

B10-66

*UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE*  
*FACULDADE DE BIOLOGIA*

*Tese de licenciatura*

*Tema: Detecção de autoanticorpos em soros  
com padrão "indeterminado" a técnica  
Western Blot para HIV1 e HIV2*

*Autora: Vitória C. Lobo*

*Supervisor: Dr. Fernando de La Cruz*

R

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de manifestar o meu apreço ao supervisor do trabalho Dr. Fernando de La Cruz pela constante prontidão na resolução dos problemas surgidos durante o decorrer do trabalho e, pela meticulosa revisão do mesmo.

Queria também deixar aqui ficar o meu reconhecimento à Fundação Moçambicana para Investigação em Saúde (FUMIS), pelo apoio financeiro cedido para a realização deste trabalho, ao Dr. C. Palha de Sousa pelo apoio prestado na revisão do relatório final, à Dr. Lucia Barquet pelo auxílio na análise estatística dos dados e pelo encorajamento por ela incitados bem como ao Instituto Nacional de Saúde.

A Sra. Leonor dos Santos, e ao pessoal técnico do South African Institut for Medical Reséarch (S.A.I.M.R.), pelo ensino das técnicas de Imunofluorescência e à faculdade de Biologia agradeço também todo o apoio que me foi prestado.

A todos o meu obrigado.

A autora



*ABREVIATURAS*

- ANA - Anti-nuclear antibody (anticorpos anti-nucleares)
- ADN - Acido Desoxiribonucleico
- ARC - AIDS Related Complex (Complexo sintomático relacionado com o SIDA)
- ARN - Acido Ribonucleico
- BS - Banco de Sangue
- EIA - Enzyme Immuno Assay (Imunoensaio enzimático)
- ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- ENV - Gene que codifica para as glicoproteínas do envelope viral
- GAG - Gene que codifica para as proteínas do "core" (núcleo) viral
- HCM - Hospital Central de Maputo
- HIV - Human Immunodeficiency Virus (Virus de Imunodeficiência Humana)
- HLA - Human Leucocytic Antigen (Antígeno Leucocítico Humano)
- FITC - Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)
- Ig.- Imunoglobulinas.
- Indeterm.- Indivíduos Moçambicanos com reactividade indeterminada ao Western Blot para HIV.
- L/K - Liver/ Kidney ( Autoanticorpos contra o figado e o rim).
- LNRS - Laboratório Nacional de Referencia do Sida.
- MA - Mitochondrial Autoantibodies ( Autoanticorpos contra as mitocôndrias).
- MHC - Major Histocompatibility Complex (Complexo de histocompatibilidade principal)
- Neg. N. Moç.- Indivíduos não Moçambicanos com reactividade negativa ao Western Blot para HIV.
- Neg. Moç.- Indivíduos Moçambicanos com reactividade negativa ao Western Blot para HIV.
- PBS - Phosphate Buffer Saline.

PCA - Parietal Cell Autoantibodies (Autoanticorpos contra as células parietais).

PCR - Polimerase Chain Reaction (Reacção da cadeia de polimerase)

POL - Gene que codifica para as enzimas necessárias para a replicação viral

Pos.- Indivíduos Moçambicanos com reactividade positiva ao Western Blot para HIV.

RID - Radial Immunodifusion (Imunodifusão radial)

SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS-Adquired Immunodeficiency Virus)

SMA - Smooth Muscle Autoantibodies (Autoanticorpos contra o músculo liso).

WB - Técnica Western Blot para HIV.

## SUMARIO

Os testes serológicos utilizados para o diagnóstico laboratorial da Infecção pelo Vírus HIV (Human Immunodeficiency Virus), são inicialmente testados pela técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), e, apresentando um resultado positivo, são posteriormente analisados por um teste de confirmação denominado Western Blot. Este teste baseia-se na identificação de anticorpos específicos para cada um dos componentes antigénicos virais, preparados a partir de células de cultura e transferidos para tiras de nitrocelulose por electroforese, com as quais se incuba o soro a testar. A presença de anticorpos específicos dirigidos contra o vírus no soro do indivíduo, leva à ligação destes com os antígenos virais. A adição de um conjugado de imunoglobulina anti-humana ligada a uma enzima, e a adição de substrato específico a esta, revela um padrão de bandas coloridas nos sítios onde ocorreu a ligação dos anticorpos específicos aos antígenos virais. Esta técnica confirma a exposição às proteínas do vírus quando aparecem todas as bandas de proteína viral na tira do teste, que correspondem aos critérios de positividade estabelecidos, ou inexistência de tal exposição quando não se verifica qualquer padrão de bandas. Porém, tem sido frequente a ocorrência de resultados "indeterminados" ou "não-conclusivos", que são assim referidos por apresentarem reactividade a bandas de proteína viral que não preenchem os critérios de positividade estabelecidos.

Estes resultados permanecem até ao momento sem qualquer significado, embora várias hipóteses tenham sido postas para a sua clarificação. Tem sido descrito por outros autores que eles podem ser devidos ao estadio da doença em que se encontra o indivíduo infectado, a reacções inespecíficas originadas pela existência de elevados níveis de imunoglobulinas no soro dos indivíduos ou pela presença de autoanticorpos. Os autoanticorpos são considerados como possível causa dos resultados indeterminados devido, quer à existência de homologia de certas proteínas do HIV com proteínas normais do organismo, quer à possível reacção dos autoanticorpos presentes no soro do indivíduo com proteínas celulares presentes nas tiras do teste Western Blot.

Um dos grandes problemas enfrentados na serologia do HIV, é a ocorrência destes resultados indeterminados nas provas de confirmação pelo Western Blot que em soros de indivíduos Moçambicanos tem tido uma elevada frequência. As consequências desta situação são negativas para o rastreio do HIV nos Bancos de Sangue, para a vigilância

epidemiológica e monitorização da evolução da infecção e bem como para o diagnóstico dos casos clínicos.

Este trabalho insere-se na pesquisa do significado da presença de autoanticorpos e de níveis elevados de imunoglobulinas na ocorrência destes resultados.

Assim a determinação do nível de Igs, detecção de factores reumatoides e de outros tipos de autoanticorpos foi feita, usando-se a técnica de Imunodifusão Radial, o Teste de aglutinação e Provas de Imunofluorescência respectivamente. A amostra foi composta por 60 soros de indivíduos Moçambicanos com resultados indeterminados, 30 soros de indivíduos com resultados positivos, 30 soros de indivíduos com resultados negativos Moçambicanos e 30 soros de indivíduos com resultados negativos não Moçambicanos, à técnica do Western Blot.

Pode constatar-se pelos resultados obtidos que, os indivíduos infectados com o HIV apresentam um nível significativamente superior de IgG e IgM ao observado nos indivíduos com resultados indeterminados e negativos, excluindo-se porém a possibilidade de afirmar de forma concludente que a ocorrência destes resultados surja como resultado de uma hipergamaglobulinemia.

Em relação ao factor reumatoide e aos outros autoanticorpos estudados, verificaram-se valores superiores nos indivíduos positivos e indeterminados ao Western Blot para HIV comparando-os com os indivíduos negativos. Os resultados obtidos quanto à presença de factores reumatoides e dos outros autoanticorpos estudados não permitem tirar conclusões sobre a existência de uma associação entre eles e os resultados indeterminados.

Estes resultados não permitem, no momento actual, a introdução das provas de determinação de imunoglobulinas, de detecção de factores reumatoides e de anticorpos anti-nucleares e anti-tecido pesquisados neste trabalho, como provas adicionais para a clarificação do significado dos resultados indeterminados.

## INDICE

1. Introdução .....	1
1.1. Revisão bibliográfica .....	1
1.1.1. Generalidades .....	1
1.1.2. Imunoglobulinas .....	11
1.1.3. Factor reumatoide .....	12
1.1.4. Autoanticorpos .....	13
1.2. Objectivos .....	15
2. Metodologia do estudo .....	16
2.1. Selecção das amostras .....	16
2.2. Quantificação de imunoglobulinas .....	17
2.3. Detecção de factores reumatoides .....	17
2.4. Detecção de autoanticorpos .....	18
2.4.1. Anticorpos anti-nucleares .....	18
2.4.2. Teste do bloco composto .....	19
2.4.3. Anticorpos anti-ADN .....	21
2.4.4. Anticorpos contra a tiroide .....	22
2.5. Análise de dados .....	23
2.5.1. Valores de imunoglobulinas .....	23
2.5.2. Factor reumatoide e autoanticorpos ..	23
3. Resultados, Discussão, Conclusões, Recomendações ..	24
3.1. Apresentação dos resultados .....	24
3.1.1. Imunoglobulinas .....	24
3.1.2. Factor reumatoide .....	29
3.1.3. Autoanticorpos .....	31
3.1.4. Associação entre a presença de factores reumatoides e a concentração de imunoglobulina .....	34
3.2. Discussão dos resultados .....	37
3.3. Conclusões .....	44
3.4. Recomendações .....	45
4. Referencias bibliográficas .....	46
5. Anexos .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1.1. Generalidades

O vírus de Imunodeficiência Humana (HIV) tem sido descrito desde a sua descoberta em 1983 como o agente etiológico primário do Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) [1]. Conhecem-se até ao momento duas variantes do vírus, as quais têm sido designadas por HIV1 e HIV2. Ambos os vírus pertencem ao grupo dos retrovírus, assim chamados por possuírem a sua informação genética no Ácido Ribonucleico (ARN), e na sua composição uma enzima chamada transcriptase reversa, a qual, uma vez que o vírus invade a célula hospedeira permite a síntese a partir do ARN viral de um ADN (Ácido Desoxiribonucleico) com capacidade para inserir-se dentro do genoma de tal célula onde pode permanecer silencioso até ao momento de se iniciar o processo de replicação viral [2,3].

O genoma do HIV, isto é, os genes contidos no ácido nucleico viral têm sido amplamente estudados nos últimos anos, permitindo a identificação de diferentes genes, classificados como genes estruturais e genes reguladores (Anexo 1). Do ponto de vista serológico são de maior interesse os chamados genes estruturais, cuja presença tem sido demonstrada no HIV e em todos os outros retrovírus [2,3].

Existem três genes estruturais que são essenciais para a replicação viral:

\* GAG - assim designado por codificar para os antígenos de grupo específico (Group Antigen), e que contém a informação genética para as proteínas do núcleo "core" viral nomeadamente p24 e p15 que formam uma cobertura proteica ao ARN viral, e p17;

\* POL - gene que codifica para a enzima transcriptase reversa (Polimerase), e que contém como tem sido descrito mais recentemente



a informação para uma integrase ou endonuclease (enzima necessária para a integração do ADN viral dentro do ADN da célula hospedeira) e para uma protease (enzima importante na produção final das proteínas virais activas)..

\* ENV - que codifica para uma glicoproteína da envoltura a gp120 a qual forma as protuberâncias externas na superfície do vírus e uma outra proteína que está integrada na membrana externa do vírus conhecida como transmembranária, designada gp41. Estas glicoproteínas da envoltura, são as que conferem a especificidade serológica de tipo, que permitiram a revelação de diferenças entre o HIV1 e o HIV2 para as mesmas [2,3,4,5,6] (Figura 1).

O vírus HIV infecta principalmente uma subpopulação particular de linfócitos T, que possui na sua membrana um marcador identificado como CD4, e, que apresenta uma especificidade "ligando-receptor" para a glicoproteína 120 (gp120) da envoltura do vírus. Esta subpopulação de linfócitos conhecidos como linfócitos T4 pela presença do marcador CD4, tem sido associada com a função helper/inducer (auxiliar/indutora) dentro do processo de desenvolvimento duma resposta imune [3,7,8].

A população de linfócitos T, que recebe este nome dado que no desenvolvimento do sistema imune sofre um processo de maturação a nível do Timo, é uma população heterogénia de células que intervem na resposta imune mediada por células ou imunidade celular, e no processo de cooperação celular para a síntese de anticorpos [9,10]. Com o desenvolvimento de técnicas de produção de anticorpos monoclonais foi possível identificar a presença de marcadores específicos na membrana das células T que permitem a diferenciação das diferentes subpopulações de acordo com a função que exercem na resposta imune [10]. Assim, conhecem-se os marcadores CD11 presentes em todos os linfócitos T, os marcadores CD4 que identificam as populações de linfócitos T com funções auxiliares

ou inductoras, e o marcador CD8 que identifica aquelas com funções supressoras e citotóxicas [7,9,11].

Na sua função de auxiliadora no desenvolvimento duma resposta imune, os linfócitos T4 estimulam os linfócitos T8 na sua função citotóxica, na destruição das células alteradas ou estranhas ao organismo, no aumento da actividade dos fagócitos incluindo os macrófagos mediante a libertação de mediadores solúveis ou citocinas, na estimulação da produção de anticorpos pelos linfócitos B, e jogam um papel importante na regulação da actividade das "Natural Killer". (Matadoras naturais) [5,7,9].

O facto do HIV possuir como célula alvo os linfócitos T4, [7] e, dado o importante papel que estes desempenham na resposta imune, é justificada a afectação que sobre estes produz a infecção por este vírus [3]. Por outro lado, tem sido indicado, que o facto de os linfócitos T4 serem estimulados frequentemente, na medida que o sistema imunitário do indivíduo é estimulado pela invasão no organismo de outros agentes infecciosos, sejam estes vírus, bactérias ou fungos, favorece o processo de activação do vírus e a sua passagem da fase silenciosa à fase activa da sua multiplicação dentro da célula [3,7,12]. No caso do HIV cuja multiplicação acontece dentro do linfócito T4, a infecção conduz à morte da célula e à perda da sua função, bem como à produção de um maior número de vírus que irão infectar novas células. Estudos recentes tem indicado que, a proporção de linfócitos T4 afectados num indivíduo infectado pelo HIV pode ser da ordem de 1 em cada 100 linfócitos T4. Por outro lado, o linfócito infectado, pode produzir citocinas quanti- e qualitativamente alteradas o que traduz numa desregulação total do funcionamento do sistema imune cuja manifestação mais evidente é o Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) nas suas diferentes fases [5].

Nesta situação de desregulação do sistema imune, os linfócitos B não ficam de fora, e, tem sido reportada a existência duma activação policlonal desta população celular com a consequente produção aumentada de imunoglobulinas inclusivamente sem ser em resposta a um estímulo específico [4,13]. Esta activação tem sido explicada pelo efeito das citocinas produzidas pelas células infectadas, devido à desregulação geral existente no sistema imune do indivíduo infectado, e, também devido ao facto de a fixação do vírus na célula alvo desencadear um processo de estimulação ao actuar como um sinal fisiológico falso, provocando um excesso de sinais de activação imune [1].

Esta activação policlonal dos linfócitos B, conduz a situações de hipergamaglobulinemia, e inclusivamente tem sido indicada a ocorrência de desordens autoimunes induzidas pela infeção pelo HIV [13,14]. Neste último aspecto, as reacções autoimunes podem ser induzidas pelos seguintes meios: o vírus pode alterar ou apresentar alguns componentes da célula hospedeira tornando-a assim antigénica; o vírus pode activar ou inibir directamente as células do sistema imune (como foi acima indicado); alguns antígenos virais podem reagir de forma cruzada com os componentes próprios do organismo hospedeiro, por causa da similaridade estrutural existente entre as proteínas do vírus e as proteínas normais do organismo, e, por último, as respostas anti-idiotípicas dirigidas contra o receptor do vírus podem também induzir uma resposta autoimune [15,16].

Para o caso da infeção pelo HIV, tem sido descrita a presença em indivíduos infectados de imunoglobulinas resultantes de fenómenos autoimunes [4]. Este fenómeno tem sido explicado pela existência duma sequência molecular homóloga entre a proteína gp120 da envoltura viral, e aquela do Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II (Antígeno MHC II) ambas com

capacidade de interactuar com a molécula CD4 [1,17]. Além disso, autoanticorpos dirigidos contra o ADN e contra células sanguíneas têm sido encontrados em indivíduos infectados com o HIV [17].

Porém a similaridade da sequência estrutural de algumas proteínas normais do organismo tem sido reportada não só em relação ao Complexo Principal de Histocompatibilidade e à gp120, mas, também entre a p17 e a Timosina alfa, a gp120 e neurointerleukina, e a gp120 e regiões da Ig G e Ig A [4,18], o que poderia servir de base à aparição de autoanticorpos (Ver anexo 2). De facto, a homologia existente entre a gp120 e partes da molécula de IgG e IgA poderia dar lugar a que os anticorpos antivirais actuassem como factores reumatoides, e, inclusivamente formassem imunocomplexos estes últimos presentes em 60-80% dos pacientes com SIDA ou ARC (Complexo sintomático relacionado com o SIDA) ainda que possam dever-se a outras causas [4,19].

Pelo facto de os indivíduos que vivem em países Africanos e outros em desenvolvimento, terem uma exposição a várias doenças infecciosas ao longo da sua vida, esta exposição confere-lhes uma diferente experiência imunológica em relação a indivíduos que vivem em países desenvolvidos com um diferente grau de exposição às mesmas [20]. Sabe-se, que a exposição do organismo a várias doenças infecciosas constitui um estímulo forte que pode resultar numa elevação do nível "normal" das imunoglobulinas séricas ou activar o sistema imune no sentido da formação de autoanticorpos incluindo os factores reumatoides [13,20].

Entre as doenças infecciosas que têm sido indicadas como causadoras dos fenómenos acima descritos encontram-se a malária, cujo agente causador tem sido reconhecido como um activador policlonal dos linfócitos B, e, inclusivamente, como activador de clones "proibidos" produtores de autoanticorpos [10,11], as bactérias, e

o vírus Epstein Barr, este último com a particularidade de estimular os linfócitos B sem requerer a participação dos linfócitos T helper [19].

Os aspectos acima detalhados tem importância na medida em que os métodos de diagnóstico mais factíveis de serem utilizados para identificar os indivíduos infectados pelo HIV são os métodos serológicos [21]. A aquisição de métodos precisos de identificação dos indivíduos infectados que permitam não só fazer a estimativa da sua prevalência na população mas intervir nas medidas de controle de transmissão através de sangue doado, torna-se importante pelo facto de que a infeção por HIV causa uma doença mortal, para a qual não existem meios terapêuticos eficazes e que tem progredido até atingir carácter de pandemia [21].

Embora o diagnóstico de confirmação da infeção possa ser feito mediante o isolamento do vírus a partir das células do sangue dos indivíduos infectados, este procedimento é demasiado oneroso e complexo para ser usado como método diagnóstico de rotina [6]. Por essa razão, e tendo em conta a relação existente entre a presença de anticorpos e a infeção, utiliza-se como método alternativo para o diagnóstico a deteção de anticorpos específicos para o vírus [18,21].

Dois testes serológicos são utilizados para diagnóstico da infeção pelo HIV, os testes de rastreio, e os de confirmação. Os imunoensaios enzimáticos usualmente designados por EIA (Enzyme Immuno Assay) são usados primariamente como testes de rastreio, e, aquelas amostras apresentando reacção positiva são posteriormente testadas pelos testes de confirmação. Nos testes de rastreio utilizam-se como antígenos, extratos virais obtidos de culturas de células infectadas, proteínas virais recombinantes obtidas por engenharia genética ou peptidos sintéticos que contêm os epítopes.

específicos dos antígenos virais [18]. Incluídos nos testes de rastreio encontram-se diferentes métodos de imunoenaios enzimáticos como o chamado ELISA (Enzyme Immunosorbent Assay), competitivo, indirecto, etc., e o dot EIA entre outros [18,22,23].

Para a confirmação, utilizam-se testes mais específicos como são o caso do Western Blot mais aceite e utilizado, a Imunofluorescência Indirecta e a Radioimunoprecipitação [12]. Os ensaios de confirmação quando positivos, indicam exposição passada as proteínas virais, e provável infecção corrente [4].

O ensaio de Western Blot é útil na elucidação da especificidade da resposta de anticorpos ao HIV [18], pois define o perfil de anticorpos aos produtos genéticos específicos virais [22]. Neste ensaio, proteínas individuais de um lisado de HIV são fraccionadas por electroforese com base no seu peso molecular em gel de poliacrilamida. As bandas de proteínas são então transferidas para as tiras de nitrocelulose que reagirão com o soro do paciente. Se anticorpos contra o vírus estiverem presentes, a ligação entre estes e os antígenos virais específicos ocorre nas zonas das bandas correspondentes àquelas produzidas pelos antígenos virais. Estas bandas tornam-se visíveis através do uso de um conjugado de imunoglobulina anti-humana marcada com enzima peroxidase, seguida a adição do substrato específico à enzima. A presença de imunoglobulinas dirigidas contra o vírus no soro testado é indicada pela coloração das bandas de proteína viral presentes nas tiras de teste. Antígenos virais reconhecidos produzem bandas de proteína que provêm dos produtos dos três genes estruturais do vírus, nomeadamente p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp120 e gp160 [18,23] (Figura 2).

Existem critérios para considerar uma prova de Western Blot como positiva, designados critérios de positividade. Quatro diferentes

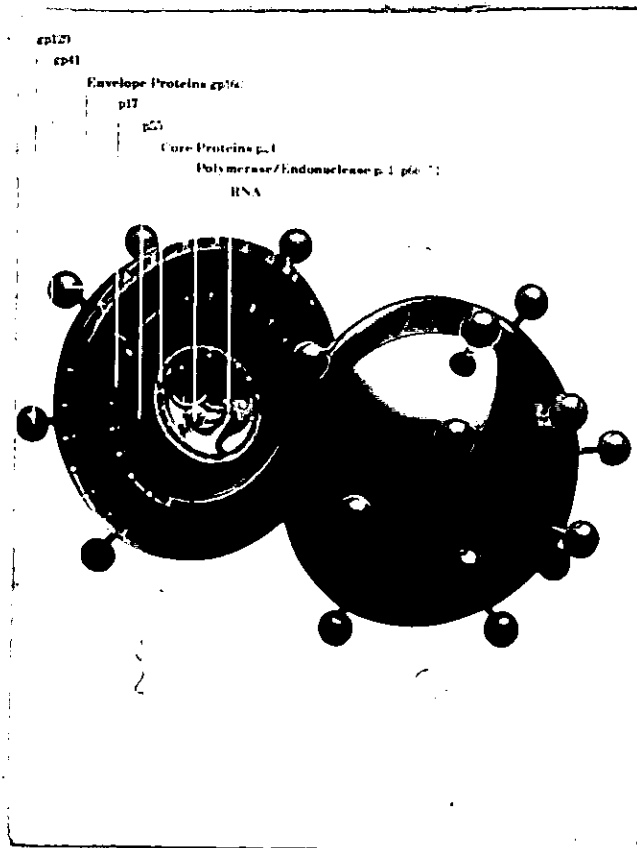


Figura 1: Estrutura antigenica do virus HIV

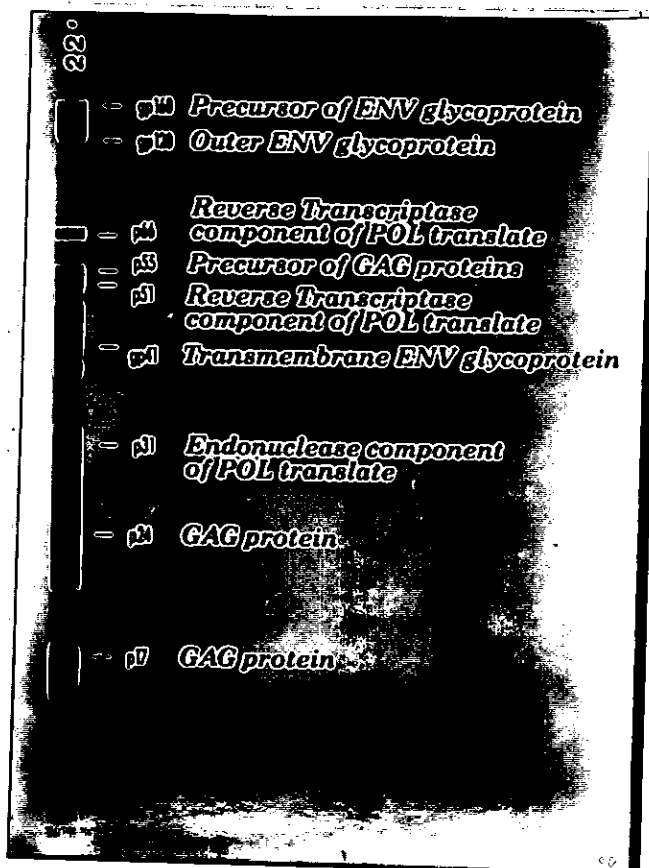


Figura 2: Antigenos do HIV numa tira do teste Western Blot.

critérios-padrão (standard criteria) para a positividade de um teste de confirmação pelo Western Blot correntemente utilizados incluem: o da Food and Drug Administration dos E.U.A. (Estados Unidos da América) para o teste DuPont (presença de anticorpos contra a p24, p31, e gp120/160); o critério da Cruz Vermelha Americana, E.U.A. (presença de pelo menos uma proteína de cada produto genético); o critério da Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors/Department of Defense Criteria, E.U.A. (presença de anticorpos contra qualquer das 2 proteínas p24, gp41 e gp120/160), e o critério da Consortium for Retroviruses Serology Standardization, E.U.A. (presença de anticorpos contra pelo menos p24 ou p31 e gp41 ou gp120/160). Os resultados negativos não apresentam nas tiras do Western Blot reacção com nenhuma das bandas de proteínas correspondentes aos antígenos virais [21, 24].

O critério utilizado pelo Laboratório de Referência do SIDA considera positivo o teste que apresente pelo menos uma proteína de cada produto genético [25].

Todos os outros padrões de bandas que não são incluídos nas categorias acima citadas são considerados resultados "indeterminados" ou "não-conclusivos" e sobre eles nenhuma conclusão pode ser tirada sobre a evidência de exposição do indivíduo às proteínas virais [21,22]. Possíveis explicações para a reactividade dos "indeterminados" incluem o estadio da doença em que se encontra o indivíduo, podendo apresentar um estadio precoce ou avançado da infecção, a variabilidade biológica da resposta ao HIV, a reacção cruzada com outros anticorpos dirigidos contra outros retrovírus relacionados com o HIV, presença de autoanticorpos, e artefactos técnicos [14,26]. Recomenda-se que estes soros sejam retestados 2-3 meses mais tarde, uma vez que o indivíduo infectado possa encontrar-se em estado de seroconversão [6,14]. Outros fenómenos que tem sido referidos como possível causa



dos resultados indeterminados são uma reactividade cruzada com outros retrovírus ou uma reacção cruzada ainda não compreendida que é usualmente encontrada em indivíduos saudáveis e em pacientes com anticorpos contra o antígeno HLA, com bilirubinemia, doenças do tecido conectivo e gamopatias policlonais [14,27].

A grande heterogenidade dos padrões de reactividade dos "Western Blot" observados em Moçambique, e, o facto dos resultados indeterminados aparecerem com relativa frequência em indivíduos que apresentam sintomas relacionados com os característicos da infecção, reforça a necessidade de clarificar este problema [28]. Entre os dadores de sangue ELISA positivos em Moçambique resultados indeterminados apresentam uma frequência de 60%, enquanto que num estudo no qual foram testados 46831 soros pelo método ELISA foi revelada uma taxa de reactividade positiva pelo "Western Blot" de 3.4%, dos quais 1.8% apresentaram resultados indeterminados, sendo 0.78% para HIV1 e 1.04% para HIV2, com variados padrões de reactividade [29].

O significado biológico de um resultado indeterminado permanece por ser esclarecido, se bem que à partida se assumia que o mesmo seja devido a múltiplas causas, muito provavelmente actuando ao mesmo tempo [28]. Por outro lado, do ponto de vista do controle de transmissão da infecção por HIV, pelas transfusões de sangue, a procura de métodos que permitam obter um certo grau de clarificação sobre se um resultado indeterminado estará associado ou não com a infecção HIV, reveste-se de particular importância [30]. Assim, o presente trabalho é o primeiro na procura de explicações biológicas ou de possíveis causas inespecíficas que permitam discriminar através de provas laboratoriais, resultados indeterminados associados à infecção pelo HIV daqueles que ocorrem devidos a causas inespecíficas [31].

Neste trabalho propõem-se verificar se a presença de autoanticorpos e hipergamaglobulinemia poderia estar na origem do aparecimento dos resultados indeterminados ou não-conclusivos nos ensaios de Western Blot para HIV 1 e HIV2.

### 1.1.2. Imunoglobulinas

Podem ser descritas 5 classes de Imunoglobulinas (Ig) nomeadamente IgG, IgA, IgM, IgD e IgE em ordem decrescente de concentração no soro, que se distinguem pelas diferenças estruturais nas suas cadeias pesadas. A direcção antigénica da cadeia pesada permite preparar antisoros específicos às classes que são úteis para a sua detecção e determinação [11].

A IgG, principal Ig do soro humano, constitui 80% do total de Igs e ocorre principalmente na resposta secundária a um determinado antígeno. Os anticorpos IgG são capazes de destruir as bactérias e os parasitas sendo também activos na neutralização dos vírus. A IgA constitui aproximadamente 15% das Igs totais e é a Ig predominante das secreções do tracto gastrointestinal e respiratório. A sua principal função, é de protecção aos vários elementos epiteliais do organismo expostos da invasão por microorganismos patogénicos particularmente virais e bacterianos. A resposta primária, é elaborada pela IgM a qual é essencialmente confinada à corrente sanguínea. Em baixas concentrações no soro, a IgD funciona como receptor de antígenos linfocíticos prosseguindo no momento em estudo o seu papel na resposta imune [10,11]. Embora muito importante biologicamente a IgE é encontrada em muito baixas concentrações no soro [11].

As alterações nas concentrações de Igs podem ser tanto quantitativas quanto qualitativas. As primeiras envolvem mais que uma classe de Igs. Esta situação ocorre em indivíduos que

apresentem hipergamaglobulinemia embora possam existir deficiências selectivas de uma ou duas classes de Ig. Uma hipergamaglobulinemia policlonal é uma condição frequentemente achada depois de uma forte estimulação das defesas imunes. O antígeno pode vir de agentes causadores de doenças infecciosas, de doenças autoimunes ou em doenças do fígado agudas ou crónicas. As alterações qualitativas referem-se a aspectos funcionais [31].

### 1.1.3. Factores Reumatoides

O factor reumatoide pertence à classe de imunoglobulinas G e M, que reagem contra a região variável das cadeias pesadas das imunoglobulinas G. O factor reumatóide é encontrado em indivíduos com doenças de natureza autoimune ou infecciosas e supõe-se que neste último caso, o provável estímulo para o aparecimento de factores reumatóides, seja a presença de IgG com estrutura alterada pela combinação com um antígeno exógeno ou a perda da autotolerância do sistema imune a essa classe de imunoglobulina.

Acredita-se que o factor reumatóide seja formado contra a IgG em complexos imunes, como no caso de complexos vírus-anticorpo e que a estrutura da IgG se altera quando está agregada a vírus ou a outros antígenos [9,10,32].

#### 1.1.4. Autoanticorpos

Autoimunidade refere-se a uma condição tida como resultado de uma resposta imunológica de um hospedeiro contra constituintes do seu próprio organismo. As respostas autoimunes, referem-se à produção de anticorpos contra autoantígenos ou sejam, autoanticorpos. Algumas respostas podem ou não estar associadas com doença autoimune [9]. Alguns dos possíveis mecanismos no desenvolvimento da autoimunidade são:

a) Exposição a antígenos sequestrados. Antígenos que estando sequestrados em órgãos não tiveram contacto com o sistema imune durante o desenvolvimento deste, e que, devido a um dano que os exponha em contacto com o sistema imune, pode desencadear uma resposta autoimune e levem à formação de anticorpos dirigidos contra esses antígenos [9].

b) Falta de tolerância a nível das células T. A falta de resposta aos constituintes normais do corpo é mantida a nível das células T helper. A activação destas células tolerantes por antígenos não próprios que cruzam com os próprios - ou pela substituição da actividade das células T helper por certos factores inespecíficos - leva a que células B pré-existent e não tolerantes aos constituintes próprios sejam activadas para a produção de autoanticorpos. A activação das células T helper pode portanto ser induzida pela produção de um novo determinante antigénico numa molécula normal do organismo por associação com um novo antígeno. As células B podem também ser induzidas a produzir autoanticorpos por activadores policlonais como é o caso de alguns vírus ou bacterias [16,20].

c) Semelhança entre as proteínas normais do corpo e antígenos estranhos. A penetração de antígenos com estruturas moleculares

semelhantes às de proteínas normais do corpo, pode levar ao aparecimento de reacções autoimunes contra essas proteínas próprias. Por exemplo, a febre reumática é produzida pela invasão de algumas espécies de estreptococcus, que libertam toxinas com estrutura antigénica semelhante à do músculo cardíaco e à das membranas sinoviais. Este antígeno, faz com que o sistema imune desenvolva autoimunidade contra as estruturas do coração e articulações.

d) Defeitos na rede idiotípo-anti-idiotípo. A região variável das imunoglobulinas podem actuar como determinantes antigénicos gerando assim outros anticorpos que reconhecem os anticorpos com especificidades distintas. Estes determinantes das regiões variáveis das imunoglobulinas são denominadas idiotípos e os anticorpos contra eles dirigidos são chamados anti-idiotípos. Os determinantes idiotípo-anti-idiotípo expressos pelos produtos solúveis das células B e T possuem a função de regular a resposta imune. Um dado anticorpo pode surgir como produto de uma estimulação pelo antígeno ou de uma estimulação pelo anti-idiotípo, e, a indução de idiotípos na ausência de antígeno tem sido amplamente demonstrada. Respostas autoimunes tem sido também referidas como expressão de anomalias na regulação imune que leva à produção excessiva ou diminuída de anticorpos anti-idiotípos [9,10].

Outros factores tem sido referidos como indutores de respostas autoimunes nomeadamente função diminuída das células T supressoras, e defeitos do timo entre outros [9].

### *1.2. OBJECTIVOS*

1. Determinar os valores de concentração das imunoglobulinas Ig A, Ig G e Ig M em séros de indivíduos com resultados positivos, negativos e indeterminados pela técnica Western Blot.
2. Detectar a presença de autoanticorpos em séros de indivíduos com resultados positivos, negativos e indeterminados pela técnica Western Blot.
3. Comparar os valores de imunoglobulinas e a presença de Autoanticorpos entre o grupo de Indeterminados e os grupos de positivos e negativos para HIV.

## *2. METODOLOGIA DO ESTUDO*

### *2.1. SELECÇÃO DAS AMOSTRAS*

A amostra estudada foi constituída por 150 soros. Destes, 60 eram de indivíduos com resultados indeterminados pela técnica Western Blot para HIV, colectados no Banco de Sangue (BS), 30 soros de indivíduos com resultados positivos pelo "Western Blot" para HIV provenientes das consultas do Hospital Central de Maputo (HCM), 30 soros de indivíduos Moçambicanos com resultados negativos, e, 30 soros de indivíduos não Moçambicanos com resultados negativos. Estes dois últimos grupos foram colectados no Laboratório Nacional de Referência do Sida (LNRS) e constituíram o grupo de controle. As amostras de soros com resultados indeterminados foram enviadas ao LNRS para confirmação do resultado positivo (feito para anticorpos anti-HIV pela técnica ELISA comercial "Pasteur Diagnostic"), usando a técnica Western Blot comercial "DuPont", em seleccionadas com base nos padrões de proteínas mais frequentes (Anexo 3). As amostras de soro com resultados positivos para HIV, foram enviadas ao LNRS para confirmação do diagnóstico de infecção por HIV, e as com resultados negativos, para efeitos de deslocação ao exterior do País.

A idade dos indivíduos cujos soros foram incluídos no estudo estão compreendidas entre os 4 meses e os 69 anos (Anexo 4).

A colecta das amostras foi feita ao longo do ano de 1989 no caso dos soros colectadas no BS, e no primeiro semestre do ano em curso para o caso das amostras do HCM e das amostras colectadas no LNRS.

O soro colectado depois dos primeiros testes para detecção de anticorpos contra o vírus (ELISA e Western Blot) foram aliquotados e conservados a -20°C até à realização dos testes que fizeram parte deste estudo.

Precedendo às técnicas para detecção de autoanticorpos, as amostras foram inactivadas a 56°C durante 30 minutos.

## 2.2. QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS

Para a determinação de Imunoglobulinas (Igs), foi utilizado o método de Imunodifusão Radial (RID) que permite calcular a concentração de um antígeno, a partir do anel de precipitina formado pela difusão do antígeno no gel contendo anticorpo [33]. Neste teste, nas escavações das placas de gel agarose (Kallestad Laboratories) contendo anti-soro monoespecífico foi depositado um volume de 5µl do soro a testar e 5µl de soro controle. Depois de tapadas as placas foram incubadas a temperatura ambiente numa superfície plana na ausência de claridade. (Ver anexo 5).

Os resultados foram obtidos pela leitura dos diâmetros dos anéis de precipitação e os valores de concentração respectivos foram lidos usando as tabelas fornecidas no kit e específicas para cada lote de placas.

As leituras dos anéis foram feitas depois de 24 Horas de incubação para as 3 classes de Igs. O resultado final foi obtido depois de 48 Horas de incubação para a IgA e IgG e, 72 Horas de incubação para a IgM.

## 2.3. DETECÇÃO DE FACTORES REUMATOIDES

Foi utilizado um teste de aglutinação que se baseia nas propriedades aglutinantes da imunoglobulina G, da classe dos Factores Reumatóides (FR). Assim, uma Ig G é ligada a um transportador particulado (látex) revestida com gamaglobulina humana e a presença de FR é identificada pela ocorrência de uma reacção de aglutinação [34].



Um volume de 40 µl de soro a uma diluição de 1:5 com solução salina isotónica 0.9% e a mesma quantidade de soros control positivo e negativo foram depositadas nas áreas de reacção da placa teste (Behring Laboratories, FR-Látex Rapid Test). Uma gota de Reagente Látex-RF foi acrescentada a cada amostra de soro e a agitação da placa foi feita para permitir a reacção total. Transcurridos 2 minutos a aglutinação foi avaliada fazendo para tal a comparação com a reacção dos soros de controle. Os soros foram considerados positivos ou negativos conforme apresentassem ou não uma reacção de aglutinação. Os controis positivos serviram de para a comparação destes resultados. (Ver anexo 6).

## 2.4. DETECÇÃO DE AUTOANTICORPOS

### 2.4.1. Anticorpos anti-nucleares

Este ensaio de Imunofluorescência [35] baseia-se na utilização de lâminas (Kallestad Laboratories) cobertas com substrato de cultura de células de tecido epitelial humano. Uma gota (aprox. 25 µl) de soro a testar a uma diluição de 1:40 com PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7.2, foi depositado nos diferentes poços da lâmina de forma a cobrir toda a área do tecido. Seguiu-se a incubação das lâminas em câmara húmida a temperatura ambiente por 30 minutos. Findo este tempo o excesso de soro foi removido em lavagem dupla com PBS num agitador magnético. O passo a seguir envolveu a secagem das lâminas mantendo o cuidado de não permitir a secagem do substrato, e a adição de 1 gota de conjugado monovalente de gamaglobulina anti-humana marcada com FITC (Fluorescein Isothiocyanate "Isotiocianato de fluoresceína"). As lâminas foram de novo incubadas em câmara húmida no escuro a temperatura ambiente durante 30 minutos. Lavagem dupla e secagem antecederam a montagem da lâmina com glicerol. A observação ao microscópio foi feita com objectiva de 40X.

A presença de um padrão discernível de fluorescência foi

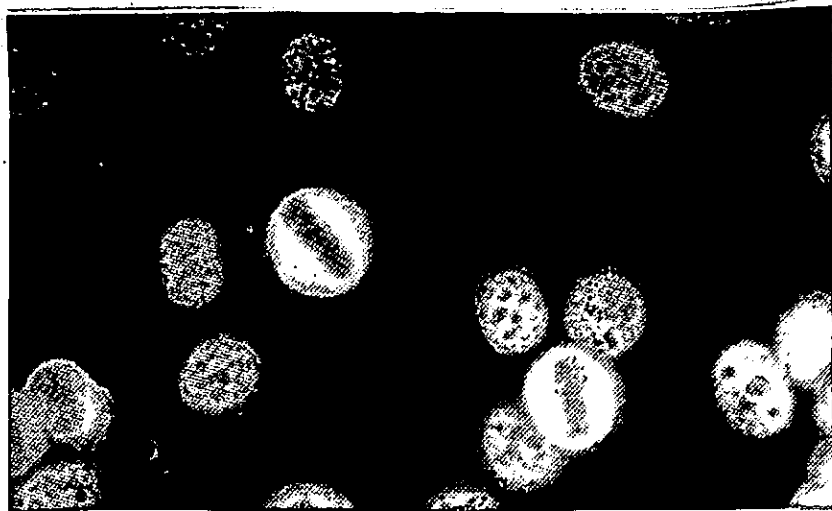
considerada como indicadora da presença de anticorpos anti-nucleares no soro testado, tendo sido confirmada pela comparação com soro de controle positivo usado durante o teste. Consideraram-se positivos os soros que apresentaram padrões de fluorescência em títulos iguais ou superiores à diluição de 1:40. A não existência de anticorpos anti-nucleares comparável ao soro de controle negativo foi determinada na ausência de qualquer padrão de imunofluorescência. (Ver figura 3,4 e 5 e anexo 7).

#### 2.4.2. Teste do Bloco Composto

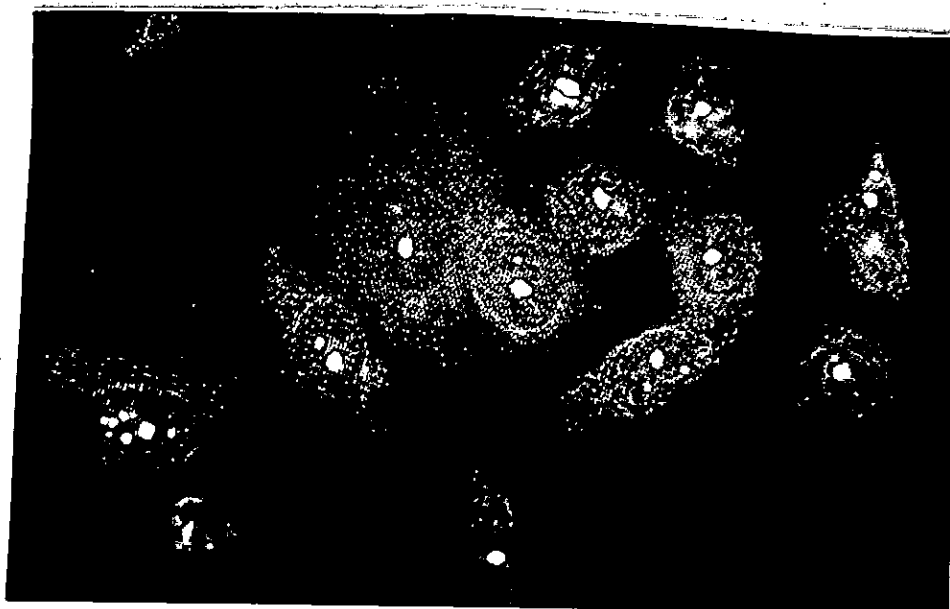
O sistema de teste emprega como substrato o fígado, rim e estômago de rato e tem a capacidade de detectar através de um único teste a presença dos seguintes anticorpos: anticorpos anti-nucleares (ANA), anticorpos contra as células parietais (PCA), anticorpos anti-mitocondriais (MA), anticorpos contra o músculo liso (SMA), anticorpos contra o fígado e o rim "liver/kidney" (LK) e anticorpos anti-ribossoma [31].

Neste ensaio o soro a testar foi diluído a 1:20 com PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7.2, e depositou-se no poço da lâmina (Kallestad Laboratories) um volume de 50 µl de soro diluído cobrindo toda a área contendo substrato. As lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara húmida. Depois desse tempo uma lavagem dupla permitiu a remoção do soro que não se ligou ao antígeno na lâmina. As lâminas foram secas rapidamente para não permitir a secagem do substrato e imediatamente foi acrescentada 1 gota de conjugado polivalente de gamaglobulina anti-humana marcada com FITC. As lâminas foram de novo incubadas por um período de 30 minutos em câmara húmida a temperatura ambiente, seguindo-se a lavagem como anteriormente referido. A montagem das lâminas foi feita com 1 gota de glicerol seguindo-se a observação ao microscópio de fluorescência com objectiva de 20X.

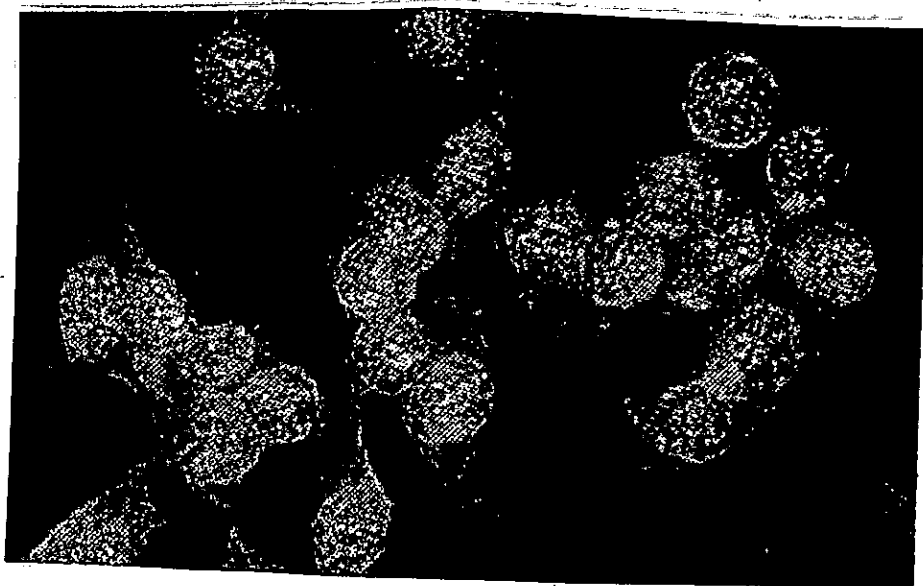
*Figura 3: Anticorpos anti-nucleares positivos com fluorescência dispersa por todo o núcleo.*



*Figura 4: Anticorpos anti-nucleares positivos apresentando os nucleolos fluorescentes.*

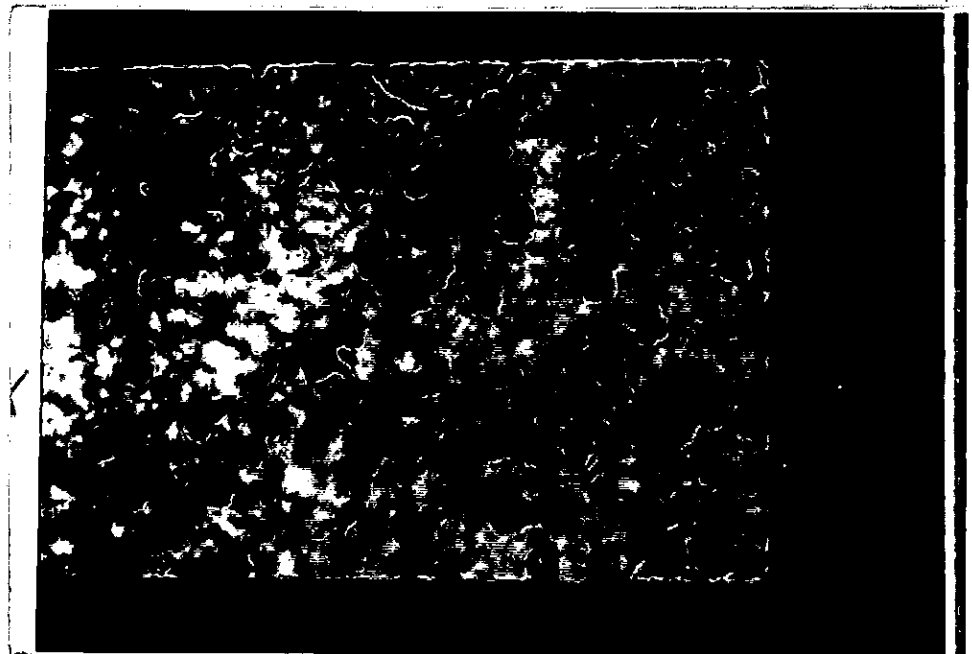


*Figura 5: Anticorpos anti-nucleares negativos com ausência de fluorescência.*



Os resultados obtidos foram interpretados com base na existência ou não de fluorescência em qualquer dos tecidos usados como substrato na lâmina. Os resultados foram considerados positivos, nos soros com títulos iguais ou superiores a 1:20. Os resultados negativos foram determinados na ausência de fluorescência semelhante ao soro de controle negativo. (Ver figura 6 e anexo 8)

Figura 6: Anticorpos anti-musculo liso negativo.



#### 2.4.3. Anticorpos Anti-ADN (Crithidia nDNA)

Este método utiliza uma lâmina cujo substrato é a *Crithidia luciliae*, um hemoflagelado que possui um núcleo e um kinetoplasto muito ricos em DNA. É também baseado em Imunofluorescência Indirecta para uma determinação qualitativa e semi-quantitativa [32,34]. A presença de anticorpos anti-ADN é revelada pela reação destes com o núcleo e o kinetoplasto da *Crithidia luciliae*. Um volume de 40 µl de soro foi depositado nos poços da lâmina e estas foram incubadas por 30 minutos. No segundo passo um conjugado polivalente de gamaglobulina marcada com FITC foi adicionado ao substrato depois da lavagem dupla das lâminas com PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7.2. O excesso de conjugado foi retirado por

lavagem dupla com PBS e foi acrescentado à lâmina 1 gota de glicerol para a leitura dos resultados no microscópio de fluorescência com objectiva de imersão. Uma reacção positiva é indicada por uma fluorescência verde do kinetoplasto e do núcleo ou somente do kinetoplasto. (Ver anexo 9)

#### **2.4.4. Anticorpos contra a tiroide**

Através deste teste fêz-se a pesquisa de anticorpos que reagem contra os antígenos tiroglobulina e microssoma da tiroide. Neste método baseado em hemaglutinação passiva utilizam-se suspensões de eritrócitos sensibilizados com os antígenos tireoglobulina e microssoma que devido ao tratamento com ácido tânico adquirem a capacidade de adsorver antígenos na sua superfície [31].

Para cada soro a testar e soro de controle utilizaram-se diluições de 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320. Um volume de 25µl de soro de cada diluição foi depositado nos poços da microplaca de diluição para detecção de antígenos tireoglobulina e de microssoma (Wellcome Thymune T Kit e Wellcome Thymune M, Wellcome Diagnostic). Imediatamente se adicionou 25µl de uma suspensão de eritrócitos controle ao poço de diluição 1:10 que corresponde ao controle. Aos restantes adicionam-se 25 µl de eritrócitos sensibilizados com tireoglobulina e com microssoma para a pesquisa de autoanticorpos contra estes 2 antígenos. A microplaca foi agitada para permitir a mistura do conteúdo da microplaca e deixada sedimentar a temperatura ambiente ao abrigo da luz solar num lugar livre de vibrações. A leitura dos resultados foi feita decorridos 45 minutos. Um soro é considerado positivo se no poço da microplaca os eritrócitos sensibilizados com antígeno são aglutinados pelos anticorpos específicos ao antígeno presentes no soro e sedimentam no fundo do poço em forma de tapete difuso. Um soro é negativo se no poço da microplaca se forma um círculo pequeno ou um botão compacto no fundo do poço da microplaca.

## **2.5. ANALISE DE DADOS**

### **2.5.1. Valores de Imunoglobulinas**

Estimaram-se os valores médios e os desvios padrões das concentrações de IgA, IgG, e IgM em cada um dos grupos estudados e compararam-se entre si utilizando um teste de t de Student segundo o pacote de aplicações estatísticas MICROSTAT para computador pessoal. Aceitaram-se como significativas todas aquelas diferenças cujos valores de probabilidade (p) dada pelo teste t de Student) fossem menores que 0.05.

### **2.5.2. Factor Reumatoide e autoanticorpos**

Estimou-se frequência da aparição do factor reumatoide e dos autoanticorpos em cada um dos grupos estudados e compararam-se entre si utilizando um teste de Chi-quadrado segundo o pacote de aplicações estatísticas MICROSTAT para computador pessoal. Aceitaram-se como significativas todas aquelas diferenças cujos valores de probabilidade dada pelo teste Chi-quadrado (p) fossem menores que 0.05.

### 3. RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, RECOMENDAÇÕES

#### 3.1. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

##### 3.1.1. Imunoglobulinas

Os valores de concentração médios das 3 classes (IgA, IgG, IgM) são apresentados nas tabelas 1, 2, e 3 nas quais se incluem os 4 grupos estudados quanto a reactividade HIV. Os mesmos resultados foram ilustrados em forma de gráfico nas figuras 7 e 8 onde aparecem os valores em diferentes unidades de concentração mg/dl e IU/ml respectivamente. A comparação entre os grupos de indivíduos com resultados indeterminados, positivos e negativos Moçambicanos e não Moçambicanos à técnica Western Blot é demonstrada nas tabelas 4, 5, 6, e 7.

Na comparação feita entre <sup>HIV + Moçamb. e Indeterminados</sup> indeterminados e <sup>23 de Sexo Feminino e HIV + e 19 de Sexo Masculino</sup> positivos verifica-se <sup>ou</sup> que existem diferenças significativas entre estes 2 grupos para o <sup>caso</sup> caso da IgG e da IgM. Os mesmos resultados são encontrados quando se comparam os positivos com os negativos Moçambicanos e com os negativos não Moçambicanos. Entre o grupo de indeterminados e os 2 grupos de negativos estudados os resultados do teste estatístico indicam não haverem diferenças significativas entre eles. Para a IgA todos os valores indicam que os grupos podem ser considerados homogêneos pois nenhuma diferença significativa foi aqui encontrada. p=1

Tabela 1: Valores de concentração de imunoglobulinas no grupo de indivíduos com resultados indeterminados. (n=60)

	Média	DP	Min.	Max.
Ig A (mg/dl)	281.2	120.2	70	674
Ig A (IU/ml)	171.8	70.2	43	411
Ig G (mg/dl)	2113.7	563.2	275	3751
Ig G (IU/ml)	244.9	60.1	147	432
Ig M (mg/dl)	195.3	97.1	53	531
Ig M (IU/ml)	218.7	108.7	59	574

DP= Desvio padrão

Min.= Valor mínimo de concentração

Max.= Valor máximo de concentração

mg/dl= miligrama/decilitro

IU/ml= International Units/mililitro (Unidades Internacionais/mililitro)

Tabela 2: Valores de concentração de imunoglobulinas no grupo de indivíduos com resultados positivos. (n=30)

	Média	DP	Min.	Max.
Ig A (mg/dl)	321.5	157.1	100	677
Ig A (IU/ml)	199.4	95.8	61	413
Ig G (mg/dl)	3238.1	807.5	1766	5401
Ig G (IU/ml)	369.3	94.9	203	622
Ig M (mg/ml)	339.8	197.5	88	690
Ig M (IU/ml)	381.9	196.4	99	772

DP= Desvio padrão

Min.= Valor mínimo de concentração

Max.= Valor máximo de concentração

mg/dl= miligrama/decilitro

IU/ml= International Units/mililitro (Unidades Internacionais/mililitro)



Tabela 3: Valores de concentração de immunoglobulinas no grupo de indivíduos negativos Moçambicanos. (n=30)

	Média	DP	Min.	Max.
Ig A (mg/dl)	299.1	165.2	62	677
Ig A (IU/ml)	192.4	191.4	38	558
Ig G (mg/dl)	2024.8	704.9	843	3820
Ig G (IU/ml)	231.8	79.7	97	432
Ig M (mg/dl)	229.2	153.7	53	690
Ig M (IU/ml)	256.4	172.0	59	772

DP= Desvio padrão

Min.= Valor mínimo de concentração

Max.= Valor máximo de concentração

mg/dl= miligrama/decilitro

IU/ml= International Units/mililitro (Unidades Internacionais/mililitro)

Tabela 4: Valores de concentração de immunoglobulinas no grupo de indivíduos negativos não Moçambicanos. (n=30)

	Média	DP	Min.	Max.
Ig A (mg/dl)	285.4	150.4	12	693
Ig A (IU/ml)	185.6	98.6	7	423
Ig G (mg/dl)	1703.1	537.5	1007	3235
Ig G (IU/ml)	195.8	61.1	116	372
Ig M (mg/dl)	205.7	106.3	33	541
Ig M (IU/ml)	230.8	118.5	37	606

DP= Desvio padrão

Min.= Valor mínimo de concentração

Max.= Valor máximo de concentração

mg/dl= miligrama/decilitro

IU/ml= International Units/mililitro (Unidades Internacionais/mililitro)

Tabela 5: Comparação dos valores de concentração médios de Ig A

	t	p	gl
Positivos/ Indeterm.	1.3525	0.0898	88
Neg. Moç./ Indeterm.	0.5879	0.2790	88
Neg. N.Moç./ Indeterm.	0.1435	0.4431	88
Positivos/ Neg. Moç.	0.5380	0.2963	58
Positivos/ Neg. N.Moç.	0.9108	0.1831	58
Neg. N.Moç./ Neg. Moç.	0.3375	0.3685	58

t= Valor dado pelo teste t de Student

p= Valor de probabilidade

gl= Graus de Liberdade

Tabela 6: Comparação dos valores de concentração médios de Ig G

	t	p	gl
Indeterm./ Positivos	7.6900	9.38E-12	88
Neg. Moç./ Indeterm.	0.6479	0.2594	88
Indeterm./ Neg. N.Moç.	3.3209	6.5390	88
Positivos/ Neg. Moç.	6.1996	3.19E-8	58
Positivos/ Neg. N.Moç.	8.6968	2.10E-12	58
Neg. N.Moç./ Neg. Moç.	1.9960	0.0253	58

t= Valor dado pelo teste t de Student

p= Valor de probabilidade

gl= Graus de Liberdade

Tabela 7: Comparação dos valores de concentração médios de Ig M

	t	p	gl
Positivos/ Indeterm.	5.2502	5.22E-7	88
Neg. Moç./ Indeterm.	1.2747	0.1029	88
Neg. N.Moç./Indeterm.	0.4620	0.3226	88
Positivos/ Neg. Moç.	2.8160	3.32E-3	58
Positivos/ Neg. N.Moç.	3.7167	2.282E-4	58
Neg. N.Moç./ Neg. Moç.	0.6887	0.2469	58

t= Valor dado pelo teste t de Student

p=Valor de probabilidade

gl= Graus de liberdade

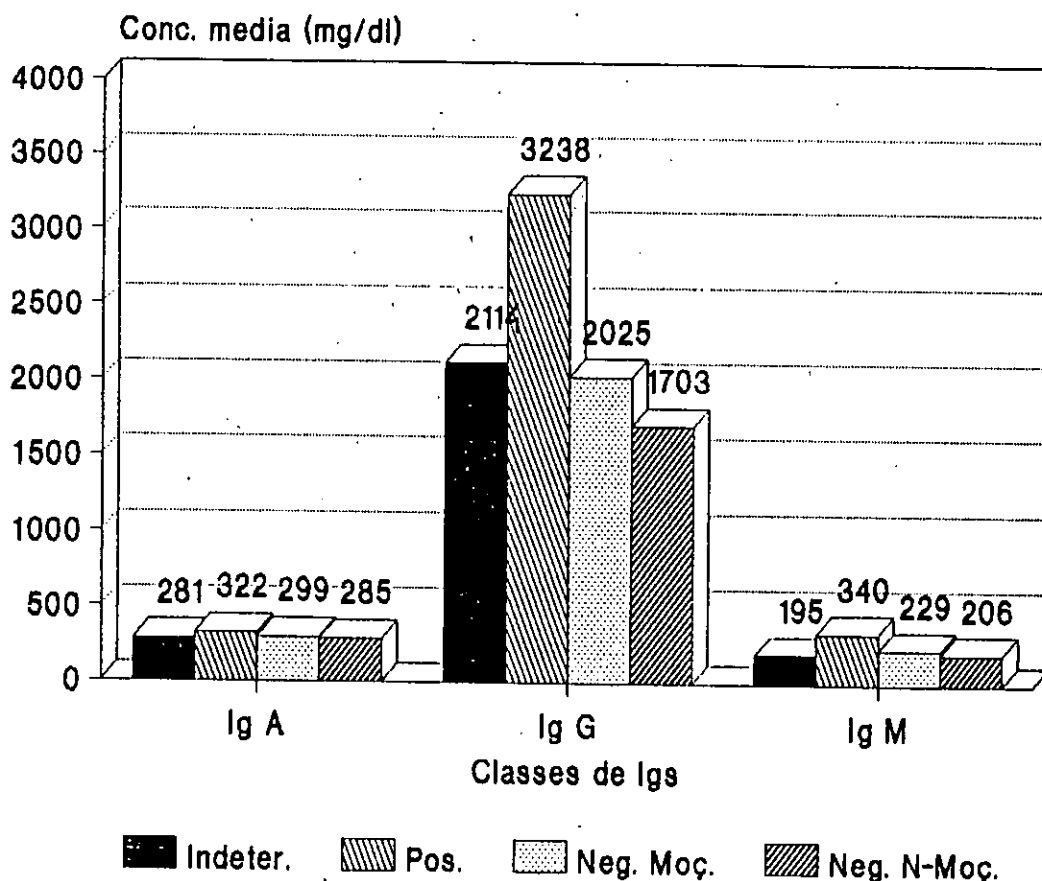


Figura 7: Concentração de imunoglobulinas por classe nos 4 grupos estudados em mg/dl.

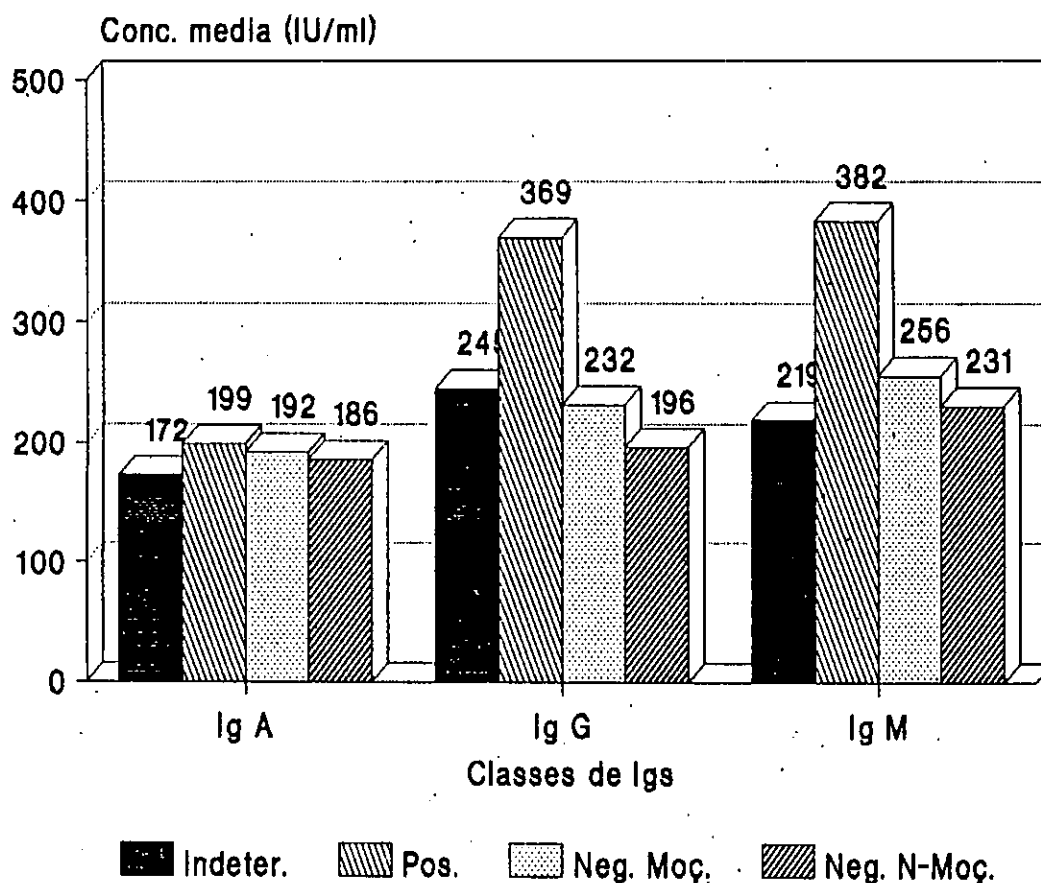


Figura 8: Concentração de imunoglobulinas por classe nos 4 grupos estudados em IU/ml.

### 3.1.2. Factor Reumatoide

No que concerne aos factores reumatoides os valores percentuais dos indivíduos com factor reumatoide positivo e negativo encontram-se organizados na tabela 8 e na figura 9. A tabela 9 mostra a comparação feita entre os grupos de indivíduos com resultados indeterminados, positivos, negativos Moçambicanos e negativos não Moçambicanos.

A comparação feita entre os 2 grupos de negativos dão um resultado não significativo pelo que as seguintes análises foram feitas agrupando os num só. Assim nova comparação foi feita entre o grupo de indeterminados, os positivos e os negativos totais. Depois de feita esta análise verificou-se serem significativas as diferenças existentes entre os 3 grupos.

Tabela 8: Valores numéricos e percentuais do Factor Reumatoide positivo e negativo.

	Positivos		Negativos	
	Nº	%	Nº	%
Indeterminados	23	38.3	37	62.7
Positivos	14	46.7	16	53.3
Negativos Moç.	4	13.3	26	86.7
Negativos não Moç	6	20.0	24	80.0

Número de indivíduos

%= Percentagem

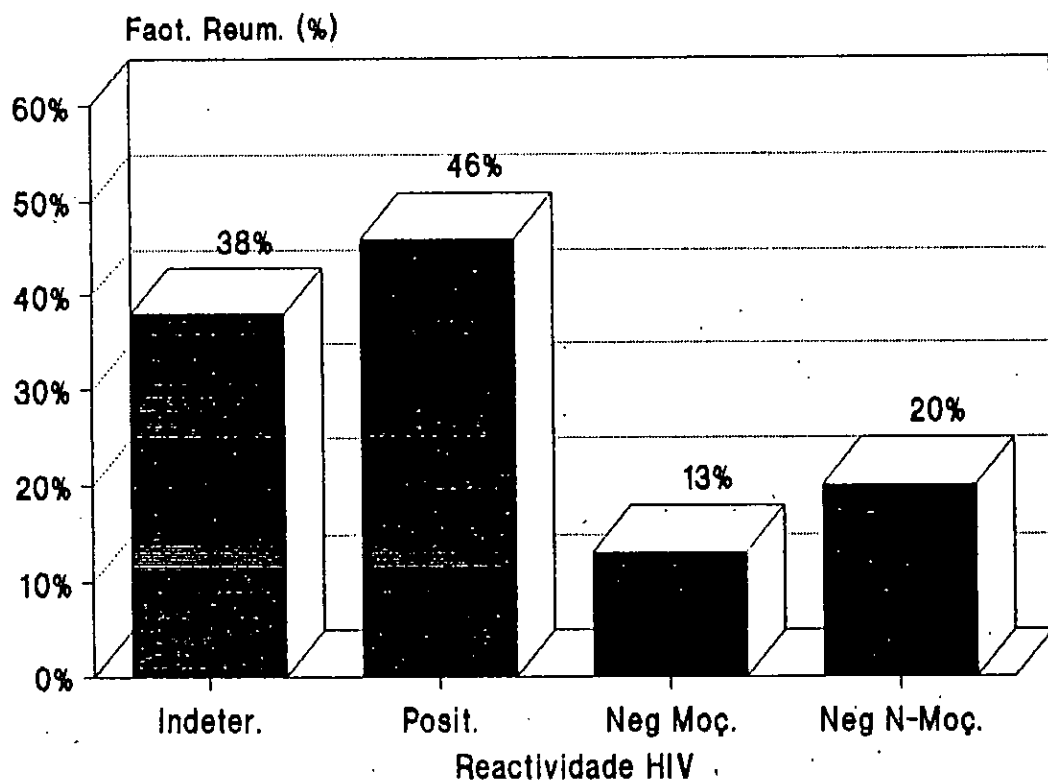
Tabela 9: Comparação das frequências do Factor Reumatoide nos grupos de estudo

	X <sup>2</sup>	p	gl
Neg. Moç./ Neg.N.Moç.	0.120	0.7290	58
Pos./ Neg. Totais	7.734	5.42E-3	88
Indeterm./Positivos	0.281	0.5960	88
Indeterm./ Neg. Totais	6.019	0.0142	88

X<sup>2</sup>= Valor dado pelo teste Chi-quadrado

p= Valor de probabilidade

gl= Graus de liberdade



■ F. Reumatoide

Figura 9: Percentagem de indivíduos com factor reumatoide positivo.

### 3.1.3. Autoanticorpos

Na tabela 10 vem expressa a percentagem de indivíduos com presença de autoanticorpos encontrada nos diferentes grupos e os mesmos dados são apresentados na figura 10. A tabela 11 permite demonstrar se existem diferenças significativas entre os 4 grupos estudados.

O grupo de indeterminados comparado com o grupo de positivos demonstra haverem diferenças significativas entre eles. O mesmo resultado é encontrado na comparação entre positivos e negativos.

No caso dos negativos não foram encontradas diferenças significativas entre estes 2 grupos.

Tabela 10: Valores numéricos e percentuais de Autoanticorpos positivos e negativos.

	Positivos		Negativos	
	Nº	%	Nº	%
Indeterminados	14	23.3	46	76.7
Positivos	16	53.3	14	46.7
Negativos Moç.	1	3.3	29	96.7
Negativos não Moç	3	10.0	27	90.0

Nº= Número de indivíduos

%= Percentagem

Tabela 11: Comparação das frequências de Autoanticorpos nos grupos de estudo

	X <sup>2</sup>	p	gl
Indeterm./ Pos.	6.806	9.084E-3	88
Indeter./Neg. Totais	5.294	0.021	118
Pos./ Neg. Totais	22.574	2.024E-6	88
Neg. Moç./ Neg. N.Moç.	0.260	0.605	58

X<sup>2</sup>= Valor dado pelo teste Chi-quadrado

p= Valor de probabilidade

gl= Graus de liberdade

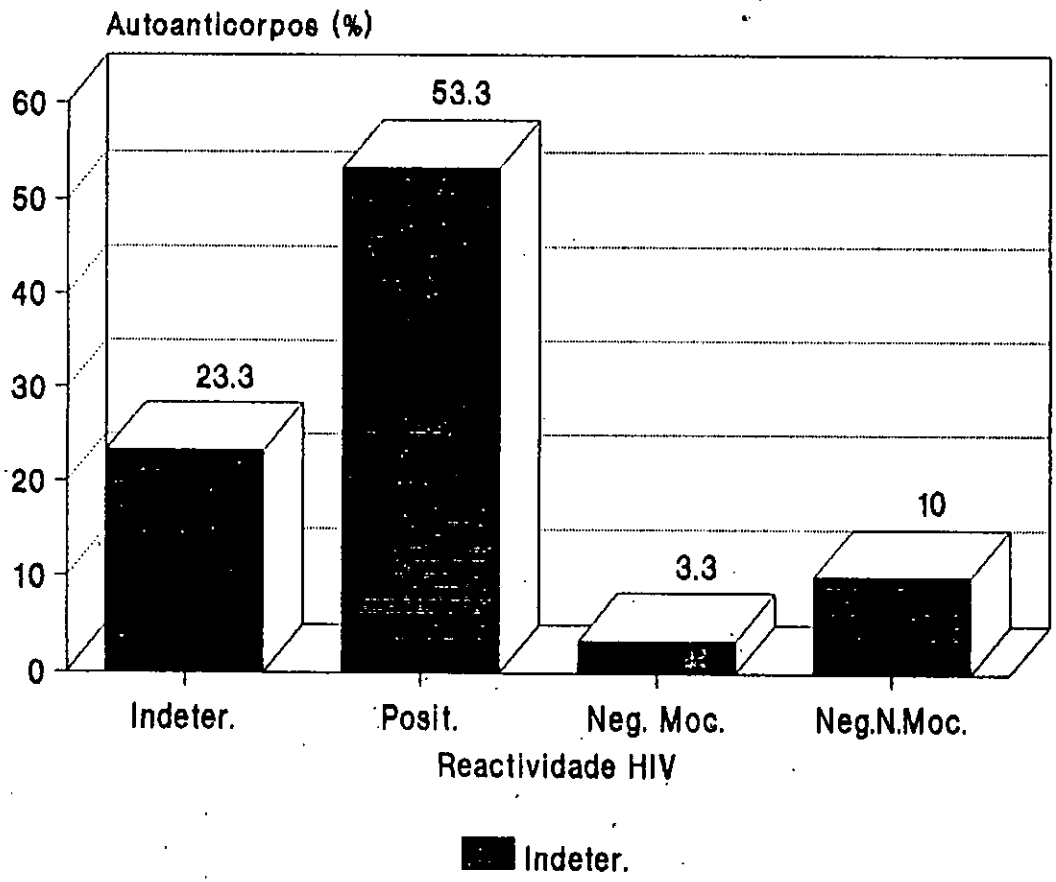


Figura 10: *Percentagem de indivíduos com autoanticorpos positivos.*



#### 3.1.4. Associação entre a presença de Factores Reumatoides e os valores da concentração de Imunoglobulinas

Para verificar se existiam diferenças significativas quanto à concentração de imunoglobulinas nos indivíduos com factor reumatoide positivo e negativo resultados foram organizados nas tabelas 12, 13, 14 e 15 com os valores médios de IgA, IgG e IgM, o desvio padrão e os valores encontrados no teste t de Student bem como a probabilidade.

Os indivíduos com resultados "indeterminados" à técnica do W.B. para HIV não apresentaram valores de concentração média de Igs das três classes estudadas significativamente diferentes nos casos em que o factor reumatoide é positivo ou negativo. Para os positivos ao HIV observaram-se valores significativamente superiores de IgG e IgM nos indivíduos que apresentaram factor reumatoide positivo. No caso da IgA os valores achados não diferem para as duas variáveis consideradas. Na comparação feita em indivíduos negativos Moçambicanos somente os valores de concentração de IgG foram significativamente superiores na presença de factores reumatoides. Para IgA e IgM os valores achados não apresentaram diferenças significativas. Nos indivíduos negativos não Moçambicanos os resultados demonstram a não existencia de diferenças significativas nos valores de concentração media de imunoglobulinas A, G, e M na presença ou não de factor reumatoide.

Tabela 12: Comparação dos valores médios de imunoglobulinas na presença e ausência de factores reumatóides no grupo de indivíduos com resultados indeterminados à técnica Western Blot.

	IgA					IgG					IgM				
	M	DP	t	p	gl	M	DP	t	p	gl	M	DP	t	p	gl
F.R.Pos	281.6	111.2	0.064	0.475	58	2011	414.9	1.114	0.135	58	198.2	107.4	-0.24	0.407	58
F.R.Neg	283.6	127.3				2178	637.3				191.9	93.4			

M= Valor médio  
 DP= Desvio padrão  
 t= Valor dado pelo teste t de Student  
 p= Valor de probabilidade  
 gl= Graus de liberdade

Tabela 13: Comparação dos valores médios de imunoglobulinas na presença e ausência de factores reumatóides no grupo de indivíduos com resultados positivos à técnica Western Blot.

	Ig A					Ig G					Ig M				
	M	DP	t	p	gl	M	DP	t	p	gl	M	DP	t	p	gl
F.R.Pos	351.7	144.4	-0.97	0.17	28	3589	909.9	-2.79	4.73 E-3	28	447.4	136.6	-2.42	0.01	28
F.R.Neg	296.4	166.6				2847	519.0				136.6	219.6			

M= Valor médio  
 DP= Desvio padrão  
 t= Valor dado pelo teste t de Student  
 p= Valor de probabilidade  
 gl= Graus de liberdade

Tabela 14: Comparação dos valores médios de imunoglobulinas na presença e ausência de factores reumatóides no grupo de indivíduos com resultados negativos à técnica Western Blot (n=30).

	Ig A					Ig G					Ig M				
	M	DP	t	p	gl	M	DP	t	p	gl	M	DP	t	p	gl
F.R.Pos	307.8	207.5	-0.11	0.46	28	2800	887.4	-2.58	7.69 E-3	28	340.8	235.3	-1.64	0.057	28
F.R.Neg	297.8	162.8				1906	609.2				211.2	133.1			

M= Valor médio

DP= Desvio padrão

t= Valor dado pelo teste t de Student

p= Valor de probabilidade

gl= Graus de liberdade

Tabela 15: Comparação dos valores médios de imunoglobulinas na presença e ausência de factores reumatóides no grupo de indivíduos com resultados negativos não Moçambicanos à técnica Western Blot

	Ig A					Ig G					Ig M				
	M	DP	t	p	gl	M	DP	t	p	gl	M	DP	t	p	gl
F.R.Pos	326.7	273.8	-0.75	0.23	28	1960	872.1	-1.34	0.095	28	251.0	105.1	-1.18	0.125	28
F.R.Neg	275.0	107.0				1639	411.6				194.3	105.7			

M= Valor médio

DP= Desvio padrão

t= Valor dado pelo teste t de Student

p= Valor de probabilidade

gl= Graus de liberdade

### *3.2. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS*

Os resultados obtidos demonstram a existência de valores significativamente superiores de Imunoglobulina G nos indivíduos infectados por HIV do que nos grupos de indivíduos negativos e com resultados serológicos indeterminados. No caso da Imunoglobulina A não foram observadas diferenças significativas das concentrações médias de cada um dos grupos estudados, e, no caso da Ig M observou-se que a concentração média era significativamente diferente no grupo dos indivíduos infectados pelo HIV que nos restantes grupos.

Em relação ao grupo de maior interesse para este estudo, o grupo de indeterminados, e tendo em conta que o teste de confirmação utilizado no Laboratório Nacional de Referência do SIDA, é um testes de Western Blot para a determinação de imunoglobulinas G específicas para as proteínas virais, os resultados obtidos excluem a possibilidade de concluir que os resultados indeterminados sejam devidos a uma elevada concentração de Ig G nos soros desses indivíduos, já que as concentrações desta classe de Imunoglobulina observada no grupo dos indivíduos com Western Blot indeterminado não diferiu significativamente das observadas nos dois grupos de indivíduos com Western Blot negativo utilizados como controis.

Os valores significativamente elevados para a concentração da Ig M observados nos indivíduos com Western Blot positivo e por tanto infectados com HIV são interpretados como expressão de hipergamaglobulinemia que tem sido reportada nestes doentes por outros autores [1,13,17,36] e cuja existência foi também observada em pacientes Moçambicanos.

Referente aos grupos de indivíduos negativos Moçambicanos e não Moçambicanos e aparentemente saudáveis utilizados como controis

destaca-se o facto de não existirem diferenças significativas entre eles. Assim, a origem dos indivíduos controis Moçambicanos, a maioria deles vivendo em áreas urbanas com melhores condições ambientais que outros vivendo em áreas rurais ou mais expostos a estímulos de doenças infecciosas poderia explicar que os mesmos apresentam concentrações de Imunoglobulinas semelhantes às dos indivíduos procedentes da América e Europa utilizados como controis o que difere em certo sentido com o reportado por outros autores que referem que as concentrações de Imunoglobulinas observadas nos indivíduos africanos são mais elevadas [20,37]. No entanto qualquer afirmação neste sentido precisa de um estudo mais aprofundado, tomando em consideração outras variáveis como sendo sexo, idade, estado nutricional, área de residência para os indivíduos Moçambicanos e no caso dos controis não Moçambicanos o tempo de permanência em Moçambique, área de residência e possíveis episódios de enfermidades infecciosas durante a sua estadia no País, aspectos estes que não foram avaliados no presente estudo por estarem fora dos seus objectivos.

Em relação às frequências observadas para a presença do factor reumatoide os resultados obtidos não permitem excluir que este possa ser um factor causador de resultados indeterminados ao Western Blot. Isto porque a frequência observada no grupo de indivíduos com resultados indeterminados no Western Blot é significativamente mais elevada que a observada no grupo de indivíduos negativos Moçambicanos e não Moçambicanos, o que poderia ser interpretado como a existência de uma associação entre a presença de factor reumatoide e um resultado indeterminado no Western Blot. Porém no grupo de indivíduos com Western Blot positivo também a frequência observada de factor reumatoide foi significativamente maior que nos grupos de indivíduos com resultados negativos, o que tem sido reportado por outros autores que têm associado a infecção por HIV com a presença de factor reumatoide no soro (4,5,39).

Assim os resultados obtidos neste estudo não permitem concluir que a ocorrência de um resultado indeterminado ao Western Blot seja devido à presença de factores reumatoides no soro. Poderia no entanto presumir-se pelos resultados observados que a existência de uma associação entre a infecção por HIV e a presença de factor reumatoide fosse um elemento a favor de que entre os indivíduos com resultados indeterminados poderiam encontrar-se indivíduos que realmente estivessem infectados com HIV. Isto poderia explicar-se pelo facto de tais indivíduos se encontrarem num momento de evolução serológica no qual não fossem detectável a presença dos anticorpos específicos para as proteínas virais necessários para preencher os critérios de positividade, o que precisaria de ser demonstrado mediante técnicas como a Polymerase Chain Reaction (PCR) [14] que permite a detecção do genoma viral dentro da célula infectada do indivíduo e que constitui neste momento o método mais sensível para o diagnóstico da infecção pelo HIV mas que ainda não está disponível no País.

Por outro lado considerar a presença do factor reumatoide com base nos resultados obtidos como significado de reacções inespecíficas que dê como resultado final um padrão de reactividade indeterminado no Western Blot seria possível tomando-se em conta o reportado por alguns autores sobre a existência de homologia na sequência de algumas proteínas virais e determinadas regiões das cadeias pesadas das Ig G [4] ou sobre a produção de reacções inespecíficas no Western Blot em soros de indivíduos que possuem factores reumatoides e complexos imunes [18]. Para a demonstração disto seriam requeridos outros estudos, como sendo as provas de absorção, que não estiveram incluídas nos objectivos deste estudo. No entanto, é conveniente assinalar que a presença de factor reumatoide tem sido reportada em indivíduos que apresentam uma variedade de infecções agudas e crónicas e inclusivamente em indivíduos aparentemente saudáveis vivendo nos trópicos [20].

É de salientar a diferença significativa observada quando comparadas as concentrações de IgG nos indivíduos positivos e negativos para anticorpos anti-HIV com presença de factores reumatóides no soro o que pode ser interpretado como resultado do que acima se refere sobre a indução da produção de factores reumatóides nos indivíduos com o vírus HIV.

Os estudos acima propostos poderão esclarecer melhor a possível associação entre a presença dos factores reumatóides e os resultados indeterminados no Western Blot. Mas, os resultados obtidos neste estudo demonstram que no momento actual o uso do teste de detecção de factores reumatóides para considerar um padrão de reactividade indeterminado no Western Blot como sendo inespecífico e não relacionado com a infeção HIV resulta ainda de pouco valor.

No caso dos outros autoanticorpos estudados observou-se uma situação semelhante à observada com o factor reumatóide. Assim constatou-se uma frequência significativamente superior nos indivíduos infectados pelo HIV e naqueles que apresentavam padrões de reactividade indeterminada no Western Blot que nos indivíduos dos grupos controis com resultados negativos.

A presença de autoanticorpos nos indivíduos infectados pelo HIV tem sido explicada por outros autores como devida ao facto da existência de homologia entre as proteínas virais e algumas proteínas normais do organismo [4,17]. Num estudo anteriormente feito foi observada a presença de anticorpos anti-nucleares e anti-tecido em 62% dos indivíduos infectados pelo HIV mas não apresentando ainda manifestações clínicas e de 86% nos doentes de SIDA [39]. Os resultados obtidos neste estudo, onde 53.3% dos indivíduos Moçambicanos infectados por HIV apresentaram pelo menos um dos autoanticorpos estudados nomeadamente anti-nuclear

e anti-tecido são comparáveis com os valores obtidos por outros autores, confirmando que no caso destes indivíduos, podem ser observadas frequências semelhantes. A existência destes autoanticorpos em indivíduos portadores do vírus HIV, não tem sido associada à existência de qualquer doença autoimune específica, mas, produzidos como resultado de uma activação imune pela infecção pelo vírus, estando actualmente em estudo o seu possível papel na patogenia e desenvolvimento do SIDA [5].

No que diz respeito à possibilidade de considerar os autoanticorpos responsáveis pela ocorrência de padrões de reactividade indeterminada no Western Blot, os resultados tal como no caso dos factores reumatóides, não são concludentes. Porém, tem sido referido o facto de, durante a produção dos antígenos para o teste de Western Blot, encontrarem-se envolvidas linhagens celulares, cujos componentes não são totalmente separados dos componentes virais, e, que poderiam servir como antígenos para potenciais reacções inespecíficas entre estes componentes celulares e os autoanticorpos, mas, o desenho feito neste estudo, não permitiu que o mesmo se debruçasse sobre este aspecto. Seria necessário, fazer estudos que incluam a reacção do soro em questão com tiras do Western Blot preparadas com produtos celulares procedentes das mesmas linhagens celulares onde foi multiplicado o vírus para a produção de antígeno, mas não estando infectadas, e analisar as reacções que se produzem comparando-as com aquelas que aparecem nas tiras do teste de Western Blot comercial actualmente usado. Só através deste enfoque, poder-se-ia obter mais clareza sobre qual o significado que a presença de autoanticorpos possui na ocorrência dos resultados indeterminados. Além disso, e como anteriormente referido para o caso dos factores reumatóides, a presença de autoanticorpos em indivíduos com resultado indeterminado ao Western Blot pode representar na realidade infecção pelo HIV, mas num estadio da resposta serológica que não permite o seu diagnóstico



com os métodos serológicos disponíveis. Neste caso, seria justificado realizar um estudo incluindo técnicas mais sensíveis de diagnóstico da infecção pelo HIV, que, tal como anteriormente dito que não estão ainda disponíveis no país.

Porém, os resultados obtidos não permitem considerar o teste de autoanticorpos como uma prova adicional que permita esclarecer o significado dum resultado indeterminado no Western Blot com fins de diagnóstico.

Da associação feita nos indivíduos com resultados indeterminados ao Western Blot quanto ao nível de imunoglobulinas na presença ou não de factores reumatóides, não se verificam valores significativamente diferentes nas três classes de imunoglobulinas estudadas (Tabela 12). Isto sugere que, a formação de factores reumatóides pode surgir como resultado duma activação policlonal que poderia levar ao aparecimento de imunoglobulinas G e M que reagem com as regiões variáveis das cadeias pesadas da classe G das imunoglobulinas.

Nos indivíduos positivos ao HIV, os que apresentam positividade nos testes de detecção de factores reumatóides, possuem valores superiores de IgG e IgM em relação aos que não possuem factor reumatóide. No caso da IgA, não foram encontradas diferenças significativas entre os indivíduos com factor reumatóide positivo e com negativo. Isto pode ser explicado, pelo facto de os factores reumatóides pertencerem às classes de imunoglobulinas G e M. Têm sido reportados por outros autores elevados níveis de imunoglobulinas particularmente da classe G em indivíduos que apresentam factores reumatóides [32]. Muitos autores têm descrito os vírus como potenciais indutores de fenómenos autoimunes, pelo seu papel de activadores policlonais e estimuladores de secreção de imunoglobulinas, especialmente de factores reumatóides [32].

Nos indivíduos Moçambicanos com resultados negativos no Western Blot para HIV, somente a imunoglobulina G, apresenta valores significativamente mais elevados nos que possuem factor reumatoide positivo, em relação aos que não o possuem. A mesma explicação pode ser dada neste caso, para o facto da aparição de factor reumatoide pode estar associado com uma elevação desta classe de Ig no soro, expressão duma história anterior de estimulação do sistema imune. No entanto, os resultados obtidos nos indivíduos negativos não Moçambicanos não apoia totalmente esta afirmação, pois não se observa associação entre uma elevada concentração de imunoglobulinas e a presença de factor reumatoide. Porém, o estudo deste aspecto do problema merece ser tratado em trabalhos futuros.

### *3.3. CONCLUSÕES*

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. As concentrações de imunoglobulinas IgG e IgM observadas nos indivíduos com resultados positivos pela prova do Western Blot para anticorpos anti-HIV, e, considerados infectados, foram significativamente superiores que as observadas nos indivíduos com resultados indeterminados e negativos na mesma prova, confirmando a presença de uma hipergamaglobulinemia nos indivíduos infectados pelo HIV.
2. Nos grupos de indivíduos com padrões de reactividade positiva e indeterminada ao Western Blot para anticorpos anti-HIV, observaram-se frequências de ocorrência do factor reumatoide e de outros autoanticorpos, que diferiram significativamente das observadas no grupo de indivíduos com resultados negativos na mesma prova.
3. Dos resultados obtidos pela comparação entre cada um dos grupos estudados, pode concluir-se que a concentração de imunoglobulinas, em particular a concentração de IgG, não sugere uma associação entre estas e a aparição de resultados indeterminados ao Western Blot.
4. Os resultados obtidos na determinação do factor reumatoide, e, dos restantes autoanticorpos estudados não, permitem concluir que os mesmos estejam associados à ocorrência de resultados indeterminados na técnica do Western Blot. A associação encontrada entre infecção por HIV e presença de factores reumatoides e dos restantes autoanticorpos estudados, impedem a utilização destas provas como um elemento adicional para a clarificação do significado de um resultado indeterminado ao Western Blot.

### *3.4. RECOMENDAÇÕES*

Os resultados indeterminados à técnica Western Blot para HIV requerem clarificação quanto ao seu significado, parecendo porém que outros enfoques deveriam ser procurados, a saber:

1. Procurar a associação entre a ocorrência dos resultados indeterminados ao Western Blot para HIV com a ocorrência posterior de padrões de reactividade positivos, padrões de reactividade negativos ou com o aparecimento de sinais e sintomas de doença por HIV.
2. Introduzir um controle celular (tira sensibilizada com antígenos das células onde o vírus foi replicado), ou, por absorção prévia destes antígenos nos soros, estudar a resolução obtida na reactividade da tira do Western Blot.
3. Estudar a reactividade dos soros com padrão indeterminado para HIV em testes usando a mesma técnica (Western Blot), mas, para retrovírus relacionados com o HIV, para análise da reactividade cruzada que possa eventualmente existir entre eles.
4. Existindo disponibilidade de técnicas de biologia molecular (Polimerase Chain Reaction), estudar os indivíduos com resultados indeterminados ao Western Blot para HIV quanto à presença do genoma viral nos seus linfócitos.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Ascher, M.S.; Sheppard, H.W. (1990). AIDS As Immune System Activation.II. The Panergic Immnesia Hypothesis. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. Vol.3:177-191.
- [2]. Peterlin, B.M.; Luciw,P.A.(1988). Molecular Biology of HIV. Scientific American. AIDS Vol.2 (suppl 1): 529-540.
- [3]. Gallo, R.C.(1987). The AIDS Virus. Scientific American. USA.
- [4]. Schupbach, J. (1989). Human Retrovirology. Facts and Concepts. Springer-Verlag. New York.
- [5]. Philadelphia Science Group (Ed.). (1989). AIDS 89: Summary. A Practical Synopsis of the V International Conference on AIDS. Montreal.
- [6]. Burke, D.S.; Redfield, R.R.; Putnam, P.; Alexander, S.S. (1987). Variations in Western Blot Banding Patterns of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy Associated Virus. Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Vol. 22: 124-130.
- [7]. Laurence; J. (1985). The Immune System in AIDS. Scientific American, 253:70-79.
- [8]. Lang,W. et al. (1989). Patterns of T Lymphocyte Changes with Human Immunodeficiency Virus Infection: From Seroconversion to the Development of AIDS. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes Vol.2:63-69.

- [9]. Roitt, I. (1989). Essential Immunology. 9th Edition. Blackwell Scientific Publication. London.
- [10]. Gell P.G.H.; Coombs, R.R.A.; Lachmann, P.J. (1980). Clinica Immunologica. 2nd Ed. Salvat. Espanha.
- [11]. Clark, W.R. (1986). The Experimental Foundations of Modern Immunology. 3th Ed. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.
- [12]. Harry, D.J. et al. (1989) Antigen Detection for Human Immunodeficiency Virus. Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology. Vol.2:241:249.
- [13]. Lane, H.C.; Masur, H.; et al. (1989). Abnormalities of B-Cell Activation and Immunodeficiency in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. New England Journal of Medicine Vol.309 N°28:453-458.
- [14]. Dock, N.L. (1988). Evaluation of Atypical Human Immunodeficiency Virus Immunoblot Reactivity in Blood Donors. Transfusion Vol.28: 412-418.
- [15]. Srinivasappa, V. et al. (1986). Molecular Mimicry: Frequency of Reactivity of Monoclonal Antiviral Antibodies with Normal Tissues. Journal of Virology Vol.57 N°1: 397-401.
- [16]. Fields, B.N.; Knipe, D.M. (1986). Fundamental Virology. Raven Press. New York.
- [17]. Andrieu, J.M.; Even, P.; Venet, A.. (1986). AIDS and Related Syndromes as a Viral-Induced Autoimmune Disease of the Immune System: An Anti-MHC II Disorder. Therapeutic Implications. AIDS Research Vol.2 N°3.

- [18]. Gurtler, L. AIDS: (1988). Which Tests Confirm the Diagnosis?. Clinical Diagnosis and Laboratory.
- [19]. Bowen, D.L.; Lane, H.C.; Fauci, A.S. (1984). Immune Function In The Acquired Immunodeficiency Syndrome In Acquired Immune Deficiency Syndrome Symposia On Molecular and Cellular Biology Vol 16. (Ed) Gottlieb, M.S.; Groopman, J.E. New York.
- [20]. Greenwood, B.M., Whittle, H.C. (1981). Immunology of Medicine in the Tropics. ELBS. Londres.
- [21]. Masci, J.R. (1989). New Approches And Techniques For Detecting Antibody To The HIV. LabMedica.
- [22]. Lundeborg, G.D. (1988). Serological Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection by Western Blot testing. Jama 260(5): 674-9.
- [23]. Jackson, J.B.; Balfour, H.H. (1988). Pratical Diagnostic Testing for Human Immunodeficiency Virus. Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology.
- [24]. Centers for Disease Control. (1989). Interpretation and Use of the Western Blot Assay for Serodiagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type I Infections. MMWR. Vol. 38. N°S7.
- [25]. Immunology Laboratory. (1987). Final Report on the Evaluation of HIV Situation in Moçambique. Instituto Nacional de Saude. Moçambique.
- [26]. Centers for Disease Control. (1987). Update: Serologic Testing for Antibody to Human Immunodeficiency Virus. MMWR 36(52).

- [27]. Organon Teknika. (1988). Human Immunodeficiency Virus (HIV). USA.
- [28]. Palha de Sousa, C.; Barreto, J.; De La Cruz, F.; Barquet, L. (1989). Non-conclusive results in HIV Western Blot Analysis of Mozambican Sera. Immunology Laboratory. National Health Institute. 5th International Conference Montreal . June 1989.
- [29]. De La Cruz, Fernando; Barreto, J.; Palha C.; Barquet; Cabral, J.R.; Schwalbach, J.F. (1988). HIV in Mozambique - A general overview. Instituto Nacional de Saude. Moçambique.
- [30]. Sixth International Conference on AIDS . São Francisco. California. USA. June 1990. Follow Up of Donors With Indeterminate Results.
- [31]. Bigazzi, P.E.; Burek, C.L.; Rose, N.R. (1986). Antibodies to Tissue-Specific Endocrine, Gastrointestinal, and Neurological Antigens In Manual of Clinical Laboratory Immunology 3rd Edition. pp 762-770. Ed. American Society For Microbiology. Washington, D.C.
- [32]. Ballou, S.P.; Kushner, I. (1986). Crithidia luciliae Immunofluorescence Test For Antibodies to DNA In Manual of Clinical Laboratory Immunology 3rd Edition. pp 740-743. Ed American Society For Microbiology. Washington, D.C.
- [33]. Check, I.J.; Piper, M. (1986). Quantitation of Immunoglobulins in Manual of Clinical Laboratory Immunology by American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- [34]. Linke, J.B. Williams Jr, R.C. (1986). Tests For Detection of Rheumatoid Factors In Manual of Clinical Laboratory Immunology 3rd Edition. pp 759-761. Ed. American Society For Microbiology. Washington, D.C.



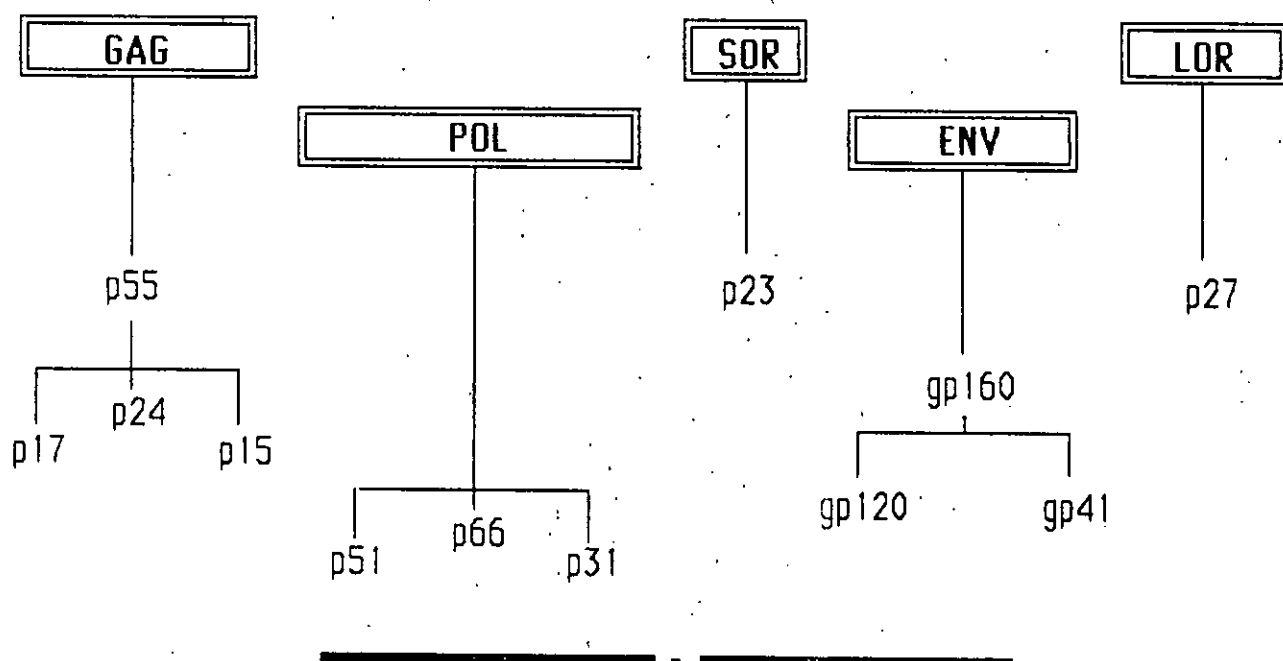
- [35]. Fritzler, M.J. (1986). Immunofluorescent Antinuclear Antibody Tests annual of Clinical Laboratory Immunology 3rd Edition. pp 733-739. Ed. American Society For Microbiology. Washington, D.C.
- [36]. Hersh, E.M.; Reben, J.M.; Munn, C.G.; Mansell, P.W.A. (1986). Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) in Manual of Clinical Laboratory Immunology by American Society For Microbiology. Washington, D.C.
- [37]. Becher, W. (1976). Variations of Immunoglobulins In Disease. Journal of Clinical Pathology. Brithish Association. London.
- [38]. Mayer-Siuta, Rosemary. (1988). Autoantibodies and Circulating Immune Complexes in Subjects Infected With Human Immunodeficiency Virus. Med Microbiologic Immun., 177:189-194.

## 5. ANEXOS

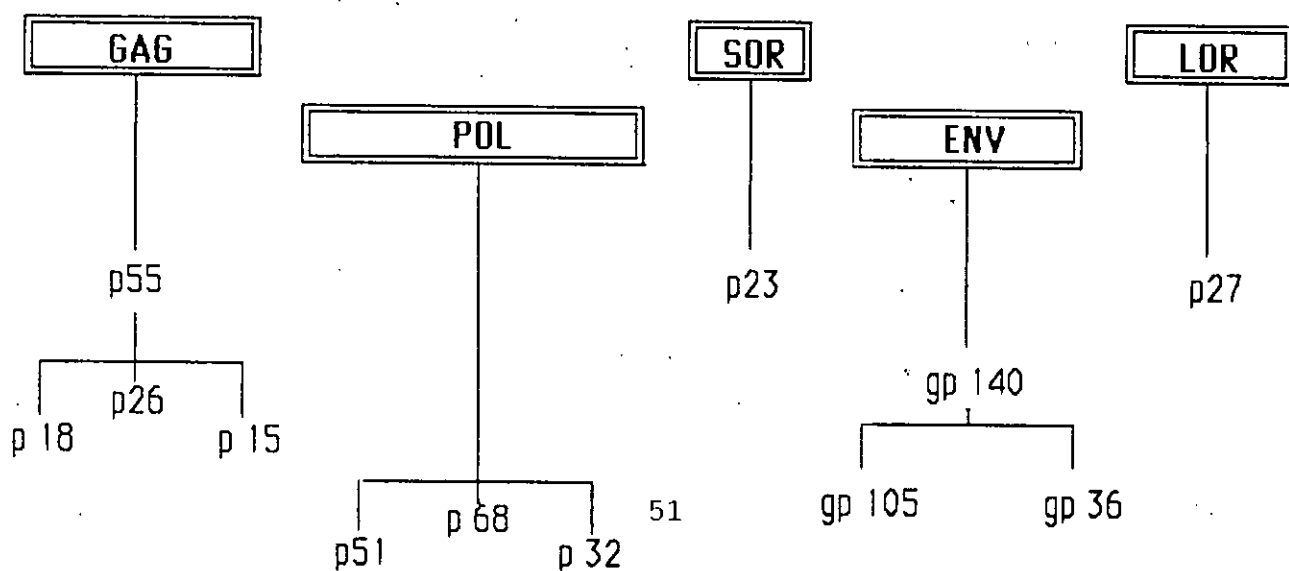
### Anexo 1

Genoma do virus HIV1 e HIV2 e as proteínas codificadas pelos genes correspondentes

#### HIV 1



#### HIV 2



Anexo 2

Homologia entre proteínas do virus HIV e proteínas Humanas

Proteína do HIV	Proteína Humana	Area de interferencia
gp 120	MHC - II Neurointerleukina  Ig G  Ig A	Reconhecimento do antígeno pelas cel. T4 Activação das células B Funções neurológicas Formação de complexos imunes, Factores Reumatoides Formação de complexos imunes Factores Reumatoides, Tolerância Imune ao epítopo receptor da gp 120
gp 41	IL -2 MHC -II	Activação de linfócitos Reconhecimento do antígeno pelas cel. T4
p 17	Timosina -alfa	Activação das células T

Anexo 3

Padrão de proteínas dos soros com resultados indeterminados

No do Soro	Padrao de proteínas		No do Soro	Padrao de proteínas		No do Soro	Padrao de proteínas	
	HIV 1	HIV 2		HIV 1	HIV 2		HIV 1	HIV 2
1	17		21	24	26	41		18, 26
2	17		22	24	26	42		18,26,68
3	17,55	26	23	17		43		26
4	17	26	24		26,68	44		26
5	17, 24		25		18,26,68	45	17	
6	17	26	26	17, 160		46	24	
7	55		27		26	47	24	26
8	17, 160		28		18, 26	48	17, 24	18, 26
9	17		29		18, 26	49	17	26
10	17, 160	26	30		18, 26	50	17, 24	18, 26
11	17	26	31		18, 26	51	24	26
12	17	26	32		18,26,56	52	17	18, 26
13	24	18	33		26	53	24	26
14		18, 26	34	17		54	24	
15		18, 26	35		26	55	17, 24	26
16	24	26	36		18, 26	56	24	
17		26	37	24	26	57	24	26
18	17		38		18, 26	58	17	
19		26, 68	39		18, 26	59	17, 24	26
20		26	40	17, 24		60	17, 41, 55	

Anexo 4

Distribuição dos indivíduos pelos grupos de idades nos 4 grupos estudados quanto à reactividade HIV

Idades \ HIV	Indeterm.	Pos.	Neg. Moç.	Neg.N. Moç.
< 15	0	4	3	0
16- 25	23	2	6	2
26- 35	31	18	14	14
36- 45	6	4	5	11
> 45	0	2	2	3

## ANEXO 5

### IMUNODIFUSÃO RADIAL

#### Material

1. Placas de gel agarose contendo soro monoespecífico das classes de imunoglobulinas A, G, M, E e D.
2. Soros control IgA, IgG e IgM.

#### Procedimentos

1. Depositar 5µl de soro nos poços da placa de gel sem permitir que a ponta da pipeta toque as margens dos poços.
2. Incubar a temperatura ambiente num local escuro.
3. Com papel milimétrico, fazer a leitura do diâmetro dos anéis formados pela difusão do soro depositado no gel, decorridas 24 horas para IgA, IgG e Ig M.
4. Fazer a segunda leitura dos anéis de precipitina das placas, para IgA e IgG depois de 48 horas e para IgM depois de 72 horas.

#### Interpretação dos resultados

Os diâmetros dos anéis de precipitina são convertidos em unidades de concentração de imunoglobulinas (mg/dl e IU/dl), através de uma tabela correspondente de valores previamente calculados, fornecidos pelo "kit".

## ANEXO 6

### Testo de aglutinação

#### Reagentes

1. Reagente-Latex-FR
2. Soro controle FR positivo
3. Soro controle FR negativo
4. Solução salina isotónica (NaCl) 0.9%

#### Procedimentos

1. Deixar os reagentes e os soros atingir a temperatura ambiente.
2. Diluir os soros a testar e os soros controle negativo e positivo 1:5 com solução salina isotónica (NaCl) 0.9%
3. Depositar 1 gota (aprox. 40µl) de soro diluído e o mesmo volume de soro controle positivo e negativo em cada uma das áreas de reacção da placa de teste.
4. Adicionar 1 gota (aprox. 40µl) de reagente-látex-RF a cada amostra de soro de teste e soro controle positivo e negativo; depois de misturar com um palito, balançar a placa de teste.
5. Decorridos 2 minutos avaliar a ocorrência ou não da reacção de aglutinação. Para tal comparar com a reacção nos soros controle.

#### Interpretação

A reacção de aglutinação indica a presença de factores reumatoides; A ausência de uma reacção de aglutinação, indica que o soro do individuo ou não contém factores reumatoides ou têm-nos a uma concentração menor de 20 UI/ml que é a concentração à qual corresponde a diluição de 1:5 .

## ANEXO 7

### Teste de imunofluorescência para anticorpos anti-nucleares

#### Preparação dos reagentes

1. PBS (Phosphate Buffer Saline) - Dissolver o conteúdo de cada embalagem tampão em 1 litro de água destilada. Misturar até à completa dissolução. Ajustar o pH para 7.2.
2. Soro controle positivo e soro controle negativo para anticorpos antinucleares - Reconstituir com 0.5 ml de água destilada estéril.
3. Conjugado gamaglobulina anti-humana polivalente marcada com Isocianato de fluoresceína (FITC) - Reconstituir com 3.0 ml de água destilada estéril.
4. Glicerol.

#### Procedimento

1. Remover do congelador as lâminas com substrato de cultura de células, e, deixar atingir a temperatura ambiente.
2. Fazer a diluição de 1:20 dos soros e dos controles com PBS pH 7.2, em microplacas de diluição identificando cada poço com o soro do paciente correspondente e os controles.
3. Com uma pipeta automática depositar 1 gota (aproximadamente 25 µl) de soro do paciente e de soro control diluídos nos respectivos poços cobrindo toda a área das células.
4. Incubar as lâminas numa câmara húmida à temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos.



5. Findo o período de incubação remover as lâminas da câmara húmida e remover o excesso de soro com uma lavagem suave com PBS antes de os colocar numa câmara de lavagem. Proceder à lavagem dupla de 10 minutos cada uma com PBS pH 7.2, num agitador magnético mudando o PBS no intervalo entre as 2 lavagens.
6. Remover as lâminas do PBS e secar com com papel de filtro de forma a não permitir a secagem dos poços com substrato.
7. Adicionar 1 gota de conjugado de gamaglobulina anti-humana marcada com isocianato de fluoresceína (FITC).
8. Incubar as lâminas em câmara húmida por 30 minutos à temperatura ambiente.
9. Repetir o passo 5 e 6.
10. Aplicar 1 gota de glicerol e cobrir com a lamela, observando em seguida ao microscópio de fluorescência.

#### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Um soro é considerado negativo se a fluorescência nuclear for menor ou igual à do control negativo e se não existir nenhum padrão discernível de fluorescência nuclear.

Uma fluorescência maior que a do control negativo um padrão claramente discernível de fluorescência, indica que o soro é positivo. Se a fluorescência nuclear não for claramente positiva o soro é considerado negativo, pois pode ser devida a uma reacção inespecífica.

Os resultados positivos devem ser titulados e o último título no qual ainda persistir o padrão de fluorescência é que serve como título máximo de positividade.

Para a detecção das várias especificidades nucleares do teste ANA, a célula em fase de divisão é que permite definir a especificidade do antígeno. Antes da divisão da célula a maioria dos antígenos nucleares estão uniformemente distribuídos através de todo o núcleo.

A maioria dos substratos "Hep 2" (Células Epiteliais Humanas) possui células mitóticas visíveis que são caracterizadas por apresentarem uma forma celular redonda ou circular sem membrana nuclear detectável.

Os padrões detectados podem ser de vários tipos o que permite relacioná-los com os constituintes do núcleo com os quais as anticorpos presentes no soro reagiram e assim fazer uma associação destes com as distintas doenças autoimunes. As doenças autoimunes podem ser classificadas segundo os constituintes do núcleo so substrato de lâmina aos quais os autoanticorpos estão dirigidos.

## ANEXO 8

### Teste do bloco composto

#### Preparação dos reagentes

1. PBS (Phosphate Buffer Saline) - Dissolver o conteúdo de cada embalagem tampão em 1 litro de água destilada. Misturar até à completa dissolução. Ajustar o pH para 7.2.
2. Soro controle positivo e soro controle negativo para anticorpos cntra os tecidos - Reconstituir com 0.5 ml de água destilada estéril
3. Conjugado gamaglobulina anti-humana polivalente marcada com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) - Reconstituir com 3.0 ml de água destilada estéril.
4. Glicerol

#### Procedimento

1. Remover as lâminas do congelador e deixar atingir temperatura ambiente.
2. Diluir os soros e os controis 1:40 com PBS pH 7.2
3. Depositar os soros diluidos (aprox. 0.025 µl) sobre toda a área com antígeno e colocar numa câmara húmida por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar as lâminas da câmara húmida e retirar o excesso de soro da área com substrato com uma lavagem suave com solução PBS pH 7.2.
5. Com PBS pH 7.2 fazer uma lavagem dupla de 10 minutos cada uma, num agitador magnético mudando a solução de PBS entre as duas lavagens.

6. Secar as lâminas com papel absorvente sem secar a área com substrato.
7. Depositar 1 gota de (0.05) de conjugado cobrindo a área da lâmina com substrato.
8. Incubar em câmara húmida a temperatura ambiente durante 30 minutos.
9. Repetir os passos 4 e 5.
10. Aplicar 1 gota de glicerol e cobrir com a lamina com a lamela fazendo seguidamente a leitura no microscópio de fluorescência.

#### Interpretação dos resultados

Um resultado positivo é confirmado por um padrão de fluorescência em qualquer dos tecidos presentes na lâmina. Uma reação positiva deve ser testada de novo com soro mais diluído. Diluições duplas são as mais utilizadas (1:40, 1:40, 1:80,...). As diluições permitem determinar qual o título máximo de fluorescência.

Um resultado negativo é dado pela ausência de total fluorescência.

## ANEXO 9

### Anti -ADN

#### Preparação dos reagentes

1. PBS - Dissolver o conteúdo de cada embalagem tampão com 1 litro de água destilada e misturar até à completa dissolução. Ajustar o pH a 7.2
2. Soros de controle positivos e negativos para anticorpos anti-ADN - Reconstituir com 0.5 ml de água destilada estéril.
3. Conjugado gamaglobulina monovalente anti-humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC)- Reconstituir com 3 ml de água destilada estéril.
4. Glicerol.

#### Procedimento

1. Remover as lâminas do congelador e deixar atingir a temperatura ambiente. Retirar as lâminas do envelope sem tocar as áreas cobertas com antígeno.
2. Fazer a diluição dupla dos soros e os controis (1:5, 1:10, 1:20, 1:40) com PBS, pH 7.2.
3. Depositar uma gota (aprox. 0.025 ml) sobre as áreas com antígeno e incubar em câmara húmida temperatura ambiente durante 30 minutos.
4. Remover as lâminas da câmara húmida e proceder à sua lavagem com PBS, pH 7.2 ,em corrente suave sem permitir a corrente directa sobre as áreas de antígeno.
5. Colocar as lâminas numa câmara de lavagem com PBS, pH 7.2 por 10 minutos no agitador magnético duas vezes consecutivas mudando a solução de PBS entre as lavagens.

6. Secar as áreas sem antígeno das lâminas com papel absorvente.
7. Depositar 1 gota (aprox. 0.025 ml) de conjugado sobre os poços cobrindo toda esta área.
8. Incubar as lâminas em câmara húmida a temperatura ambiente durante 30 minutos.
9. Proceder à lavagem como no passo 5.
10. Adicionar uma gota de glicerol a cada poço e proceder à leitura no microscópio de fluorescência.

#### Interpretação dos resultados

O resultado positivo é dado por uma fluorescência no núcleo, e, ou no kinetoplasto.

Quando não se verifica qualquer padrão de fluorescência, ou quando esta aparece no corpo basal.