase pré-AIDS, e o denominaram *lymphadenopathy associated virus* (LAV).[6] Para o isolamento, utilizaram cultura de linfócitos acrescida de fator de crescimento de células T, fitohemaglutinina e anti-α-interferon. Como se tratava de um provável caso de AIDS, não foi possível naquele momento confirmar seu papel na etiologia da AIDS.[6] Vale ressaltar que a técnica de cultura empregada pelos franceses para o isolamento deste vírus foi possível graças às descobertas feitas anteriormente por norte-americanos: transcriptase reversa, fator de crescimento de células T humanas, e identificação, isolamento e cultura do primeiro retrovírus humano, o HTLV. O HTLV foi isolado de casos de leucemia/linfoma de células T, em 1979, pelo grupo do Prof. Robert Gallo.[7] Em 1982, o mesmo grupo isolou um segundo retrovírus humano de um caso de tricoleucemia de células T; este recebeu a denominação HTLV-II.[8] Em 1983, Gallo e colaboradores isolaram o HTLV de um caso de AIDS, contudo, não afirmaram que este vírus seria o agente etiológico da AIDS, apenas sugeriram que poderia ser um retrovírus semelhante à família dos HTLV, já que eles apresentavam tropismo por células T, e estas células eram as mais comprometidas nos casos de AIDS.[9]

A confirmação de que um retrovírus humano era o agente causal da AIDS se deu em 1984, quando o grupo do Prof. Gallo detectou, isolou e produziu partículas virais de um terceiro retrovírus humano (por eles denominado HTLV-III) utilizando linfócitos de vários casos pré-AIDS (LAS/ AIDS *related complex*, ARC) e AIDS. Diferentemente do observado nas infecções por HTLV-I e HTLV-II que resultavam em proliferação de linfócitos, o HTLV-III mostrava efeito citopático em linfócitos T4.[10,11] A cultura em larga escala do HTLV-III possibilitou a produção de teste sorológico para seu diagnóstico. Como LAV e HTLV-III eram o mesmo vírus, em 1986 ele recebeu a denominação *human immunodeficiency virus* (HIV). Após várias polêmicas



Acesso aberto



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

relacionadas à descoberta do HIV, em 1987, norte-americanos e franceses declararam descoberta conjunta do HIV e o teste sorológico teve seus direitos autorais e de propriedade intelectual reconhecido para ambos.

No Brasil, o primeiro Programa de AIDS foi criado em agosto de 1983, no Instituto de Saúde da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, durante a gestão do Prof. Dr. João Yunes (Secretário de Saúde), após pressão de alguns intelectuais homossexuais preocupados com o surgimento da AIDS nos EUA e sua chegada ao Brasil.[12] Nesta ocasião, em virtude de número elevado de casos de sarcoma de Kaposi descritos na literatura, foi designada como coordenadora do Programa a Divisão de Hansenologia e Dermatologia Sanitária, na pessoa de seu diretor Dr. Paulo Roberto Teixeira.[12] O Programa inicialmente foi denominado Programa Estadual de Controle e Prevenção de DST/AIDS (PE DST/AIDS), com estrutura multidisciplinar compreendendo as áreas de: Assistência, Educação, Epidemiologia, Laboratório, Política Pública e Prevenção, tornando-se serviço de referência nacional e das Américas Central e do Sul. Ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo coube o componente Laboratório do Programa, tendo como atribuição padronizar e implantar tecnologias utilizadas na detecção de marcadores imunológicos, virológicos, parasitológicos, celulares e moleculares para diagnóstico, prognóstico e monitoramento de pacientes, assim como das infecções oportunistas associadas à AIDS.[12]

Como na época, o agente etiológico da AIDS não havia sido identificado, ainda não existiam testes para o diagnóstico sorológico e molecular da AIDS. Coube, então, ao Laboratório de Imunologia Celular da Seção de Imunologia do IAL dar suporte ao diagnóstico e monitoramento de casos suspeitos de AIDS, avaliando marcadores de imunidade celular: número de linfócitos T e B e de subpopulações de linfócitos T (T4 e T8, também conhecidos à época como "OKT4 e OKT8", e posteriormente denominados T CD4+ e T CD8+), relação de células T4/T8, e a proliferação de linfócitos (teste de transformação blástica de linfócitos em cultura) quando estimulados por mitógenos e antígenos.

Há que se destacar a participação da Dra. Mirthes Ueda (Chefe da Seção de Sorologia) coordenadora da área de Laboratório do PE DST/AIDS e dos Diretores da Divisão de Biologia Médica e da Diretoria Geral do IAL; Dr. Eliseu Alves Waldman e Dr. Pedro Paulo Chieffi, respectivamente, que não mediram esforços para que o PE DST/AIDS – componente Laboratório fosse implantado e tivesse êxito.

Os desafios enfrentados pelo IAL foram grandes. Havia falta de conhecimento de medidas de segurança para manipular material potencialmente infectado e desconhecido, tanto a nível individual (EPI) como coletivo (Cabines de Segurança e Laboratórios de Segurança Biológica NB2 e NB3). Também houve necessidade de atualização bibliográfica praticamente diária do inusitado agente e da nova doença; carência de insumos e equipamentos para padronização de novas



Acesso aberto



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

metodologias; entre outros. Todavia, o IAL suplantou tais desafios graças à inestimável participação dos funcionários e das estruturas de todas as Seções que compunham a Divisão de Biologia Médica e Divisão de Patologia, assim como dos Serviços Básicos e da Diretoria de Administração.

## Desafios e Contribuições do Laboratório de Imunologia Celular - I

As técnicas de quantificação de linfócitos T e B e o teste de transformação blástica de linfócitos (cultura de linfócitos estimulados com mitógenos e antígenos), já haviam sido padronizadas e vinham sendo utilizadas para pesquisa de outros agravos de interesse em saúde pública, constando das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, do ano de 1982.[13]

Para a quantificação de subpopulações de linfócitos T4 e T8, houve necessidade de padronização e implantação da técnica, e a compra dos anticorpos monoclonais (AcMo) direcionados aos antígenos de superfície específicos de cada subpopulação de linfócitos T. Estes anticorpos foram adquiridos pelo PE DST/AIDS da empresa Becton Dickinson (representante no Brasil), sendo que o AcMo Leu3a identificava linfócitos T4 e o AcMo Leu2a identificava linfócitos T8. A técnica a ser padronizada referia-se à imunofluorescência direta (IFD) e eram necessárias duas preparações para a contagem destas células, uma vez que os dois AcMo vinham marcados com o mesmo fluorocromo (isotiocinato de fluoresceína, cor verde). Posteriormente, o AcMo Leu2a foi marcado com ficoeritrina (cor vermelha) e isto facilitou a visualização das duas populações de linfócitos em uma mesma preparação, otimizando tempo de leitura e material do paciente. Outrossim, durante a padronização desta técnica observou-se movimentos de membrana com formação de *caps* e posterior incorporação no interior das células do complexo Leu3a–CD4 e Leu2a–CD8; isto foi solucionado adicionando-se azida sódica à preparação. Com o aperfeiçoamento da metodologia de IFD, foram determinados os valores normais de T4 e T8 utilizando amostras de sangue de pessoas do Laboratório, aparentemente sadias, e a técnica passou a ser empregada nos casos suspeitos de AIDS, e posteriormente no monitoramento da infecção pelo HIV.

Cabe sublinhar que os pedidos médicos de avaliação do perfil imunológico dos pacientes atendidos pelo PE DST/AIDS não apresentavam dados epidemiológicos tampouco clínicos dos pacientes, e, portanto, os exames eram conduzidos às cegas.

Em 1985, decidiu-se realizar uma análise dos resultados dos 111 primeiros casos enviados pelo PE DST/AIDS ao IAL. Com auxílio dos médicos do Instituto de Saúde, os pacientes foram agrupados em: RISCO (23 homens expostos ao risco sexual por serem homossexuais/bissexuais e quatro mulheres parceiras de pacientes com AIDS); LAS/ARC (36 homens e uma mulher com linfadenopatia generalizada e persistente e com sintomas inespecíficos como febre, mal-estar



Acesso aberto



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

geral, diarreia e perda de peso), e AIDS (47 homens homossexuais/bissexuais com infecções oportunistas e/ou sarcoma de Kaposi). Os resultados obtidos foram comparados com um grupo Controle (n=11). A descrição da casuística do estudo, dos resultados alcançados e das análises estatísticas fomentaram a primeira Dissertação de Mestrado sobre esta matéria feita no Brasil, apresentada à Escola Paulista de Medicina (atualmente Universidade Federal de São Paulo), área de Microbiologia e Imunologia, em 1985,[14] e parcialmente publicada.[15] Com ela, foi possível traçar o perfil imunológico característico dos casos de AIDS que incluíram: leucopenia, linfopenia, diminuição do número de linfócitos T e B e de linfócitos T4, aumento percentual de linfócitos T8, inversão da relação T4/T8, e resposta diminuída de proliferação de linfócitos frente aos mitógenos fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (Con-A) e pokeweed (PWM) e ao antígeno PPD. Ademais, observou-se que a maioria dos casos de categoria de risco para adquirir a infecção e/ou na fase pré-AIDS e AIDS se concentraram na faixa etária dos 20 aos 40 anos, com média de 31 anos, sem diferença estatisticamente significante entre eles. Estes resultados estão sumarizados na Tabela 1 e a totalidade deles nas Figuras 1 a 6.

**Tabela 1**. Resultados da avaliação de marcadores de resposta imune mediada por células de 11 controles sadios e de 111 casos suspeitos de AIDS, encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz para análise (1983-1985).

| | GRUPOS | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Controle (n=11) | RISCO (n=27) | LAS/ARC (n=37) | AIDS (n=47) |
| Idade em anos | 30,4 | 30,7 | 31,9 | 30,8 |
| Leucocitos/mm$^3$ | 5.264 | 5.956 | 5.6896 | 4.764* |
| Linfócitos/mm$^3$ | 1.968 | 2.317 | 2.2647 | 1.2187* |
| Linfócitos T (%) | 64,0 | 64,8 | 62,2 | 52,1* |
| Linfócitos T/mm$^3$ | 1.2477 | 1.510 | 1.404 | 662* |
| Linfócitos B (%) | 18,2 | 16,6 | 15,0 | 18,6 |
| Linfócitos B/mm$^3$ | 397,3 | 362,7 | 307,6 | 214,6* |
| Linfócitos T4 (%) | 44,4 | 37,8 | 26,3 | 13,5* |
| Linfócitos T4/mm$^3$ | 863,0 | 808,6 | 591.4 | 191.2* |
| Linfócitos T8 (%) | 21,6 | 26,6 | 37,3* | 39,0* |
| Linfócitos T8/mm$^3$ | 424,8 | 612,8 | 797,6* | 538,2 |
| Relação T4/T8 | 2,3 | 1,6 | 0,74* | 0,53* |
| PHA 20 µg/mL | 255.980 | 233.382 | 175.853 | 118.450* |
| Con-A 20 µg/mL | 172.270 | 136.493 | 111.128 | 54.795* |
| PWM 20 µg/mL | 75.943 | 71.470 | 27.761 | 17.930* |
| PPD 10 µg/mL | 59.989 | 16.696 | 15.505* | 7.099* |

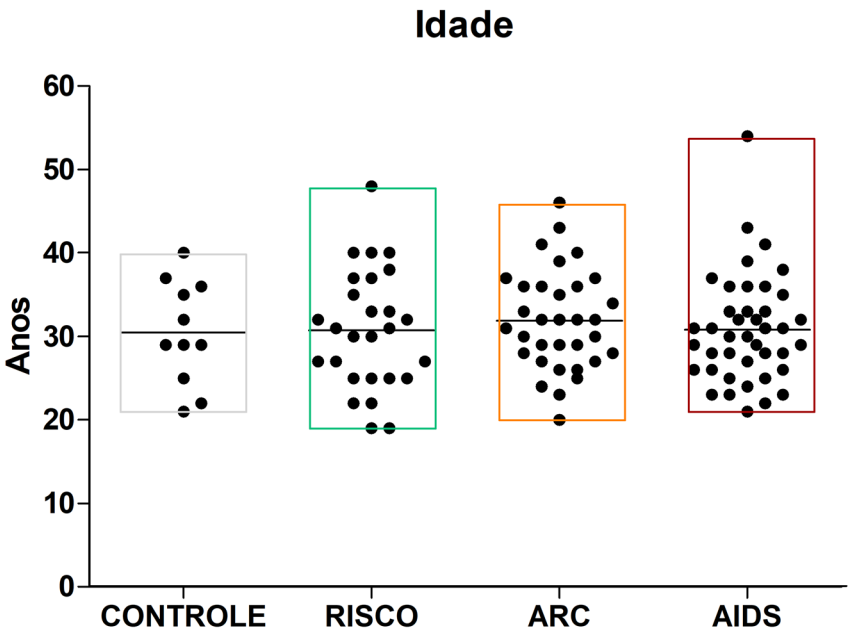
Fonte: Araujo AC. 1985.[14]

Número de células (leucócitos e linfócitos do sangue periférico) expressos em média das contagens de cada grupo. Resposta proliferativa de linfócitos expressa em média das contagens por minuto (cpm) no final de 3 dias de cultura usando mitógenos e 7 dias de cultura usando antígeno PPD. Resultados de *p≤0.05 foram considerados significantes usando análise de variância de Kruskal-Wallis complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn.


CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

Figura 1. Valores de idade dos grupos de estudo.




| Teste | | | P value |
|---|---|---|---|
| Kruskal-Wallis statistic | | | 0,805 |
| Dunn's Multiple Comparison Test | Difference in rank sum | P < 0.05? | Summary |
| CONTROLE vs RISCO | -0,564 | No | ns |
| CONTROLE vs ARC | -6.727 | No | ns |
| CONTROLE vs AIDS | 0,1984 | No | ns |
| RISCO vs ARC | -6.163 | No | ns |
| RISCO vs AIDS | 0,7624 | No | ns |
| ARC vs AIDS | 6.926 | No | ns |

Fonte: Araujo AC. 1985.[14]

Legenda: As barras representam os valores médios das idades em cada grupo.



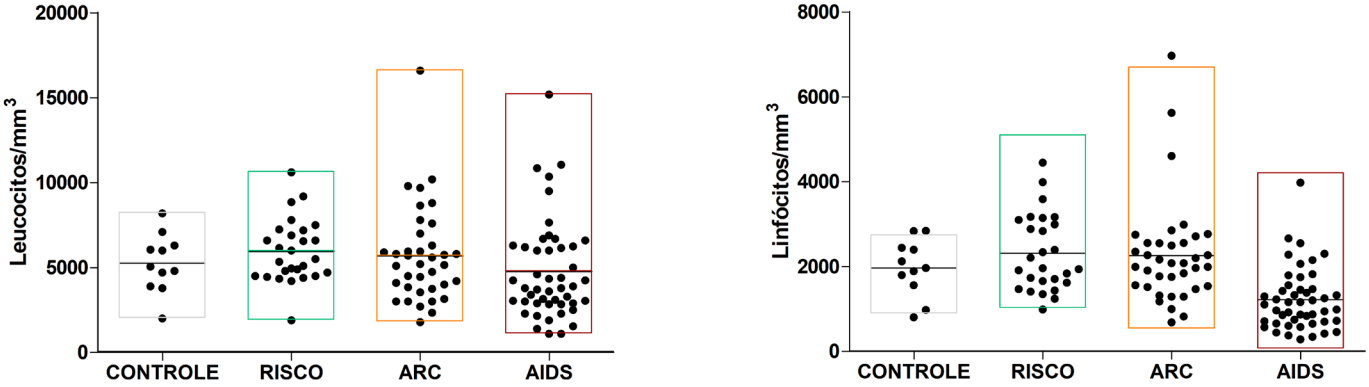
Acesso aberto



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

Figura 2. Contagem de leucócitos e linfócitos por mm³ de sangue nos grupos de estudo.




| Teste | | | P value |
|---|---|---|---|
| **Kruskal-Wallis statistic** | | | |
| Leucócitos | | | 0,0242 |
| Linfócitos | | | <0,0001 |
| **Dunn's Multiple Comparison Test** | **Difference in r** | **P < 0.05?** | **Summary** |
| **Leucócitos** | | | |
| CONTROLE vs RISCO | -9.808 | No | ns |
| CONTROLE vs ARC | 1.177 | No | ns |
| CONTROLE vs AIDS | 15,44 | No | ns |
| RISCO vs ARC | 10,98 | No | ns |
| RISCO vs AIDS | 25,25 | Yes | * |
| ARC vs AIDS | 14,27 | No | ns |
| **Linfócitos** | | | |
| CONTROLE vs RISCO | -8.567 | No | ns |
| CONTROLE vs ARC | -3.607 | No | ns |
| CONTROLE vs AIDS | 35,37 | Yes | * |
| RISCO vs ARC | 4,96 | No | ns |
| RISCO vs AIDS | 43,94 | Yes | *** |
| ARC vs AIDS | 38,98 | Yes | *** |

Fonte: Araujo AC. 1985.[14]

Legenda: As barras correspondem aos valores médios de contagens. Diferenças estatisticamente significante usando análise de variância de Kruskal-Wallis complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn estão demonstradas por asterisco e correspondem a: *p≤0.05; ***p≤0.001.



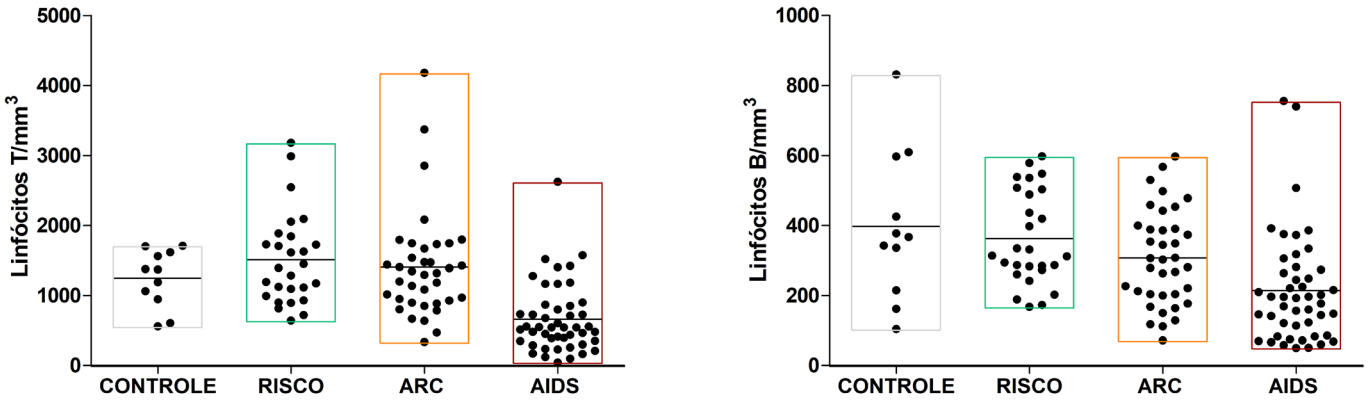
Acesso aberto



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

**Figura 3.** Contagem de linfócitos T e B por mm³ de sangue nos grupos de estudo.




| Teste | | | P value |
|---|---|---|---|
| **Kruskal-Wallis statistic** | | | |
| Linfócitos T | | | <0,0001 |
| Linfócitos B | | | <0,0001 |
| **Dunn's Multiple Comparison Test** | **Difference in rank sum** | **P < 0.05?** | **Summary** |
| **Linfócitos T** | | | |
| CONTROLE vs RISCO | -8.983 | No | ns |
| CONTROLE vs ARC | -2.247 | No | ns |
| CONTROLE vs AIDS | 39,61 | Yes | ** |
| RISCO vs ARC | 6.736 | No | ns |
| RISCO vs AIDS | 48,6 | Yes | *** |
| ARC vs AIDS | 41,86 | Yes | *** |
| **Linfócitos B** | | | |
| CONTROLE vs RISCO | 1 | No | ns |
| CONTROLE vs ARC | 13 | No | ns |
| CONTROLE vs AIDS | 38,48 | Yes | ** |
| RISCO vs ARC | 12 | No | ns |
| RISCO vs AIDS | 37,52 | Yes | *** |
| ARC vs AIDS | 25,41 | Yes | ** |

Fonte: Araujo AC. 1985.[14]

Legenda: As barras correspondem aos valores médios de contagens. Diferenças estatisticamente significante usando análise de variância de Kruskal-Wallis complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn estão demonstradas por asterisco e correspondem a: **p≤0.01; ***p≤0.001.



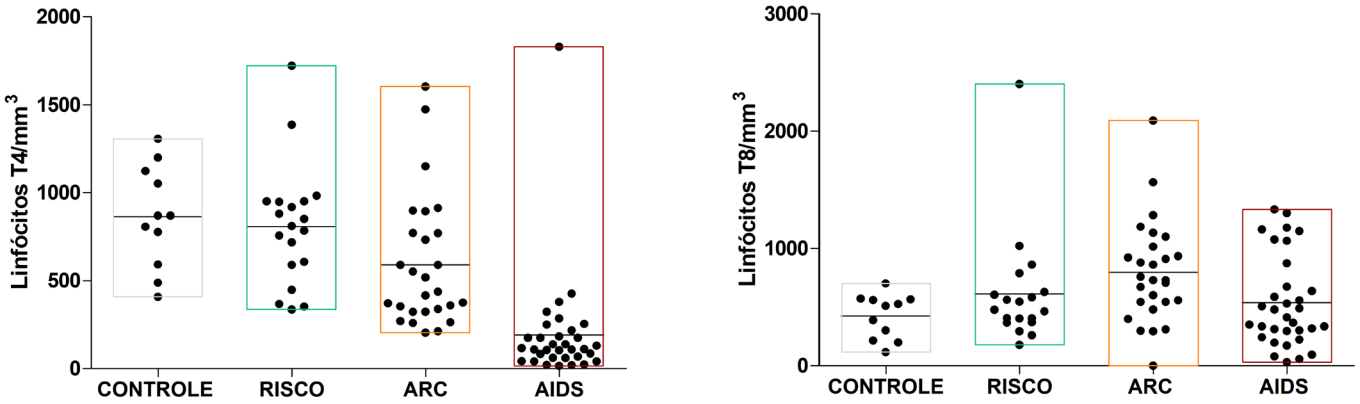
Acesso aberto



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

**Figura 4.** Contagens de subpopulações de linfócitos T (T4 e T8) por mm³ de sangue nos grupos de estudo.




| Teste | | | P value |
|---|---|---|---|
| **Kruskal-Wallis statistic** | | | |
| Linfócitos T4 | | | <0,0001 |
| Linfócitos T8 | | | 0,0156 |
| **Dunn's Multiple Comparison Test** | **Difference in rank sum** | **P < 0.05?** | **Summary** |
| **Linfócitos T4** | | | |
| CONTROLE vs RISCO | 3.536 | No | ns |
| CONTROLE vs ARC | 16,79 | No | ns |
| CONTROLE vs AIDS | 49,06 | Yes | *** |
| RISCO vs ARC | 13,26 | No | ns |
| RISCO vs AIDS | 45,52 | Yes | *** |
| ARC vs AIDS | 32,27 | Yes | *** |
| **Linfócitos T8** | | | |
| CONTROLE vs RISCO | -9.467 | No | ns |
| CONTROLE vs ARC | -23,97 | No | ns |
| CONTROLE vs AIDS | -5.061 | No | ns |
| RISCO vs ARC | -14,5 | No | ns |
| RISCO vs AIDS | 4.406 | No | ns |
| ARC vs AIDS | 18,91 | Yes | * |

Fonte: Araujo AC. 1985.[14]

Legenda: As barras correspondem aos valores médios de contagens. Diferenças estatisticamente significante usando análise de variância de Kruskal-Wallis complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn estão demonstradas por asterisco e correspondem a: *p≤0.05; ***p≤0.001.



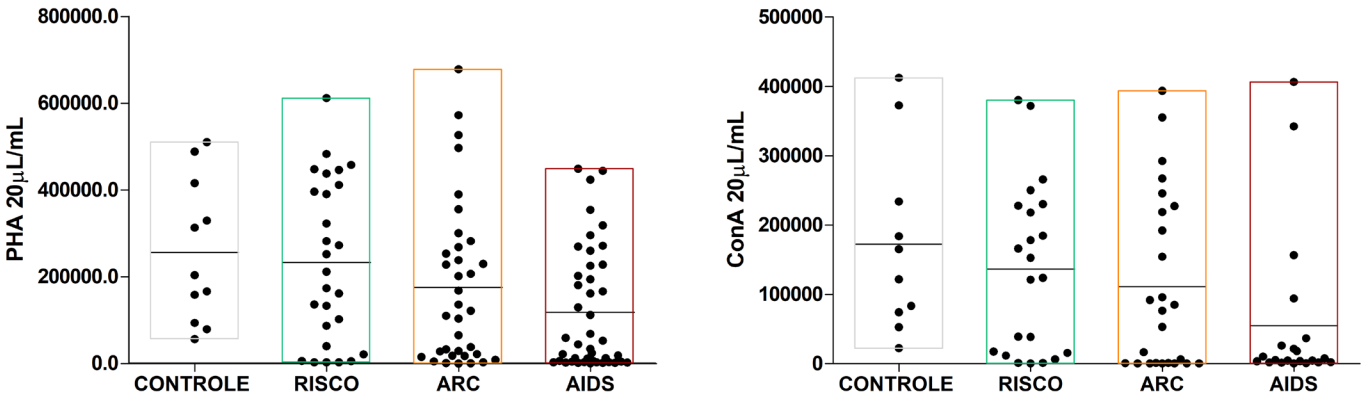
Acesso aberto



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

**Figura 5.** Contagem de proliferação de linfócitos após três dias de cultura, estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) e concanavaliana A (Con-A), nos grupos de estudo.




| Teste | | | P value |
|---|---|---|---|
| **Kruskal-Wallis statistic** | | | |
| PHA | | | 0,0111 |
| ConA | | | 0,0195 |
| **Dunn's Multiple Comparison Test** | **Difference in rank sum** | **P < 0.05?** | **Summary** |
| **PHA** | | | |
| CONTROLE vs RISCO | 8.088 | No | ns |
| CONTROLE vs ARC | 18,89 | No | ns |
| CONTROLE vs AIDS | 30,19 | Yes | * |
| RISCO vs ARC | 10,8 | No | ns |
| RISCO vs AIDS | 22,1 | Yes | * |
| ARC vs AIDS | 11,3 | No | ns |
| **ConA** | | | |
| CONTROLE vs RISCO | 7.582 | No | ns |
| CONTROLE vs ARC | 16,66 | No | ns |
| CONTROLE vs AIDS | 23,85 | Yes | * |
| RISCO vs ARC | 9.078 | No | ns |
| RISCO vs AIDS | 16,27 | No | ns |
| ARC vs AIDS | 7.192 | No | ns |

Fonte: Araujo AC. 1985.[14]

Legenda: As barras correspondem aos valores médios de contagens. Diferenças estatisticamente significante usando análise de variância de Kruskal-Wallis complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn estão demonstradas por asterisco e correspondem a: *p≤0.05.



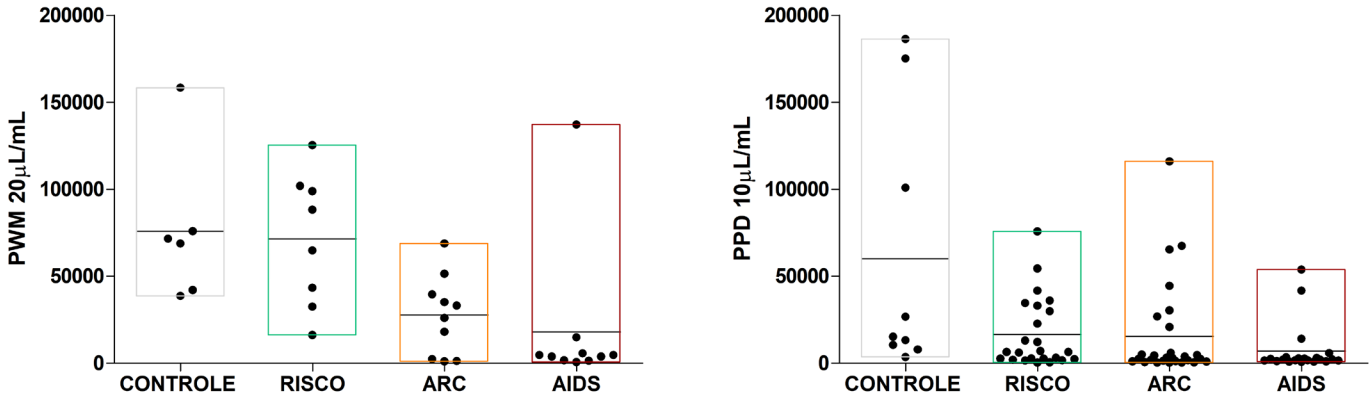
Acesso aberto



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

**Figura 6.** Contagem de proliferação de linfócitos após três dias de cultura estimulada com pokeweed (PWM) e sete dias de cultura com PPD, nos grupos de estudo.




| Teste | | P value | |
|---|---|---|---|
| **Kruskal-Wallis statistic** | | | |
| PWM | | 0,0018 | |
| PPD | | 0,0023 | |
| **Dunn's Multiple Comparison Test** | **Difference in rank sum** | **P < 0.05?** | **Summary** |
| **PWM** | | | |
| CONTROLE vs RISCO | 1.208 | No | ns |
| CONTROLE vs ARC | 11,53 | No | ns |
| CONTROLE vs AIDS | 15,83 | Yes | * |
| RISCO vs ARC | 10,33 | No | ns |
| RISCO vs AIDS | 14,63 | Yes | * |
| ARC vs AIDS | 4,3 | No | ns |
| **PPD** | | | |
| CONTROLE vs RISCO | 17 | No | ns |
| CONTROLE vs ARC | 27,17 | Yes | * |
| CONTROLE vs AIDS | 32,65 | Yes | ** |
| RISCO vs ARC | 10 | No | ns |
| RISCO vs AIDS | 16 | No | ns |
| ARC vs AIDS | 5.484 | No | ns |

Fonte: Araujo AC. 1985.[14]

Legenda: As barras correspondem aos valores médios de contagens. Diferenças estatisticamente significante usando análise de variância de Kruskal-Wallis complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn estão demonstradas por asterisco e correspondem a: *p≤0.05; **p≤0.01.

Ao fim desta pesquisa, o Laboratório de Imunologia Celular continuou fornecendo suporte ao PE DST/AIDS, através da contagem de células T CD4+ e T CD8+, e do uso da técnica de IFD, até o ano de 1993 (período de dez anos). Em 1992, o Diretor Técnico do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS (CRT DST/AIDS) e Membro da Comissão Científica AIDS da Secretaria de Estado de Saúde, Dr. David Salomão Lewi, instituiu uma Comissão para Discussão e Racionalização do Uso de Fluxocitometros no Estado de São Paulo, da qual o Laboratório foi convidado a participar. Com o aumento da demanda e a possibilidade de automação do processo de contagem das células T CD4+ e T CD8+, em 1994 a IFD foi substituída pela citometria de fluxo, e esta atividade passou a ser desenvolvida na Seção de Sorologia do IAL


CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

(Laboratório de Imunofenotipagem/Citometria de Fluxo). Em 1995, foi implantada a Rede de Laboratórios de CD4+/CD8+ no Estado de São Paulo, tendo como coordenador o Laboratório de Imunofenotipagem do IAL Central.

## Desafios e Contribuições do Laboratório de Imunologia Celular - II

Durante o suporte viabilizado pelo Laboratório de Imunologia Celular ao PE DST/AIDS, verificou-se um aumento no número de mulheres infectadas pelo HIV, quer seja pelo uso de drogas injetáveis, contato sexual com parceiro infectado ou contato com múltiplos parceiros sem uso de preservativo. Estas mulheres encontravam-se na faixa etária de maior atividade sexual e reprodutiva, sendo este um fator que contribuiu para o surgimento de casos de AIDS em crianças, por transmissão vertical.

Preocupados com esta situação, em 1988 o Laboratório iniciou a busca de possíveis técnicas alternativas que poderiam ser utilizadas no diagnóstico de infecção pelo HIV em crianças, visto que toda criança nascida de mãe soropositiva para o HIV resultava HIV positiva nos testes sorológicos. Isto se devia ao fato dos anticorpos maternos atravessarem a placenta e perdurarem por até 15 meses após o nascimento (em alguns casos até 18 a 24 meses), inviabilizando a utilização desta metodologia com crianças desta faixa etária.

Utilizando informações de literatura que descreviam ativação policlonal de linfócitos B na AIDS e secreção espontânea de anticorpos anti-HIV em sobrenadante de cultura de células mononucleares (CMNs) do sangue periférico de longa duração de pacientes infectados,[16,17] decidiu-se em 1999, investir na possibilidade de utilizar a produção de anticorpos *in vitro* como ferramenta para o diagnóstico de infecção perinatal pelo HIV. A técnica denominada *in vitro antibody production* (IVAP) levava cerca de oito dias para produzir anticorpos em quantidade suficiente para serem detectados em ensaios sorológicos, apesar de esta produção ter início nas primeiras 24h de cultura (Figura 7).



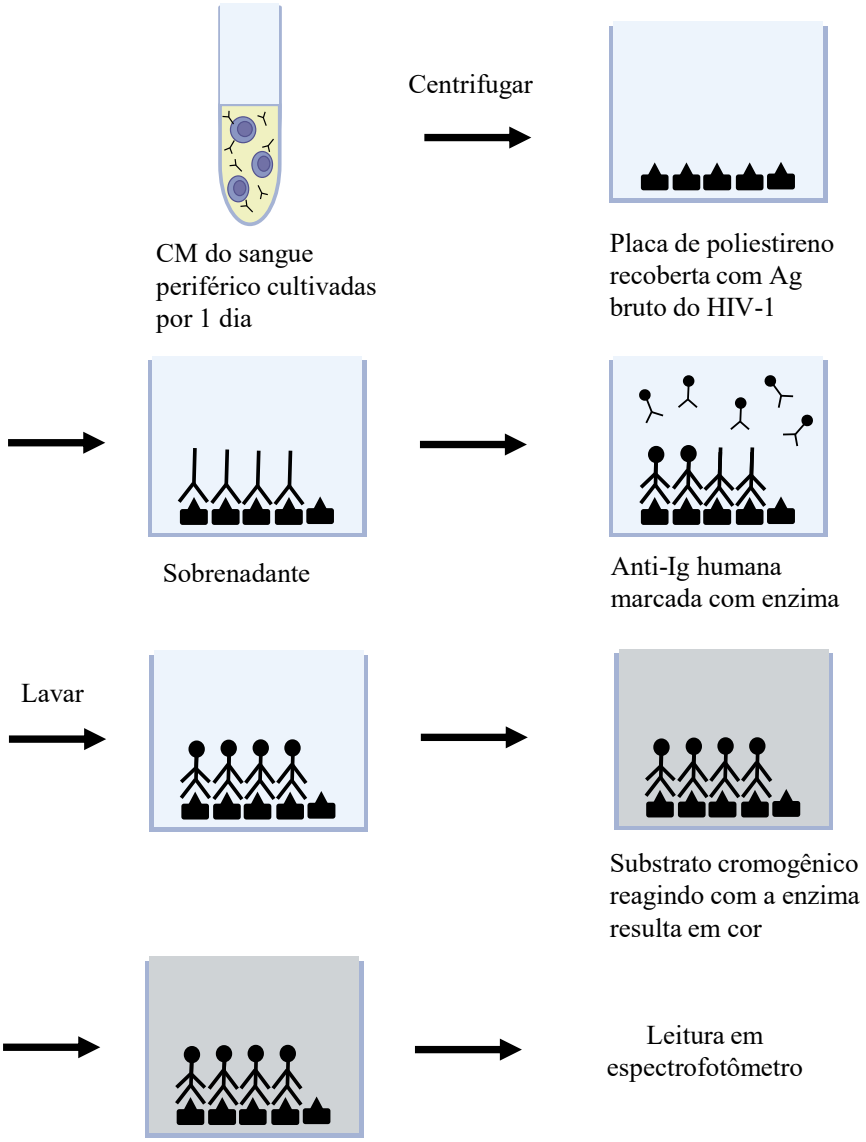
Acesso aberto



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

**Figura 7.** Representação esquemática da técnica de produção espontânea de anticorpos anti-HIV *in vitro* (IVAP).




Fonte: Caterino-de-Araujo A., 1993.[20]

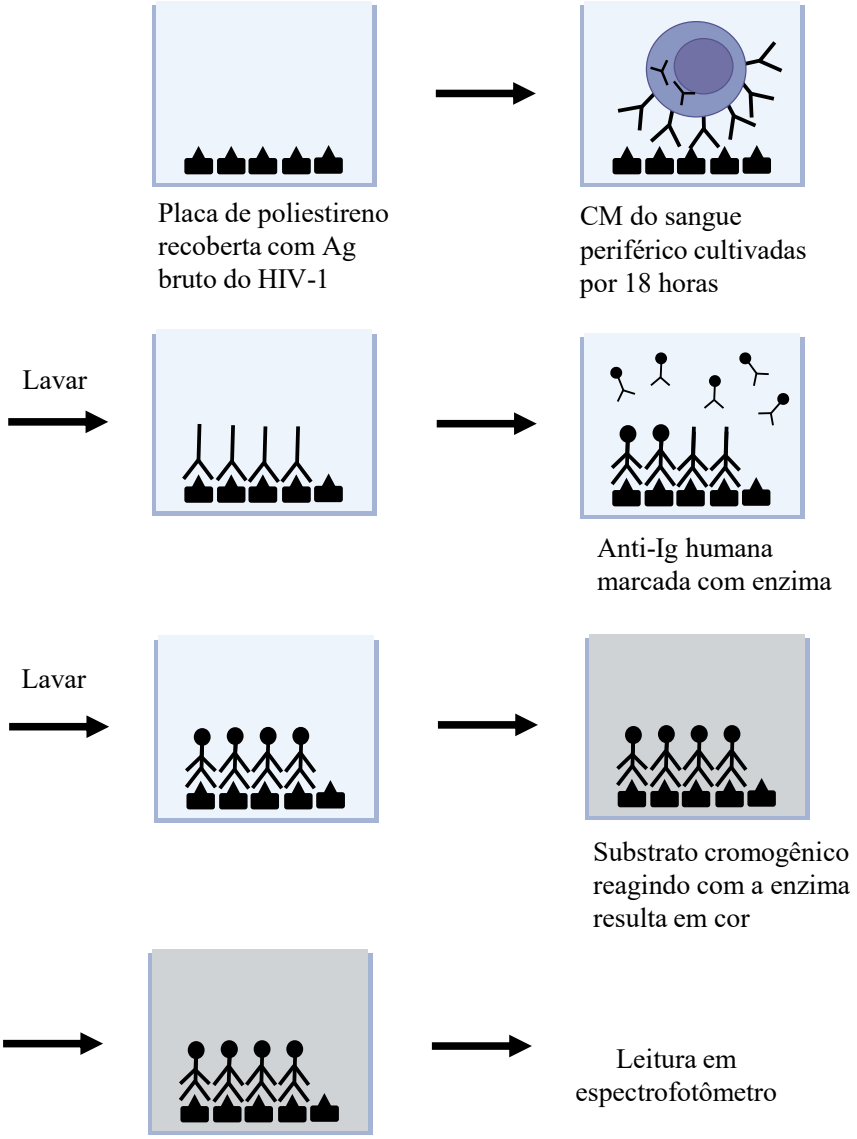
Para aumentar a secreção de anticorpos anti-HIV e diminuir o tempo de detecção, decidiu-se inovar, estimulando as CMNs com antígenos do HIV presentes em placas de um ensaio imunoenzimático (EIA) disponível no mercado nacional (EIA-LAV Genetic Systems, Seattle, USA). Foram feitas várias análises referentes à viabilidade celular quando em contato com a placa do kit, número de células por orifício da placa, tempo de cultura (um a oito dias), reatividade cruzada com células obtidas de pacientes com outras infecções/doenças, e uso de células de adultos e crianças. Após a otimização e estudo de cinética de produção de anticorpos, foi possível padronizar a técnica denominada *in vitro induced antibody production* (IVIAP), capaz de detectar anticorpos produzidos por linfócitos B de adultos e crianças infectadas, após 24 horas.[18,19] A vantagem em se utilizar este kit é que tanto a indução da secreção de anticorpos


CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

(cultura) como a detecção dos anticorpos secretados é realizada na mesma placa, usando os reagentes do próprio kit e seguindo as instruções do fabricante (Figura 8).

**Figura 8.** Representação esquemática da técnica de produção induzida de anticorpos anti-HIV *in vitro* (IVIAP).




Fonte: Caterino-de-Araujo A., 1993.[20]

O estudo comparativo da IVAP e IVIAP usando cultura de 24h mostrou maior sensibilidade da IVIAP, principalmente quando utilizada com CMNs de crianças.[20]

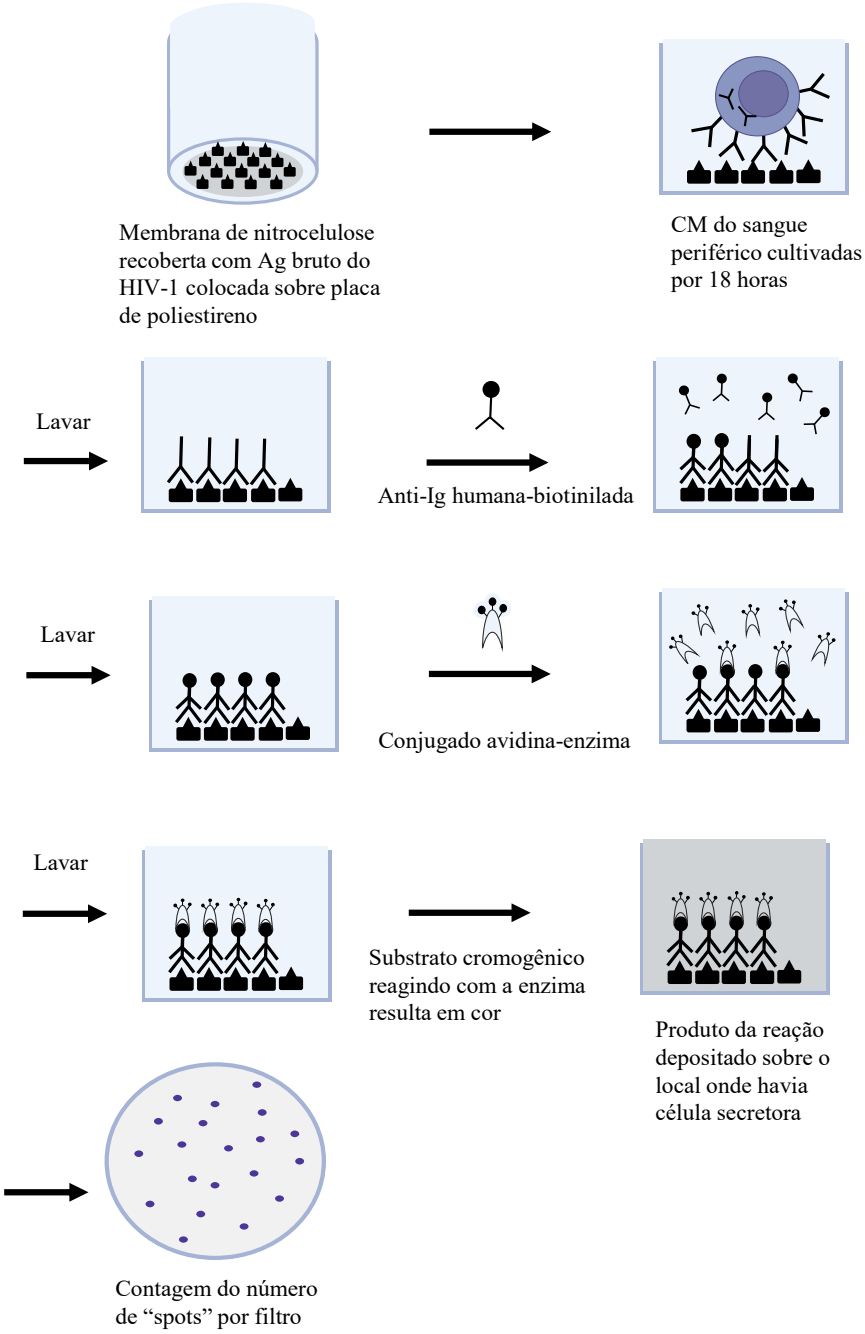
A seguir, foi realizado um estudo comparativo da IVIAP com a técnica ELISPOT, que além de detectar células produtoras de anticorpos, consegue quantificá-las. Cada ponto (*spot*) detectado na membrana de nitrocelulose adsorvida com lisado viral de HIV representa


CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

um linfócito B secretor de anticorpo específico (Figura 9). Os resultados obtidos revelaram desempenho semelhante quando aplicadas com CMNs de adultos e crianças, porém, a IVIAP levou vantagem em relação ao ELISPOT por ser mais rápida, segura, de menor custo e de fácil execução, e por empregar menos CMNs para resultar positiva.[20]

**Figura 9.** Representação esquemática da técnica ELISPOT.




Fonte: Caterino-de-Araujo A., 1993.[20]



Acesso aberto



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

Por fim, a IVIAP foi empregada no acompanhamento de 57 crianças do Instituto da Criança (IC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Unidades de Imunologia e Infectologia), e em 33 delas foi possível comparar seu desempenho em relação à PCR *in house* para pesquisa de segmentos do genoma do HIV regiões LTR e *env* (realizadas na Itália, no Instituto de Oncologia, Universidade de Pádua). Os resultados obtidos mostraram concordância entre a IVIAP e PCR com índice Kappa= 0,94.[20] Ainda, a IVIAP descartou infecção pelo HIV em várias crianças do IC, e mais três casos enviados pela Fundação Estadual do Bem-Estar do Menor (antiga FEBEM) ao IAL para adoção. Os resultados de todas as etapas desta pesquisa foram apresentados na Tese de Doutorado defendida em 1993 no Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo, área de Imunologia.[20] Digno de nota, quando este trabalho teve início não havia kit para determinação de carga viral de HIV, e era necessário aguardar dois anos para se ter certeza se uma criança exposta ao HIV havia sido infectada ou não. O trabalho foi agraciado com vários prêmios, com destaque para o Prêmio Jovem Cientista 1993 (CNPq, Fundação Roberto Marinho e Grupo Gerdau).[21,22]

## Conclusão

O IAL cumpriu sua missão e mostrou seu potencial científico/inovador também na epidemia de AIDS no Brasil. Com muito orgulho o IAL fez parte do Primeiro Programa de DST/AIDS implantado no estado de São Paulo e no Brasil, e nesses 40 anos vem atuando no diagnóstico de infecções oportunistas associadas a AIDS, na quantificação de células CD4+/CD8+ e de Carga Viral de HIV, na caracterização genética de subtipos virais e de tropismo viral, na busca de marcadores genéticos de resistência aos antirretrovirais, na produção de material de referência e no controle de qualidade dos ensaios sorológicos para o HIV, e na formação e capacitação de profissionais na área de laboratório em nível de especialização e de pós-graduação.

## Agradecimentos

À Karoline Rodrigues Campos pela preparação das figuras em GraphPad Prism usando dados de Araujo AC, 1985,[14] e à Francieli Marinho Carneiro pela modernização das figuras IVAP, IVIAP e ELISPOT de Caterino-de-Araujo A, 1993.[20] Ao Dr. Paulo Roberto Teixeira pelo brilhantismo com que conduziu o primeiro Programa Estadual de DST/AIDS de São Paulo e do Brasil, pelo incentivo e confiança. À Dra. Marli Izabel Penteado Manini pelo levantamento dos dados clínicos dos 111 pacientes, e a toda equipe do PE DST/AIDS do Instituto de Saúde pela colaboração. À Dra. Anete Sevciovic Grumach (Unidade de Imunologia) e a Dra. Heloísa


CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

Helena de Sousa Marques (Unidade de Infectologia) do Instituto da Criança HC-FMUSP pelo acompanhamento clínico e auxílio no levantamento de dados dos casos pediátricos. À Dra. Mirthes Ueda Chefe da Seção de Sorologia do IAL pelo apoio incondicional, e a todos do Instituto Adolfo que contribuíram direta ou indiretamente para a realização destes estudos.

## Referências

1. CDC. Pneumocystis Pneumonia: Los Angeles. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Centers for Disease Control. 1981;30(21):250-2. [acesso em 4 julho 2023] Disponível em: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm
2. CDC. Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Pneumonia Among Homosexual Men — New York City and California. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Centers for Disease Control. 1981;30(25):305-8. [acesso em 4 julho 2023] Disponível em: https://www.jstor.org/stable/23300179
3. CDC. Opportunistic Infections and Kaposi's Sarcoma among Haitians in the United States. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Centers for Disease Control. 1982;31(26):353-4,360-1. [acesso 4 julho 2023] Disponível em: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001123.htm
4. CDC. Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Centers for Disease Control. 1982;31(27):365-7. [acesso 4 julho 2023] Disponível em: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001126.htm
5. CDC. Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) -United States. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Centers for Disease Control. 1982;31(37):507-8,513-4. [acesso 4 julho 2023] Disponível em: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001163.htm
6. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983 May 20; 220(4599), 868-71. doi: https://doi.org/10.1126/science.6189183
7. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA. 1980;77(12):7415-9. doi: https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7415
8. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science. 1982;218:571-3. doi: https://doi.org/10.1126/science.6981847
9. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983;220(4599):865-7. doi: https://doi.org/10.1126/science.6601823
10. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science. 1984;224(4648):497-500. doi: https://doi.org/10.1126/science.6200935
11. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science. 1984; 224(4648):500-3. doi: https://doi.org/10.1126/science.6200936





CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

12. Laurindo-Teodorescu L, Teixeira PR. Histórias da aids no Brasil: as respostas governamentais à epidemia de aids. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, Brasília, Brasil, 2015; Vol. 1, pp. 1-464. [acesso 4 julho 2023] Disponível em: https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000235557?posInSet=2&queryId=f390b88f-74e1-450d-a274-cfb553262cc7

13. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos microbiológicos, parasitológicos e imunológicos. São Paulo (SP); 1982. 2 v.

14. Araujo AC. Avaliação in vitro da resposta imune mediada por células na Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS). [dissertação de Mestrado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, UNIFESP; 1985.

15. De-Araujo AC. Cell-mediated immunity in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. Brazilian J Med Biol Res. 1987;20:579-82. [acesso em 6 julho 2023] Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Adele-Caterino-De-Araujo/publications

16. Amadori A, Zamarchi R, Ciminale V, Del Mistro A, Siervo A, Alberti A, et al. HIV-1-specific B cell activation. A major constituent of spontaneous B cell activation during HIV-1 infection. J Immunol. 1989;143(7):2146-52. [acesso 6 julho 2023] Disponível em: https://doi.org/10.4049/jimmunol.143.7.2146

17. Amadori A, De Rossi A Faulkner-Valle GP, Chieco-Bianchi L. Spontaneous in vitro production of virus-specific antibody by lymphocytes from HIV-infected subjects. Clin Immunol Immunopathol. 1988;46(3):342-51. [acesso em 6 julho 2023] Disponível em: https://doi.org/10.1016/0090-1229(88)90053-0

18. Caterino-de-Araujo A, de-los-Santos-Fortuna E, Grumach AS. An alternative method for in vitro production of HIV-1-specific antibodies. Brazilian J Med Biol Res. 1991;24:797-9. [acesso em 6 julho 2023] Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Adele-Caterino-De-Araujo/publications

19. Caterino-de-Araujo A. Rapid in vitro detection of HIV-1-specific antibody secretion by cells-culture with virus antigens. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 1992;87(2):239-47. [acesso 6 julho 2023] Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Adele-Caterino-De-Araujo/publications

20. Caterino-de-Araujo A. Produção induzida de anticorpos in vitro: novo método para o diagnóstico de infecção perinatal pelo vírus da imunodeficiência humana [tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP; 1993.

21. Caterino-de-Araujo A. Produção induzida de anticorpos in vitro: Novo método para o diagnóstico de infecção perinatal pelo vírus da imunodeficiência humana. In: CNPq, Fundação Roberto Marinho, Grupo Gerdau (organizadores). Prêmio Jovem Cientista 1993. Saúde da População e Controle de Endemias. Rio de Janeiro; 1996. p. 21-37.

22. Prêmio Jovem Cientista - 30 Anos Revelando Talentos e Impulsionando a Pesquisa. CNPq, Gerdau, GE, Fundação Roberto Marinho. Brasília; 2011. p. 61. [acesso em 27 julho 2023] Disponível em: http://estatico.cnpq.br/portal/premios/2012/pjc/pdf/livro_web.pdf



Acesso aberto



CC BY

Boletim Epidemiológico Paulista
10.57148/bepa.2023.v.20.39498 1806-4272

## Contribuição dos autores

Não se aplica.

## Aprovação dos autores

O autor é responsável por todos os aspectos do trabalho, incluindo a garantia de sua precisão e integridade.

## Conflito de interesses

O autor declara não ter conflito de interesse no trabalho submetido.

## Financiamento

Não houve financiamento para esta publicação.


CC BY