

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**IZANNERY IZABAUX LEÔNIO DA SILVA**

**EXPRESSÃO DE IL-10 E INTERFERON GAMA EM SUBPOPULAÇÕES DE  
LINFÓCITOS B EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2020**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

IZANNERY IZABAUX LEÔNCIO DA SILVA

**EXPRESSÃO DE IL-10 E INTERFERON GAMA EM SUBPOPULAÇÕES DE  
LINFÓCITOS B EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade Federal da  
Paraíba, como parte das exigências para  
obtenção do grau de bacharel em  
Biotecnologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatjana Keesen de  
Souza Lima

JOÃO PESSOA - PB  
2020

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586e Silva, Izannery Izabaux Leôncio da.  
Expressão de IL-10 e interferon gama em subpopulações  
de linfócitos B em indivíduos saudáveis / Izannery  
Izabaux Leôncio da Silva. - João Pessoa, 2020.  
70 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima.  
TCC (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Biotecnologia. 2. Imunologia. 3. Linfócitos B. 4.  
Bregs. I. Lima, Tatjana Keesen de Souza. II. Título.

UFPB/BC

CDU 60

IZANNERY IZABAUX LEÔNCIO DA SILVA

**EXPRESSÃO DE IL-10 E INTERFERON GAMA EM SUBPOPULAÇÕES DE  
LINFÓCITOS B EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade Federal da  
Paraíba, como parte das exigências para a  
obtenção do grau de bacharel em  
Biotecnologia.

Aprovado em: 25 de Novembro de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**

Tatjana Keesen de Souza Lima

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatjana Keesen de Souza Lima

Cbiotec - UFPB

Orientadora

Pedro Henrique de Sousa Palmeira

Pedro Henrique Sousa Palmeira

Graduação em Biotecnologia - UFPB

Sandra Rodrigues Mascarenhas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Cbiotec - UFPB

*Dedico não só este trabalho mas todas as conquistas da minha vida aos meus pais. À minha mãe, Francinete Silva, eterna gratidão por ser um exemplo de amor e parceria durante toda essa jornada. Ao meu pai, João Leôncio, que apesar de nos ter deixado tão precocemente permanece em nossas memórias com a lembrança de sempre buscar a realização de nossos sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, pois sem Ele, nada seria possível pela benção de ter sido escolhida para fazer parte da família que tenho hoje, pela força nos momentos mais difíceis e pelas oportunidades que foram a mim oferecidas ao longo dessa trajetória.

Toda a minha gratidão à minha **mãe Francinete Silva**, por todo apoio e companheirismo, e que, além de mãe será sempre minha melhor amiga. Estaremos sempre juntas independente do momento, e juntas finalizamos mais uma etapa da minha vida.

Aos meus familiares pela união e apoio nessa trajetória, pois a vida é cheia de mudanças e foi graças a todos que pude chegar até aqui, em meio à tantas adversidades. Meu carinho especial para todos que contribuíram para minha vida pessoal e acadêmica, agradeço imensamente por ser parte da grande **família Luís Silva**.

Mudar sozinha para outra cidade foi difícil, principalmente por ter que passar pela dor da perda do meu pai durante essa transição, mas tive a sorte de conhecer pessoas incríveis nessa jornada. Nunca esquecerei do meu eterno **2016.1**, obrigada a todos da turma pelos momentos de risada, amizade e companheirismo dentro e fora da sala de aula, sei que levarei sempre essas pessoas para a vida toda e desejo que todos consigam trilhar seus sonhos sempre.

Aos meus amigos mais próximos, que me proporcionaram os melhores momentos da graduação, me apresentaram à uma amizade verdadeira e construtiva. Sei que sempre poderá confiar em vocês, **Brendo, Carlos e Yann**.

Às pessoas que aceitaram se juntar a mim em inúmeras jornadas e experiências que até então pareciam impossíveis, onde tivemos tantos aprendizados e passamos por tantas coisas juntos durante essa trajetória, **Renata e Hyago** vocês foram essenciais para a construção de quem eu sou hoje e tenho um carinho imenso por cada um, gratidão por todas as aventuras que passamos juntos.

Durante a graduação também tive a oportunidade de realizar mobilidade acadêmica na Universidade de Évora em Portugal, foi sem sombra de dúvidas uma das experiências mais gratificantes da minha vida, conheci pessoas incríveis que irei levar comigo pelo resto da minha vida. Obrigada à todos que fizeram parte da nossa Casa da Moeda, **Bruna** pelo seu jeito sincero e doce de ver a vida, **Marcela** por

sempre trazer alegria à nossa casa, **Isabela** por nos ensinar a aproveitar a vida da melhor maneira, **Beatriz** por todas as risadas e parcerias e Luísa, pelo carinho com todos.

Agradeço imensamente pela equipe que me acolheu e que me apresentou a beleza da imunologia, à todos os integrantes do **LABIDIC**, sei seremos sempre uma família. **Fany**, por todo apoio necessário nessa jornada; **Pedro**, por trilharmos juntos nosso caminho na biotecnologia, e que hoje tenho a honra de tê-lo na minha banca. À minha orientadora, um exemplo de mãe, amiga e mulher na ciência, **Tat**, obrigada por acreditar em mim e por me mostrar que é possível fazer a diferença.

À professora **Sandra Mascarenhas**, por quem sempre tive grande admiração e hoje faz parte da minha banca avaliadora.

Todos os **meus professores**, vocês foram essenciais para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional ao longo de todos esses anos.

À **secretaria e coordenação do Centro de Biotecnologia**, por prontamente me auxiliarem em todos os trâmites necessários.

Aos demais nomes que aqui não foram citados, mas contribuíram direta ou indiretamente para toda essa jornada, meus sinceros agradecimentos.

*“Eu não tenho nenhum vestido além do que uso todo dia. Se você for gentil o suficiente para me presentear com um, só peço que seja prático e escuro para que eu possa vesti-lo, e logo em seguida, ir para o laboratório.”*

*- Marie Curie*



## RESUMO

O sistema imune é a principal linha de defesa contra o ataque de patógenos e agentes externos através do estabelecimento da inflamação. Este, é dividido entre imunidade inata e adaptativa, a imunidade inata consiste em células de defesas presentes no organismo responsáveis pela resposta imediata contra agressões, já a imunidade adaptativa caracteriza a memória imunológica com principais componentes os linfócitos T e B. Os linfócitos B, alvo do trabalho, são responsáveis por mediar a resposta adaptativa através de linfócitos T CD4 auxiliares e produção de imunoglobulinas de memória. Além disso os linfócitos B são capazes de secretar diversas citocinas (IL-12, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ), que podem mediar sua ação bem como controlar a resposta por linfócitos T. A descoberta de subpopulações de linfócitos B produtores de IL-10 vem sendo cada vez mais estudada e evidenciada já que estes podem atuar como supressores do quadro inflamatório. No presente estudo foram analisados o perfil imunológico de indivíduos saudáveis pela quantificação de subpopulações de células B de memória (CD3-CD19+CD27+CD38-), B de transição (CD3-CD19+CD27-CD38+) e B imaturas (CD3-CD19+CD27-CD38++) e a expressão de IL-10 e IFN $\gamma$  em cada uma dessas subpopulações além de comparação desses níveis entre sexo. Foi visto que comparando aos demais níveis celulares, células B CD38+ expressam, em maior quantificação IL-10 e IFN $\gamma$ . Isso pode indicar um mecanismo de autorregulação. Além disso foi observado que indivíduos do sexo feminino podem ter uma menor quantificação de células B com capacidades imunossupressoras e maior expressão no microambiente celular de citocina pró-inflamatórias, porém são necessários futuros estudos para que seja realizada uma análise completa e mais aprofundada sobre o papel dessas subpopulações em indivíduos saudáveis.

**Palavras-chave:** Bregs. Imunologia. Linfócitos B.

## ABSTRACT

The immune system is the main line of defense against pathogens and external agents through the establishment of inflammation. It is divided between innate and adaptive immunity; the innate immunity consists of defense cells already present in the body that are responsible for the immediate response against aggressions, whereas adaptive immunity characterizes the immune memory with the main components including T and B lymphocytes, the last ones are main focus of this work, are responsible for mediating the adaptive response through T CD4+ helper lymphocytes and production of memory immunoglobulins. In addition, B lymphocytes are capable of secreting several cytokines (IL-12, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ), which can mediate their action as well as control the response by T lymphocytes. The discovery of subpopulations of IL-10 produced by B lymphocytes has been increasingly studied and evidenced since these can act as suppressors of the inflammatory condition. In the present study, the immunological profile of healthy individuals was analyzed by quantifying subpopulations of memory B cells (CD3-CD19 + CD27 + CD38-), transition B (CD3-CD19 + CD27-CD38 +) and immature B (CD3-CD19 + CD27-CD38 ++), the expression of IL-10 and IFN $\gamma$  in each of these subpopulations, and comparison of these levels between sexes. It was seen that compared to the other cellular levels, CD38 + B cells express, in greater quantification, IL-10 and IFN $\gamma$ . This may indicate a self-regulatory mechanism. Furthermore, it was observed that female individuals may have a lower quantification of B cells with immunosuppressive capacities and greater expression in the pro-inflammatory cytokine cell microenvironment, however future studies are still necessary for a complete and more in-depth analysis of the role these subpopulations in healthy individuals.

**Keywords:** Bregs. L lymphocytes. Immunology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Configuração da linha germinativa para recombinação dos segmentos dos genes VDJ e montagem das regiões variáveis dos anticorpos.....	24
<b>Figura 2.</b> Modelo estrutural do anticorpo, com a união das cadeias leves e pesadas por ligações dissulfídicas sítio de ligação e reconhecimento de antígenos nas regiões variáveis.....	26
<b>Figura 3.</b> Durante a expansão clonal as células B produzem anticorpos policlonais, capazes de se ligarem a diversas proteínas expressas pelos antígenos de interesse.....	28
<b>Figura 4.</b> As células B imaturas auto-reativas podem seguir três caminhos diferentes, o silenciamento funcional (anergia), sua morte por apoptose (deleção) ou edição de receptor através da substituição dos genes das imunoglobulinas.....	30
<b>Figura 5.</b> Estratégia de análise das populações celulares de linfócitos B e expressão das citocinas IL-10 e IFN $\gamma$ nas subpopulações especificadas.....	41
<b>Figura 6.</b> Comparação entre um teste sorológico considerado positivo (A) e um considerado negativo (B).....	44
<b>Figura 7.</b> Quantificação das populações celulares de B de memória CD27+, transição e reguladoras CD38+.....	46
<b>Figura 8.</b> Níveis de células B totais de memória CD27+, transição e regulatórias CD38+ em indivíduos do sexo masculino e feminino.....	47
<b>Figura 9.</b> Quantificação total de IL-10 nas subpopulações de B de memória, de transição e regulatórias.....	48
<b>Figura 10.</b> Quantificação de IL-10 em subpopulações de linfócitos B de memória CD27+ e ativados CD38+ em indivíduos do sexo masculino e feminino.....	49
<b>Figura 11.</b> Expressão de IFN $\gamma$ nas subpopulações de B de memória, transição e reguladoras.....	50

**Figura 12.** Quantificação de IFN $\gamma$  em células B de memória CD27+ e ativadas CD38+ em indivíduos do sexo masculino e feminino.....50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Caracterização fenotípica das subpopulações de células B maduras de memória, de transição e B imaturas.....	32
<b>Tabela 2.</b> Painel de marcação dos anticorpos monoclonais utilizados de acordo com seus canais específicos de leitura.....	40
<b>Tabela 3.</b> Resultado dos testes sorológicos para todos os indivíduos testados. Os indivíduos com resultados negativos obtiveram suas amostras biológicas coletadas e processadas.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADE</b>	Ampliação dependente de anticorpo
<b>Ags</b>	Antígenos
<b>BCR</b>	Receptor de célula B
<b>Bef</b>	Célula B efetora
<b>Breg</b>	Célula B reguladora
<b>CD4</b>	Cluster de diferenciação 4
<b>CD10</b>	Cluster de diferenciação 10
<b>CD19</b>	Cluster de diferenciação 19
<b>CD20</b>	Cluster de diferenciação 20
<b>CD21</b>	Cluster de diferenciação 21
<b>CD24</b>	Cluster de diferenciação 24
<b>CD27</b>	Cluster de diferenciação 27
<b>CD38</b>	Cluster de diferenciação 38
<b>CD40</b>	Cluster de diferenciação 40
<b>CDF</b>	Células dendríticas foliculares
<b>CG</b>	Centro germinativo
<b>CHIKV</b>	Vírus da Chikungunya
<b>DENV</b>	Vírus da Dengue
<b>GILZ</b>	Proteína zíper de leucina induzida por glicocorticoide
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon-gamma
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	Interferon-alpha
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-7</b>	Interleucina 7
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>IL-13</b>	Interleucina 13
<b>IL-14</b>	Interleucina 14
<b>IL-35</b>	Interleucina 35
<b>Mab</b>	Anticorpo monoclonal
<b>NK</b>	Natural Killer

<b>PB</b>	Tampão de Permeabilização
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PRR</b>	Receptor de reconhecimento de padrão
<b>SDA</b>	Solução diluidora de anticorpos
<b>SI</b>	Sistema imune
<b>SLC</b>	Cadeia leve substituta
<b>SRC</b>	Proto-oncogene tirosina proteína quinase
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>Th1</b>	Linfócito T helper 1
<b>Th2</b>	Linfócito T helper 2
<b>Treg</b>	Linfócito T regulador
<b>TNFa</b>	Fator de necrose tumoral alpha
<b>UFPB</b>	Universidade Federal da Paraíba
<b>ZIKV</b>	Vírus da zika

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1. Introdução ao sistema imune.....	21
2.2. Imunidade inata e adaptativa.....	22
2.3. Linfócitos B e sua importância.....	24
2.4. Diferenciação e expansão clonal.....	26
2.5. Subpopulações de linfócitos B.....	29
2.6. Caracterização celular de linfócitos B.....	31
2.7. Expressão de citocinas em células B.....	32
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. Objetivo geral.....	36
3.2. Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. Considerações éticas.....	38
4.2. Grupo de estudo.....	38
4.3. Critérios de inclusão e exclusão.....	38
4.4. Material biológico e processamento das amostras.....	38
4.4.1. Lise de hemácias.....	39
4.4.2. Plaqueamento celular.....	39
4.4.3. Marcação intra e extracelular.....	39
4.5. Anticorpos monoclonais.....	40
4.6. Estratégia de análise de dados a partir de citometria de fluxo.....	41
4.7. Análises estatísticas.....	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1. Testes sorológicos como critério de exclusão.....	44
5.2. Frequência das subpopulações de células B.....	45
5.3. Expressão de IL-10 nas subpopulações de células B.....	46
5.4. Expressão de IFN $\gamma$ nas subpopulações de células B.....	48
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS.....	60
GLOSSÁRIO.....	64





# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema imune possui como principal função a manutenção da homeostase do organismo contra agressões por patógenos externos e manutenção da homeostase do organismo, constituído por uma série de órgãos capazes de produzir diferentes células e por consequente uma gama de moléculas químicas intrinsecamente relacionadas entre si (MESQUITA JUNIOR et al, 2010). Esse sistema é dividido entre a imunidade inata e a adaptativa, constituída por mecanismos que compreendem barreiras físicas, químicas, biológicas. (MESQUITA JUNIOR et al, 2010), sendo assim, capazes de atuar em conjunto gerando uma resposta eficiente e rápida contra a agressão. A capacidade do sistema imunológico de regular negativamente suas respostas a fim de proteger as células do hospedeiro é denominada de tolerância imune. A tolerância imunológica inclui a tolerância aos antígenos (Ags) próprios, que previne o desenvolvimento de doenças autoimunes, como também a aceitação de Ags não-próprios, como ocorre durante transplantes e o controle negativo de respostas imunes exacerbadas (BOUAZIZ, YANABA, TEDDER; 2008). Já foram identificados diversos tipos celulares capazes de contribuir com a tolerância imunológica, como os linfócitos T reguladores. Usualmente os linfócitos B são descritos por serem reguladores positivos da resposta imune, porém cada vez mais vem sendo estudado uma nova classe dessas células que podem suprimir essa resposta positiva através da produção de interleucina 10 (IL-10), uma citocina supressora da inflamação (BOUAZIZ, YANABA, TEDDER; 2008). Embora a ação dessa classe de células B produtoras de IL-10, também denominadas de Breg venha sendo cada vez mais estudadas em doenças autoimunes, seu papel nas mesmas ainda é desconhecido (MIELLE et al., 2018). As células B reguladoras atuam principalmente na atenuação da inflamação, contribuindo para a manutenção da tolerância imune. Essas células são advindas principalmente de subpopulações imaturas e de transição, e, em quadros autoimunes, geralmente estão numericamente deficientes ou disfuncionais (OLEINIKA, MAURI, SALAMA, 2019). Cada vez mais novas evidências demonstram que os linfócitos B não são responsáveis apenas pela manutenção da imunidade adaptativa através da produção de anticorpos, mas sim atuam ativamente na regulação da resposta imune através da produção de citocinas (LUND, 2008). O perfil de citocinas das células B é influenciado pelo microambiente celular de linfócitos T auxiliares, assim além da IL-10, essas células podem expressar diferentes outros tipos

de citocinas, como IL-6 e IL-12. As células Bregs produtoras de IL-10 promovem tolerância e suprimem a resposta inflamatória, enquanto as citocinas produzidas pelas células B efetoras são capazes de amplificar a resposta imune humoral e celular, através da produção, por exemplo, de TNF-A e IFN $\gamma$  (LUND, 2008). Em processos patológicos, esse perfil celular pode ser alterado, podendo levar a um desbalanço de citocinas pró e anti-inflamatórias (LUND, 2008). Em indivíduos saudáveis, por sua vez, esse balanço contribui para a regulação da imunidade, porém ainda é pouco descrito na literatura como é o perfil do microambiente celular durante os quadros de homeostase, e se, citocinas pró inflamatórias e anti-inflamatórias atuam conjuntamente para a manutenção e produção dessas células através de um mecanismo de auto-regulação.

Sendo assim, a hipótese do nosso trabalho é de que indivíduos saudáveis possuam maior expressão de citocinas de caráter supressor da inflamação em seu microambiente celular, com uma população mais elevada de células Bregs, além de menor população celular de B ativadas expressoras de citocinas pró-inflamatórias.

## **REFERENCIAL TEÓRICO**

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Introdução ao sistema imune

O sistema imune é constituído por uma gama de células e moléculas que desencadeiam uma resposta coletiva e coordenada quando apresentados a substâncias desconhecidas sendo, assim responsável pela defesa do organismo quanto aos agentes externos ou patogênicos. A complexidade do sistema imune é tanta quanto pode-se equiparar com o sistema nervoso (JERNE, 1973).

Apesar dos crescentes estudos envolvendo a área em questão, ainda se sabe pouco acerca desse sistema. Para que ocorra a invasão de um patógeno existem primeiramente três níveis de defesa. O primeiro nível se trata das barreiras físicas propriamente ditas, como pele, muco e secreções enzimáticas. A segunda barreira é chamada de sistema imune inato, sendo a resposta inicial do corpo em relação a um microrganismo. E finalmente, a terceira barreira é chamada de resposta imune adaptativa ou adquirida, que garante a eficácia e eficiência da resposta diante uma re-exposição ao patógeno com grande especificidade mediante a formação de memória imunológica. (DELVES e ROITT, 2000). As células do sistema imune são transportadas a partir do fluxo sanguíneo, sendo capazes de alcançar todos os tecidos através dos capilares e depois retornam a um sistema vascular próprio, o sistema linfóide (JERNE, 1973).

As moléculas reconhecidas pelas células do sistema imune são chamadas de antígenos, que podem derivar desde pequenos padrões moleculares de patógenos até estruturas proteicas complexas (DELVES e ROITT, 2000). Os padrões específicos de que podem ser reconhecidos por essas células são chamados de epítomos, que se caracterizam por padrões presentes na superfície de grandes moléculas, como proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos (JERNE, 1973). Apenas uma pequena parcela de antígenos desencadeiam uma resposta imune de fato, sendo chamados de imunógenos. Alguns antígenos chamados de haptenos necessitam de moléculas maiores chamadas de carreadores para que ocorra a resposta imune (DELVES e ROITT, 2000). No ser humano, existem cerca de um trilhão de células chamadas de linfócitos e cerca de cem milhões de trilhões de anticorpos, essas células são responsáveis por garantir o reconhecimento dos antígenos e memória imunológica a longo prazo. Os linfócitos podem ser encontrados em grandes quantidades nos

linfonodos e nos tecidos de sua origem e maturação, que incluem a medula óssea, o timo e o baço (JERNE, 1973)

## **2.2 Imunidade inata e adaptativa**

A defesa inata consiste na primeira linha de defesa contra patógenos, caracterizada por mecanismos celulares e bioquímicos preparados para serem rapidamente ativados diante da infecção. Os principais componentes que constituem a defesa inata são barreiras físicas e químicas, como epitélio e muco; Células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos; Células dendríticas, Natural Killers, Células linfoides inatas; Proteínas do sistema complemento, e citocinas mediadoras de inflamações (ABBAS et al, 2015). De acordo com Delves e colaboradores (2000), pensava-se que a imunidade inata consistia em todas as respostas imunes que não possuem memória imunológica, apresentando sempre a mesma resposta independentemente do antígeno e do número de vezes que fosse ativada. Porém, estudos mais recentes já descreveram memória epigenética na imunidade inata, através de mudanças transcricionais do código genético dos receptores de reconhecimento de padrão (“Pattern Recognition Receptors” do inglês, ou PRR’s), sendo responsável pelo reconhecimento de antígenos, e regulação de genes envolvidos na imunidade inata (ZHANG; CAO, 2019). Essa região da cromatina pode sofrer alterações para reconhecer padrões genéticos específicos, ou para adaptações relacionadas a mudanças ambientais. Para sobreviverem e replicarem, diversos patógenos desenvolveram uma variedade de estratégias a fim de contornarem essa linha de defesa, como a modificação direta de proteínas e cromatina do hospedeiro (ZHANG; CAO, 2019). Além disso, hábitos comportamentais externos também podem modificar os PRR’s, tanto dificultando o reconhecimento dos antígenos quanto para a expressão de fatores de defesa (ZHANG; CAO, 2019).

Em contraste com o reconhecimento pelos receptores do sistema imune inato, onde as células já estão em sua forma funcional principal para sua programação genética, as respostas imunes adaptativas dependem de receptores que são customizados e selecionados após vários processos de recombinação somática de um grande número de segmentos genéticos. Após o primeiro encontro com o patógeno, as células que expressam esses receptores imunes podem persistir no organismo, promovendo memória imunológica e a capacidade de resposta rápida

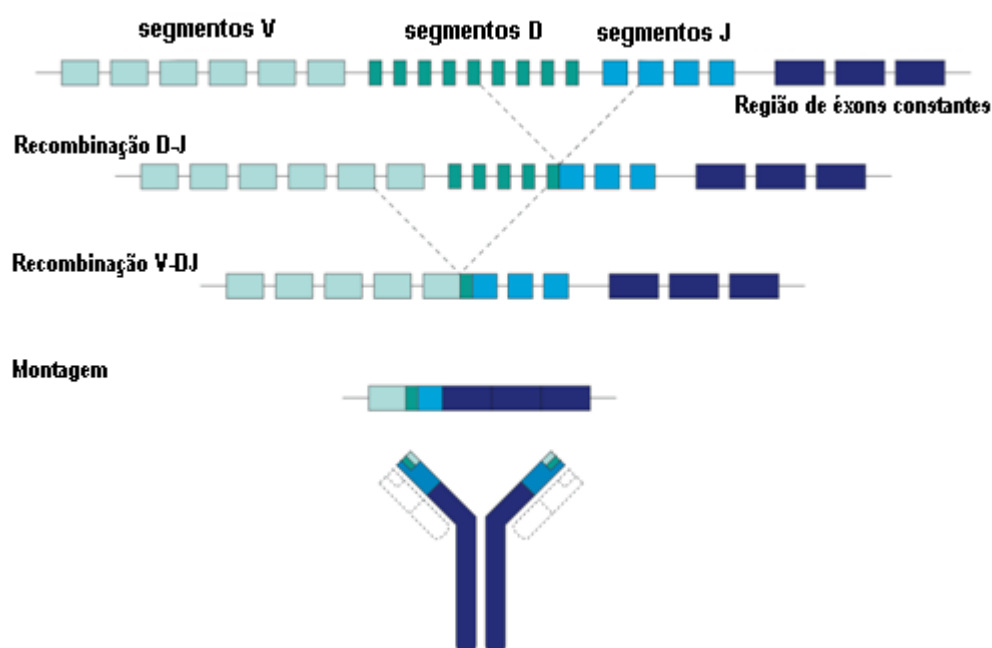
caso ocorra uma re-exposição (BONILLA e OETTGEN, 2010). As células do sistema imune adaptativo incluem os linfócitos T, que são maturados no timo sendo os efetores da resposta imune celular, e os linfócitos B, que são produzidos a partir da medula óssea e são capazes de produzir anticorpos.

Os linfócitos são produzidos a partir de células tronco primordiais do fígado fetal e medula óssea através de interações com células do estroma, como fibroblastos e citocinas (DELVES e ROITT, 2000). Essas células são extremamente móveis, após seu desenvolvimento nos tecidos linfóides primários (timo e medula óssea), viajam até os tecidos linfóides secundários, que incluem os linfonodos e baço, onde podem identificar antígenos circulantes na linfa e sangue. (BONILLA e OETTGEN, 2010). Em seus estágios iniciais de formação, não é necessária a presença de um antígeno para a sobrevivência celular, mas assim que passarem a expressar em sua superfície um receptor maduro, a sua diferenciação e expansão passam a ser antígeno-dependente. Os linfócitos antígeno-específicos possuem estruturas diferentes de acordo com a sua função (DELVES e ROITT, 2000)

É estimado que os linfócitos são capazes de produzir mais de mil diferentes regiões variáveis de anticorpos para células B e um número similar de regiões variáveis para receptores de células T. Essa grande capacidade de variação é promovida por menos de 400 genes, ocorrendo a partir de processos de recombinação que cortam, separam e modificam as regiões gênicas variáveis. (DELVES e ROITT, 2000). A disposição e combinação das instruções genéticas nas regiões variáveis envolvem a recombinação dos genes dos segmentos V, D e J unindo um segmento de cada tipo. (Figura 1)



**Figura 1.** Configuração da linha germinativa para recombinação dos segmentos dos genes VDJ e montagem das regiões variáveis dos anticorpos.



**Fonte:** Adaptado de BRITISH SOCIETY FOR IMMUNOLOGY (2020). A figura demonstra as regiões de éxons presentes nos segmentos variáveis VDJ e a região constante responsável pela recombinação e montagem final da linha germinativa para a formação de um anticorpo.

Cada linfócito usa diferentes combinações desses segmentos gênicos para formar o código genético do seu receptor antigênico. As sequências dos receptores de células T geralmente permanecem inalteradas durante a divisão celular, mas isso não é o caso da célula B, onde cada um dos centros germinativos de órgãos linfóides secundários podem passar por ainda mais rearranjos do segmento V, em um processo chamado de edição de receptor. Esse mecanismo garante que as células B autorreativas sejam capazes de identificar o erro em suas vias e que se alterem através da substituição de genes na região variável. Nesse processo, o gene V já existente na sequência rearranjada VDJ é substituído por outro gene V (DELVES e ROITT, 2000).

### 2.3 Linfócitos B e sua importância

Os linfócitos B são uma classe de células muito descritas por serem capazes de regular positivamente a resposta imune e por serem os principais desencadeadores patogênicos de doenças autoimunes devido à sua habilidade de

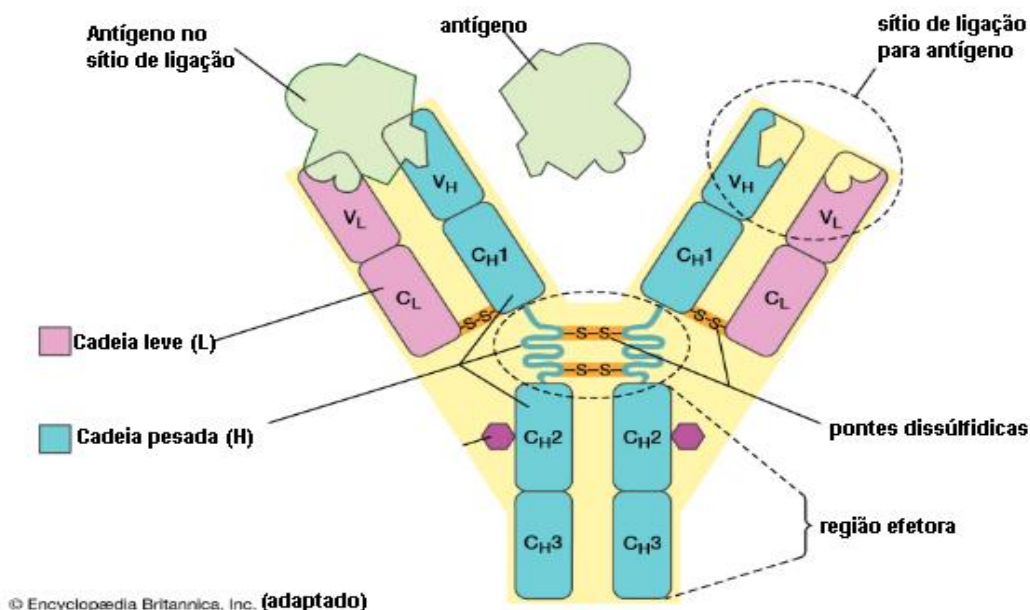
produção de autoanticorpos (MAURI; BOSBA, 2012). São populações celulares originadas a partir da medula óssea caracterizadas por expressarem clonalmente imunoglobulinas (Ig) de superfície celular capazes de reconhecer epítopos de antígenos. O desenvolvimento dessas células em mamíferos ocorre primeiramente em tecidos linfóides primários, como fígado fetal e medula óssea adulta, com subsequente maturação em tecidos linfóides secundários como linfonodos e baço (LEBIEN; TEDDER, 2008).

A descoberta dos linfócitos B como células fonte de anticorpos e seu caráter protetor do organismo ocorreu entre os anos 1960 e 1970 utilizando modelos animais e clínicos para analisar doenças que levam às deficiências imunes e foi o passo inicial para os estudos que englobam esses tipos celulares (LEBIEN; TEDDER, 2008). Cada tipo de anticorpo pode ser produzido como uma molécula circulante ou estacionária. Para serem estacionárias elas devem possuir uma transmembrana hidrofóbica onde ancora-se a molécula do anticorpo na membrana da célula B, passando a funcionar como um receptor para a célula-B. (DELVES, 2000)

O desenvolvimento de células B inicialmente é caracterizado pelo rearranjo dos loci nas cadeias H (pesada) e L (leve) das imunoglobulinas. A compreensão inicial da origem das células B se deu a partir da descoberta das Cadeias Leves Substitutas (SLC) originalmente em modelos murinos (LEBIEN; TEDDER, 2008). As SLC são heterodímeros constituídos de duas proteínas distintas ( $5\gamma$  e VpreB) que se pareiam com a cadeia pesada H dando origem às células pré-B. A maturação dos linfócitos requer a ação de uma rede de citocinas e fatores de crescimento, como a interleucina-7 (IL-7) que promove o rearranjo das cadeias VDJ (LEBIEN; TEDDER, 2008).

Os anticorpos consistem em sua estrutura por duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves unidas por ligações dissulfídicas (Figura 2). O N terminal de cada cadeia possui um domínio variável que se liga ao antígeno através das três regiões hipervariáveis determinantes de complementariedade (DELVES e ROITT, 2000). Já os domínios C terminais em ambas as cadeias formam as regiões constantes, e determinam as classes e subclasses dos anticorpos. (Figura 2). A sequência de aminoácidos nas regiões constantes da cadeia pesada podem identificar cinco classes de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), sendo quatro subclasses de IgG e duas subclasses de IgA. Todas essas classes e subclasses possuem diferentes funções.(DELVES, 2000).

**Figura 2.** Modelo estrutural do anticorpo, com a união das cadeias leves e pesadas por ligações dissulfídicas, sítio de ligação e reconhecimento de antígenos nas regiões variáveis.



**Fonte:** Adaptado de ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA (2020). A figura demonstra as principais regiões dos anticorpos incluindo sua estruturação entre cadeias leves e pesadas, unidas por pontes dissulfídicas, sítio de ligação para antígeno e região efetora.

## 2.4 Diferenciação e expansão clonal

Para exercerem a função efetora ou de memória, as células B necessitam se diferenciar em células do plasma ou células B de memória, respectivamente. Essa escolha é influenciada dependendo da região anatômica em que elas se encontram inicialmente, sendo as células localizadas próximas a medula óssea, de caráter hematopoiéticas totipotentes, destinadas à linhagem para linfócitos B. A seguir, prosseguem para o estágio pró-B onde ocorre a recombinação da cadeia pesada da imunoglobulina (CHUNG; SILVERMAN; MONROE, 2003). As células que passarem com sucesso por essa recombinação são selecionadas positivamente seguido de expansão clonal através de múltiplos ciclos mitóticos em tecidos linfoides secundários para então ser iniciada a recombinação da cadeia leve da Ig (CHUNG; SILVERMAN; MONROE, 2003). Essas alterações de aminoácidos nas Igs também são responsáveis por determinar a força de ligação ou afinidade do próprio anticorpo ao antígeno (DELVES e ROITT, 2000).

Considerando a fase inicial da resposta imune, chamada de resposta pré-CG, as células B recentemente ativadas podem adentrar o centro germinativo (CG), que é a região ativada do folículo linfóide, para então diferenciarem-se em células do plasma

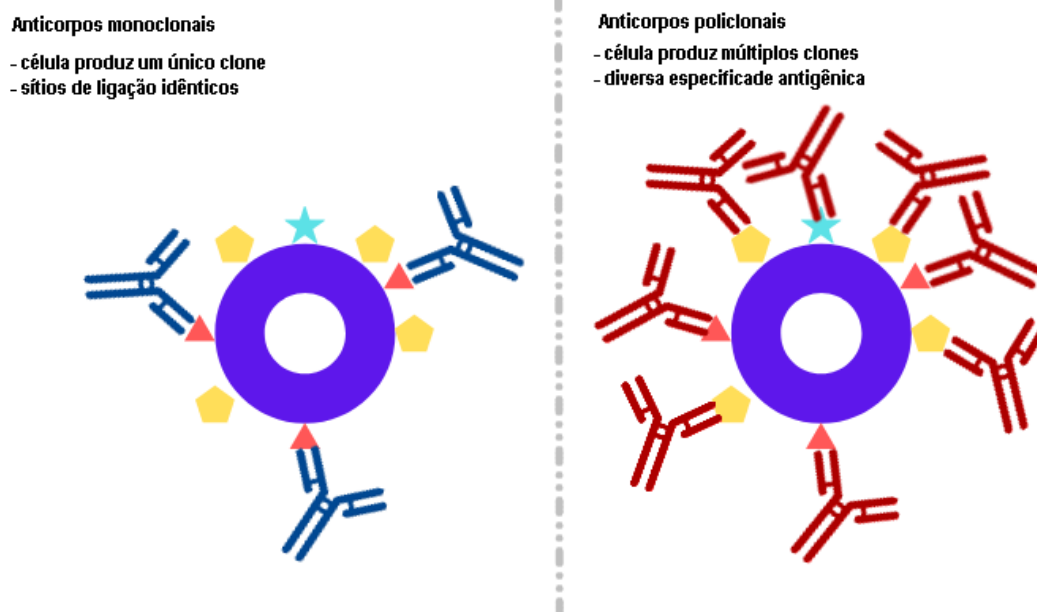
de vida curta ou em células de memória. (SHINNAKASU, KUROSAKI; 2017). Durante uma resposta imune dependente de linfócitos T, as células B também passam por proliferação, diferenciação e seleção no microambiente do centro germinativo, levando a formação do compartimento das células de memória.(COFFEY, ALABYEV, MANSER; 2009) Foi descrito que as células B imaturas presentes na resposta pré-CG podem passar por uma rápida expansão clonal no perímetro folicular sem uma indução de hipermutação somática, mudança de isótipo da cadeia pesada ou expressão de genes necessários para adentrar no centro folicular durante os estágios iniciais da resposta imune dependente de T, (COFFEY, ALABYEV, MANSER; 2009) evidenciando o papel dessas células ainda imaturas. Além disso, foi demonstrado que nesse tipo de resposta, uma maior afinidade pelo receptor de B (BCR) induz uma maior sinalização nessas células, que conseqüentemente demanda maior ajuda por linfócitos T auxiliares. (SHINNAKASU, KUROSAKI; 2017).

Após a exposição dos BCR ao antígeno, as células B foliculares migram para a borda de zonas T no centro germinativo, onde passam pela interação com linfócitos T auxiliares (COFFEY, ALABYEV, MANSER; 2009). Enquanto a região constante é responsável por especificar a classe do anticorpo (Ex. IgM ou IgG) durante a resposta imune, a região variável VDJ nas células B podem se unir a diferentes outras regiões constantes para alterar a classe do anticorpo, em um processo chamado de mudança de epítipo (DELVES e ROITT, 2000). Subseqüentemente, as células B ainda imaturas presentes na resposta pré-CG podem viajar até o centro do folículo e rapidamente se proliferar em associação com células dendríticas foliculares (CDFs) resultando na formação e ativação do próprio centro germinativo. (COFFEY, ALABYEV, MANSER; 2009).

Cada célula B é programada para expressar apenas uma das grandes possibilidades de anticorpos em potencial, possuindo a mesma especificidade para um antígeno. Os clones selecionados para participar de uma resposta imune são selecionados caso eles possuam um receptor capaz de se ligar ao antígeno apresentado, em um processo chamado de seleção clonal (DELVES e ROITT, 2000). Na expansão clonal as células selecionadas por antígenos se proliferam, levando ao rápido aumento do número de células B ou T capazes de reconhecer o antígeno. A maioria das respostas envolvem diferentes clones, sendo assim consideradas policlonais (figura 3), já que até mesmo os antígenos mais simples possuem vários

diferentes epítomos, sendo cada um deles capazes de se ligar a somente um clone em específico (DELVES, 2000).

**Figura 3.** Durante a expansão clonal as células B produzem anticorpos policlonais, capazes de se ligarem a diversas proteínas expressas pelos antígenos de interesse.



**Fonte:** própria. A ilustração demonstra a diferença de especificidade antigênica dos anticorpos monoclonais e policlonais.

Em alguns casos pode-se existir o que se chama de resposta imune cruzada, que de maneira geral reflete as relações filogenéticas entre os organismos (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001). Uma relação filogenética mais intrínseca pode resultar em um alto grau de homologia entre estruturas primárias de certas proteínas ou sequência de aminoácidos sendo capaz de ser reconhecidos por certas células de memórias com epítomos semelhantes, resultando em uma resposta imune secundária mesmo para um organismo novo, devido ao alto grau de relação entre eles (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001). A resposta imune cruzada geralmente acontece diante exposição à diferentes alérgenos e alguns tipos de vírus (STETTLER et al, 2016).

Em alguns flavivírus a resposta cruzada é a principal característica de potencializar o papel patológico de doenças, já que os anticorpos com resposta cruzada são elicitados a partir de infecções prévias de vírus heterólogos. Esse fenômeno é conhecido como amplificação dependente de anticorpo (em inglês “Antibody Dependent Enhancement” ou ADE) (STETTLER et al, 2016). Já é descrito epidemiologicamente que para os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV), uma

infecção primária é capaz de proteger contra a reinfecção para o mesmo sorotipo, porém representa um risco para o desenvolvimento de um quadro mais grave da doença caso ocorra reinfecção com um sorotipo diferente (STETTLER et al, 2016). O papel dos anticorpos em casos de dengue grave é demonstrado por estudos que avaliaram que a presença de anticorpos maternos em crianças pode representar um maior risco para o desenvolvimento da forma mais grave da doença. Além disso também vem sendo corroborada a tese de que indivíduos com anticorpos para DENV podem desenvolver um quadro mais grave da infecção pelo vírus da zika (ZIKV) e vice-versa (STETTLER et al, 2016).

## **2.5 Subpopulações de linfócitos B**

As células B são subdivididas em duas grandes famílias: B1 que são originadas em precursores do fígado fetal e maturam em mucosas, cavidade pleural e peritoneal; e a B2 que são originadas de precursores derivados de medula óssea e maturam em tecidos secundários linfóides. As células B1 ainda podem ser subdivididas em células B1a e B1b, enquanto as células B2 podem ser subdivididas em células imaturas transitórias (T1, T2 e T3), células B maduras foliculares (FO) ou de zonas marginais (MZ) (LUND, 2008).

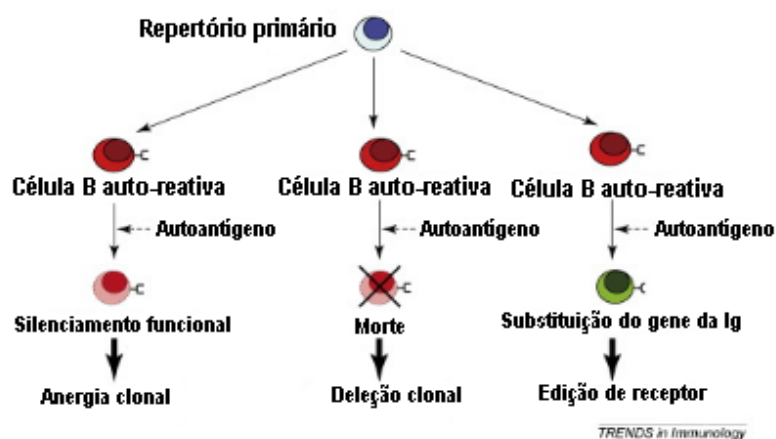
A proliferação de linfócitos naive durante o primeiro encontro com o antígeno caracteriza a resposta imune primária, gerando tanto células T e B efectoras e de memória. As células B de memória promovem uma resposta imune secundária quantitativamente e qualitativamente superior após um encontro subsequente com o mesmo antígeno (DELVES e ROITT, 2000). As células B de memória estão incluídas no grupo B2, já que sua maturação ocorre em centros germinativos de tecidos linfóides secundários. Quando isso ocorre, as células B naive entram em expansão clonal com mudança do isótipo e hipermutação somática na região genética IgV após interação com antígenos, para que ocorra a diferenciação em células B de memória e outras células do plasma (AGEMATSU et al, 2000)

As células de memória estão em maior número quando comparado com as subpopulações imaturas, além de serem mais fáceis de serem ativadas garantindo que a resposta secundária seja mais rápida do que a resposta primária. A resposta secundária produz um maior número de linfócitos e no caso das células B, promove a indução de maiores níveis de anticorpos que possuem maior afinidade com o

antígeno. (DELVES e ROITT, 2000). Baseado nesse fato, pode-se afirmar que o conceito de vacinação promove a exposição de uma versão modificada de um patógeno de forma a ser inofensiva ao organismo porém ainda capaz de induzir a formação de células de memória sem promover os efeitos patológicos do agente infeccioso. Dessa forma, o sistema imune é capaz de promover uma resposta secundária com um forte e imediato efeito contra a versão patogênica do microorganismo em uma exposição futura. (DELVES e ROITT, 2000)

Enquanto as células B ainda estão imaturas, ocorre a seleção negativa dos clones capazes de reconhecer antígenos próprios. Essas células imaturas auto-reativas podem passar tanto por um processo de recombinação continuada da cadeia leve de modo a gerar um receptor novo não reativo, ou, sofrerem apoptose. (CHUNG; SILVERMAN; MONROE, 2003) Caso essa edição não seja bem sucedida, a célula pode ser eliminada por deleção clonal ou pode continuar sobrevivendo com uma função alterada ou reduzida para que não reaja com auto-antígenos, o que é referido por anergia clonal (DUTY et al 2009) (Figura 4). Essas células B imaturas e maduras autorreativas potencialmente patogênicas representam cerca de 20% das células B circulantes em adultos humanos saudáveis (DUTY et al 2009).

**Figura 4.** As células B imaturas auto-reativas podem seguir três caminhos diferentes, o silenciamento funcional (anergia), sua morte por apoptose (deleção) ou edição de receptor através da substituição dos genes das imunoglobulinas.



**Fonte:** Adaptado de ZOUALI, 2008. A figura demonstra as possibilidades que as células B auto-reativas podem tomar para evitar danos ao hospedeiro.

Ainda é pouco compreendido como e por quê essas células auto reativas são capazes de passar pelos pontos de verificação e sobreviver com suas funções reduzidas ou alteradas para que não reaja com o próprio (DUTY et al 2009), porém existe crescente evidências que sugerem que essas populações podem responder diante quadros de infecção ou vacinação. Em estudo realizado por Steach e

colaboradores (2020) foi sugerido que as células B imaturas com receptores específicos para antígenos externos possuem baixa resposta cruzada para antígenos próprios, além de serem menos prováveis de se expandirem clonalmente (STEACH et al, 2020).

Finalmente, as subpopulações B de transição são caracterizadas pelas células imaturas não reativas que saem da medula óssea e procedem para circulação até o baço. A emigração da medula é marca da transição do estado imaturo de B até o estado transicional 1 (T1). O desenvolvimento continuado dessas células marcam o estado transicional 2 (T2) para então culminarem em células maduras imunocompetentes. (CHUNG; SILVERMAN; MONROE, 2003)

## **2.6 Caracterização celular de linfócitos B**

A classificação para anticorpos monoclonais (mAbs) se dá a partir da identificação de receptores de membrana únicos para cada subpopulação celular, os chamados grupamentos de diferenciação (CD ou Cluster Differentiation) (LEBIEN; TEDDER, 2008). Os principais marcadores de mAbs de linfócitos B são o CD19 que englobam majoritariamente todas as linhagens de B, sendo um receptor capaz de regular sinais intracelulares de transdução amplificando a atividade das proteínas-tirosina-quinase-SRC. O CD20 por sua vez, identifica células B maduras e é um receptor que regula canais de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) de membrana e o CD21/C3d que é o receptor viral do Epstein-Barr que interage com o CD19 para gerar sinais transmembrana capaz de informar à célula sinais de inflamação no microambiente (LEBIEN; TEDDER, 2008).

Para as células de memória, o CD27 é uma das proteínas que podem ser utilizados para sua caracterização, estando presente durante sua diferenciação, se trata de uma glicoproteína do tipo 1 expressa com aumento gradual de acordo com a idade da célula. (AGEMATSU et al, 2000). As células CD27 negativas ou imaturas, possuem menor tamanho e o citoplasma escasso além da menor produção de imunoglobulinas (AGEMATSU et al, 2000). A ativação celular pode ser caracterizada pelo CD38, que é uma ectoenzima associada a membrana expressa em linfócitos ativados capaz de induzir a proliferação, diferenciação e apoptose. A expressão de CD38, geralmente por células imaturas, é conhecida por estimular a autoimunidade e em grande expressão (CD38<sup>high</sup>), são descritas em células chamadas de B



regulatórias, capazes de produzir IL-10. (DOMINGUEZ-PANTOJA et al, 2018). O termo “células de transição” foi originalmente designado para caracterizar o grupo de células emigrantes da medula óssea. Essas células expressam inicialmente IgD e CD10, porém a expressão de altos níveis de CD38 também vem sendo associadas para sua identificação. É importante que o CD27 também seja incluído se for o caso, já que populações CD38<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup> podem conter células CD27<sup>+</sup> que sejam mais propensas às populações IgM de memória (MARTIN et al, 2016). Com esse fato, os antígenos que podem ser utilizados para a identificação das subpopulações de células B de memória, B imaturas e B de transição podem ser observados na tabela 1.

**Tabela 1.** Caracterização fenotípica das subpopulações de células B maduras de memória, de transição e B imaturas.

<b>Células B de memória</b>	<b>CD3-CD19+CD27+CD38-</b>
<b>Células B de transição</b>	<b>CD3-CD19+CD27-CD38+</b>
<b>Células B imaturas</b>	<b>CD3-CD19+CD27-CD38++</b>

Fonte: própria.

## 2.7 Expressão de citocinas em células B

Além da importância para o desenvolvimento do sistema imune, as células B também são capazes de regular seu funcionamento através da expressão de citocinas imunomoduladoras (como IL-6, IL-10 e IFN $\gamma$ ) independentemente da produção de Igs (LEBIEN; TEDDER, 2008). As citocinas são um grupo de mediadores solúveis que agem como mensageiros tanto no próprio sistema imune quanto em outros sistemas no corpo, constituindo uma rede integrada altamente envolvida com a regulação das respostas imunes. As células são capazes de identificar citocinas através de receptores específicos (DELVES e ROITT, 2000).

A diferenciação entre as citocinas propriamente ditas e seus receptores as vezes é de difícil percepção, pois existem alguns tipos de receptores que se encontram em sua forma solúvel e alguns tipos de citocinas que são ancoradas na

membrana. Além de atuarem como mensageiros, algumas citocinas possuem um papel direto para defesa, como é o caso dos interferons liberados por células infectadas por vírus, o que induz o estado de resistência viral para as células adjacentes saudáveis (DELVES e ROITT, 2000). No caso dos linfócitos B a expressão de citocinas é capaz de influenciar linfócitos T, células dendríticas e funções das células apresentadoras de antígenos, regulação e neogênese dos tecidos linfóides, regulação para a rejeição de tecidos transplantados e o desenvolvimento e imunidade tumoral. (LEBIEN; TEDDER, 2008)

As células B produtoras de citocinas podem ser subdivididas em dois grupos, o primeiro seria para a população reguladora com produção discreta de citocinas e o segundo grupo seria para as chamadas “B efetoras” (LUND, 2008). As células B regulatórias (Bregs) podem ser distinguidas através da produção de IL-10 e TGFbeta-1, que ao contrário de exacerbar as respostas imunológicas, possuem um caráter de suprimir respostas inflamatórias, sendo assim de caráter protetor ao organismo durante a inflamação. Já as células B efetoras produzem citocinas relacionadas ao tipo de resposta imune (LUND, 2008), por exemplo, células B presentes na resposta do tipo Th1 são chamadas de Be-1 e produzem citocinas associadas a esta resposta, como IFN $\gamma$  e IL-12, enquanto as células B presentes na resposta do tipo Th2 (Be-2) podem produzir IL-2, IL-13 e IL-4, que são citocinas relacionadas à respostas alérgicas (LUND et al 2005; LUND, 2008).

Assim como os linfócitos Treg, as Breg produtoras de IL-10 podem ser derivadas de diferentes populações de células B como os linfócitos B2 de zonas marginais e os linfócitos B1a. As células B efetoras, por sua vez, advêm de células B2 maduras foliculares (BLAIR et al, 2010).

Existe um crescente papel da utilização de citocinas e seus antagonistas como terapêutica (DELVES e ROITT, 2000). Já é descrito a combinação de IL-2 e IFN-alpha como tratamento favorável para melanoma (KEILHOLZ et al, 1998) e a seleção de anticorpos monoclonais contra fatores de necrose tumoral em pacientes com artrite reumatoide (FELDMANN et al, 1997). No caso das células B, o perfil de citocinas expressos por elas podem variar durante alguma doença autoimune ou naturalmente de acordo com a presença de células T helper e receptores ligantes de T, responsáveis pela diferenciação de linfócitos B (LUND, 2008). Em cultura de linfócitos B totais podem ser produzidas tanto citocinas pró inflamatórias (IL-12, TNFa, IFN $\gamma$ ) quanto citocinas supressoras (IL-10), e isso acontece pois nesse meio podem ser

produzidos tanto células B imaturas capazes de suprimir a resposta imune e células B de memória que irão produzir citocinas efetoras (LUND, 2008).

O balanço da produção dessas citocinas pode ser alterado diante de quadros de doenças autoimunes. Em estudo realizado por Duddy, et al (2007) com pacientes com esclerose múltipla foi visto que as células B destes pacientes produziam menos IL-10 do que quando comparado à pacientes saudáveis (DUDDY et al, 2007). Quando realizada a depleção das células B em indivíduos com artrite reumatoide, Adlowitz e colaboradores (2015) demonstraram que as células B de memória e efetoras possuíam uma maior propensão a produzir citocinas pró-inflamatórias, principalmente Fatores de Necrose Tumoral (TNF). Ainda nesse estudo, também foi observado uma maior produção de citocinas reguladoras e anti-inflamatórias, como a IL-10, pela subpopulação de células B imaturas ainda não apresentadas a antígeno (ADLOWITZ et al, 2015), corroborando com o que foi demonstrado por Sim e colaboradores (2015) onde os níveis de IL-10 em subpopulações de células B imaturas (CD27-CD38<sup>hi</sup>) e transicionais (CD27-CD38<sup>int</sup>) são mais altos em relação às subpopulações de memória (CD27<sup>+</sup>) em pacientes com lúpus sistêmico eritematoso. As células B reguladoras, ou seja, produtoras de IL-10, também podem estar presentes em subpopulações transicionais, suas funções ainda não são completamente elucidadas. NOVA-LAMBERTI e colaboradores (2016), demonstrou que essa subclasse transicional produziu mais IL-10 e expressou maiores níveis de receptores para IL-10 após ativação com CD40 *in vivo*, sugerindo um mecanismo de regulação mediado por linfócitos T (NOVA-LAMBERTI et al, 2016). Em indivíduos saudáveis, o principal papel das células B reguladoras vem sendo associado ao seu papel protetor e de manutenção ao suprimir reações imunes indesejadas (MAURI; BOSBA, 2012). Além disso em células CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD38<sup>high</sup> foi observado que estas são responsáveis por suprimir a diferenciação de linfócitos T auxiliares em indivíduos saudáveis pela produção de IL-10 (BLAIR et al, 2010). Diante do exposto, o presente trabalho avaliou a quantificação de subpopulações celulares de linfócitos B de memória, de transição e imaturos quanto a expressão de IFN $\gamma$  e IL-10 em indivíduos saudáveis seguida por comparação entre sexo.

## **OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar subpopulações de células B imaturas, de transição e memória e verificar sua expressão de IFN $\gamma$  e IL-10 em indivíduos saudáveis do sexo masculino e feminino.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- I. Caracterizar subpopulações de células B imaturas (CD3-CD19+CD27-CD38++), células B de transição (CD3-CD19+CD27-CD38+) e células B de memória (CD3-CD19+CD27+CD38-);
- II. Avaliar a frequência populacional dessas subpopulações em ambos os sexos;
- III. Avaliar as subpopulações com relação à expressão e intensidade de fluorescência para as citocinas IL-10 e IFN $\gamma$ ;
- IV. Realizar comparação quanto a expressão de IL-10 e IFN $\gamma$  por subpopulações de células B em homens e mulheres saudáveis.

## **METODOLOGIA**

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Considerações éticas**

O projeto foi aprovado e incluído pela Plataforma Brasil sob título “Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue” (CAAE: 59833416.6.0000.5183) (ANEXO A) para ensaios laboratoriais em Humanos. Todos os voluntários foram claramente informados acerca da importância da pesquisa bem como os possíveis riscos físicos através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B)

### **4.2. Grupos de estudo**

Todos os indivíduos que aceitaram participar voluntariamente deste estudo fizeram parte de dois grupos: 1) Indivíduos do sexo masculino (n= 4), 2) Indivíduos do sexo feminino (n = 3). Do número total, todos apresentaram idade entre 18-27 anos ( $M_a \cong 20,57$  |  $D_p \cong 2,99$ ), e foram submetidos à testagem rápida sorológica a fim de identificar infecções anteriores por DENV ou CHIKV.

### **4.3. Critérios de inclusão e exclusão**

Para o projeto realizado foram selecionados apenas indivíduos saudáveis que nunca apresentaram nenhuma sintomatologia de arboviroses (dengue, zika e chikungunya), confirmados por testes rápidos de sorologia para anticorpos IgG para DENV e CHIKV. Os testes sorológicos devem ser realizados em indivíduos clinicamente saudáveis para evitar a presença de anticorpos virais específicos causadores de reações de imunidade cruzada que podem interferir no resultado final. Além disso, nenhum dos indivíduos faziam uso de medicação contínua durante os ensaios.

### **4.4. Material biológico e processamento das amostras**

Foram coletadas amostras de sangue periférico dos voluntários no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, que foram imediatamente associadas as fichas de identificação de cada indivíduo contendo seus dados clínicos. A coleta sanguínea se realizou a partir de via intravenosa em tubos sem anticoagulantes para obtenção do

soro, e em tubos com heparina, para obtenção e processamento do sangue total. Os tubos sem anticoagulante foram mantidos em temperatura ambiente por no mínimo uma hora para que houvesse a retração do coágulo e em seguida submetidos a centrifugação a 1500rpm por 5 minutos a 25°C. Com as alíquotas do soro obtido foi realizado sorologia para DENV ou CHIKV e conservados à -20°C.

#### **4.4.1. Lise de hemácias**

Foram adicionados 2 mL do sangue coletado em tubos vacutainer com heparina em um tubo Falcon de 15mL, em seguida foram adicionados 12 mL de solução tampão de lise contendo bicarbonato e cloreto de amônio. Após a adição da solução de lise, houve a homogeneização em vórtex e incubação a temperatura ambiente durante 10 minutos sob proteção de luminosidade; Após esse período os tubos foram centrifugados à 2000 rpm à 25°C durante 5 minutos com freio desligado. Efetuado o descarte do sobrenadante, foi realizada a ressuspensão do pallet celular com posterior adição de 12mL de solução salina ou PBS e posterior centrifugação sob as mesmas configurações. Esse processo de ressuspensão e lavagem foi realizado por duas repetições, após a última centrifugação as células foram ressuspendidas em PBS 1X em um volume final de 200µL (o que equivale a 10x menos o volume do sangue colocado inicialmente no tubo Falcon).

#### **4.4.2. Plaqueamento celular**

Em capela de fluxo laminar vertical foram adicionados 25 µL das amostras em placas de 96 poços de fundo em U juntamente com 175 µL de RPMI suplementado e 10µL de brefeldina A. A brefeldina é necessária para o acúmulo de proteínas de interesse para marcação no interior do citoplasma, já que impede seu transporte ao Complexo de Golgi. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> durante 4 horas.

#### **4.4.3. Marcação intra e extracelular**

Após o período de incubação, a placa foi centrifugada durante 8 minutos à 1300rpm a 4°C onde o sobrenadante foi desprezado e a placa foi vortexada. Em paralelo foram preparadas as soluções contendo os mixes de anticorpos extracelulares diluídos em Solução de Diluição de Anticorpos (SDA) nas concentrações padronizadas de 40 µL/poço e adicionadas à placa que deve ser



incubada durante 15 minutos em geladeira a 4°C. Após a incubação foram acrescentados aos poços 150 µL de PBS e centrifugados durante 8 minutos a 1300 RPM e 4°C em seguida desprezando seu sobrenadante e resuspendendo as células em 100 µL de PBS e 100 µL de Formaldeído 4% obedecendo o período de incubação de 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse período a placa foi novamente centrifugada durante 8 minutos a 1300RPM e 4°C e foi desprezado o sobrenadante para a adição de 150 µL de PBS e submetido à uma nova centrifugação seguindo os mesmos parâmetros e subsequente adição de 40µL das soluções contendo os anticorpos intracelulares diluídos em Permeabilization Buffer (PB) e incubados durante 30 minutos em temperatura ambiente, em seguida adicionados mais 150µL de PB em todos os poços para centrifugação durante 8 minutos a 1300RPM e 4°C, o sobrenadante foi desprezado e as células resuspendidas usando o vórtex. Posteriormente, foram adicionados 150µL de PBS, sendo a placa novamente centrifugada sob mesmos parâmetros mencionados. Finalmente, o conteúdo de todos os poços foi ressuspendido em 200µL de solução Wash B para transferências de tubos FACS específicos para leitura em Citômetro de Fluxo FACS CANTO II (onde foram obtidos cerca de 70.000 eventos e posteriormente analisados no software FlowJo).

#### 4.5. Anticorpos monoclonais

Foram adquiridos anticorpos monoclonais adquiridos na BD-Pharmigen TM (CA, USA) ou Ebioscience (San Diego, CA, USA). As informações referentes aos anticorpos monoclonais e os respectivos canais são demonstrados na tabela 2.

**Tabela 2:** Painel de marcação dos anticorpos monoclonais utilizados de acordo com seus canais específicos de leitura.

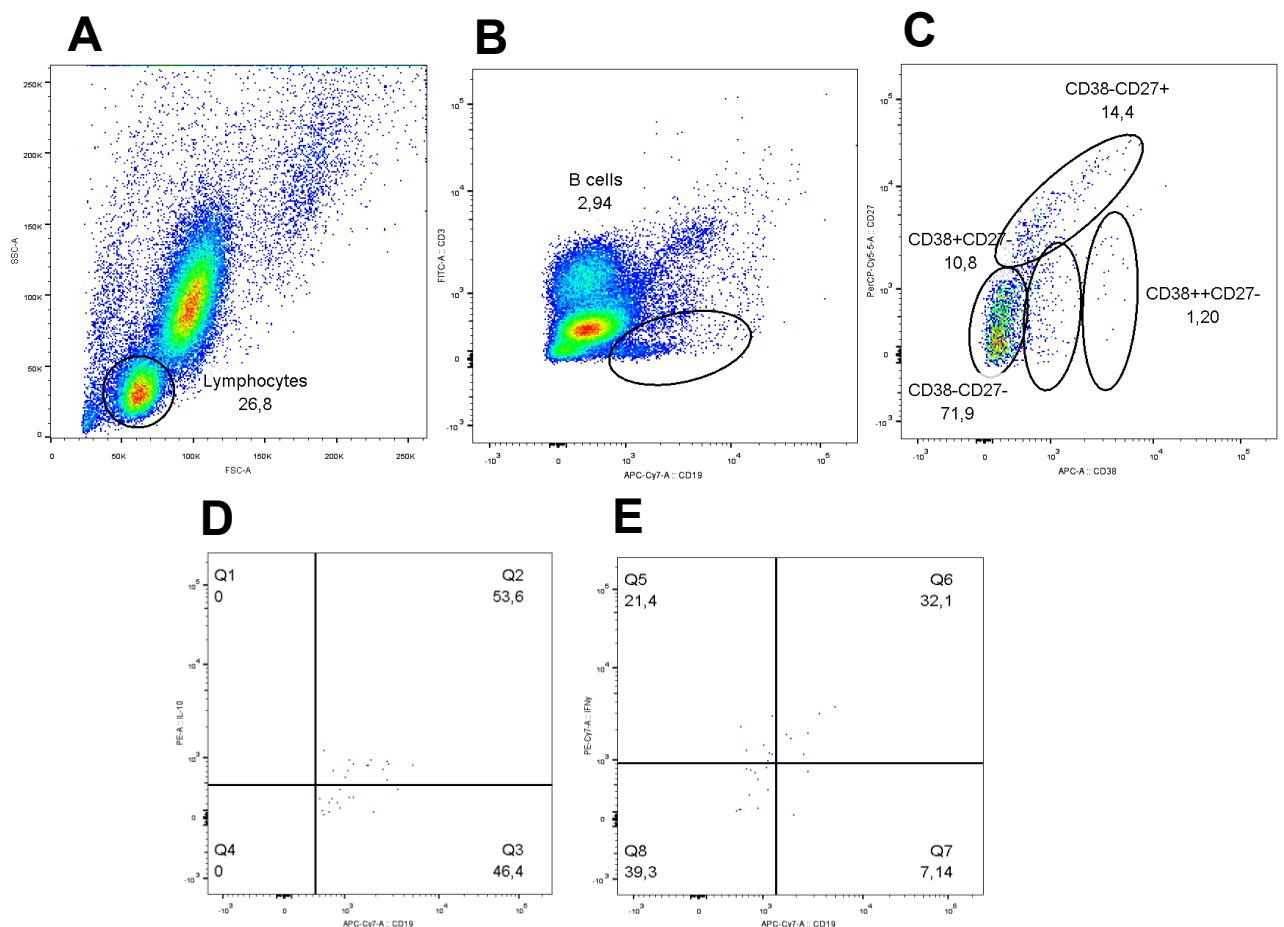
Canais	FITC	PE	PECy5	PECy7	APC	APCCy7
Intra		IL-10		IFNy		
Extra	CD3		CD27		CD38	CD19

**Fonte:** Própria.

#### 4.6. Estratégia de análise de dados a partir de citometria de fluxo

A análise populacional dos linfócitos B (CD19) e a produção das citocinas de interesse IL-10 e IFN $\gamma$  foram realizadas através do software FlowJo (V10.0.7). Para isso foi realizado um gate na região correspondente aos linfócitos, podendo ser visualizados através de suas características padrão de tamanho e granulosidade FSC-SSC (Fig. 5a). E posteriormente seleção das células B de interesse correspondendo às populações equivalentes as células com marcação CD19 positiva e CD3 negativas (Fig. 5b). As subpopulações das células B puderam ser demarcadas e identificadas através da comparação entre os parâmetros CD27 (eixo Y) e CD38 (eixo X) (Fig. 5c). Finalmente cada subpopulação pôde ser avaliada individualmente em sua expressão de IL-10 e IFN $\gamma$  (Fig. 5d-5e).

**Figura 5.** Estratégia de análise das populações celulares de linfócitos B e expressão das citocinas IL-10 e IFN $\gamma$  nas subpopulações especificadas



Fonte: Própria.

#### **4.7. Análises estatísticas**

As análises estatísticas e comparativas foram realizadas através do software Graphpad Prism (SAS Institute INC. / Versão 8.4.2). Para a comparação entre dois grupos distintos foi realizado os testes de Mann-Whitney e teste T do tipo não pareados cujas diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando  $p \text{ value} \leq 0.05$ . Já para as análises comparativas entre três grupos distintos, foram gerados resultados através de testes ANOVA com múltiplas comparações seguido pelo método de Tukey cujas diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando  $p \text{ value} \leq 0.05$ .

## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Testes sorológicos como critério de exclusão

Foram realizados testes rápidos para DENV e CHIKV em 15 indivíduos (tabela 3) e excluídos todos aqueles com resultado positivo (figura 6).

**Tabela 3.** Resultado dos testes sorológicos para todos os indivíduos testados. Foram coletadas e processadas as amostras biológicas de indivíduos com resultado negativo para o teste.

Identificação	Sexo	Teste	Código final
001	F	+	-
002	F	+	-
003	F	-	CTL1
004	F	+	-
005	F	+	-
006	M	+	-
007	M	-	CTL2
008	M	-	CTL3
009	M	+	-
010	M	-	CTL4
011	M	-	CTL5
012	F	-	CTL6
013	M	+	-
014	M	+	-
015	F	-	CTL7

**Fonte:** própria. A tabela distribui a quantidade de indivíduos voluntários total pelo sexo, resultado do teste sorológico e caso positivo, o código utilizado para identificação da amostra biológica encaminhada para o processamento por citometria de fluxo.

**Figura 6.** Comparação entre um teste sorológico considerado positivo (A) e um considerado negativo (B).

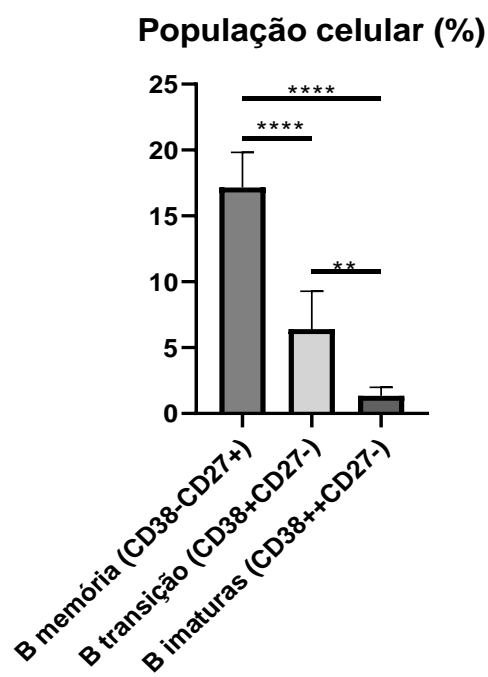


**Fonte:** Própria. A realização de testes imunocromatográficos deve indicar positividade para a primeira listra controle (reagente), o que garante a eficiência do teste, e, caso exista interação antígeno-anticorpo de interesse, uma nova listra será obtida (positividade).

## 5.2. Frequência das subpopulações de células B

De maneira geral, foi visto que os maiores níveis entre subpopulações celulares analisadas correspondem às células B de memória CD27+ (figura 7). Esses níveis celulares foram seguidos das células B de transição CD38+ e células B imaturas CD38++, em menor quantificação porém com expressão ainda relevante (figura 7).

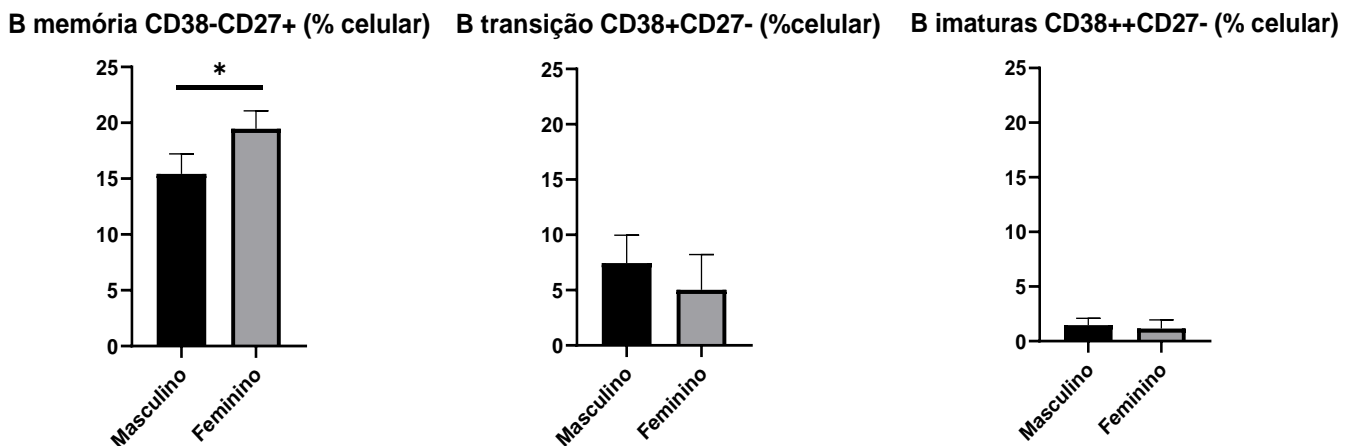
**Figura 7.** Quantificação das populações celulares de B de memória CD27+, transição e imaturas CD38+



**Fonte:** Própria. O gráfico correlaciona as subpopulações de B de memória, B de transição e B ativadas reguladoras em função da sua quantificação celular total.

Além disso, foi realizada uma comparação entre os sexos masculino e feminino em relação aos níveis dessas populações celulares (figura 8), onde foi observado que existem diferenças estatisticamente relevantes com um aumento de células de memória em indivíduos do sexo feminino. Para as demais populações não existiram diferenças significativas entre os sexos, porém pode-se observar uma tendência com aumento para as células B CD38+ em indivíduos do sexo masculino.

**Figura 8.** Níveis de células B totais de memória, transição e imaturas em indivíduos do sexo masculino e feminino

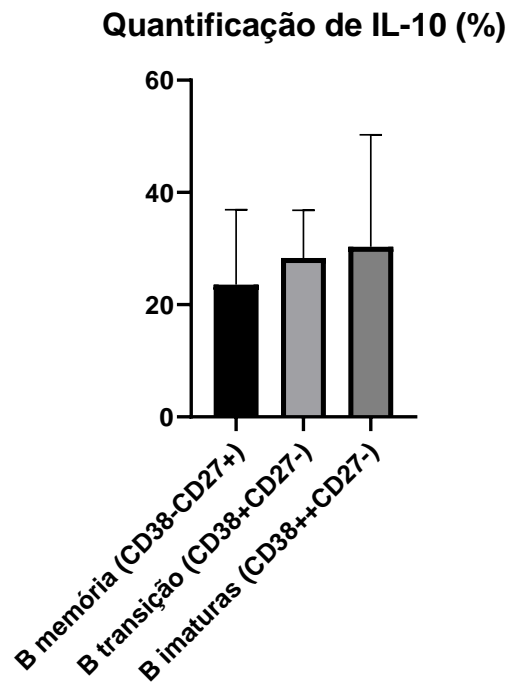


**Fonte:** Própria. Cada gráfico demonstra as subpopulações da esquerda para a direita respectivamente: B de memória, B de transição e B imaturas em função da sua quantificação celular total nos indivíduos do sexo masculino e feminino.

### 5.3. Expressão de IL-10 nas subpopulações de células B

Foram avaliadas a expressão de IL-10 nas três subpopulações de linfócitos B (Figura 9). Comparativamente, embora alterações estatísticas significativas não tenham sido observadas, células CD38+ apresentam uma tendência de aumento em comparação com as células CD27+.

**Figura 9.** Quantificação total de IL-10 nas subpopulações de B de memória, de transição e regulatórias.

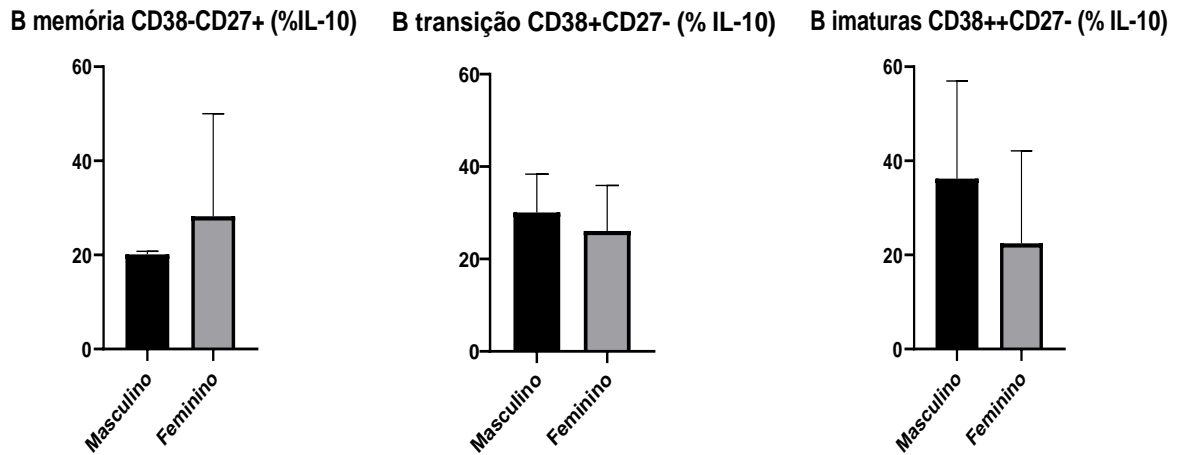


**Fonte:** Própria. É apresentada a quantificação total da expressão de IL-10 por cada subpopulação estudada.

Em relação a comparação entre o sexo correlacionando a expressão de IL-10 por essas subpopulações estudadas (figura 10), foi visto que entre indivíduos do sexo masculino e feminino a porcentagem dessa citocina em células CD27+ provavelmente é maior entre indivíduos do sexo feminino. É observada uma maior tendência para expressão IL-10 de maneira geral em ambos os sexos em células CD38+, em relação às subpopulações de memória.



**Figura 10.** Quantificação de IL-10 em subpopulações de linfócitos B de memória CD27+ e ativados CD38+ em indivíduos do sexo masculino e feminino

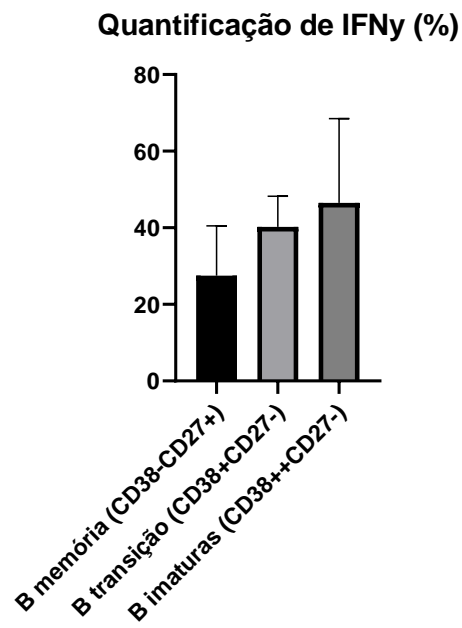


**Fonte:** Própria. Cada gráfico demonstra as subpopulações da esquerda para a direita respectivamente: B de memória, B de transição e B ativadas reguladoras; em função da sua expressão de IL-10 nos indivíduos do sexo masculino e feminino.

#### 5.4. Expressão de IFN $\gamma$ nas subpopulações de células B

Em quantificação de IFN $\gamma$  nas subpopulações estudadas (figura 11), também não houve alterações estatísticas significativas porém ainda foi observado a tendência para maior concentração em células CD38+ quando comparado às células CD27+.

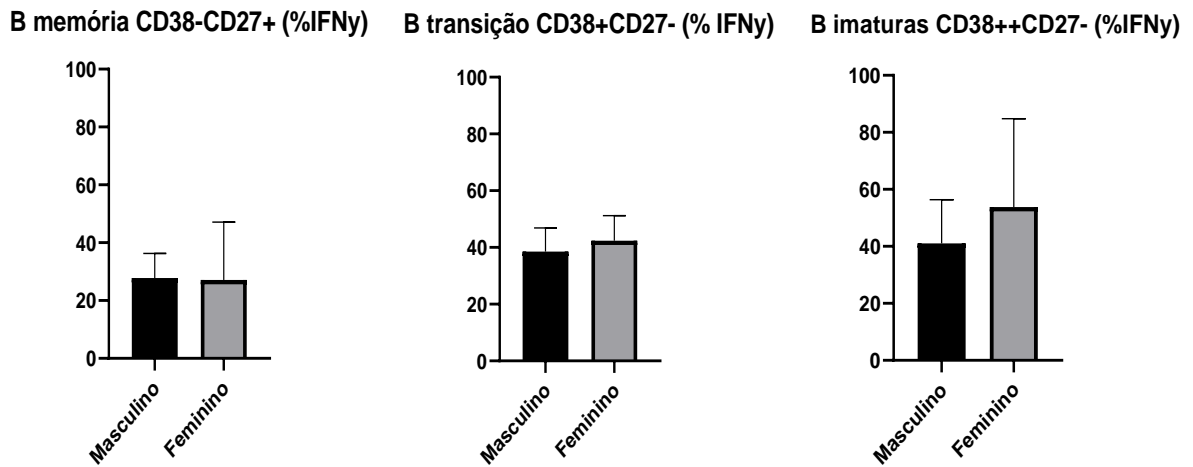
**Figura 11.** Expressão de IFN $\gamma$  nas subpopulações de B de memória, transição e reguladoras



**Fonte:** Própria. É apresentada a quantificação total da expressão de IFN $\gamma$  por cada subpopulação estudada.

Foi realizada também a comparação entre indivíduos do sexo masculino e feminino em relação a expressão de IFN $\gamma$  (figura 12). Pode ser observado as células CD38+ podem expressar essa citocina em maior quantidade em ambos os sexos quando comparado às subpopulações CD27+

**Figura 12.** Quantificação de IFN $\gamma$  em células B de memória CD27+ e imaturas CD38+ em indivíduos do sexo masculino e feminino.



**Fonte:** Própria. Cada gráfico demonstra as subpopulações da esquerda para a direita respectivamente: B de memória, B de transição e B imaturas; em função da sua expressão de IFN $\gamma$  nos indivíduos do sexo masculino e feminino.

## **DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

Em panorama geral de quantificação das subpopulações celulares analisadas, uma maior população total de células CD27+ é esperada, o que corrobora a ideia de maturação de células B imaturas em de memória com a produção de anticorpos IgG após exposição à diferentes antígenos ao longo da vida, como em processos de imunização controlada como as vacinas (AGEMATSU et al, 2000). Sabendo que as células B de memória CD27+ estão relacionadas com as respostas mediadas por linfócitos T helper e subsequente produção de anticorpos e citocinas pró-inflamatórias (AGEMATSU et al, 2000), os resultados obtidos podem indicar que indivíduos do sexo feminino saudáveis possuem um perfil imunológico mais ativo comparado aos indivíduos do sexo masculino, o que deve ser relacionado à variações fisiológicas hormonais (BEAGLEY e GOCKEL, 2003). Já é descrito na literatura que indivíduos do sexo feminino possuem uma maior resposta para células B e T e possuem maior quantidade de células T CD4 circulantes do que homens. Além disso a incidência da maior parte das doenças autoimunes estão presentes em mulheres, e a severidade dessas doenças tendem a diminuir durante a gravidez (BEAGLEY e GOCKEL, 2003) indicando um mecanismo direto de correlação do sistema imune-endócrino. Estudos anteriores com modelos animais demonstraram que em resposta para imunização em camundogos do sexo feminino, foi apresentada uma resposta mais ativa de T CD4 com conseqüente maior produção de anticorpos e células de memória (BEAGLEY e GOCKEL, 2003). Em modelos animais de lúpus eritematoso sistêmico, foi descrito que o estradiol além de impedir a tolerância de indução de células B autorreativas, também é responsável por mediar a expansão dessas células B de zonas marginais, assim aumentando a produção de anticorpos autorreativos (BEAGLEY e GOCKEL, 2003).

Considerando os resultados obtidos em relação a expressão de IL-10, foi observada maior quantificação total dessa citocina em células CD38+ em relação à CD27+. Isso ocorre pois as células CD27 negativas também conhecidas como B naive ou B imaturas são produtoras de IL-10. A IL-10 é uma citocina capaz de suprimir um quadro inflamatório e é descrita por serem produzidas por células B imaturas e de transição desempenhando papel regulador. Já foi realizado estudo com quadro de depleção de células B de memória CD27+ onde ocorreu a supressão do perfil inflamatório, evidenciando o papel dessas células no estabelecimento da inflamação (DUDDY et al, 2007). Além disso, mudanças na quantificação de outras

subpopulações de B também podem alterar o repertório de citocinas imunomoduladoras, como foi descrito por Duddy (2007) que mostrou um grande aumento de produção de IL-10 em modelos murinos para Lúpus, sugerindo uma correlação entre o aumento de células B de zonas marginais durante a patologia. O mesmo grupo demonstrou ainda que pacientes com esclerose múltipla que foram tratados com Rituximab e Mitoxantrone (drogas depletoras de células B) apresentaram um perfil inflamatório suprimido com maiores níveis de citocinas anti-inflamatórias circulantes, o que ocorreu devido a diminuição de células de memória CD27+ concluindo que essas são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias.

Como o presente estudo foi realizado apenas com pacientes saudáveis, pode ser observado que todas as populações expressaram IL-10 em algum grau, porém sua maior tendência em células CD38+, o que pode corroborar com os estudos já existentes na literatura. Quando realizada a comparação entre o sexo correlacionando a expressão de IL-10 pelas subpopulações estudadas, foi visto que entre indivíduos do sexo masculino e feminino a porcentagem dessa citocina em células CD27+ provavelmente é maior entre indivíduos do sexo feminino. Como o desvio padrão das amostragens é muito alto devido à variação do perfil imunológico de cada paciente, seria necessário realizar novos estudos com uma amostragem maior para confirmar ou excluir as sugestões aqui descritas. Sabendo disso e considerando estudos mais recentes, também já foi demonstrado que tanto subpopulações de células B imaturas, quanto células maduras e plasmoblastos possuem capacidade de se diferenciarem em células produtoras de IL-10 em camundongos e humanos, caracterizando um mecanismo de plasticidade celular (ROSSER, MAURI; 2015). Isso pode sustentar o conceito de que o pré-requisito inicial para a determinação em células Breg não é a expressão de um fator de linhagem específico, mas sim o microambiente em que a célula B se encontra (ROSSER, MAURI; 2015). Dessa forma, também é necessária a identificação do estímulo necessário para a indução da transformação de uma célula B para adquirir a capacidade reguladora.

No caso da população de células B regulatórias, ou Bregs é necessário ainda que exista novos estudos acerca da caracterização fenotípica dessas subpopulações, bem como seus mecanismos de indução e estabilidade in vivo. Além da IL-10, quando estimuladas, as células B podem produzir uma gama de citocinas pró-inflamatórias, como IL-4, IL-17, IFN $\gamma$ , fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e IL-35

(ROSSER, MAURI; 2015). Essas evidências demonstram a importância da avaliação do papel em conjunto dessas substâncias no microambiente celular em quadros saudáveis e patológicos. O IFN $\gamma$ , citocina alvo de estudo no atual projeto, é um tipo II de interferon que possui vários papéis importantes para a resposta imune inata contra infecções e para a regulação de respostas imunes adaptativas. Acredita-se que este tipo de IFN majoritariamente produzido por células natural killers (NK) e células T CD4+ pode fortalecer a imunidade inata através da indução de fatores antimicrobianos ou cascatas degradativas em outras células imunes. Porém, mais recentemente também já foi descrita sua produção a partir de células B efetoras, na qual essas células B $\gamma$ IFN $\gamma$  são capazes de induzir a ativação de macrófagos e desenvolver proteção tumoral, além de exacerbar a resposta de linfócitos T auxiliares. (MATSUSHITA, 2019).

Em quantificação de IFN $\gamma$  nas subpopulações estudadas foi observado sua maior tendência de expressão a partir de células CD38+ quando comparado às células CD27+. Mais recentemente, foi descrito na literatura que o IFN $\gamma$  no microambiente celular é capaz de induzir a formação de células CD38+ produtoras de IL-10 e imunoglobulinas (VAN DE VEEN et al, 2016), sugerindo um mecanismo de compensação em respostas inflamatórias mediadas por linfócitos T, que produzem citocinas pró-inflamatórias. Portanto, essa maior expressão de IFN $\gamma$  em células CD38+ corrobora que esta citocina desempenha um mecanismo de autoindução para a formação de novas células reguladoras CD38+, capazes de produzir IL-10. Quando realizada a comparação entre sexo, pode ser observado que apenas as células CD38+ expressaram IFN $\gamma$  em maior quantidade em ambos os sexos com um leve aumento em indivíduos do sexo feminino quando comparada as células de memória CD27+. Sabendo que a expressão de IFN $\gamma$  por essas células promove um mecanismo de compensação para a produção de novas células CD38+ reguladoras produtoras de IL-10 (VAN DER VEEN, 2016), é sugestivo que em indivíduos do sexo feminino possam ter a expressão mais acentuada dessa citocina como regulação da autoimunidade adaptativa. Em análise conduzida por Beagley e Gockel (2003) foi realizado um estudo em modelo animal demonstrando que a progesterona e estradiol aumentaram a expressão de células T CD8 em culturas de PBMC (LU et al, 2002). Assim, foi sugerido que as ações de hormônios esteroides nesse grupo celular podem regular a secreção de anticorpos mediados por células B em tecidos linfoides sistêmicos e resposta do tipo Th2, que envolve a expressão direta de IL-10 por essas

células. (BEAGLEY e GOCKEL, 2003). Além disso, Bruscoli e colaboradores (2018) foi o primeiro grupo que estudou o mecanismo de regulação da expressão de IFN $\gamma$  a partir de linfócitos B, enfatizando a importância da proteína zíper de leucina induzida por glicocorticoide (GILZ) que desempenha um importante papel capaz de regular a expressão de IFN $\gamma$  em células B. Células deficientes de GILZ produzem uma maior quantidade dessa citocina e demonstra que a GILZ é capaz de regular a atividade de células T CD4 $^{+}$  via produção de IFN $\gamma$  pelas células B (BRUSCOLI, et al 2018), evidenciando as interações cada vez mais intrínsecas de B/T para a regulação de respostas imunes adaptativas.

A atividade reguladora dessas células B expressoras de IL-10 mediada por resposta T vem sendo cada vez mais estudada. Em estudo realizado por M. e colaboradores (2019) com caracterização ex-vivo de células B regulatórias CD38 $^{high}$ , foi observado que estas promovem a transformação e expansão de células Tregs devido à presença de IL-10 e também foi visto que elas inibem a expansão de células T citotóxicas, Natural Killers além de outras citocinas pró-inflamatórias. Além disso, pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica que foram submetidos ao tratamento com anticorpos anti-CD38 tiveram menor quantidade de células Bregs e Tregs com aumento proporcional de células pró-inflamatórias (MANNA et al 2019). Isso sugere que essas células produtoras de IL-10 podem ser alvo de pesquisas para sua utilização de forma terapêutica para o alívio de doenças autoimunes e de caráter inflamatório. Já foi demonstrado que em camundongos com deleção para uma subpopulação específica de células B produtoras de IL-10 também apresentaram uma deficiência relacionada com as células Tregs, o que foi associado como consequência de células T pró-inflamatórias após indução da autoimunidade (CARTER et al, 2011). Em estudo conduzido por Blair e colaboradores (2010), foi analisada propriedades funcionais e reguladoras de populações isoladas de células B obtidas a partir sangue periférico em adultos saudáveis, onde puderam concluir que algumas dessas subpopulações podem suprimir a diferenciação de células T CD4 auxiliares bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias (BLAIR et al, 2010). Portanto, a produção de IL-10 através de células B em indivíduos saudáveis possui caráter inibitório do estado de inflamação persistente.

A principal resposta do sistema imune efetiva é o estabelecimento de um quadro inflamatório, onde as células T e B são capazes de expressar citocinas que podem provocar mudanças no microambiente celular para defesa do hospedeiro

contra um antígeno (MEDZHITOV, 2008). De acordo com Nathan e Ding (2010), “O problema da inflamação não é a quantidade de vezes que é iniciada, mas sim quantas vezes ela falha em cessar”. Após a infecção, a resposta inflamatória é essencial para a defesa contra patógenos e ativação de proteínas que controlam a cicatrização. Caso não seja resolvida, a resposta inflamatória é capaz de causar danos ao tecido do hospedeiro, que podem levar a uma enorme variedade de patologias (MEDZHITOV, 2008). A inflamação não resolvida propriamente dita é a principal característica patogênica de diversas doenças autoimunes, como aterosclerose, obesidade, cancer, doença obstrutiva pulmonar crônica, asma, artrite reumatoide, etc (MEDZHITOV, 2008). Essa inflamação não é a causa principal para essas doenças, mas possuem uma grande importância para o estabelecimento da patogenicidade (NATHAN, DING; 2010). Em indivíduos saudáveis a inflamação é auto-limitante, ou seja, o próprio organismo é capaz de regular mecanismos para que esse quadro seja cessado. A maioria das células pró-inflamatórias são apoptóticas, sendo capazes de regular sua atividade até a sua apoptose, que em seguida são fagocitadas por outras células viáveis, como os macrófagos, que também expressam citocinas anti-inflamatórias como TGF-beta e IL-10. Assim, a resolução da inflamação é majoritariamente controlada através da liberação de mediadores e citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10) produzida pelas células reguladoras (KENNEDY et al, 2009; NATHAN, DING; 2010;).

Considerando as perspectivas mais atuais para a utilização de subpopulação de células B como medidas terapêuticas para doenças autoimunes, a depleção de Acs anti-CD20 vem demonstrando cada vez mais sua eficácia (MATSUSHITA, 2019). Esses efeitos benéficos podem ter como principal causa o desbalanço entre as subpopulações de células B reguladoras e B efetoras no início e estabelecimento das doenças. (NATHAN, DING; 2010). Sabendo que as subpopulações reguladoras possuem um papel protetor com a expressão de citocinas anti-inflamatórias é de se esperar que as células B efetoras possuam o papel contrário com a expressão de citocinas promotoras da inflamação, como IL-6 e IFN $\gamma$ . Porém, essas subpopulações possuem um papel essencial no que se diz respeito à proteção contra a resposta imune para patógenos e células tumorais (MATSUSHITA, 2019). Portanto, é necessário que exista um correto balanço entre essas subpopulações de células B para a correta manutenção do sistema imune. Cada vez mais novas subpopulações de células B reguladoras vêm sendo descritas com expressão de diferentes citocinas



que até então são pouco exploradas na literatura. Matsushita (2019) elencou diferentes citocinas já expressas por essas subpopulações com considerável potencial regulador, como a IL-35, que antes acreditava ter sua produção restrita pelas Tregs, mas já foi descrita a produção em células B e capacidade reguladora em camundongos (MATSUSHITA, 2019). Além disso também já foi descrita proteção e tolerância ao transplante em camundongos induzidas por células B positivas para TGF- $\beta$  (LEE, et al 2014; MATSUSHITA, 2019). Outro fator importante a ser analisado, mesmo ainda cedo para sugerir, é a epigenética da resposta imune dessas subpopulações envolvidas, que pode alterar diretamente o balanço celular de linfócitos B reguladores e efetores em indivíduos saudáveis baseados em seus hábitos comportamentais ao longo da vida. Portanto, ainda é necessária análise mais aprofundada considerando o estilo de vida de cada voluntário e como isso é refletido na quantificação total celular e expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cada vez mais tem sido de interesse os estudos relacionados às células B, já que estas são capazes de mediar a regulação da imunidade adaptativa mediada pelos linfócitos T. As células CD27+ efectoras ou de memória são descritas em maiores quantidades quando comparadas à outras populações em indivíduos saudáveis, o que é corroborado por serem células diretamente relacionadas com a imunidade secundária após exposição à antígenos ao longo da vida. As células B reguladoras são subpopulações ainda imaturas (CD38+) capazes de secretar IL-10, uma citocina supressora da resposta imune. Em indivíduos saudáveis foi verificada a quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IFN $\gamma$ ) e anti-inflamatórias (IL-10) nessas subpopulações celulares estudadas bem como a comparação do perfil imunológico por sexo do indivíduo. Foi observado que em indivíduos do sexo feminino possuem no geral menor população de células CD38+ e secreção em maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias em relação aos indivíduos do sexo masculino, o que pode ser correlacionado com as mudanças hormonais mais expressivas no corpo feminino. Sabe-se também que o interferon gama (IFN $\gamma$ ) no microambiente induz a expansão clonal de células imaturas, então sua maior quantificação não indica necessariamente uma inflamação, mas pode ser visto como um mecanismo regulador auxiliar para a produção de novas células reguladoras produtoras de IL-10. Esses resultados ainda são inconclusivos devido à alta variação do desvio padrão, portanto, é necessário que seja realizado novos estudos com um maior número de indivíduos para que sejam realizadas futuras análises. É esperado que sejam descobertas novas populações de linfócitos B reguladores capazes de expressar diferentes citocinas que possam contribuir com a supressão da resposta imune, para assim serem futuros alvos terapêuticos em doenças autoimunes e principalmente qual é o papel das citocinas descritas até então como “pró-inflamatórias” no desenvolvimento dessa classe celular.

## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

AALBERSE, Rob C.; AKKERDAAS, J.; VAN REE, R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. **Allergy**, v. 56, n. 6, p. 478-490, 2001.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, 7. a Edição. p23-26. 2012.

ADLOWITZ, Diana G. *et al.* Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response. **PLoS One**, Rochester, 5 jun. 2015.

AGEMATSU, Kazunaga *et al.* CD27: a memory B-cell marker. **Immunology today**, v. 21, n. 5, p. 204-206, 2000.

BEAGLEY, Kenneth W.; GOCKEL, Christine M. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 13-22, 2003.

BLAIR, Paul A. *et al.* CD19<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. **immunity**, v. 32, n. 1, p. 129-140, 2010.

BONILLA, Francisco A.; OETTGEN, Hans C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S33-S40, 2010.

BOUAZIZ, Jean-David; YANABA, Koichi; TEDDER, Thomas F. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. **Immunological reviews**, v. 224, n. 1, p. 201-214, 2008.

BRITISH SOCIETY FOR IMMUNOLOGY. **Generation of B-Cell / antibody diversity**. Disponível em: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/immune-development/generation-b-cell-antibody-diversity>. Acesso em: 2 out 2020

BRUSCOLI, Stefano *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits interferon-gamma production in B cells and suppresses colitis in mice. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1720, 2018.

CARTER, Natalie A. *et al.* Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 10, p. 5569-5579, 2011.

CHUNG, James B.; SILVERMAN, Michael; MONROE, John G. Transitional B cells: step by step towards immune competence. **Trends in immunology**, v. 24, n. 6, p. 342-348, 2003.

COFFEY, Francis; ALABYEV, Boris; MANSER, Tim. Initial clonal expansion of germinal center B cells takes place at the perimeter of follicles. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 599-609, 2009.

DELVES, Peter J.; ROITT, Ivan M. The immune system. **New England journal of medicine**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.

DOMÍNGUEZ-PANTOJA, M. et al. CD38 protein deficiency induces autoimmune characteristics and its activation enhances IL-10 production by regulatory B cells. **Scandinavian journal of immunology**, v. 87, n. 6, p. e12664, 2018.

DUDDY, Martin et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 10, p. 6092-6099, 2007.

DUTY, J. Andrew et al. Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 1, p. 139-151, 2009.

ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA. **Antibody.** Disponível em: <https://www.britannica.com/science/antibody>. Acesso em: 2 out 2020

FELDMANN, Marc et al. Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  therapy of rheumatoid arthritis. In: **Advances in immunology**. Academic Press, 1997. p. 283-350.

JERNE, Niels Kaj. The immune system. **Scientific American**, v. 229, n. 1, p. 52-63, 1973.

KEILHOLZ, Ulrich et al. Results of interleukin-2-based treatment in advanced melanoma: a case record-based analysis of 631 patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 9, p. 2921-2929, 1998.

KENNEDY, Adam D.; DELEO, Frank R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic research**, v. 43, n. 1-3, p. 25-61, 2009.

LEBIEN, Tucker W.; TEDDER, Thomas F. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1570-1580, 2008.

LEE, Kang Mi et al. TGF- $\beta$ -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. **European journal of immunology**, v. 44, n. 6, p. 1728-1736, 2014.

LÜ, F. X. et al. The strength of B cell immunity in female rhesus macaques is controlled by CD8<sup>+</sup> T cells under the influence of ovarian steroid hormones. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 128, n. 1, p. 10-20, 2002.

LUND, Frances E. et al. Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. In: **B Cell Tropic Factors and B Cell Antagonism in Autoimmune Disease**. Karger Publishers, 2005. p. 25-54.

LUND, Frances E. Cytokine-producing B lymphocytes—key regulators of immunity. **Current opinion in immunology**, v. 20, n. 3, p. 332-338, 2008.

MANNA, Alak et al. CD38hi B-regulatory (B-reg) cells maintain pathological immune tolerance in chronic lymphocytic leukemia (CLL)/B cell diseases: Potential therapeutic considerations. 2019.

MARTIN, Victoria G. et al. Transitional B cells in early human B cell development—time to revisit the paradigm?. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 546, 2016.

MATSUSHITA, Takashi. Regulatory and effector B cells: Friends or foes?. **Journal of Dermatological Science**, v. 93, n. 1, p. 2-7, 2019.

MAURI, Claudia; BOSMA, Anneleen. Immune regulatory function of B cells. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 221-241, 2012.

MEDZHITOV, Ruslan. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MESQUITA JÚNIOR, Danilo et al. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

NATHAN, Carl; DING, Aihao. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-882, 2010.

NOVA-LAMPERTI, Estefania et al. IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4+ T-cell responses. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016.

OLEINIKA, Kristine; MAURI, Claudia; SALAMA, Alan D. Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 15, n. 1, p. 11-26, 2019.

ROSSER, Elizabeth C.; MAURI, Claudia. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. **Immunity**, v. 42, n. 4, p. 607-612, 2015.

SIM, Ji Hyun *et al.* Autoregulatory function of interleukin-10-producing pre-naïve B cells is defective in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research&Therapy**, Seoul, 19 jul. 2015.

SHINNAKASU, Ryo; KUROSAKI, Tomohiro. Regulation of memory B and plasma cell differentiation. **Current opinion in immunology**, v. 45, p. 126-131, 2017.

STEACH, Holly R. et al. Cross-reactivity with self-antigen tunes the functional potential of naive B cells specific for foreign antigens. **The Journal of Immunology**, v. 204, n. 3, p. 498-509, 2020.

STETTLER, Karin et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 823-826, 2016.

VAN DE VEEN, Willem et al. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 3, p. 654-665, 2016

ZHANG, Qian; CAO, Xuetao. Epigenetic regulation of the innate immune response to infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 7, p. 417-432, 2019.

ZOUALI, Moncef. Receptor editing and receptor revision in rheumatic autoimmune diseases. **Trends in immunology**, v. 29, n. 3, p. 103-109, 2008.



## GLOSSÁRIO

**Apoptose.** Autodestruição programada de uma célula que é realizada pela própria célula para controle da população de células saudáveis.

**Anticorpo.** Moléculas que atuam na defesa do organismo e são produzidos por plasmócitos originários da diferenciação dos linfócitos B.

**Antígeno.** Partícula ou molécula capaz de deflagrar a produção de anticorpo específico

**Autoimunidade.** Falha em uma divisão funcional do sistema imunológico que resulta em respostas imunes contra as células e tecidos do próprio organismo.

**Ciclo mitótico.** É o ciclo de duplicação celular que compreende as fases de intérfase e mitose.

**Citocina.** Designação genérica de certas substâncias secretadas por células do sistema imunitário que controlam a imunorreação do organismo.

**Cromatina.** Complexo de DNA e proteínas que se encontram dentro do núcleo celular nas células eucarióticas.

**Endógeno.** Qualquer substância que se origina no interior do organismo a partir de um tecido interno ou órgão.

**Epítomos.** É a menor porção de antígeno capaz de gerar a resposta imune.

**Estroma.** Tecido vascularizado que forma o tecido nutritivo e de sustentação de um órgão ou glândula.

**Fibroblastos.** Células que constituem a base do tecido conjuntivo e que podem se diferenciar outros elementos.

**Filogenia.** História evolutiva de uma espécie ou grupo taxonômico.

**Flavivírus.** Gênero de vírus de RNA de cadeia positiva da família *Flaviviridae* transmitidos por mosquitos ou carrapatos.

**Hematopoiese.** Processo de formação, desenvolvimento e maturação dos elementos figurados do sangue a partir de um precursor celular comum e indiferenciado.

**Hipermutação somática.** É um mecanismo de mutação celular que faz com que o sistema imunológico se adapte a novos elementos invasores.

**Homeostase.** Estado de equilíbrio interno que se mantém constante independente das alterações que ocorrem no meio externo.

**Hospedeiro.** Um organismo que abriga e nutre outro organismo parasita ou não.

**Imunocompetência.** Capacidade de apresentar uma resposta imunitária após exposição ao antígeno.

**Imunógenos.** Outra denominação para antígenos.

**Imunoglobulinas.** Outra denominação para anticorpos.

**Imunologia.** Ramo da biologia que estuda o sistema imunitário de todos os organismos.

**Inflamação.** Reação do organismo a uma infecção ou lesão tecidual que pode erradicar microrganismos ou agentes irritantes para que ocorra a regeneração.

**Interferon.** Proteína produzida por linfócitos e fibroblastos para interferir na replicação de fungos, vírus, bactérias, células tumorais e estimular a atividade de defesa de outras células.

**Interleucina.** Proteínas produzidas por linfócitos com variadas funções.

**Linfócitos.** São células responsáveis pela resposta imune e pela defesa do corpo.

**Microambiente celular.** Ambiente local que cerca uma célula que contém os sinais físicos e químicos capazes de influenciar o comportamento celular.

**Microrganismo.** Qualquer organismo microscópico, como bactérias, fungos e vírus.

**Patógenos.** Organismos que são capazes de causar doença em um hospedeiro.

**Recombinação gênica.** Troca aleatória de material genético durante a meiose.

**Sorotipo.** Grupo de microrganismos relacionados que se distinguem por diferirem na resposta a diferentes anticorpos.

**Tecido linfoide.** Tecido conetivo no sistema linfático que contém grande quantidade de linfócitos.

**Totipotencia.** É a capacidade de uma única célula geralmente uma célula-tronco, de se dividir e produzir todas as células diferenciadas no organismo.

**ANEXOS**

## ANEXOS

### ANEXO A – Parecer de Aprovação pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue

**Pesquisador:** Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

**Área Temática:** Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

**Versão:** 4

**CAAE:** 59833416.6.0000.5183

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

**Patrocinador Principal:** National Institutes of Health (NIH)

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.117.372

##### Apresentação do Projeto:

###### INTRODUÇÃO

Os vírus que causam a Dengue, a Zika e a Chikungunya pertencem ao grupo dos arbovírus, vírus transmitidos por artrópodes, da ordem díptera. São vírus que permanecem na natureza em ciclos complexos envolvendo um ou mais vertebrados-reservatórios, que podem ser humanos ou animais domésticos, e insetos vetores que infectam-se após o repasto sanguíneo do vertebrado virêmico, transmitindo o vírus a outros vertebrados (após período de incubação extrínseca necessária). Dentro desse grupo temos vírus classificados em diferentes grupos (Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae). Os vírus da Dengue (DENV) e da Zika (ZIKV) estão inclusos na família Flaviviridae que é composta por três gêneros: O gênero Flavivírus (no qual estão agrupados os quatro sorotipos dos Vírus Dengue (DENV 1-4), o Zika Vírus, Vírus da Febre Amarela, Vírus do Oeste do Nilo e da Encefalite Japonesa), o gênero Pestevírus na qual inclui-se os vírus da diarreia bovina e da peste suína clássica, e o gênero Hepacivírus, no qual

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.750-521  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

## ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto:** Avaliação da resposta imune humana inata e adaptativa nas arboviroses: Correlação entre mecanismos celulares e prognóstico na infecção pelos vírus Zika, Chikungunya e dengue

**Pesquisadora:** Tatjana Keesen de Souza Lima

**I. Esclarecimentos**

Estamos convidando você para participar como voluntário de uma pesquisa sobre a Zika, Chikungunya e Dengue, que são doenças causadas por um microorganismo (micróbio) transmitido para o ser humano através da picada do mosquito, que se chama *Aedes aegypti*. Nosso objetivo com essa pesquisa é avaliar porque existem pessoas que ficam mais doentes que as outras quando estão com essas doenças e comparar a diferença entre elas; por exemplo, algumas podem ter hemorragia (sangramento intenso) no caso da dengue, dores articulares mais fortes na Chikungunya e manchas avermelhadas parecidas com alergia no caso da zika. Outras pessoas apresentam a doença apenas com sintomas leves como febre, dores musculares, dor de cabeça, entre outros, que podem confundir o diagnóstico, por serem muito parecidas. Para isto, vamos realizar um estudo do seu sistema de defesa (imunológico), no qual serão analisadas as células que são capazes de defender o organismo contra o microorganismo que causa a Zika, a Chikungunya e a dengue.

Caso aceite participar do estudo você fará uma consulta médica e deverá permitir a realização da coleta do seu sangue. Além disto, você deverá autorizar o nosso acesso a sua ficha médica, para que possamos coletar informações sobre o estado atual da sua doença e os resultados dos exames realizados. Você também deverá responder um questionário a respeito da sua saúde. Quando você estiver respondendo esse questionário se alguma pergunta lhe causar constrangimento você poderá deixar de respondê-la. Esses procedimentos se justificam pelo fato da avaliação médica, as informações acerca do seu estado de saúde e também das informações que constarão no questionário, nos permitir inclui-lo no grupo de pessoas doentes ou saudáveis, visando uma correta distribuição e análise dos resultados obtidos.

Vamos a seguir, explicar a você para que utilizaremos o material biológico e os riscos e desconforto que poderão existir.

Todos os procedimentos estarão de acordo com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde. Com sua permissão serão coletados, por uma pessoa devidamente treinada, aproximadamente 15 mL do seu sangue; utilizando material estéril e descartável. Os riscos e desconfortos que você correrá nessa coleta são mínimos e poderão ser desmaio, sangramentos, manchas arroxeadas ou infecção no local da coleta. Entretanto iremos minimizar estes riscos com cuidados na realização deste procedimento, que são a limpeza no local da coleta através da utilização de álcool e pressionando a região do braço onde foi feita a coleta com algodão por alguns minutos, após a retirada da agulha. Com o sangue coletado iremos realizar um exame das células do seu

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

sangue (hemograma), para determinar se você tem anemia. Uma parte do seu sangue será armazenada a uma temperatura que permita a conservação das células em um equipamento direcionado para esse fim. A outra parte do seu sangue iremos utilizar para estudar seu sistema de defesa (sistema imunológico), como também faremos uma análise para confirmar se você tem Zika, Chikungunya ou Dengue. Além disso, será realizado o estudo farmacológico da riparina, uma substância isolada de uma planta, que quando colocada em contato com o seu sangue poderá atuar de maneira positiva, ativando o seu sistema de defesa a combater melhor a infecção. Essa abordagem permitirá a proposição futura de novas estratégias de diagnóstico e tratamento e associações terapêuticas, visando à melhoria da qualidade de vida dos portadores dessas doenças. Após a realização dos ensaios seu material biológico será descartado.

Com a sua autorização, uma parte do material biológico, o que foi acondicionado de maneira adequada para manutenção das células, será enviada para outro país (Inglaterra), onde os pesquisadores de lá farão estudos de substâncias no sangue que podem influenciar na resposta do seu sistema de defesa (imunológico). Após a realização dos ensaios seu material biológico será descartado.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, para a guarda e utilização do material biológico sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Para erradicar qualquer risco de vazamentos dados dos prontuários e questionários aplicados serão guardados em local seguro, conhecido apenas pela equipe brasileira envolvida na pesquisa. A amostra será armazenada como biorepositório, que é um tipo de armazenamento das suas amostras, somente no tempo de execução deste projeto. Também garantimos que, o seu sangue que irá para Inglaterra, será utilizado apenas para este estudo e, em seguida, descartados.

Todos os seus dados serão confidenciais e colocados de maneira anônima por devida codificação dos seus dados (ARBXX). Todas as informações do seu prontuário e questionários serão depositadas em um banco de dados (drive), cuja senha só terá acesso os pesquisadores envolvidos. Só após essa codificação é que o seu material biológico será encaminhado à Inglaterra. Garantimos que todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Também é importante assegurar que caso você tenha interesse nos resultados de exames e da pesquisa basta solicitar ao pesquisador responsável.

Os benefícios da sua participação nesta pesquisa são que você estará contribuindo para um melhor entendimento da doença, e com estudos que podem trazer a descoberta de novos tratamentos e/ou cura. Dessa maneira, contribuindo com a ciência e a comunidade à sua volta.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária. Você não será pago por participar do estudo. No entanto, caso você tenha algum gasto, como por exemplo, com transporte e alimentação, você será ressarcido. Caso sofra algum dano decorrente da pesquisa (direto ou indireto, imediato ou tardio), você terá direito à assistência integral e imediata pelo tempo que for necessário, além do direito de buscar indenização.

Você receberá uma via deste documento devidamente assinada pelo pesquisador e por você e rubricada em todas as páginas por ambos. Toda dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá entrar em contato com a pesquisadora Dr<sup>a</sup> Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, no Centro de Biotecnologia,



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária- João Pessoa - PB - Brasil - CEP: 58051-900 Fone: (83) 3216-7371.

Dúvidas a respeito de questões éticas desta pesquisa poderão ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFPB. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, que existe nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos sujeitos em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos. Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW- 2º andar (ao lado da biblioteca) Horário do Expediente: 8:00 às 12:00 hs e 13:00 às 17:00 hs. Campus I-Cidade Universitária-Bairro: Castelo Branco-CEP:58059-900-João Pessoa-PB- FAX (083) 32167522- CNPJ:24098477/007-05- Telefone: (083) 32167964- E-mail:comitedeetica@hulw.ufpb.br.

Além do CEP, também existe o CONEP - A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – que é responsável por examinar os aspectos éticos de pesquisas envolvendo seres humanos, nas seguintes áreas: Genética humana, reprodução humana, novos dispositivos para a saúde, pesquisas em populações indígenas, pesquisas conduzidas do exterior e aquelas que envolvam aspectos de biossegurança. Endereço: Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Anexo B. Sala 104B. Brasília-DF, CEP: 70.058-900. Fone: (61) 3315-3821 / 3315-2151 / 3315-3566. e-mail: cns@saude.gov.br

Você, ou alguém que você indique em caso de óbito ou condição incapacitante, terá o acesso gratuito a todas às informações e resultados associados a seu material biológico, inclusive informações genéticas que possam implicar riscos para doenças não preveníveis ou familiares. Quando tiver necessidade você também terá aconselhamento genético gratuito. É importante afirmar que os seus dados genéticos são confidenciais e que não serão repassados a terceiros. Todas as suas informações genéticas serão guardadas de forma anônima de maneira codificada em um banco de dados guardado por senha. Apenas os pesquisadores envolvidos terão acesso a essas informações.

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será desenvolvida, os riscos e benefícios envolvidos, bem como os meus direitos, e concordo em participar voluntariamente do estudo “Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue” autorizando o uso do meu sangue para a realização deste estudo.

Participante da pesquisa: (assinatura ou impressão datiloscópica):

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Voluntário:

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pesquisador