



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**  
**PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO – PROPESP**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA-  
PPGIBA**

**ASSOCIAÇÃO DO DESBALANÇO DE RANKL/OPG NA PERDA ÓSSEA EM  
PESSOAS VIVENDO COM HIV**

**ALANNA QUÉSEDE PAIVA DA SILVA**

**Manaus- AM**

**2025**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**  
**PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS – GRADUAÇÃO – PROPESP**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA –**  
**PPGIBA**

**ALANNA QUÉSEDE PAIVA DA SILVA**

**ASSOCIAÇÃO DO DESBALANÇO DE RANKL/OPG NA PERDA ÓSSEA EM**  
**PESSOAS VIVENDO COM HIV**

Dissertação apresentada para  
Defesa no Programa de Mestrado  
em Imunologia da Universidade  
Federal do Amazonas, na área de  
concentração imunologia básica e  
aplicada.

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira

**Coorientador:** Prof. Dr. Yury Oliveira Chaves

**Manaus- AM**

**2025**

#### Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

---

- S586a      Silva, Alanna Quésede Paiva da  
              Associação do desbalanço de RANKL/OPG na perda óssea em  
              pessoas vivendo com HIV / Alanna Quésede Paiva da Silva. - 2025.  
              78 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Paulo Afonso Nogueira.  
              Coorientador(a): Yury Oliveira Chaves.  
              Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas,  
              Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada,  
              Manaus, 2025.
1. HIV. 2. RANKL. 3. OPG. 4. Perda Óssea. I. Nogueira, Paulo  
              Afonso. II. Chaves, Yury Oliveira. III. Universidade Federal do  
              Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e  
              Aplicada. IV. Título
-

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz,  
e os seus planos serão bem-sucedidos”.

*Provérbios 16:3*

## **AGRADECIMENTOS**

### **DEUS**

"Porque dele, e por ele, e para ele são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém". Romanos 11.36

"Rendei graças ao **SENHOR**, porque ele é bom, e sua misericórdia dura para sempre." Salmos 107.1

Meu **PAI**, amigo e companheiro de todas as horas!

### **FAMÍLIA**

Primeiro lugar Deus, segundo família. Sem uma base sólida seria impossível ficar de pé, principalmente naquelas horas em que precisamos ouvir verdades e receber motivação que tocam à alma. Família é lar! Obrigada papai, mamãe e mano! Vocês foram meu suporte para que eu mantivesse a resiliência e chegasse ao final, mesmo diante de muralhas que pareciam intransponível aos meus olhos. Durante dois anos de luta e muito aprendizado contar com vocês foi essencial nesse processo. Minha mãe me acalmou nos momentos de maiores tensões, e desespero. Seu conforto, palavras de bênçãos e orações me proporcionaram a paz e equilíbrio emocional para continuar a caminhada. Sou imensamente grata!

### **ORIENTADOR DR. PAULO AFONSO NOGUEIRA**

Sou imensamente grata ao meu orientador. Contar com sua paciência, conhecimento, e esclarecimento de dúvidas quando solicitado, me fez ter forças para enxergar que é possível saltar muralhas, mesmo diante de limitações que parecem inatingíveis. Suas orientações foram essenciais para eu entender o projeto de forma aprofundada e com clareza! Vale salientar que o admiro muito por sua grande capacidade de conseguir administrar quatro telas de computador simultaneamente, e sem perder o foco. Fiquei impressionada pela destreza e maestria com que executa e refina suas tarefas. Sem ele não teria sido possível finalizar mais uma etapa da minha vida.

## **COORDINADOR DR. YURY OLIVEIRA CHAVES**

Sou imensamente grata por ter sido o principal responsável pelo meu ingresso na pesquisa científica, uma vez que eu nunca havia pensado e nem cogitado a possibilidade de entrar nesse “mundo.” Professor Yury como o chamo respeitosamente, esteve presente desde o início da minha graduação, me acompanhando na subida de cada degrau até chegar ao mestrado. Sua metodologia e habilidade de promover reflexão visando direcionar o caminho a seguir, me incentivaram a procurar cada vez mais sair da zona de conforto rumo ao conhecimento, aprofundamento e aperfeiçoamento gradativo da minha escrita. Fui sempre desafiada por ele em cada situação, e valeu à pena! Afirmando com clareza e gratidão que sua forma de “sempre sugerir” e “não impor” me ajudaram muito a melhorar cada vez mais em todos os aspectos da minha vida.

## **COLABORADORAS**

Sou imensamente grata a estas colegas que me acolheram de braços abertos e que nunca se negaram a estender suas mãos e compartilhar com desprendimento seus conhecimentos, quando precisei. Meu carinho às mestras: Thaíssy dos Santos Xavier, Ana Carolina Shuan Laco, Rebeca de Souza Pinheiro. Minha gratidão também às colegas de Iniciação Científica: Isabele Rodrigues Praxedes e Sophia Coêlho Ferreira por todo o apoio recebido. Saibam que levarei todas no coração!

## **PROFESSORA DRA. AYA SADAHIRO**

Gratidão a minha professora de estágio em docência! Ela é incrível e uma excelente profissional. Ao seu lado recebi os primeiros passos da docência, e sou grata porque aceitou me lapidar como sua última aluna de estágio. Sua contribuição foi extremamente valiosa e me alargou a visão em diversos campos da vida. Dedicação e comprometimento nas aulas me deram uma visão ampla de como ensinar e aprender, futuramente. Fui agraciada por sua experiência e abençoada pelo ser humano que é. Ensinar é um dom, mas nem todos conseguem desenvolvê-lo com esmero e amor. O bom exemplo ensina até sem palavra alguma. Obrigada por receber tudo o que eu precisava!

## **SECRETARIA DO PPGIBA**

Sou grata aos profissionais **Edson Augusto Brazão Castro, Magda Rabelo da Silva e Ana Paula de Araújo**. Os atendimentos disponibilizados por esta equipe sempre atingiram minhas expectativas da melhor forma possível. São pessoas atenciosas, simpáticas e empáticas!

## **GRUPO DCDIA**

Gratidão a este Grupo que me acompanhou eficazmente desde a Iniciação Científica até ao Mestrado. Realmente são excelentes no que fazem!

## **CAPES**

Gratidão ao suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa a mim concedida durante todo o período do mestrado.

## **UFAM**

Meus sinceros agradecimentos à Universidade Federal do Amazonas por tornar possível a viabilização do Programa de Pós-Graduação Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA.

Seu corpo docente altamente qualificado, proporciona qualidade e segurança no processo de qualificação dos alunos que buscam contar a excelência de cada professor para fazer a diferença no mercado de trabalho. Sou grata porque vivi cada momento dessa caminhada de pós-graduanda na área de Imunologia, e senti-me segura, preparada e desafiada a continuar na busca de conhecimento cada vez mais.

## RESUMO

O advento da terapia antirretroviral (TARV) favoreceu a saúde das pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA), de modo que elas têm alcançado maior longevidade. No entanto, o envelhecimento nessa população tem sido acompanhado por perda progressiva da integridade fisiológica, incluindo a redução da massa óssea. Este estudo observacional e transversal teve como objetivo investigar o desbalanço da produção de RANKL/OPG e citocinas de células TCD4+ auxiliares dos perfis Th1, Th2 e Th17 em PVHA. Foram recrutados 23 participantes com idade acima de 50 anos, submetidos à densitometria óssea (DMO) e coleta de sangue para obtenção do plasma. Desses, 8 apresentaram densidade óssea normal e 15 foram classificados com osteopenia (7 mulheres e 8 homens). As citocinas IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A e IL-6 foram quantificadas por citometria de fluxo (CBA). Na resposta Th1, homens sem doença óssea apresentaram concentrações elevadas de IFN- $\gamma$  e IL-2 em comparação ao grupo controle. Na resposta Th2, IL-4 esteve aumentada tanto em homens sem doença óssea quanto nos osteopênicos. Em relação à resposta Th17, a IL-6 mostrou elevações significativas nos homens sem doença óssea, homens osteopênicos e mulheres osteopênicas, todos comparados aos controles. Foi realizado a quantificação de concentrações séricas do ligante ativador de receptor do Fator Nuclear Keppa B (RANKL) no grupo homens osteopênicos e apresentaram redução, a osteoprotegerina (OPG) estava aumentado e a razão RANKL/OPG apresentaram concentrações baixas, indicando um possível consumo de RANKL preferencialmente expresso e consumido localmente em sítios de inflamação crônica, em vez de permanecer detectável na circulação. O IFN- $\gamma$  apresentou um papel central ao exibir correlações moderadas a fortes com IL-2, IL-10 e IL-17A, além de correlação direta entre IL-4 e IL-10. No grupo de homens com osteopenia, o padrão de correlação foi menos estruturada, incluindo correlação negativa entre OPG e TNF-  $\alpha$ , sugerindo uma desregulação imunoinflamatória. A razão RANKL/OPG mostraram um desequilíbrio do eixo condicionado pela infecção pelo HIV. Sendo assim, nosso estudo sugere o perfil Th1 que o balanço de resposta tipo Th1 possa atuar na interface imunoesquelética e reduzir os efeitos da reabsorção óssea. Em conclusão, nossos achados revelam que, mesmo em PVHA com estabilidade clínica e supressão virológica sustentada, a perda óssea emerge como um processo silencioso, multifatorial e progressivo, no qual a modulação imunológica e o desbalanço do eixo RANKL/OPG desempenham papel central.

**Palavras – chave:** HIV, RANKL, OPG, Perda óssea.



## ABSTRACT

The advent of antiretroviral therapy (ART) has markedly improved the health of people living with HIV/AIDS (PLWHA), allowing them to achieve greater longevity. However, aging in this population has been accompanied by a progressive decline in physiological integrity, including loss of bone mass. This cross-sectional observational study aimed to investigate the imbalance in the production of RANKL/OPG and CD4<sup>+</sup> T helper cell cytokines of the Th1, Th2, and Th17 profiles in PLWHA. A total of 23 participants over 50 years of age were enrolled and underwent bone mineral density (BMD) assessment by densitometry and blood collection for plasma analysis. Of these, 8 had normal bone density and 15 were classified with osteopenia (7 women and 8 men). The cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, and IL-6 were quantified by flow cytometry (CBA). Within the Th1 profile, men without bone disease exhibited higher concentrations of IFN- $\gamma$  and IL-2 compared with the control group. Regarding the Th2 response, IL-4 was increased both in men without bone disease and in those with osteopenia. For the Th17 profile, IL-6 levels were significantly elevated in men without bone disease, men with osteopenia, and women with osteopenia, all compared with controls. Serum quantification of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) in men with osteopenia revealed reduced concentrations, whereas osteoprotegerin (OPG) was increased, resulting in lower RANKL/OPG ratios. This pattern suggests preferential expression and consumption of RANKL at local sites of chronic inflammation rather than persistence in circulation. IFN- $\gamma$  exhibited a central role, showing moderate to strong correlations with IL-2, IL-10, and IL-17A, as well as a direct correlation with IL-4 and IL-10. In contrast, the correlation pattern in men with osteopenia was less structured, including a negative correlation between OPG and TNF- $\alpha$ , suggesting immunoinflammatory dysregulation. The reduced RANKL/OPG ratio further reflects disruption of this axis conditioned by HIV infection. Taken together, our findings suggest that Th1-type responses, particularly the balance within this profile, may act on the immuno-skeletal interface to mitigate the effects of bone resorption. In conclusion, our study demonstrates that even in PLWHA with clinical stability and sustained viral suppression, bone loss emerges as a silent, multifactorial, and progressive process in which immune modulation and imbalance of the RANKL/OPG axis play a central role.

**Keywords:** HIV, RANKL, OPG, Bone loss

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Taxa de detecção de aids (por 100.000 hab.) segundo UF e capital de residência.....	24
<b>Figura 2</b> - Estrutura do HIV.....	25
<b>Figura 3</b> - Ciclo de vida do HIV.....	26
<b>Figura 4</b> - Fases clínicas da infecção pelo HIV.....	28
<b>Figura 5</b> - Modulação mediada por células NK da função das células T CD8 <sup>+</sup> antivirais.....	32
<b>Figura 6</b> - Desregulação imunológica associada ao HIV.....	33
<b>Figura 7</b> - O vírus HIV, o envelhecimento e a terapia antirretroviral combinada (cART do inglês, combined anti-retroviral therapy) desempenham um papel na causa de diversas morbidades presentes durante a infecção pelo HIV.....	35
<b>Figura 8</b> - Interações entre os sistemas imunológico e esquelético.....	39
<b>Figura 9</b> - Dinâmica osteoclastogênica.....	41
<b>Figura 10</b> - Dosagem de citocinas séricas interleucina -2 (IL – 2), interleucina – 4 (IL -4), interleucina – 6 (IL -6), interleucina – 10 (IL – 10), concentrações de proteína do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina – 17A ( IL-17A) e interferon gama IFN- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) do plasma de PVHA e do grupo controle sem HIV.....	54
<b>Figura 11</b> - Dosagem sérica de Osteoprotegerina (OPG) e o ligante ativador do receptor do fator nuclear keppa-B (RANKL) no plasma de PVHA e grupo sem HIV.....	56
<b>Figura 12</b> - Análise de rede das variáveis medidas das citocinas interleucina -2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina- 10 (IL-10), concentrações de proteína do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina -17A (IL-17A), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), dosagem de osteoprotegerina (OPG) e dosagem do ligante ativador do receptor do fator nuclear keppa-B (RANKL). .....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características clínicas e gerais da população do estudo que realizaram DMO.....	49
<b>Tabela 2</b> - Características clínicas da população analisada separados por grupos.....	50
<b>Tabela 3</b> - Análises hematológicas entre PVHA sem problema ósseo e osteopênicas.....	52
<b>Tabela 4</b> - Análises bioquímicas entre PVHA sem problema ósseo e osteopênicas.....	53

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b> Cronograma.....	66
<b>Quadro 2-</b> Equipe de Projeto.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>%</b>	Percent (Porcentagem)
<b>μL</b>	Microliter (Microlitro)
<b>mL</b>	Milliliter (Mililitro)
<b>AIDS</b>	Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
<b>CA</b>	Capsid (Capsídio)
<b>CD4</b>	Cluster of Differentiation
<b>CXCR4</b>	C-X-C chemokine receptor type 4 (Receptor de quimiocina do tipo 4)
<b>CCR5</b>	C-C chemokine receptor type 5 (Receptor de quimiocina do tipo 5)
<b>CFU-GM</b>	Granulocyte-Macrophage Progenitor (Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos)
<b>CV</b>	Viral Load (Carga viral)
<b>CHCM</b>	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média)
<b>DHL</b>	Lactate Dehydrogenase (Desidrogenase láctica)
<b>DMO</b>	Bone Mineral Density (Densidade mineral óssea)
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
<b>DCs</b>	Dendritic Cells (Células Dendríticas)
<b>DC-SIGN</b>	<i>Dendritic cell – specific ICAM3 grabbing non-integrin</i>
<b>ENV</b>	Envelope Protein (Proteína do envelope HIV)
<b>GAG</b>	Group-Specific Antigen (Gene que codifica a proteína precursora HIV)
<b>Gama GT</b>	Gama Glutamyl Transferase
<b>gp120</b>	Glycoprotein 120 (Glicoproteína 120 do HIV)
<b>gp41</b>	Glycoprotein 41 (Glicoproteína 41 do HIV)
<b>HAS</b>	Systemic Arterial Hypertension - SAH (Hipertensão arterial sistêmica)

<b>HCM</b>	Mean Corpuscular Hemoglobin- MCH (Hemoglobina Corpuscular Média)
<b>HDL</b>	<i>High-Density Lipoprotein</i> (Lipoproteínas de Alta Densidade)
<b>HIV</b>	Human immunodeficiency vírus (Vírus da imunodeficiência Humana)
<b>HIV – 1</b>	Human immunodeficiency vírus 1 (Vírus da Imunodeficiência Humana 1)
<b>HIV – 2</b>	Human immunodeficiency vírus 2 (Vírus da Imunodeficiência Humana 2)
<b>IL</b>	Interleukin (Interleucina)
<b>IN</b>	Integrase
<b>IMC</b>	Body Mass Index -BMI (Índice de massa corporal)
<b>IL-10</b>	Interleukin 10 (Interleucina 10)
<b>IL-17</b>	Interleukin 17 (Interleucina 17)
<b>ITRN</b>	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (Inibidores de transcriptase reversa análogos de núcleos(t)ídeos)
<b>IP/r</b>	Protease Inhibitor/ritonavir (Inibidor de protease potencializado com ritonavir)
<b>INI</b>	Integrase Strand Transfer Inhibitor (Inibidor de integrase)
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	Interferon gamma (Interferon-gama)
<b>ITRNN</b>	Non- Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (Inibidor de transcriptase reversa não análogos de nucleotídeos)
<b>LDL</b>	<i>Low-Density Lipoprotein</i> (Lipoproteínas de Baixa Densidade)
<b>LIF</b>	Leukemia Inhibitory Factor (Fator inibidor de leucemia)
<b>MA</b>	Matriz
<b>mDCs</b>	Myeloid Dendritic Cells (Células dendríticas mieloides)
<b>M-CSF</b>	Macrophage colony-stimulating fator (Fator estimulador de colônias de macrófagos)
<b>MPV</b>	Mean Platelet Volume (Volume Plaquetário Médio)
<b>NC</b>	Nucleocapsid (Nucleocapsídio)
<b>NOF</b>	National Osteoporosis Foundation (Fundação Nacional de Osteoporose)
<b>Nm</b>	Nanometer (Nanômetro)

<b>NK</b>	Células <i>natural killer</i>
<b>NKRs</b>	Natural killer cell receptors (Receptores de células assassinas naturais)
<b>OPG</b>	Osteoprotegerin (Osteoprotegerina)
<b>OPAS</b>	Pan American Health Organization (Organização Pan-Americana da Saúde)
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cell (Células Mononucleares do Sangue Periférico)
<b>PDW</b>	Platelet Distribution Width (Amplitude de Distribuição Plaquetária)
<b>PVHA</b>	People Living with HIV/SIDA (Pessoas Vivendo com HIV/AIDS)
<b>PR</b>	Protease
<b>POL</b>	Pol gene (Gene estrutural do HIV)
<b>PTH</b>	Parathyroid hormone (Paratormônio)
<b>pDCs</b>	Plasmacytoids Dendritic Cells (Células dendríticas plasmocitóides)
<b>PDGF</b>	Platelet-Derived Growth Factor (Fator de crescimento derivado de plaquetas)
<b>PGE2</b>	Prostaglandin E2 (Prostaglandina E2)
<b>RANKL</b>	Receptor Activator of Nuclear Factor kB Ligand (Ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa-B)
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)
<b>RDW</b>	Red Cell Distribution With (Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos)
<b>SIV</b>	Simian Immunodeficiency Virus (Vírus da imunodeficiência símia)
<b>SINAN</b>	Notifiable Diseases Information System (Sistema de Informação de Agravos de Notificação)
<b>SU</b>	Surface (Superfície)
<b>TARV</b>	Antiretroviral Therapy - ART (Terapia Antirretroviral)
<b>TDF</b>	Tenofovir
<b>TGO</b>	Glutamic-oxaloacetic transaminase - GOT (Transaminase Glutâmico-Oxalacética)
<b>TGP</b>	Glutamic-pyruvic transaminase – GPT (Transaminase Glutâmico-Pirúvica)
<b>TNF α</b>	Tumor Necrosis Factor-Alpha (Fator de necrose tumoral alfa)

<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor (Fator de necrose tumoral)
<b>TM</b>	Transmembrane (Transmembrana)
<b>TR</b>	Reverse Transcriptase (Transcriptase reversa)
<b>TLR7</b>	Toll – Like receptors (Receptores do tipo Toll)
<b>T<sub>regs</sub></b>	T Regulatory cells (Células T reguladoras)
<b>Th17</b>	Th17 cells (Células Th17)
<b>Th1</b>	Th1 cells (Células Th1)
<b>Th2</b>	Th2 cells (Células Th2)
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor- $\beta$ (Fator de crescimento transformador beta)
<b>TPO</b>	Thrombospondin (Trombospondina)
<b>VCM</b>	Mean Corpuscular Volume (Volume Corpuscular Médio)



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1 Histórico HIV/AIDS.....	22
2.2 Epidemiologia HIV/AIDS.....	23
2.3 Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).....	24
2.4 Ciclo de Replicação do Vírus.....	25
2.5 História Natural da Infecção pelo HIV.....	27
2.6 Imunopatogênese do HIV.....	30
2.7 Terapia Antirretroviral (TARV).....	33
2.8 Impacto do Uso Prolongado da TARV na Perda Óssea.....	34
2.9 Imunologia e Perda óssea.....	36
2.10 RANKL/OPG na Perda Óssea em PVHA.....	40
2.11 Impacto do HIV na Homeostase Óssea e Remodelação Esquelética.....	42
3. JUSTIFICATIVA.....	43
4. OBJETIVOS.....	44
4.1 Objetivo Geral.....	44
4.2 Objetivos Específicos.....	44
5. METODOLOGIA.....	45
5.1 Aspectos Éticos.....	45
5.2 Tipo de Estudo.....	45
5.3 Critérios de inclusão e não – inclusão.....	45
5.4 Coleta das Amostras.....	46
5.5 Obtenção dados clínicos .....	46
5.6 ELISA para Marcadores de Renovação Óssea.....	46
5.7 Quantificação de Citocinas do Plasma.....	46
5.8 Análise Estatística.....	47
6. RESULTADOS.....	48
7. DISCUSSÃO.....	59
8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	64
9. CONCLUSÃO.....	65
10. CRONOGRAMA.....	66
11. EQUIPE DO PROJETO.....	67

12. REFERÊNCIAS.....	68
----------------------	----

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem afinidade pela proteína de superfície celular CD4 (Cluster of differentiation 4) presentes nos linfócitos Th que coordenam as respostas imunes a combater outras infecções. No estágio tardio da infecção, se não tratado, o enfraquecimento do sistema imunológico deixa o organismo vulnerável a infecções oportunistas, conhecido como a síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Moura; Faria, 2017; Trindade et al., 2019). A terapia antirretroviral (TARV) trouxe um êxito no controle virológico e na redução significativa da morbimortalidade resultando na qualidade de vida das pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA). Nos dias de hoje, a infecção pelo HIV deixou de ser uma doença letal e passou a ser uma doença crônica (Polejack; Seidl, 2010). (Martins; Martins, 2011; Palella et al., 1998).

Com o avanço da idade, essas pessoas apresentam maior risco de polimedicação e uma carga maior de comorbidades relacionadas ao envelhecimento, como doenças cardiovasculares, neurocognitivas e ósseas (Compston; McClung; Leslie, 2019; Ofotokun et al., 2015). Por essa razão, as comorbidades relacionadas à idade surgem mais precocemente do que o esperado do que as pessoas sem a infecção pelo HIV (Warriner; Mugavero; Overton, 2014).

O HIV está inserido como um fator de risco para a osteoporose segundo as diretrizes da Fundação Nacional de Osteoporose (NOF). As PVHA possuem um risco mais elevado da DMO baixa e de fraturas por fragilidade do que pessoas que não estão com HIV (Cosman et al., 2014).

A perda óssea possui uma incidência duas vezes maior em mulheres do que em homens. O HIV e a menopausa atuam como fatores independentes à perda óssea em mulheres vivendo com HIV/AIDS em uso de TARV o que provavelmente provoca um desbalanço ainda maior entre RANKL/OPG (Siris et al., 2014; Weitzmann, 2017). Uma importante consequência metabólica da menopausa em mulheres é a redução da densidade mineral óssea (DMO) do risco de osteoporose. Para mulheres vivendo com HIV, isso é especialmente preocupante, pois a infecção pelo HIV está associada a maior suscetibilidade a alterações ósseas, como osteopenia e osteoporose (McComsey et al., 2010) o que resulta em risco aumentado de fraturas em comparação com a população em geral. (Shiau et al., 2013).

O metabolismo ósseo envolve fisiologicamente um processo extremamente coordenado de remodelação mineral contínua entre formação óssea e reabsorção mineral (Raggatt; Partridge, 2010). Esta remodelação é realizada por três unidades multicelulares básicas (osteoclastos, osteoblastos e osteócitos) e são mediadas por células imunes e citocinas (Ofotokun et al., 2015; Titanji; Ofotokun; Weitzmann, 2020; Weitzmann et al., 2022). O processo de formação óssea e a reabsorção mineral são moduladas por uma citocina pró-osteoclastogênica: o ligante ativador do receptor do fator nuclear keppa B (RANKL) que estimula os osteoclastos, e a osteoprotegerina (OPG) uma citocina anti-osteoclastogênica que estimula os osteoblastos. Sob condições fisiológicas normais, há um balanço de OPG/RANKL, porém em condições inflamatórias, o desbalanço é RANKL/OPG promovendo a perda óssea (Ofotokun et al., 2015; Titanji et al., 2018; Titanji; Ofotokun; Weitzmann, 2020; Weitzmann, 2013).

A osteoporose no HIV está associada a uma modulação causada pela ativação imune e inflamação crônica (Chen et al., 2022; Ofotokun et al., 2015). A ativação crônica e as concentrações persistentemente elevadas de citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e as interleucinas (IL-1 e IL-6), ativam proteínas com o RANKL, que, por sua vez, levam à ativação dos osteoclastos e à reabsorção óssea (De Menezes et al., 2017).

As classes de TARV possuem modos de ação distintos e são mediados por diferentes vias bioquímicas. Consequentemente, as PVHA convivem com um certo grau de alterações metabólicas e a osteoporose pode ser uma delas. Todas as classes estão correlacionadas com a perda óssea, sendo independente do regime antirretroviral, dessa forma a TARV tem um efeito indireto na homeostase óssea (Brown et al., 2009; Bruera et al., 2003; Piso et al., 2011). Contudo, a perda óssea na infecção pelo HIV tem sido mais comumente associada ao uso do medicamento antirretroviral tenofovir (TDF) em comparação com outros antirretrovirais (Mary-Krause et al., 2012). Conforme as PVHA envelhecem, é esperado um aumento das comorbidades médicas, como a osteoporose e fraturas por fragilidade (Smit et al., 2015). No entanto, essa perda óssea é estabilizada ao longo do tempo (Amorosa; Tebas, 2006; Warriner; Mugavero; Overton, 2014).

Recentemente, uma avaliação da densidade mineral óssea (DMO) por absorciometria de raios X de dupla energia (DXA ou DEXA) foi realizada por nossa equipe em PVHA acima de 40 anos e de ambos os sexos. Como as citocinas RANKL,

OPG, e citocinas pró e anti-inflamatórias tem papéis críticos na modulação da remodelação óssea, o presente estudo visa quantificar as concentrações séricas de ambas as citocinas com as oriundas dos perfis de células T auxiliares Th1, Th2 e Th17. Ao medir os níveis dessas citocinas, podemos entender melhor os mecanismos de perda óssea em PVHA e, assim, desenvolver estratégias para prevenir ou tratar a osteoporose nesse grupo de risco.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Histórico HIV/AIDS

A AIDS foi identificada pela primeira vez no ano de 1981, quando um número de jovens homossexuais sucumbiram a infecção oportunista por *Pneumocystis carinii* e uma malignidade rara por Sarcoma de Kaposi, (Centers for Disease Control (CDC), 1981; Greene, 2007). Um retrovírus foi posteriormente identificado no ano de 1983 e denominado de vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) sendo o agente causador de uma das doenças infecciosas arrasadoras que surgiram na história recente (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984; Popovic et al., 1984).

O HIV teve sua origem a partir de múltiplas introduções zoonoses, resultantes da transmissão do vírus da imunodeficiência símia (SIV) de primatas não humanos para humanos na África Ocidental e Central. Essa transmissão provavelmente ocorreu durante atividades como caça, comércio ou criação de primatas, mas principalmente pelo abate e consumo de sua carne. A partir desse contato, variantes do SIV presentes em chimpanzés e em macacos *sooty mangabey* sofreram adaptações e mutações progressivas, dando origem às diferentes linhagens do HIV. (Hahn et al., 2000).

Desde que o HIV- 1 foi exposto, as origens para seu surgimento repentino, grau de disseminação epidêmica e sua patogenicidade única tem sido alvo de intenso estudo. Em 1986 foi descoberto um vírus morfolologicamente semelhante, porém antigenicamente distinto, que causava AIDS em pacientes na África Ocidental (Clavel et al., 1986). Surpreendentemente, esse novo vírus, nominado vírus da imunodeficiência humana tipo 2 (HIV-2), no entanto, estava relacionado distantemente ao HIV-1, mas estava diretamente relacionado a um vírus símio que estava causando imunodeficiência em macacos no cativeiro (Chakrabarti et al., 1987; Guyader et al., 1987).

Esses eventos zoonóticos independentes originaram várias linhagens de HIV: grupos M, N, O e P de HIV-1 e os grupos A-H de HIV-2. A dimensão da epidemia causada por cada grupo ela varia consideravelmente. O grupo M do HIV-1 é o responsável pela pandemia global do HIV, onde aproximadamente 33 milhões de pessoas foram infectadas. O grupo O causa algumas dezenas de milhares de infecções na África Centro-Ocidental. O grupo N foi encontrado num grupo de pessoas

nos Camarões e o grupo P foi recentemente identificado em duas pessoas originárias dos Camarões (Ayouba et al., 2001; Plantier et al., 2009; Roques et al., 2004; Simon et al., 1998; Vallari et al., 2011).

Segundo a literatura a diversidade global e regional do HIV é complexa e está em constante evolução, representando um grande desafio para o desenvolvimento de vacinas contra o vírus. A vigilância contínua da epidemiologia molecular do HIV-1 é essencial para o planejamento, teste e implementação eficaz de vacinas contra o HIV (Hemelaar et al., 2019).

## **2.2 Epidemiologia HIV/AIDS**

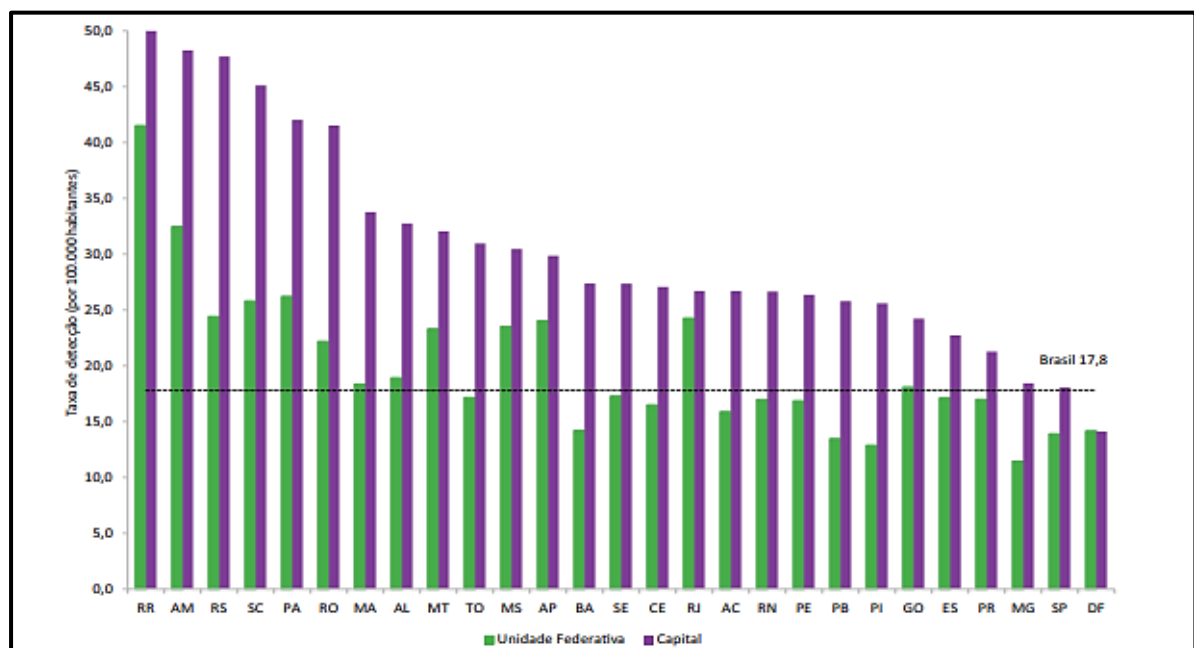
Segundo a Organização Pan – Americana da Saúde (OPAS) o HIV permanece sendo um problema de saúde pública mundial (OPAS, 2024). Mundialmente no ano de 2023, 39,9 milhões de pessoas vivem com HIV no mundo, 1,3 milhão de pessoas se tornaram recém-infectadas pelo vírus e cerca de 630.000 pessoas morreram por doenças relacionadas à AIDS no mundo (UNAIDS, 2024).

De acordo com publicação do Ministério da Saúde em relação ao Boletim Epidemiológico de HIV/AIDS foi evidenciado que desde o ano de 2007 até junho de 2024 foram notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 541.759 casos da infecção por HIV no Brasil. Os resultados foram apresentados por Regiões em ordem decrescente, evidenciando que o maior índice de infecção por HIV concentra-se na região sudeste, a saber:

- Sudeste – 222.262 (41,0%)
- Nordeste – 118.431 (21,9%)
- Sul – 101.441 (18,7%)
- Norte – 56.229 (10,4%)
- Centro-Oeste – 43.396 (8,0%)

Durante o período analisado, observou-se que a maioria dos casos de infecção por HIV ocorreu entre indivíduos de 15 a 24 anos, correspondendo a 24,8% dos casos no sexo masculino e 19,4% no sexo feminino. Desde 1980 a junho de 2024, foram identificados 1.165.599 casos de AIDS no Brasil. O país tem registrado,

anualmente, uma média de 36 mil novos casos de AIDS nos últimos 5 anos. O número anual de casos de AIDS vem diminuindo a partir de 2013, uma tendência que foi observada em todas as regiões do país; e em 2020 o índice atingiu o menor valor desde da década de 1990 com 14,5 casos por 100 mil habitantes. Em 2023, o *ranking* das UF referente as taxas de detecção de AIDS mostraram que os Estados de Roraima (Boa Vista) e Amazonas (Manaus), apresentaram maiores taxas, 50,4 e 48,3 casos por mil habitantes, respectivamente em 2023 (Figura 01) (BRASIL, 2024).



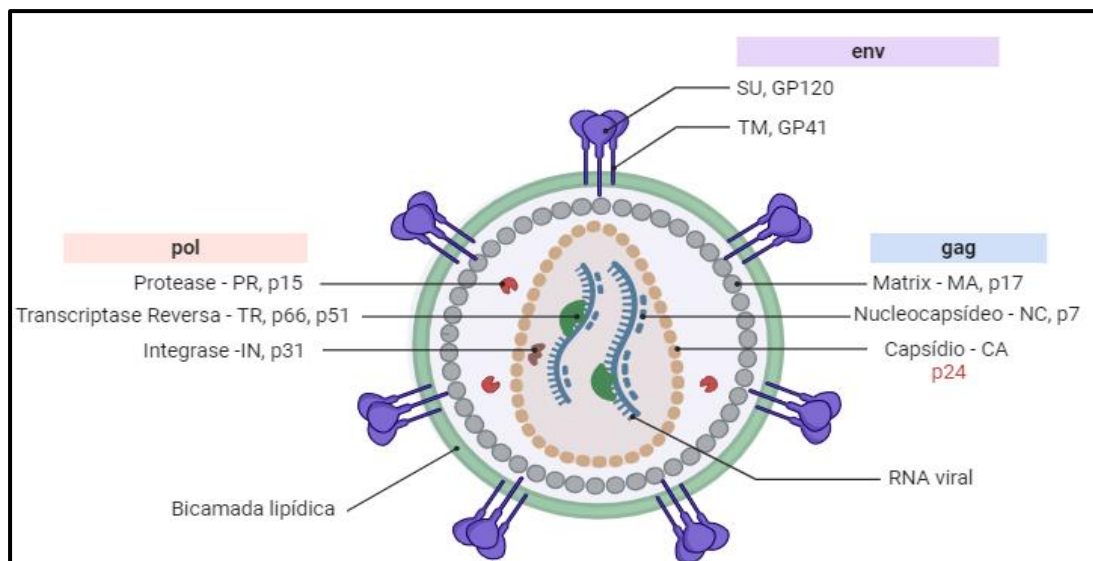
**Figura 1** - Taxa de detecção de aids (por 100.000 hab.) segundo UF e capital de residência. Brasil, 2023 (BRASIL, 2024).

### 2.3 Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV

O HIV pertence a ordem *Ortervirales*, faz parte da família *Retroviridae*, e da subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Lentivirus*. Este vírus possui um genoma composto por RNA e enzimas que permitem a retrotranscrição (Deeks, 2011; Steckbeck; Kuhlmann; Montelaro, 2013).

O HIV-1, é esférico e possui um diâmetro de cerca de 120nm e possui pontas de glicoproteínas virais que se sobressaem do seu envelope (Sakuragi, 2011). O HIV possui um núcleo cônico elétron-denso característico, contornado por um envelope lipídico que é derivado da célula hospedeira durante o processo de brotamento (Figura 2) (Steckbeck; Kuhlmann; Montelaro, 2013).





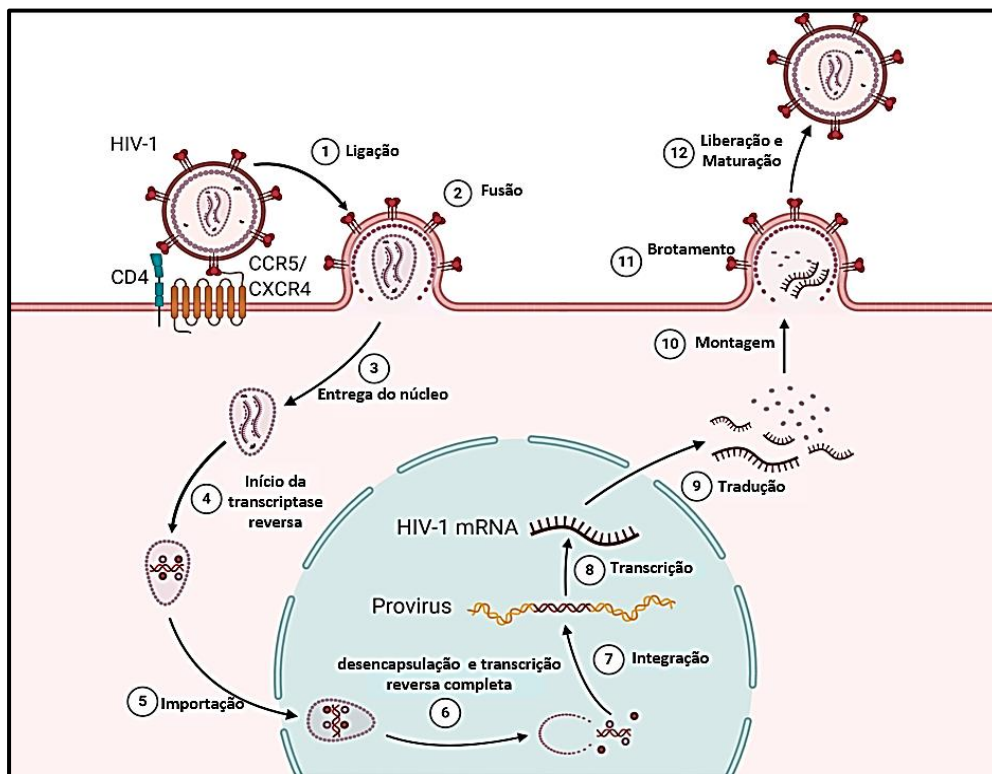
**Figura 2-** Estrutura do vírus HIV. Adaptado de (Steckbeck; Kuhlmann; Montelaro, 2013).

O HIV-1 contém os 3 genes estruturais típicos dos retrovírus: *gag*, *env* e *pol*. Ademais, possui os genes regulatórios *tat*, *ver* e *nef*, também possui genes acessórios *vif*, *vpr* e *vpu* (no HIV-1) e *vpx* (no HIV-2) (Ferreira; Riffel; Sant'Ana, 2010). Os genes *gag* e *env* codificam proteínas estruturais, (Matrix – MA, p17), (Capsídeo – CA, p24), (Nucleocapsídeo – NC, p7) e (Superfície -SU, gp120) e Transmembrana (TM, gp41) respectivamente. O gene *pol* codifica as enzimas virais, (Protease – PR, p,15), (Transcriptase reversa – TR, p66, p51) e (Integrase – IN, p,31). Os genes regulatórios são fundamentais na regulação no ciclo viral e na patogênese do vírus, o gene *env* é uma das regiões mais alterável do genoma do HIV, ele é responsável pela modificação das glicoproteínas de superfície e transmembrana, sua principal função é mediar a entrada do HIV na célula (Freed, 2001). O vírus normalmente infecta as células TCD4<sup>+</sup>, os macrófagos e células dendríticas (McElrath; Haynes, 2010).

## 2.4 Ciclo de Replicação do Vírus

Conforme podemos observar na figura 3, a infecção começa com a ligação quando o vírus utiliza a glicoproteína gp120 e os co-receptores de quimiocinas (CXCR4/CCR5) para invadir as células TCD4<sup>+</sup> (etapa 1). Em seguida ocorre a fusão onde o co-receptor acaba provocando alterações conformais subsequentes,

permitindo que a subunidade gp41 insira seu peptídeo de fusão hidrofóbico na membrana lipídica do hospedeiro (etapa 2). Após ocorre a entrega do núcleo (etapa 3). Em seguida intercorre o início da transcrição reversa do RNA genômico viral (ocorre formação do DNA a partir do RNA pela ação da enzima transcriptase reversa do HIV) (etapa 4).



**Figura 3** – Ciclo de Vida do HIV ( Adaptado de RAMDAS et al., 2020).

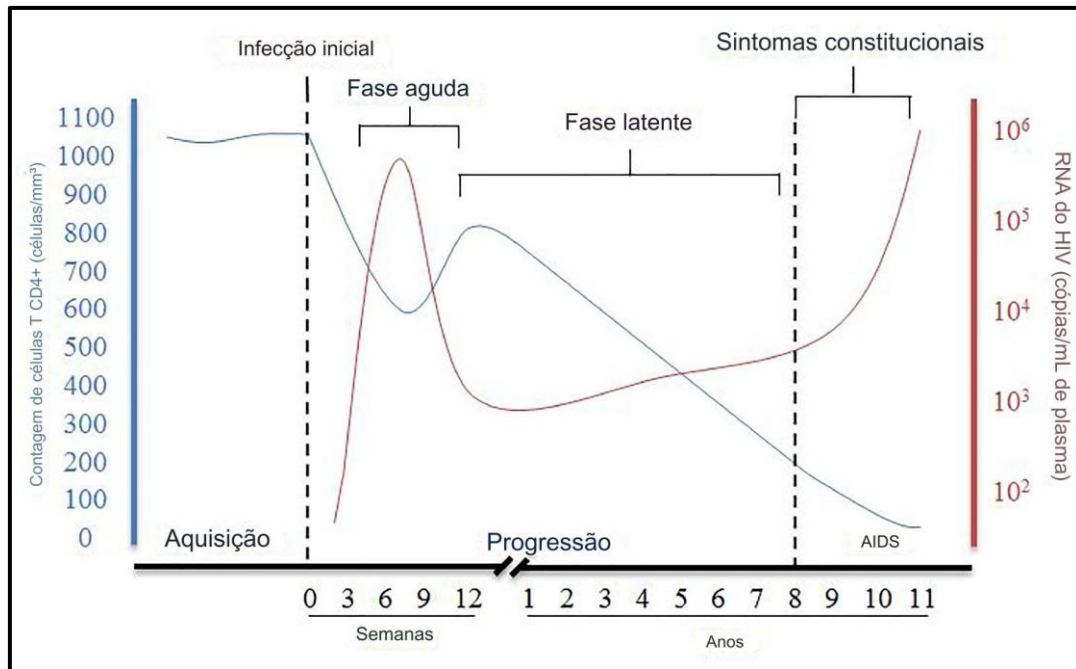
Após acontece a importação para o núcleo da célula (etapa 5). Em seguida ocorre a desencapsulação e a transcrição reversa completa (etapa 6). Após ocorre a integração ao DNA do hospedeiro pela enzima integrase (etapa 7). A ativação da célula hospedeira leva a transcrição do DNA em RNA mensageiro (etapa 8). Após ocorre a tradução em proteínas virais (etapa 9). Em seguida ocorre a montagem (etapa 10). Após ocorre o brotamento onde as proteínas virais se agrupam na superfície celular formando assim um novo vírion (etapa 11). Na última etapa ocorre a liberação e maturação, dessa forma vírion está pronto para infectar outras células (etapa 12) (Berger; Murphy; Farber, 1999; Doms; Moore, 2000; Ramdas et al., 2020; Vaishnav; Wong-Staal, 1991; Waheed; Freed, 2009).

## 2.5 História Natural da Infecção pelo HIV

A história natural da infecção pelo HIV é marcada pela deterioração da imunidade, causada pela infecção do HIV nas células do sistema imunológico, principalmente os linfócitos TCD4<sup>+</sup>. Isso resulta no aparecimento severo de infecções que normalmente seriam controladas pelo sistema imunológico. Conforme a fisiopatologia do HIV, os órgãos linfoides são os principais locais de replicação e propagação do vírus (Deeks, 2011; Pantaleo; Fauci, 1996).

A infecção é caracterizada em três fases clínicas diferentes: Infecção aguda, fase crônica, que é também conhecida como latência clínica e a doença AIDS (BRASIL, 2018).

Durante a infecção primária pelo HIV, ocorre um pico de viremia seguido pelo desencadeamento de respostas imunes inata e adaptativa, que reduzem significativamente a carga viral, mas não conseguem eliminá-la. Nesse período há uma recuperação parcial dos linfócitos CD4<sup>+</sup>, embora sem retornar aos níveis basais. Na fase assintomática subsequente, a perda contínua das células TCD4<sup>+</sup> e a redução gradativa da capacidade regenerativa das células de memória central e ingênuas resultam na imunodeficiência, mesmo com um aparente equilíbrio de citocinas no sangue periférico e no tecido linfoide. O vírus persiste em replicação contínua e a contagem de CD4<sup>+</sup> declina de forma lenta e progressiva, culminando no comprometimento imune profundo característico do estágio avançado da infecção, a AIDS (Figura 4) (Biancotto et al., 2007; Fry, 2001; Napolitano et al., 2001; Okoye et al., 2007).



**Figura 4** – Fases clínicas da infecção pelo HIV. Adaptado de (An; Winkler, 2010).

Conforme podemos observar na figura 4, a progressão da doença do HIV é representada pela contagem relativa de células TCD4<sup>+</sup> em células/mm<sup>3</sup> (azul) e RNA viral do HIV em cópias/ml de plasma (vermelho) e a sua relação durante o HIV desde a aquisição até ao desenvolvimento da AIDS (An; Winkler, 2010).

A fase aguda é caracterizada pela infecção dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> de memória nos tecidos linfoides das mucosas e pela morte de um grande número de células infectadas. Os tecidos das mucosas são grandes reservatórios de linfócitos e são importantes locais de residência de linfócitos T de memória, esta perda causa uma depleção de linfócitos, tanto que poucas células são detectadas no sangue e outros tecidos (Alcamí, 2004; Brenchley et al., 2006; Haase, 2005). Esta fase pode durar de 4 a 12 semanas sem os sintomas clínicos específicos, e frequentemente ocorre: febre, dor de cabeça, entre outros sintomas comuns outras doenças virais (figura 4) (Katzenstein et al., 2003).

Após a infecção das mucosas, ocorre a disseminação do vírus e o desenvolvimento de respostas imunes do hospedeiro, conhecido como viremia primária (Kumar et al., 2010). As células dendríticas (DCs) que estão presentes no epitélio capturam o vírus no local de entrada e migram para os linfonodos, onde elas disseminam o vírus para os linfócitos TCD4<sup>+</sup> através de contato direto de célula a

célula. Esse processo de replicação induz à viremia secundária, quando um alto número de partículas do vírus está presente no sangue. O vírus se dissemina pelo organismo devido a infecção de linfócitos TCD4+, macrófagos e DCs nos tecidos linfoides periféricos (Kumar et al., 2010). Enquanto a infecção se dissemina, a pessoa desenvolve respostas imunes humorais e células antivirais (Gandhi; Walker, 2002). Essas respostas são evidenciadas pela soroconversão e pelo desenvolvimento de linfócitos citotóxicos CD8+ (TCD8+) para o vírus, contendo parcialmente a infecção e a produção viral (Kumar et al., 2010; Staprans; Feinberg, 2004).

Após a resolução do quadro da infecção primária e soroconversão, a pessoa entra na fase crônica ou latência, esta fase pode durar até 10 anos, ou até que ocorram infecções oportunistas ou quadros clínicos graves e que perduram, caracterizando manifestação da AIDS (figura 4) (Pantaleo; Fauci, 1996). A replicação viral é mantida no baço e nos linfonodos, porém, há um balanço entre a destruição das células TCD4+ e sua produção. Contudo, ocorre uma destruição lenta e gradativa de células TCD4+, macrófagos e DCs (Bartlett; Moore, 1999; Geskus et al., 2007).

A fase final da infecção é a progressão para a AIDS (figura 4), que é caracterizada pelo colapso das defesas do hospedeiro. Esse colapso leva a infecção a uma evolução para doença grave, caracterizada pelo aparecimento de comorbidades e coinfeções, que podem resultar ao óbito (Kumar et al., 2010). Esta etapa é marcada pela intensa e progressiva depleção das células TCD4+ (Forsman; Weiss, 2008). Concordou-se que as pessoas infectadas desenvolvem a AIDS quando a carga viral está alta e a contagem de linfócitos TCD4+ é menor que  $200 \text{ mm}^3$  (Naif, 2013). A depleção é intensificada pelo aumento de apoptose de linfócitos infectados e não infectados pelo HIV (Forsman; Weiss, 2008). Ocorrem a produção e/ou ativação de citocinas pró e anti-inflamatórias que refletem uma intensa replicação viral associada a uma imunossupressão que predispõe as infecções oportunistas e/ou neoplasias (Gandhi; Walker, 2002).

Embora o sistema imunológico possua uma capacidade generativa, ocorre perdas que não conseguem ser compensadas devido a replicação viral e a destruição dos linfócitos TCD4+, o que leva à uma exaustão do sistema imunológico e a uma grave depleção desses linfócitos, a manifestação tardia da infecção é a AIDS (figura 4). Antes da introdução da TARV, a expectativa de vida após o diagnóstico da AIDS era de aproximadamente um ano (Lemp, 1990).

## 2.6 Imunopatogênese do HIV

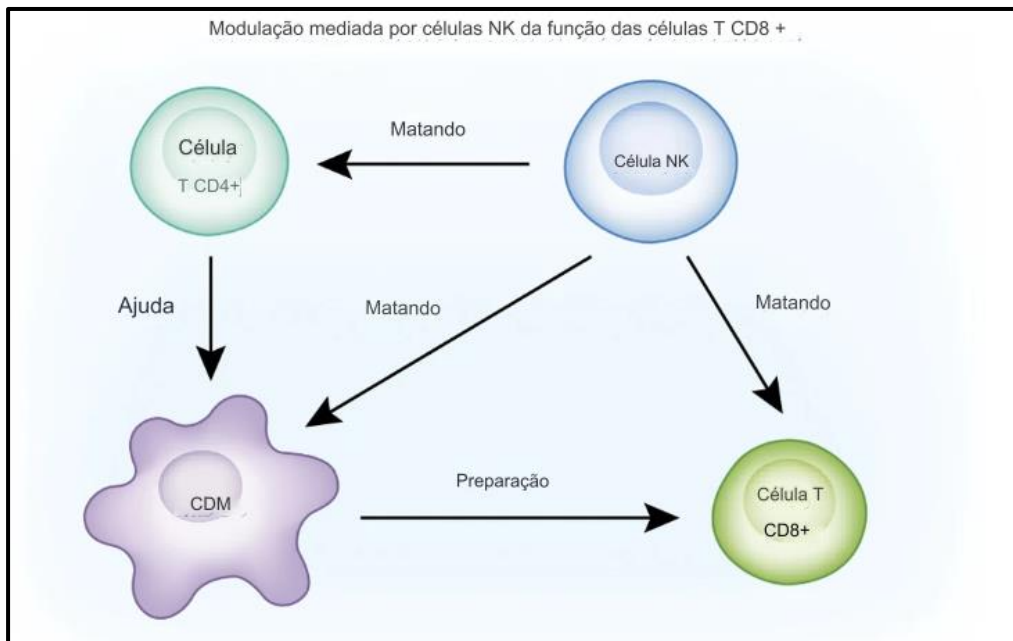
Uma característica marcante da patogênese do HIV é a incapacidade do sistema imunológico de controlar e eliminar o vírus. Os eventos iniciais após a infecção viral têm recebido uma atenção especial, pois, em infecções virais comuns, as respostas primárias costumam ser suficientes para eliminar o vírus. No caso do HIV, essas respostas não são eficazes na eliminação do patógeno. A resposta imunológica inicial ao HIV é mediada predominantemente por mecanismos inatos e pela ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, capazes de reduzir a carga viral, mas não é dependente de anticorpos como em outras infecções virais, já que a soroconversão não ocorre em poucos dias. Durante a fase aguda, observa-se um pico de viremia plasmática, mas a produção de anticorpos é retardada. Esse atraso decorre da elevada variabilidade genética e da intensa glicosilação das proteínas de envelope, que dificultam o reconhecimento antigênico pelos linfócitos B, somando-se à dependência da ativação coordenada dos linfócitos B por linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares, cuja depleção precoce em tecidos linfoides e na mucosa intestinal compromete essa interação. Como resultado, a soroconversão só se estabelece semanas após a infecção. Este fator dificulta a detecção diagnóstica em alguns casos (Mogensen et al., 2010).

Na fase aguda da infecção pelo HIV, a resposta imune é marcada pelo reconhecimento inicial do vírus por DCs, que desempenham um papel essencial na patogênese da doença. Esse reconhecimento ocorre nos estágios iniciais e persiste ao longo de toda infecção (Turville et al., 2001). Isso acontece porque essas células são os alvos primários do vírus após a exposição da mucosa, e podem também ser utilizadas como reservatório viral (McMichael et al., 2010).

O evento inicial para que o HIV infecte uma DC é a ligação ao CD4, mediada pela proteína gp120, e aos co-receptores CCR5 e CXCR4. As DCs também conseguem capturar o HIV por meio de receptores de lectina, especialmente o CD209, também chamado de DC-SIGN (*Dendritic cell – specific ICAM3 grabbing non-integrin*) (Manches; Frleta; Bhardwaj, 2014; Turville et al., 2002). A interação entre o HIV-1 e o receptor DC-SIGN provoca a internalização do vírus, mantendo intacto no endossomo. Ao transportar o vírus para os linfonodos, as DCs aumentam a probabilidade de infecção dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e a rápida disseminação subsequente do vírus nas células do hospedeiro (Martin-Gayo; Yu, 2017; Sabatté et al., 2007).

Já foi demonstrado, que na infecção pelo HIV, as células dendríticas plasmocitóides (pDCs) são capazes de induzir um estado antiviral caracterizado pela produção de grandes quantidades de IFN- $\alpha$  (interferon alfa), além de outras quimiocinas e citocinas pró – inflamatórias, a partir do reconhecimento do RNA viral via TLR7 (Manches; Frleta; Bhardwaj, 2014). Contudo, estudos demonstraram que as pCD podem induzir a diferenciação das células T reguladoras (T<sub>regs</sub>) e maior liberação de IL-10 suprimindo a ativação de células linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos efetores (Manches et al., 2008). Nos compartimentos teciduais preferenciais do vírus, como a mucosa intestinal, essa resposta pode diminuir a populações das células Th17 durante a infecção, levando a perda da integridade intestinal e à consequente translocação microbiana, o que favorece a progressão para a AIDS (Brenchley et al., 2006; Favre et al., 2009).

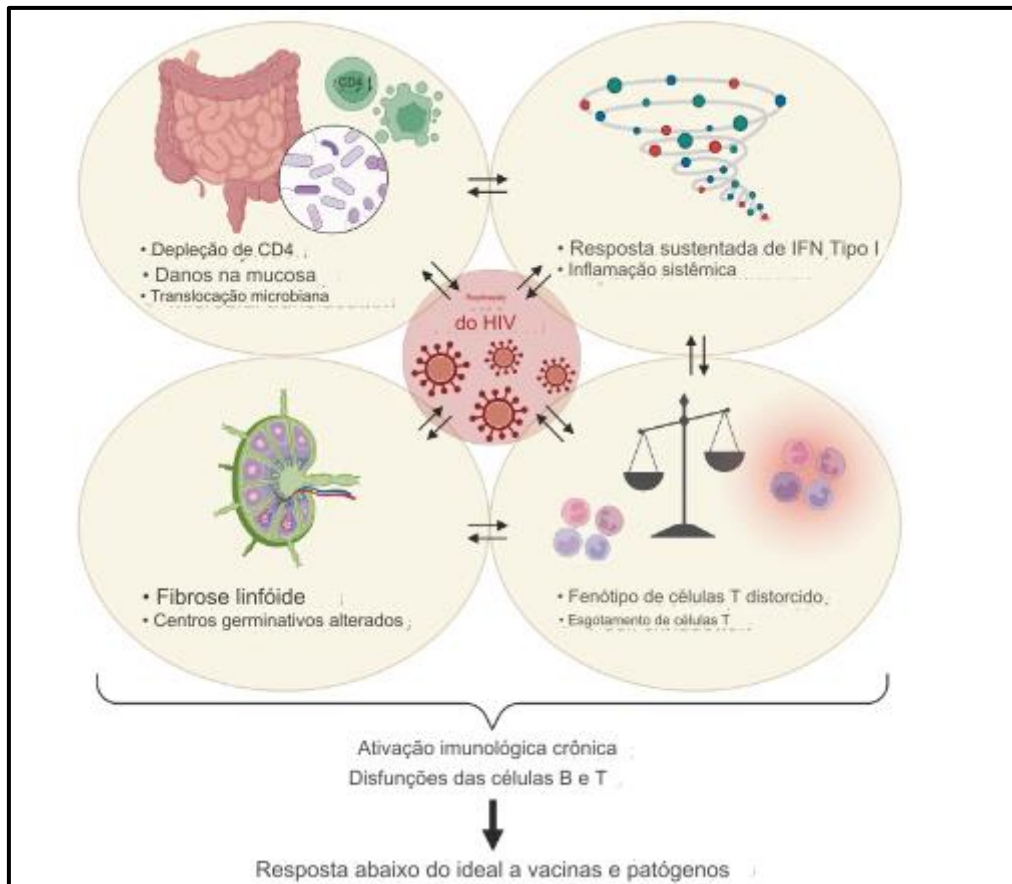
Durante a infecção aguda, as células *natural killer* (NK) também atuam que um papel central na modulação da força e função da resposta antiviral das células TCD8<sup>+</sup>. Elas são preparadas para responder de forma rápida às células infectadas pelo HIV, que possui expressão aumentada de ligantes para receptores NK ativadores codificados pela linha germinativa (NKR), como ocorre nas células infectadas pelo HIV (Tremblay-McLean et al., 2017). As células NK matam células T auxiliares CD4<sup>+</sup> específicas do vírus como é observado durante a infecção primária, podendo assim reduzir a quantidade de ajuda necessária para a ativação de células TCD8<sup>+</sup>, ou podem matar células dendríticas mieloides (mDCs), contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa deficiente. Além disso, as células NK podem matar diretamente células TCD8<sup>+</sup> específicas do vírus ativado (figura 5) (Altfeld; Gale Jr, 2015).



**Figura 5** - Modulação mediada por células NK da função das células T CD8 + antivirais. Adaptado de (Altfeld; Gale Jr, 2015).

O HIV tem um impacto significativo no tecido linfóide associado ao intestino, comprometendo a integridade epitelial intestinal. Isso resulta em uma translocação microbiana e inicia uma ativação imunológica crônica e aguda. A ativação imunológica persistente agrava o esgotamento progressivo de células TCD4<sup>+</sup>, levando a alterações nos fenótipos das células T e promovendo a exaustão dessas células. A infecção pelo HIV também danifica a rede de células reticulares fibroblásticas dentro dos tecidos linfóides, afetando sua estrutura e, conseqüentemente, as reações do centro germinativo. O HIV causa um efeito cumulativo no sistema imunológico que compromete a capacidade do hospedeiro de coordenar de forma efetiva as respostas imunológicas contra outros patógenos ou responder de forma ideal as vacinas (figura 6) (Höft; Burgers; Riou, 2024).





**Figura 6** - Desregulação imunológica associada ao HIV. Adaptado de (Höft; Burgers; Riou, 2024).

## 2.7 Terapia Antirretroviral (TARV)

Com a introdução da TARV, tornou-se possível controlar a multiplicação viral e desacelerar a progressão da doença. Isso resultou em uma redução da morbimortalidade associada e proporcionou às PVHA uma maior expectativa e qualidade de vida. Além disso, a infecção passou a ser considerada uma condição crônica passível de controle (Fiuza et al., 2013; Picelli; Díaz-Bermúdez, 2014).

A adesão a TARV é crucial para a eficácia do tratamento da infecção pelo HIV, para garantir uma supressão viral sustentada, é necessário que a ingestão dos medicamentos ultrapasse 95% das doses recomendadas (Paterson et al., 2000). Os benefícios deste tratamento, destacam-se o aumento da sobrevida, a redução das internações hospitalares, a diminuição da incidência de infecções oportunistas e da transmissão vertical do HIV, além da melhoria da qualidade de vida e da manutenção da produtividade dessas pessoas (Polejack; Seidl, 2010). Os autores Polejack e Seidl (Polejack; Seidl, 2010) ressaltam que, entre as estratégias para combater a epidemia

globalmente, sobressai o programa brasileiro de distribuição universal e gratuita de medicamentos antirretrovirais para PVHA, implementado desde 3 de novembro de 1996 pela Lei nº 9.313 (Brasil, 1996).

Todas as etapas do ciclo de replicação viral caracterizam alvos para a TARV. No presente, o esquema inicial contém 3 classes de fármacos usados na TARV para combater o HIV, possuindo dois inibidores de transcriptase reversa análogos de núcleos(t)ídeos (ITRN) e possui um terceiro de outra classe: um inibidor de integrase (INI), um inibidor de protease potencializado com ritonavir (IP/r) ou um inibidor de transcriptase reversa não análogos de nucleotídeos (ITRNN). De acordo com o ministério da saúde o esquema deve ser administrado em dose única diária. A associação de tenofovir e lamivudina pertencem a classe dos ITRN, enquanto o dulegravir, o darunavir potencializado por ritonavir e o efavirenz são, respectivamente, a escolha dentre os INI, IP/r e ITRNN. É importante salientar que o esquema preferencial para o início do tratamento é a associação de tenofovir com lamivudina e dolutegravir (Brasil, 2024).

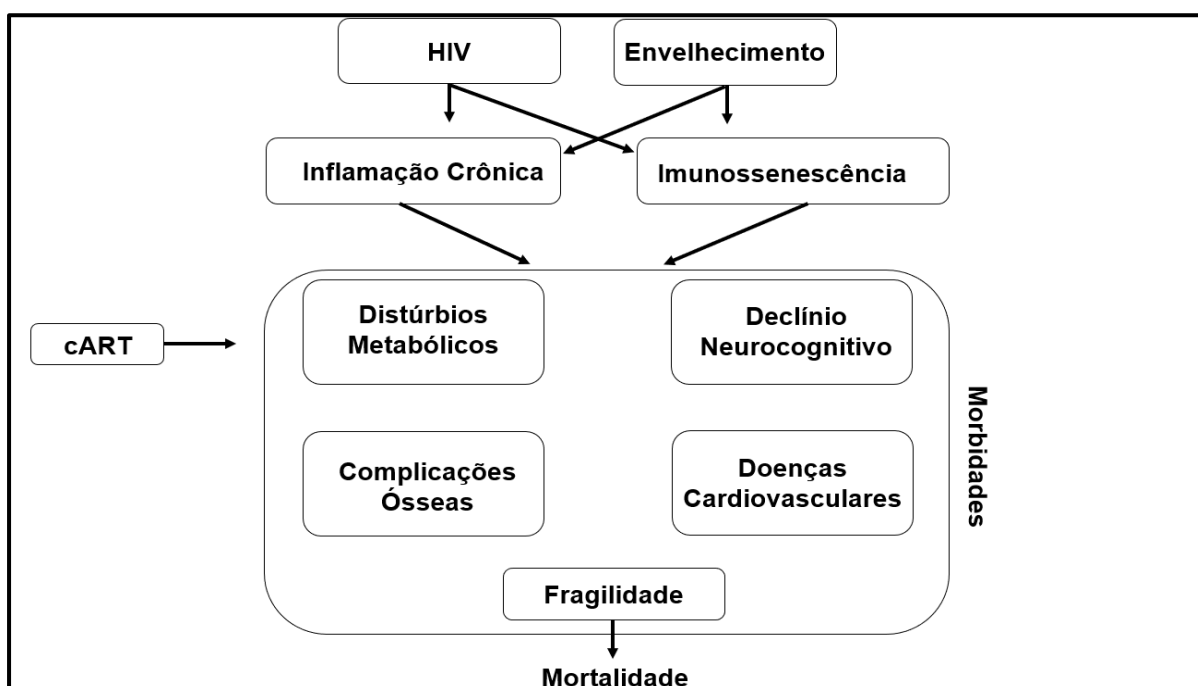
A necessidade de adesão entre os usuários da terapia ainda propicia o dano ao sistema imunológico, que se reflete em níveis baixos de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, que tem como resultados a progressão para AIDS e consequentemente o aumento da chance de manifestação de infecções oportunistas (Fonseca et al., 2012; Romeu et al., 2012).

## **2.8 Impacto do Uso Prolongado da TARV na perda Óssea**

Com o constante aprimoramento das combinações de TARV, o perfil da população com HIV está se transformando e a expectativa de vida das PVHA em uso regular da terapia se aproxima agora da população que não possui a infecção. Em países Europeus e nos Estados Unidos da América (EUA), mais de 50% dos pessoas vivendo com HIV/AIDS têm mais de 50 anos (Alvarez et al., 2016; Scherrer et al., 2022). Contudo, a TARV não leva a cura e a infecção persistente e subclínica mantém uma inflamação crônica causada por uma ativação imunológica que a longo prazo gera complicações não relacionadas à AIDS contribuindo para um cenário de aceleração do envelhecimento representado na figura 7 (Nasi et al., 2016).

Esta condição, relativamente nova, é extremamente complexa que envolve diversos órgãos e sistemas além dos responsáveis pela imunidade. Além dos fatores

de risco comportamentais tradicionais, foram identificados importantes fatores como toxicidade dos tratamentos antirretrovirais e a inflamação crônica, que levam a um declínio funcional e uma maior vulnerabilidade a lesões ou patologias (Justice, 2010). A saúde óssea das PVHA resulta das interações complexas entre o envelhecimento, comorbidades e fatores de risco clássicos que afetam a fragilidade óssea sendo muito comum nessa população e, em menor grau, da infecção por HIV bem controlada (Biver, 2022).



**Figura 7** – O vírus HIV, o envelhecimento e a terapia antirretroviral combinada (cART do inglês, combined anti-retroviral therapy) desempenham um papel na causa de diversas morbididades presentes durante a infecção pelo HIV. Adaptado de (Nasi et al., 2016).

A literatura aponta que há prevalência e incidência de osteoporose em PVHA a partir da quinta década de idade em comparação com pacientes controles, principalmente (Goh et al., 2018; Jespersen et al., 2021). Essa incidência foi demonstrada em várias populações, incluindo mulheres na África do Sul rural (Gregson et al., 2020). Por outro lado, foram relatados déficits substanciais no conteúdo mineral ósseo e na densidade, apesar do uso de TARV com crianças e adolescentes com idades entre 8 e 16 anos vivendo com HIV na África Subsaariana. O efeito do HIV na DMO foi acentuado nas últimas fases da puberdade, especialmente

nas moças, e com a utilização da medicação tenofovir disoproxil fumarato (TDF) (Rukuni et al., 2021).

Assim, a TARV afeta a saúde óssea, independentemente da diminuição indireta e transitória da DMO que é observada após o início de qualquer regime de TARV, associada à reconstituição imunológica. O declínio maior na DMO ocorre após o início na TARV, por um período limitado de 1 a 2 anos. Os dados do estudo START mostraram claramente que a perda óssea durante o início da TARV é significativamente maior do que a causada pela infecção HIV isoladamente (Ofotokun et al., 2015, 2016). No entanto, esses efeitos não se comparam com a perda óssea em PVHA com a infecção HIV não tratada. Nesses casos, a DMO diminui vertiginosamente devido à saúde instável, perda de peso e feitos diretos do vírus. (Hoy et al., 2017).

## **2.9 Imunologia e perda óssea**

O osso é constituído por uma matriz extracelular que inclui uma proteína fibrosa chamado colágeno tipo I e uma matriz mineral. O colágeno é sintetizado por fibroblastos e osteoclastos, enquanto a matriz mineral ou inorgânica, composta por hidroxiapatita de cálcio, é produzida pelos osteoblastos. O osso é um tecido dinâmico e metabolicamente ativo, que passa por um contínuo processo de modelagem e remodelação. A modelagem é responsável pelo crescimento e pela adaptação mecânica do osso, resultando em modificações na sua estrutura devido à carga mecânica do corpo. A remodelação óssea, por sua vez, remove e repara o osso danificado (como fraturas), mantendo a integridade do esqueleto adulto e a homeostase mineral. Ambos os processos são conduzidos por uma população heterogênea de células, que formam a unidade multicelular básica do tecido ósseo, composta por três tipos de células: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (Raggatt; Partridge, 2010).

Os osteoblastos são responsáveis pela produção e mineralização da matriz óssea por meio da secreção de colágeno e sua calcificação em matriz óssea. Eles se desenvolvem a partir de células mesenquimais pluripotentes, guiados por fatores regulatórios de transição. Os precursores dos osteoblastos têm origem na medula óssea e migram através na circulação, sendo especificamente adaptados para

remover a matriz óssea mineralizada. Essas células expressam receptores do hormônio da paratireoide (Paratormônio -PTH). O estágio de diferenciação dos osteoblastos determina a contribuição de cada subpopulação no processo de remodelação óssea (Raggatt; Partridge, 2010).

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea por meio da degradação da matriz óssea e remodelação do tecido ósseo. Eles se originam de precursores mononucleados de linhagem mieloide e derivados de monócitos e macrófagos. Eles são atraídos para os locais de reabsorção óssea por produtos parcialmente degradados do osteoide. Essas células possuem características morfológicas e fenotípicas distintas que facilitam sua identificação. Os osteoclastos são grandes, resultando da fusão de células mononucleadas, podendo conter até 50 núcleos, e expressam fosfatase ácida resistente ao tártaro e receptor de calcitonina. Além disto, produzem citocinas da resposta imunológica, incluindo o RANKL, necessário para a sobrevivência, expansão e diferenciação de células precursoras de osteoclastos (Raggatt; Partridge, 2010).

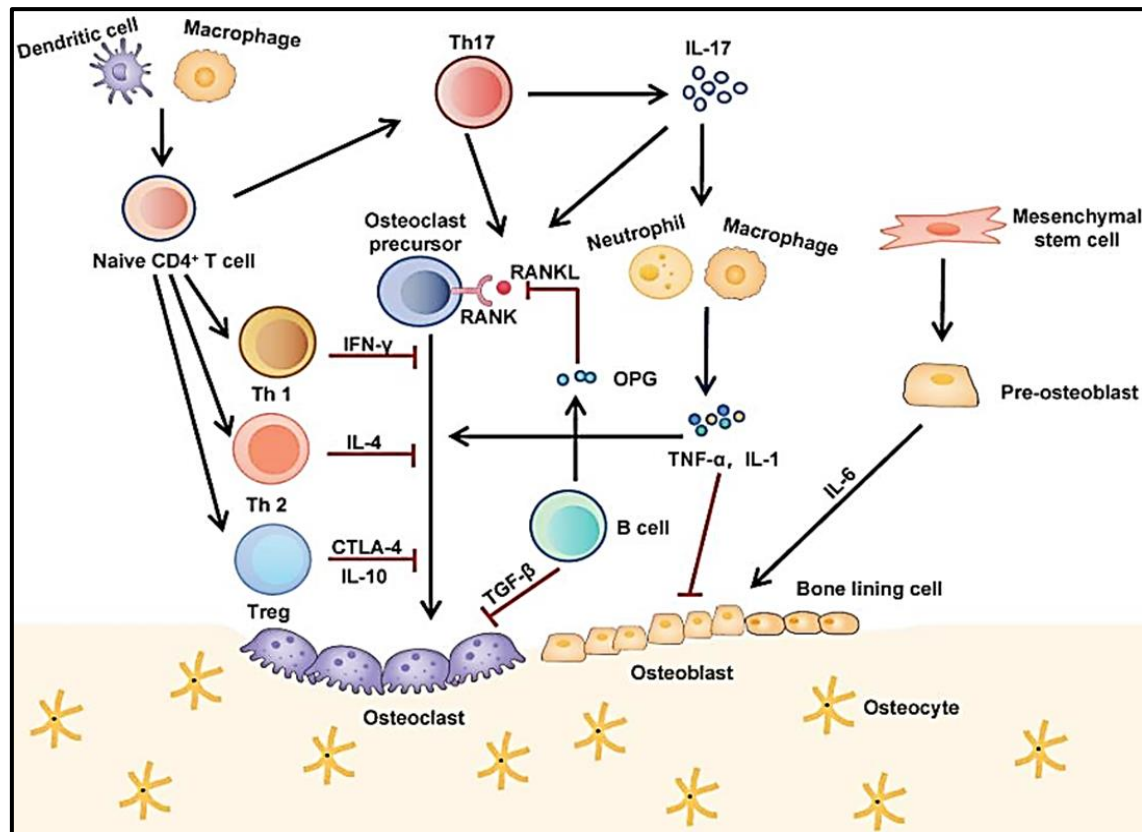
Os osteócitos são originados dos osteoblastos durante a formação do osso. Após a mineralização da matriz óssea, essas células ficam incrustadas no tecido ósseo e formam uma rede que se estende por todo osso mineralizado. Com longos processos semelhantes a dendritos que se estendem pelos canálculos (túneis) dentro da matriz mineralizada, os osteócitos são metabolicamente menos ativos. No entanto, são extremamente abundantes, constituindo aproximadamente 90-95% de todas as células ósseas. Eles respondem à carga mecânica, como peso corporal e a atividade física (Raggatt; Partridge, 2010).

Tanto o processo de remodelação quanto o de modelagem óssea são extremamente coordenados por células imunológicas envolvidas na fisiologia óssea. A localização anatômica próxima entre o osso e a medula óssea permite uma interação dinâmica entre os sistemas esquelético e imunológico. A influência das células imunes na regulação óssea dinâmica é observada em condições patológicas, como doenças imunes e distúrbios hormonais. No campos da biologia óssea, pesquisas apontam para a existência de uma interface imuno-esquelética, na qual células e citocinas desempenham um papel crucial nas funções efetoras entre os sistemas esquelético e imunológico (Raggatt; Partridge, 2010).

Por meio de fatores anti-osteoclastogênicos e pró-osteoclastogênicos, o sistema imunológico modula a resposta dos osteoblastos e os osteoclastos respectivamente. Fisiologicamente, os fatores anti-osteoclastogênicos preservam a massa óssea, enquanto fatores pró-osteoclastogênicos, associados a respostas inflamatórias, promovem a perda óssea (Raggatt; Partridge, 2010; Warriner; Mugavero; Overton, 2014).

A perda óssea é uma parte natural do envelhecimento, mas pode ser intensificada por várias patologias que afetam muitas pessoas. A osteoporose ocorre quando a taxa de reabsorção óssea pelos osteoclastos excede a taxa de formação óssea pelos osteoblastos, levando a perda óssea. Como o osso está constantemente em remodelação, mantendo o equilíbrio sincronizado entre a reabsorção e a formação, a desregulação desse processo durante o período inicial da infecção primária e após o início da TARV é responsável pela perda óssea acelerada e pelas altas prevalências de osteoporose em PVHA. Em casos de imunodeficiência ou inflamação decorrentes de doenças autoimunes, o esqueleto fica vulnerável à disfunção imunológica, o que pode resultar em danos colaterais graves, como a osteoporose e o aumento do risco de fraturas ósseas (Compston, 2016; Weitzmann, 2017).

A dinâmica envolvida entre as citocinas e a osteoclastogênese são descritas na figura 8 onde se observa que as interações entre o sistema imunológico e o sistema esquelético são intrincadas e têm um papel fundamental na regeneração e reparo dos ossos. Neste contexto, diferentes subpopulações de células T, como Th1, Th2, Th17 e Treg, secretam citocinas distintas e importantes na regulação da osteoclastogênese e na atividade dos osteoblastos, influenciando diretamente o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea (Yang; Liu, 2021).



**Figura 8** - Interações entre os sistemas imunológico e esquelético. (Yang; Liu, 2021).

As células Th17 são especialmente notáveis por sua capacidade de promover a osteoclastogênese. Elas são conhecidas por secretar a interleucina-17 (IL-17), uma citocina que induz a expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) em células do estroma e osteoblastos, essencial para a diferenciação dos precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros. Além disso, a IL-17 estimula a produção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 (IL-1) por células do sistema imune inato, que, por sua vez, também promovem a osteoclastogênese. Esses processos resultam na inibição da função osteoblástica e na intensificação da reabsorção óssea (Yang; Liu, 2021).

Por outro lado, as células T das subpopulações Th1, Th2 e Treg atuam como inibidoras da osteoclastogênese. Por exemplo, as células Th1, secretam interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) que inibe a diferenciação dos osteoclastos ao interferir na via de sinalização do RANKL-RANK. As células Th2 produzem interleucina-4 (IL-4) que também antagoniza o efeito do RANKL, inibindo a atividade osteoclástica. As células

Treg, por sua vez, desempenham um papel regulador crucial, secretando IL-10 e CTLA-4, citocinas que suprimem a inflamação e reduzem a atividade osteoclástica, criando um ambiente mais propício à formação óssea (Yang; Liu, 2021).

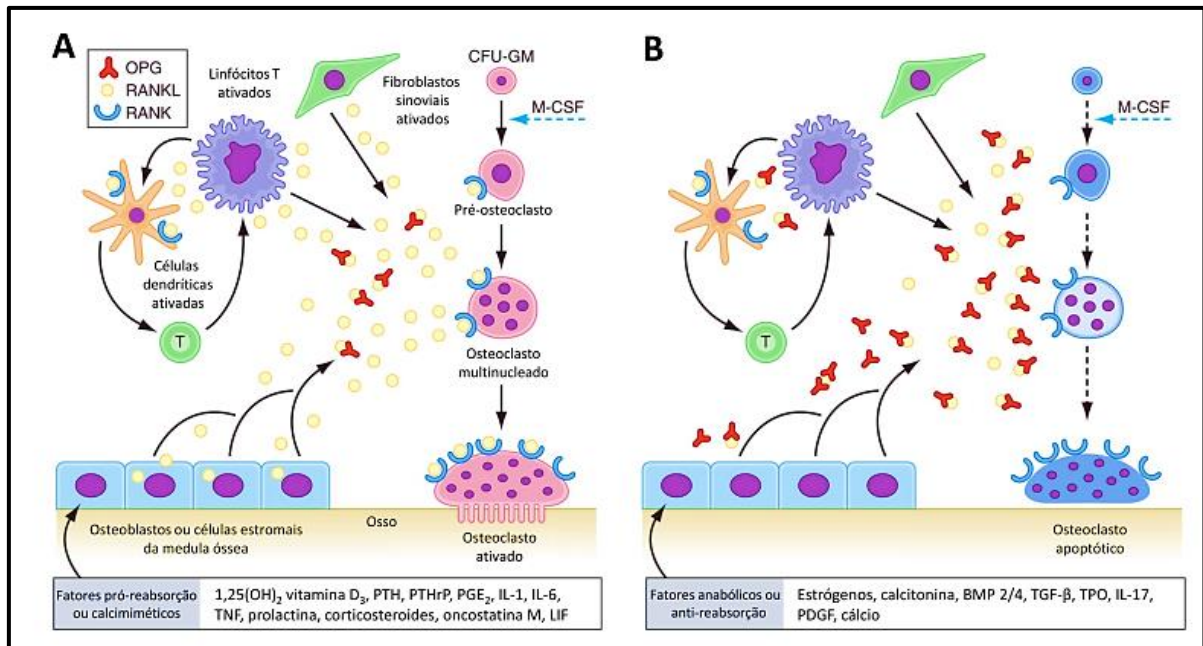
Além disso, as células B contribuem significativamente para a regulação da remodelação óssea, antagonizando os efeitos do RANKL por meio da secreção de osteoprotegerina (OPG), que bloqueia a ligação do RANKL ao seu receptor RANK nos precursores osteoclásticos. Ademais, as células B secretam o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), que pode induzir a apoptose dos osteoclastos, ajudando a preservar o tecido ósseo (Yang; Liu, 2021).

## **2.10 RANKL/OPG na Perda Óssea em PVHA**

O esqueleto é renovado constantemente pela ação coordenada de osteoclastos e os osteoblastos. Na presença de concentrações permissivas do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), a citocina osteoclastogênica chave RANKL se liga ao seu receptor RANK expresso em precursores de osteoclastos e promove sua diferenciação em pré-osteoclastos, no qual se fundem para originar osteoclastos maduros com sua característica polinuclear. Essa osteoclastogênese pode ser inibida pela citocina osteoprotegerina (OPG), que irá inibir a interação entre RANK e RANKL. Essa relação entre RANKL e OPG é um dos fatores determinantes para a diferenciação osteoclástica e a reabsorção óssea (Weitzmann; Ofotokun, 2016).

A figura 9 evidencia o equilíbrio dinâmico entre fatores pró-reabsortivos/calciotrópicos e calciomiméticos (A) e fatores anabólicos ou anti-reabsortivos (B) na regulação da atividade osteoclástica e da remodelação óssea. No painel A, observa-se que a expressão de RANKL em osteoblastos, células T ativadas, fibroblastos sinoviais e células estromais da medula óssea promove a ligação ao receptor RANK nos pré-osteoclastos, estimulando sua diferenciação em osteoclastos multinucleados e garantindo sua ativação e sobrevivência. Esse processo é impulsionado por mediadores como PTH, vitamina D ativa, PGE<sub>2</sub>, TNF, IL-1, IL-6 e LIF, que funcionam como fatores pró-reabsorção (Boyle; Simonet; Lacey, 2003).





**Figura 9** - Dinâmica osteoclastogênica. Adaptado (Boyle; Simonet; Lacey, 2003).

Já no painel B, a OPG atua como um receptor 'decoy' (receptor isca) que se liga ao ligante sem gerar sinal intracelular, apenas neutralizando o RANKL, levando à inibição da osteoclastogênese ou a redução da sobrevivência dos osteoclastos. A expressão de OPG é estimulada por fatores com efeito anabólico ou anti-reabsorção, como estrogênios, calcitonina, TGF-β, BMPs, TPO, PDGF e cálcio, os quais favorecem a indução da apoptose osteoclástica e a preservação da massa óssea. Assim, a figura ilustra de forma clara a interação entre mediadores inflamatórios, hormonais e imunológicos no controle da remodelação óssea, destacando a importância do eixo RANK/RANKL/OPG na interface imuno-esquelética (Boyle; Simonet; Lacey, 2003).

Estudos revelaram que as células imunes regulam potencialmente a renovação óssea fisiológica e patológica. As células B secretam OPG (Yun et al., 1998), e estudos realizados em camundongos demonstraram, que sob condições fisiológicas, essas células de linhagem B são a fonte dominante de OPG na medula óssea e as células T são as reguladoras centrais da expressão de OPG das células B por meio das interações co-estimulatórias (Toraldó et al., 2003).

### **2.11 Impacto do HIV na Homeostase Óssea e Remodelação Esquelética**

A infecção pelo HIV causa danos externos à imunidade celular e humoral com reflexo sobre a remodelação óssea e seus reguladores como demonstrado na literatura (Day et al., 2006; Moir et al., 2008). Um estudo com um modelo de rato transgênico com o genoma do HIV demonstraram degradação esquelética significativa e a reabsorção óssea osteoclástica elevada (Vikulina et al., 2010). Além disto, o estudo mostrou um declínio significativo na expressão de células B do fator anti-osteoclastogênico OPG e houve um aumento da expressão de células B da citocina pró-osteoclastogênia RANKL (Vikulina et al., 2010).

Estudos de Kehmia Titanji e colaboradores validaram essas descobertas pré-clínicas na infecção humana pelo HIV e mostraram pela primeira vez em humanos um possível papel para a disfunção das células B na perda óssea associada ao HIV. Eles demonstraram que as células B isoladas de pessoas com a infecção pelo HIV sem a TARV apresentam caracteristicamente um desequilíbrio na expressão de OPG e RANKL das células B, dessa forma resultando em condições favoráveis à reabsorção óssea osteoclástica aumentada (Titanji et al., 2014).

A regulação da homeostase óssea está intrinsecamente ligada a um equilíbrio de resposta pró e anti-osteoclastogênica. O envelhecimento natural do ser humano envolve um desbalanço gradual em favor de uma resposta pró-osteoclastogênica devido ao inflammaging. A infecção pelo HIV e a TARV tendem a causar esse mesmo desbalanço de uma forma mais precoce. Os autores levantaram a hipótese de que a perda óssea induzida pelo HIV pode ser causada em parte pela interrupção da interface imuno-esquelética. Portanto, um estudo comparativo entre PVHA com ou sem perda óssea e que estão submetidos aos mesmos esquemas de TARV, tendo como uso comum o tenofovir, pode contribuir com informações importantes sobre a modulação imune e a perda óssea induzida pelo HIV.

### 3. JUSTIFICATIVA

Com o advento da TARV, as PVHA vêm alcançando idades superiores a 50 anos e a redução da massa óssea tem sido observada de forma mais acelerada nesse grupo. A inflamação crônica decorrente da ativação imune está associada à modulação do metabolismo ósseo, um processo regulado por múltiplos fatores que interagem por mecanismos complexos e ainda pouco compreendidos. Diante disso, o estudo investigou o papel das citocinas de diferentes perfis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares (Th1, Th2 e Th17), bem como os mediadores da interface imuno-esquelética, em especial o eixo RANKL/OPG, a fim de compreender como esses elementos podem estar envolvidos na regulação da remodelação óssea em PVHA.

Considerando que há poucos estudos, especialmente no Brasil, que explorem a associação entre o desbalanço RANKL/OPG e a perda óssea em PVHA, buscamos aprofundar essa análise comparando indivíduos em estabilidade clínica, com faixas etárias e tempo de tratamento semelhantes, e todos em uso de TARV contendo tenofovir. Em avaliações prévias de DMO nesse grupo, verificamos que algumas pessoas apresentavam perda óssea enquanto outras não, o que reforça a relevância de investigar as citocinas pró e anti-osteoclastogênicas em conjunto com o eixo RANKL/OPG, tendo como foco principal compreender a relação entre inflamação, resposta imune adaptativa e perda óssea em PVHA acompanhadas em Manaus.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Avaliar o desbalanço da produção de RANKL/OPG e citocinas de células TCD4<sup>+</sup> auxiliares do perfil Th1/Th2/Th17 associado a perda óssea em PVHA.

### **4.2 Objetivos Específicos**

1. Caracterizar o perfil clínico e epidemiológico de pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) com alterações na densidade mineral óssea.
2. Comparar os níveis séricos de RANKL, OPG e citocinas associadas aos perfis Th1, Th2 e Th17 entre PVHA com osteopenia (homens e mulheres) e homens PVHA com densidade mineral óssea preservada.
3. Analisar as correlações entre os níveis séricos de RANKL, OPG e as citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 com a perda óssea em PVHA.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Aspectos Éticos

A aprovação ética do estudo foi concedida pelo Comitê de Ética da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), sob CAAE: 35104620.8.0000.0005 e número de parecer: 4.936.395, que faz parte de um projeto maior intitulado: AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E COMPOSIÇÃO CORPORAL EM PESSOAS QUE VIVEM COM HIV atendidos na Fundação de Medicina Tropical (FMT-HVD), Manaus, Estado do Amazonas. Após aplicação dos critérios de elegibilidade, foi solicitada a autorização dos pacientes ou de seus responsáveis para a inclusão no estudo, formalizada mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após o preenchimento do TCLE, foi realizado uma entrevista utilizando o Formulário Epidemiológico.

### 5.2 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo observacional e transversal com PVHA com idade acima de 40 anos atendidas no ambulatório de retrovirologia humana da FMT-HVD. Entre junho/2023 e junho/2024, 23 PVHA de ambos os sexos realizaram densitometria óssea por DEXA. Foi realizado a coleta de amostras de 9 ml de sangue para separação do plasma. Amostras de um grupo composto por 15 pessoas com idade superior aos 40 anos de idade foi usado como grupo controle.

### 5.3 Critérios de Inclusão e Não – inclusão

**Critérios de Inclusão:** PVHA com comprovação sorológica, idade acima 40 anos, de ambos os sexos, com carga viral indetectável e atendidos no ambulatório de retrovirologia humana na FMT-HVD.

**Critérios de Não – Inclusão:** mulheres PVHA grávidas, pessoas que não apresentam comprovação sorológica para HIV, com idade abaixo de 39 anos e que apresentam incapacidade de manter o decúbito pelo tempo necessário para a realização do exame de densitometria óssea.

#### **5.4 Coleta das Amostras**

As amostras de sangue foram coletadas no ambulatório de retrovirologia humana da FMT-HVD e processadas para obtenção de plasma na Unidade de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (UPCCB). Foram coletados até 9 mL de sangue total em tubos de heparina, e após foram encaminhadas ao laboratório para a separação de plasma.

#### **5.5 Obtenção dados clínicos**

Todo o histórico clínico dos pacientes foi obtido através do sistema de prontuário eletrônico (iDoctor versão 1.0.69b86), e foram coletados os dados clínicos de comorbidades, frequência de internações, tratamento e estado de saúde geral.

Foi obtido também dados laboratoriais de sorologia, carga viral, contagem de células TCD4<sup>+</sup> /TCD8<sup>+</sup>, marcadores hematológicos e bioquímicos.

#### **5.6 ELISA para Marcadores de Renovação Óssea**

Foram analisadas amostras de 23 pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA), nas quais se avaliaram os níveis séricos de RANKL, OPG e de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17, com o objetivo de investigar possíveis associações com a perda óssea. Como grupo controle, foram utilizadas amostras de 15 indivíduos com idade superior a 40 anos, sem diagnóstico de HIV.

A dosagem das concentrações séricas de RANKL e OPG nos plasmas foi realizada por meio de kits comerciais de ELISA: RANKL (Human TNFSF11 ELISA® Kit) e OPG (Human Osteoprotegerin SimpleStep ELISA® Kit), ambos da empresa Abcam, conforme as instruções dos protocolos fornecidos pelos fabricantes.

#### **5.7 Quantificação de Citocinas do plasma**

Foram realizados as dosagens das citocinas, interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), concentrações de proteína do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-17A (IL-17A) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) pela técnica de citometria de fluxo Cytometric Bead Array - CBA,

utilizando o *Human Th1/Th2/Th17 CBA Kit*, marca BD™ Biosciences, San Diego, CA), seguindo as orientações técnicas contidas nos protocolos preconizados pelo fabricante.

## 5.8 Análise Estatística

Os dados foram tabulados em banco de dados criado pela Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – (FMT-HVD), iDoctor - versão 1.0.69b86. Para análise dos dados, foi feita a análise descritiva com média e desvio padrão para dados paramétricos, ou mediana e intervalos interquartil (IQR) para dados não paramétricos, para comparação entre dois grupos foi utilizado teste de Mann-Whitney, e nas comparações entre os três grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Os dados foram analisados no software STATA (versão 13.0), e para análise e confecção dos gráficos foi o utilizado o GraphPad Prism (versão 9.0.2), para as análises de correlação multivariada foi utilizado teste de Spearman, os resultados foram considerados estatisticamente significativos até  $P < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

Entre junho/2023 e junho/2024, 23 PVHA a partir de 40 anos foram atendidas e recrutadas por conveniência em um ambulatório de retrovirologia humana da FMT-HVD. A predominância foi do sexo masculino, 16 homens e 7 mulheres (tabela 1). De acordo com o resultado do exame de densitometria óssea, dos 23 participantes do estudo, 8 foram classificados sem doença óssea, 15 foram classificados com osteopenia em pelo menos um dos locais avaliados (fêmur ou lombar), sendo 7 mulheres e 8 homens (tabela 1). Verifica-se tendência maior de mulheres com osteoporose em relação aos homens ( $p=0.048$ ). Como todas estavam em menopausa por conta das idades acima dos 50 anos, observa-se o impacto da hipoestrogenemia na evolução da perda óssea para osteoporose em comparação aos homens.

Em relação a internação, a maioria não teve internações dentro de um período de 5 anos. A maioria dos participantes não tinham nenhuma comorbidade, entretanto, alguns participantes apresentaram hipertensão (HAS). Na classificação do IMC, a maioria dos participantes estavam com sobrepeso que conceitualmente contribui antagonicamente a perda óssea devido ao estímulo mecânico em osteócitos (Leite-Silva et al., 2024). Os 23 participantes com DMO que retornaram à consulta apresentavam estabilidade clínica (carga viral indetectável ou suprimida abaixo de 50 cópias de RNA de HIV), IMC semelhantes e uso com mesmo esquema de TARV a base de tenofovir. Eles foram encaminhados para coleta de sangue periférico visando a separação do plasma, as amostras de plasmas foram criopreservadas em  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Tabela 1** - Características clínicas e gerais das PVHA do estudo que realizaram DMO.

	Sem Doença Óssea (N=8)		Osteopenia Homem (N=8)		Osteopenia Mulher (N=7)	
	N	%	N	%	N	%
<b>Sexo</b>						
Masculino	8	(100)	8	(100)	-	-
Feminino	-	-	-	-	7	(100)
<b>Internação*</b>						
Sim	-	-	1	(12,5)	1	(14,3)
Não	8	(100)	7	(87,5)	6	(85,7)
<b>Comorbidades</b>						
Nenhum	5	(50,0)	5	(84,7)	3	(42,8)
HAS	1	(16,6)	3	(15,3)	3	(42,8)
Diabetes	1	(16,6)	-	-	1	(14,2)
Cardiopatia	1	(16,6)	-	-	-	-
Hipertireoidismo	-	-	-	-	-	-
Hipotireoidismo	-	-	-	-	-	-
<b>Classificação IMC</b>						
Normal	1	(12,5)	3	(37,5)	1	(14,2)
Sobrepeso	4	(50,0)	4	(50,0)	3	(42,8)
Obesidade	3	(37,5)	1	(12,5)	3	(42,8)

HAS: Hipertensão arterial sistêmica; IMC: Índice de massa corporal; \*Internação dentro de um período de 5 anos.

A Tabela 2 compara os fatores relacionados à infecção pelo HIV nos três grupos. A média de idade em cada grupo mostra que o grupo de mulheres com osteopenia era de 60 anos, enquanto os dois grupos de homens vivendo com HIV (sem doença óssea e Homem com osteopenia) não diferem na idade. Na análise do tempo de uso da TARV, observou-se uma tendência de maior duração entre os homens com osteopenia (mediana de 15 anos) em comparação ao grupo sem doença óssea (10 anos), enquanto nas mulheres com osteopenia o tempo foi semelhante (11 anos), sugerindo que, nesse grupo, a menopausa exerça influência mais marcante na perda óssea. Apesar de não ter alcançado significância estatística ( $p=0,065$ ), os dados apontam para um possível efeito cumulativo do uso prolongado da TARV, especialmente em homens, sobre o risco de redução da massa óssea. O grupo mulher com osteopenia difere na mediana de idade. Em relação ao nadir, a distribuição do menor número de CD4 não diferiu entre os 3 grupos. O mesmo ocorreu com o tempo

de uso TARV, não há diferença entre os três grupos. Em relação a primeira carga viral, os grupos não diferem na carga viral antes do início da terapia antirretroviral. Em relação a contagem de células TCD4<sup>+</sup> que é importante para estimar o tempo de infecção, também não houve diferença. O mesmo aconteceu na primeira contagem de TCD8<sup>+</sup>, e com as contagens atuais de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (Tabela 2). Assim, todos esses dados reforçam a estabilidade clínica e que eles mostram homogeneidade em relação ao tempo de infecção até o diagnóstico e início do tratamento e por isso esses fatores não influenciam como confundidores.

**Tabela 2** - Características clínicas das PVHA analisadas e separadas por grupos.

	<b>Sem doença óssea (N=8)</b> Mediana (IQR)	<b>Osteopenia Homem (N=8)</b> Mediana (IQR)	<b>Osteopenia Mulher (N=7)</b> Mediana (IQR)	<b>p valor</b>
<b>Idade</b>	55 (40-65)	57 (40-66)	60 (53-72)	0.414
<b>Nadir</b>	543 (218-1156)	456 (172-952)	415 (180-1602)	0.541
<b>Tempo de TARV</b>	10 (6-20)	15 (9-29)	11 (8-14)	0.065
<b>Primeira CV</b>	81.208 (12.508 -82.511)	8.251(7.599-14.053)	26.851 (12.815-28.277)	0.588
<b>Primeiro CD4<sup>+</sup></b>	499 (22-1156)	495 (221-1004)	427 (142-701)	0.314
<b>Primeiro CD8<sup>+</sup></b>	1134 (374-2085)	653 (284-1165)	1249 (612-2287)	0.251
<b>Último CD4<sup>+</sup></b>	744 (264-1348)	655 (172-1235)	560 (121-843)	0.314
<b>Último CD8<sup>+</sup></b>	1.071 (290-2.318)	602 (269-881)	785 (473-1.120)	0.132
<b>Razão CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup></b>	0.70 (0.60 - 1.00)	0.95 (0.57-1.25)	0.83 (0.72-1.02)	0.375

Tempo de TARV: uso da Terapia antirretroviral em anos; CV: carga viral.

Como outros possíveis fatores, os dados laboratoriais hematológicos obtidos com validade de 3 meses foram usados na análise univariada comparativa (Tabela 3). Nos dados hematológicos foi observado uma diferença significativa nas hemácias e no hematócrito, entretanto em ambos os grupos a mediana ficou dentro dos valores de referência. E embora outros marcadores hematológicos como o MPV que apresentou mediana abaixo dos valores normais de referência e o PDW apresentando mediana acima dos valores de referência entre os grupos. É importante salientar que MPV e PDW, são marcadores de alteração da morfologia de plaquetas, e importantes para avaliação do estado inflamatório do paciente.

Da mesma forma foi realizada avaliação dos dados bioquímicos com validade de 3 meses (Tabela 4). De todos os marcadores bioquímicos, apenas a amilase e o magnésio apresentaram diferenças significativas nos grupos DMO normal e mulheres

osteopênicas, entretanto nos dois grupos a mediana se manteve dentro dos valores de referência. Observou-se que o LDL, assim como a hemoglobina glicada estavam acima dos valores normais de referência no grupo de mulheres osteopênicas, e a glicose nos grupos DMO normal e nas mulheres osteopênicas também estavam acima dos valores normais de referência.

Assim como a mediana da Gama GT e Glicose no grupo com HIV sem doença óssea também mostrou estar mais elevada que o valor de referência, a mediana da Glicose no grupo mulher com osteopenia mostrou estar mais elevada que o valor de referência, e que a vitamina D em ambos os grupos com osteopenia tanto em homens como nas mulheres com HIV, estava abaixo dos valores normais de referência, e como foi mencionado nos parâmetros hematológicos, não podemos examinar e nem correlacionar com exatidão esses parâmetros com a perda óssea, justamente por se tratar de um número amostral pequeno, entretanto as pessoas deste estudo estavam clinicamente estáveis.

É importante salientar que baseado nos dados hematológicos e bioquímicos, os participantes do estudo mostram também estabilidade hematológica e bioquímica de modo a não interferir como fator confundidor.

**Tabela 3** - Análises hematológicas entre PVHA sem problema ósseo e osteopênicas.

Parâmetros hematológicos	Referência	Sem doença óssea (N=8) Mediana (IQR)	Osteopenia Homem (N=8) Mediana (IQR)	Osteopenia Mulher (N=7) Mediana (IQR)	p
Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> )	4.2-5.5	5.4 (4.4-5.4)	5.0 (3.9-5.5)	4.0 (3.8-4.4) *	<b>0.023</b>
Hemoglobina (g/dL)	12.5-15.5	14.83 (13-17.35)	14.92 (11.94-16.73)	13.29 (12.59-14.45)	0.243
Hematócrito (%)	36.0-47.0	44.02 (42.2-49.25)	43.70 (42.89-49.68)	39.47 (38.01-43.83)	<b>0.039</b>
VCM (fl)	80.0-100.0	90.94 (88.75-94.45)	92.84 (90.5-95.65)	94.15 (91.3-101.4)	0.244
HCM (pg)	27.0-32.0	31.80 (30.30-33.60)	30.0 (29.93-32.40)	31.82 (29.87-32.95)	0.366
CHCM (g/dl)	32.0-36.0	33.60 (32.70-34.10)	33.12 (32.53-33.73)	32.82 (32.45-33.50)	0.689
RDW (%)	10.0-15.0	12.70 (11.90-13.90)	13.20 (12.75-14.47)	12.60 (11.99-13.70)	0.060
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> cél./mm <sup>3</sup> )	4.0-10	6.1 (5.9-8.1)	7.3 (5.6-8.1)	5.5 (5.3-7.1)	0.631
Neutrófilos (x10 <sup>3</sup> cél./mm <sup>3</sup> )	2-7	3.5 (2.9-5.4)	3.9 (2.7-4.7)	2.7 (2.5-3.7)	0.299
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> cél./mm <sup>3</sup> )	1-3	1.7 (1.4-2.7)	2.1 (1.7-2.5)	2.2 (1.7-2.5)	0.732
Monócitos (cél./mm <sup>3</sup> )	200-1.000	612 (535-678)	498 (437-649)	449 (363-569)	0.237
Eosinófilos (cél./mm <sup>3</sup> )	20-500	180 (107-293)	121 (85-223)	101 (64-188)	0.197
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	150-450	168.4 (151.0-295.3)	206.1 (166.7-239.3)	205.8 (179.4-204.8)	0.586
MPV (fl)	7.4-10.4	6.61 (5.96-7.27) *	7.42 (6.58-8.28)	6.88 (6.23-14.2) *	0.856
PDW (%)	10-18	19.66 (19.17-20.26) *	19.79 (19.09-20.53) *	19.58 (18.80-20.21) *	0.261

Análise de Teste T não paramétrico de Mann Whitney. VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (do inglês: Red Cell Distribution With); MPV: Volume Plaquetário Médio (do inglês: Mean Platelet Volume), PDW: Amplitude de Distribuição Plaquetária (do inglês: Platelet Distribution Width) e (\*) Dados fora dos valores de referência.

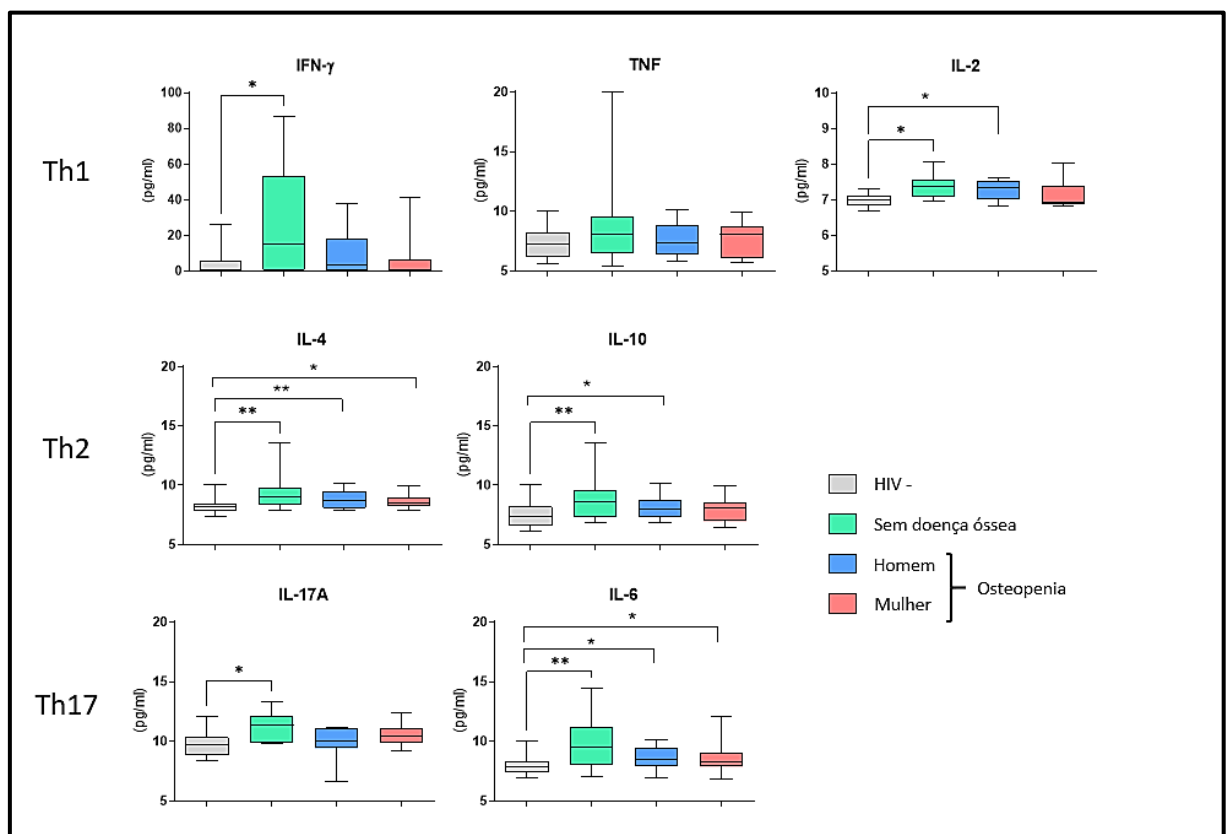
**Tabela 4** - Análises bioquímicas entre PVHA sem problema ósseo e osteopênicas.

Parâmetros bioquímicos	Referência	Sem Doença Óssea (N=8) Mediana (IQR)	Osteopenia Homem (N=8) Mediana (IQR)	Osteopenia Mulher (N=7) Mediana (IQR)	p
Amilase (U/L)	5-125	63 (56-72)	99 (77-117)	92 (72-126)	<b>0.006</b>
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.01-1.3	0.76 (0.55-0.87)	0.54 (0.38-0.73)	0.65 (0.37-0.67)	0.172
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0.01-0.30	0.21 (0.15-0.26)	0.17 (0.11-0.19)	0.14 (0.06-0.17)	0.199
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0.01-0.70	0.55 (0.37-0.65)	0.40 (0.23-0.51)	0.37 (0.31-0.53)	0.363
LDL (mg/dL)	10-100	90 (67-135)	100 (80-112)	118 (102-142) *	0.335
HDL (mg/dL)	30-70	37 (36-44)	39 (35-43)	51.5 (34-55)	0.116
Creatinina (mg/dL)	0.5-1.2	1.1 (1.0-1.3)	1.0 (0.9-1.2)	0.9 (0.8-1.2)	0.573
Cálcio (mg/dL)	8.5-10.5	10 (9.5-10.1)	9.8 (9.4-10.1)	9.8 (9.7-10.2)	0.237
DHL (U/μL)	211-423	378 (331-394)	359 (294-520)	411 (378-467)	0.444
Ferro (mg/dL)	50-175	105 (46-120)	85 (72-102)	86 (60-104)	0.803
Hemoglobina Glicada (%)	4.8-5.9	5.9 (5.49-9.83)	5.6 (5.54-6.32)	6.1 (5.46-7.77) *	0.258
Ácido Úrico (mg/dL)	2.0-6.0	4.7 (4.6-5.5)	5.0 (4.8-6.5)	4.6 (3.3-4.9)	0.289
Albumina (g/dL)	3.5-5.0	4.5 (4.2-4.5)	4.2 (4.2-4.5)	4.3 (3.6-4.5)	0.630
Fosfatase alcalina (U/L)	65-300	212 (201-268)	277 (207-307)	295 (213-396)	0.097
Gama GT (U/L)	5-45	61 (44-78) *	27 (23-43)	44 (27-74)	0.153
Glicose (mg/dL)	70-100	126 (98-191) *	98 (92-118)	119 (100-144) *	0.103
Magnésio (mg/dL)	1.3-2.5	2.1 (2.0-2.2)	2.2 (2.1-2.3)	2.3 (2.1-2.4)	<b>0.036</b>
Potássio (mEq/L)	3.6-5.2	4.3 (4.2-4.5)	4.1 (3.9-4.7)	4.3 (4.2-4.9)	0.713
Sódio (mEq/L)	135-145	139 (139-141)	140 (139-141)	143 (139-144)	0.304
TGO (U/μL)	2-38	25 (21-37)	27 (24-31)	24 (18-40)	0.856
TGP (U/μL)	2-44	36 (25-52)	31 (26-37)	21 (16-44)	0.478
Fosforo (mg/dL)	2.5-4.5	3.4 (3.3-3.6)	3.4 (3.3-4.2)	4.0 (3.9-5.0)	0.063
Vitamina D (ng/mL)	30-100	37.1 (22.6-38.1)	29.1 (26.4-38.0) *	26.6 (24.2-33.9) *	0.196
Triglicerídeos (mg/dL)	0-200	164 (115-432)	132 (118-189)	173 (148-245)	0.288

Análise de Teste T não paramétrico de Mann Whitney

Abreviação: LDL: Lipoproteínas de Baixa Densidade (do inglês: *Low-Density Lipoprotein*); HDL: Lipoproteínas de Alta Densidade (do inglês: *High-Density Lipoprotein*); DHL: Desidrogenase láctica; Gama GT: Gama Glutamil Transferase; TGO: Transaminase Glutâmico-Oxalacética; TGP: Transaminase Glutâmico-Pirúvica; (\*) Dados fora dos valores de referência.

No âmbito da biologia óssea, investigações demonstram a existência de uma interface imune esquelética, onde células do sistema imunológico e citocinas desempenham um papel fundamental na regulação das interações entre os sistemas esquelético e imunológico. Na figura 10 realizamos dosagem de citocinas do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2), Th2 (IL-4, IL-10) e Th17 (IL-17A, IL-6). Observamos o perfil Th1 concentrações séricas de IFN- $\gamma$  (pg/mL) em todos os grupos. Porém no grupo sem a doença óssea está apresentado uma mediana mais elevada em comparação com o grupo controle e homem e mulher vivendo com HIV e com osteopenia. Além disso, há uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ). As concentrações séricas de IL-2 (pg/mL) observamos que o grupo controle apresenta uma mediana mais baixa em comparação com os demais grupos. As análises nos mostraram diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo sem a doença óssea e entre o grupo controle e grupo de homens vivendo com HIV e com osteopenia (Figura 10).

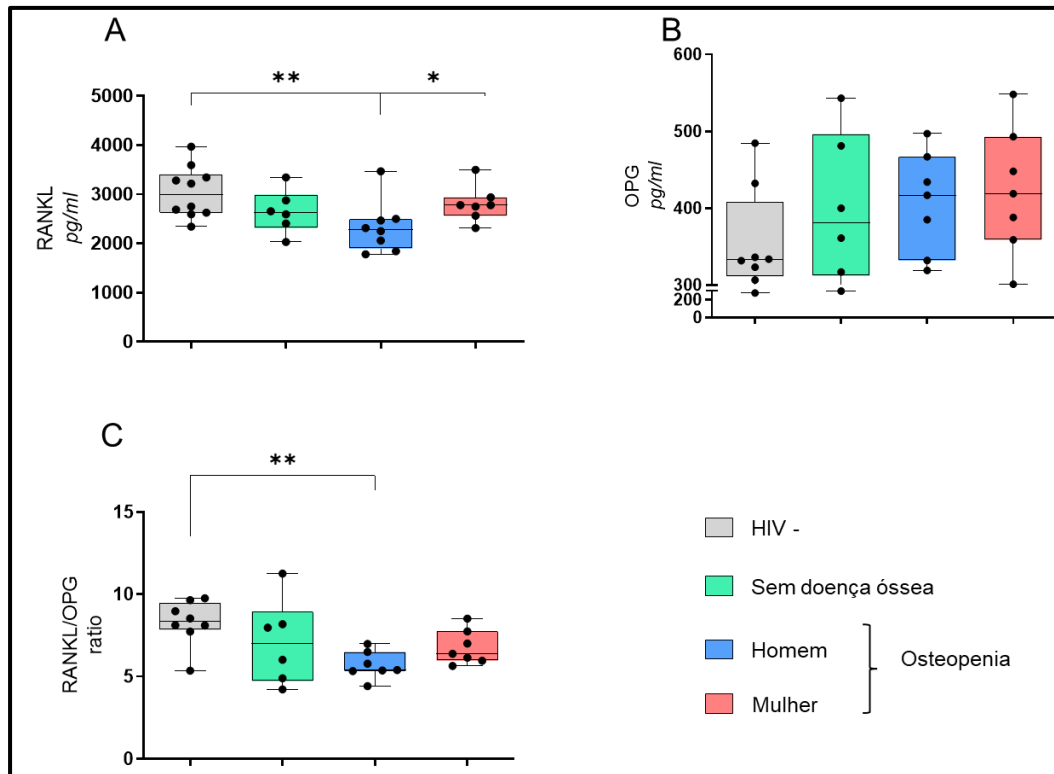


**Figura 10-** Dosagem de citocinas séricas interleucina -2 (IL - 2), interleucina - 4 (IL -4), interleucina - 6 (IL -6), interleucina - 10 (IL - 10), concentrações de proteína do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina - 17A ( IL-17A) e interferon gama IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) do plasma de PVHA e do grupo controle sem HIV. (\*) Representa as diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) Mann-Whitney test.

No perfil Th2 as concentrações séricas de IL-4 no grupo sem doença óssea e no grupo homens HIV com osteopenia são maiores estatisticamente que o grupo controle, há uma diferença estatística entre o grupo mulheres vivendo com HIV e com osteopenia em relação ao grupo controle. Nas concentrações séricas de IL-10 no grupo sem a doença óssea há uma diferença significativa em relação ao grupo controle. E o grupo homens vivendo com HIV e com osteopenia há uma diferença estatística em relação ao grupo controle (Figura 10).

No perfil Th17 as concentrações séricas de IL-17 podemos observar uma tendência natural do grupo sem doença óssea em relação ao grupo controle. Nas concentrações séricas de IL-6 foi observado três diferenças significativas entre os grupos sendo maiores que o controle, grupo sem doença óssea. Dessa forma esperaria que as pessoas com perda óssea tivessem concentrações diferentes em relação ao grupo sem doença óssea, porém temos PVHA de certa forma estável, ou seja viremia controlada. Portanto a diferença das concentrações das citocinas foi em relação ao controle (Figura 10).

A figura 11 mostra a comparação entre os grupos Controle, PVHA sem doença óssea, homens com osteopenia e mulheres com osteopenia em relação aos níveis séricos de RANKL, OPG e à razão RANKL/OPG. No painel A, observa-se que os níveis de RANKL são mais elevados no grupo controle, enquanto nos grupos de PVHA, independentemente da presença de osteopenia, os valores estão reduzidos, indicando um efeito relacionado à infecção pelo HIV. Podemos observar diferenças significativas as concentrações séricas de RANKL nos homens com osteopenia em relação às mulheres e pessoas sadias do grupo controle. No painel B, os níveis de OPG aparecem aumentados em todos os grupos de PVHA em comparação aos controles. Já no painel C, a razão RANKL/OPG encontra-se consistentemente mais baixa nos homens com osteopenia em relação ao controle, resultado da combinação de RANKL reduzido em relação ao OPG semelhante aos demais, reforçando que a alteração desse eixo está mais associada à condição da infecção pelo HIV do que ao diagnóstico de osteopenia.



**Figura 11-** Dosagem sérica de Osteoprotegerina (OPG) e o ligante ativador do receptor do fator nuclear keppa-B (RANKL) no plasma de PVHA e grupo sem HIV. (\*) Representa as diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) Mann-Whitney test.

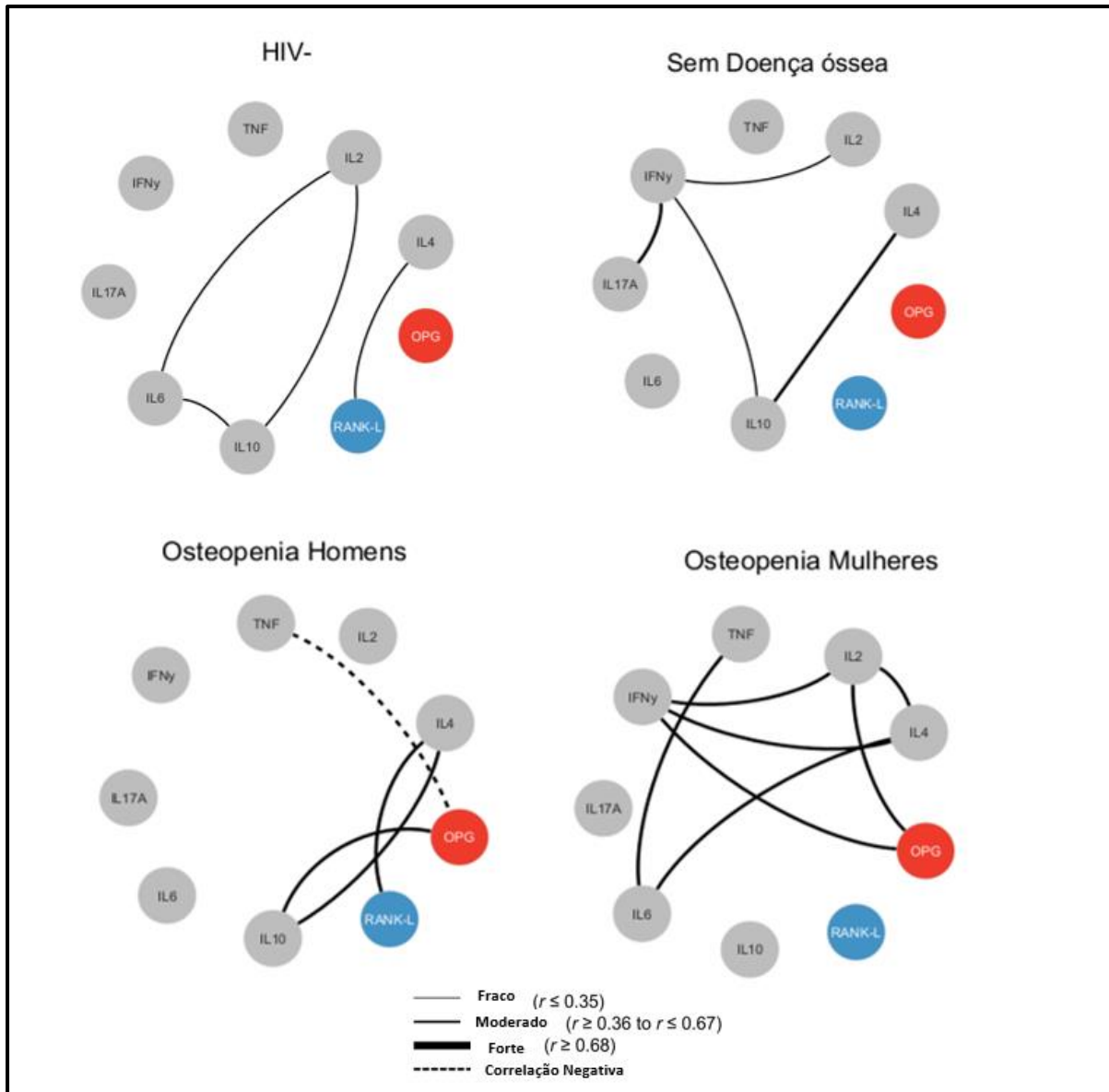
Por outro lado, na análise dos níveis de RANKL demonstraram uma redução significativa no grupo homens vivendo com HIV e com osteopenia em relação entre o grupo controle e a mulheres vivendo com HIV com osteopenia. O grupo de homens vivendo com HIV com osteopenia apresentou maior razão RANKL/OPG em comparação ao grupo controle, o que pode sugerir uma alteração no equilíbrio entre esses biomarcadores.

As diferenças que foram observadas, sugerem que pode haver variações nas concentrações plasmáticas dessas citocinas entre os grupos que foram analisados, o que pode estar relacionado a processos biológicos específicos, como remodelação óssea ou até mesmo a resposta inflamatória crônica.

Na análise de rede das citocinas e mediadores ósseos (Figura 12), observou-se que o padrão de correlação entre os grupos variou conforme o status de doença óssea e sexo. No grupo de pessoas sem doença óssea, as interações entre os mediadores sugerem uma interface imuno-esquelética funcionalmente integrada. O



IFN- $\gamma$  apresentou papel central ao exibir correlações moderadas a fortes com IL-2, IL-10 e IL-17A, além de correlação direta entre IL-4 e IL-10.



**Figura 12-** Análise de rede das variáveis medidas das citocinas interleucina -2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina- 10 (IL-10), concentrações de proteína do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina -17A (IL-17A), interferon gama (IFN-  $\gamma$ ), dosagem de osteoprotegerina (OPG) e dosagem do ligante ativador do receptor do fator nuclear keppa-B (RANKL). Correlação significativa com base no teste de correlação de *Spearman* ( $p < 0,05$ ).

No grupo de homens com osteopenia, o padrão de correlação foi menos estruturado. IL-4 apresentou correlação positiva com RANKL e com IL-10. No entanto, observou-se correlação negativa entre OPG e TNF, sugerindo um desequilíbrio entre

mediadores pró-osteoclastogênicos e protetores ósseos. Ao contrário do grupo sem doença óssea, IFN- $\gamma$  e IL-17A não estabeleceram correlações significativas, e o padrão de conexões foi mais limitado, o que indica uma possível desregulação da interface imunoesquelética. A correlação negativa entre OPG e TNF- $\alpha$  no grupo de homens com osteopenia indica uma tendência a produção de TNF- $\alpha$  em relação ao OPG, é maior em quem está perdendo osso, nos indicando que pode existir uma possível desregulação imunoinflamatória associada à perda de massa óssea.

Entre as mulheres com osteopenia, observou-se o padrão de correlação mais densa. IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 exibiram múltiplas correlações entre si. OPG também apresentou múltiplas correlações positivas entre IFN- $\gamma$  e IL-2. Esses achados sugerem uma resposta imune mais ativada e interconectada nesse grupo, possivelmente refletindo mecanismos compensatórios diante da perda óssea.

## 7. DISCUSSÃO

Pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) convivem com diferentes graus de alterações metabólicas, entre as quais a osteoporose se destaca como uma comorbidade relevante (Compston; McClung; Leslie, 2019; Ofotokun et al., 2016). A hipótese de que a perda óssea esteja relacionada à modulação da interface imunoesquelética, mediada por citocinas inflamatórias, ainda carece de elucidação mais precisa. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar essa interface em PVHA em uso regular de terapia antirretroviral (TARV), a partir dos 40 anos de idade, considerando que fragilidades ósseas e imunológicas tendem a surgir de forma precoce nessa população. Embora a TARV seja essencial para o controle da infecção pelo HIV, seu uso prolongado pode impactar negativamente a saúde óssea. No entanto, evidências apontam que essa perda tende a se estabilizar ao longo do tempo (Amorosa; Tebas, 2006; Warriner; Mugavero; Overton, 2014).

O perfil clínico e epidemiológico das pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) avaliadas neste estudo reforça que a perda óssea permanece como uma preocupação persistente com o avançar da idade (Compston; McClung; Leslie, 2019). No entanto, ainda há lacunas importantes a serem preenchidas, especialmente entre indivíduos em estabilidade clínica e em uso contínuo da TARV por longos períodos, como os incluídos nesta pesquisa (Ofotokun et al., 2015). Uma das principais características da população estudada foi a idade superior a 40 anos, associada ao uso prolongado de esquemas terapêuticos baseados em tenofovir, antirretroviral descrito na literatura como relacionado a uma redução da densidade mineral óssea entre 1% e 3% (Grant; Cotter, 2016). Observou-se maior tempo de TARV entre homens com osteopenia (15 anos) em comparação ao grupo sem doença óssea (10 anos), enquanto nas mulheres os valores foram semelhantes (11 anos), sugerindo influência mais marcante da menopausa. Apesar de não significativo ( $p=0,065$ ), o achado indica possível efeito cumulativo da TARV sobre a perda óssea, especialmente em homens. Como o p-valor foi limítrofe, estudos com maior número de participantes poderiam confirmar se essa tendência é consistente e clinicamente relevante.

No que se refere aos marcadores bioquímicos, os níveis de vitamina D estavam reduzidos, especialmente nos grupos com diagnóstico de osteopenia. Este resultado corrobora com evidências anteriores que destacam a deficiência de vitamina D como uma condição frequente entre PVHA (Kanwal; Rehman, 2023; King et al.,

2023). Além disso, foram observadas alterações nos parâmetros hematológicos PDW e MPV, os quais, segundo a literatura, podem refletir um estado inflamatório crônico em PVHA (Brenchley et al., 2006). Apesar disso, não foram observadas diferenças relevantes nos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos entre os grupos avaliados, sobretudo entre os homens com ou sem perda óssea, o que reforça a homogeneidade e estabilidade clínica dos participantes, não apenas pela supressão da carga viral, mas também pela manutenção de marcadores laboratoriais dentro da normalidade. Assim, embora a estabilidade clínica e laboratorial não revele alterações marcantes entre os grupos, os baixos níveis de vitamina D e, sobretudo, as alterações nos marcadores plaquetários indicativos de inflamação crônica reforçam que a perda óssea em PVHA se desenvolve de forma silenciosa e gradual, ressaltando a importância da investigação de marcadores imunológicos que permitam sua detecção precoce e acompanhamento sistemático.

Diversas evidências na literatura têm demonstrado uma interação significativa entre o sistema imune e a remodelação óssea, conceito atualmente conhecido como interface imuno-esquelética (Okamoto et al., 2017; Srivastava, 2018; Takayanagi, 2009). A avaliação da produção sérica de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 entre as PVHA com ou sem osteopenia não evidenciou uma citocina única capaz de discriminar claramente as pessoas com perda óssea. As diferenças observadas ocorreram sobretudo na comparação com o grupo controle não infectado, reforçando a importância desse grupo como referência. Entre as PVHA em estabilidade clínica, não se observaram alterações marcantes, mas sim nuances na modulação da resposta imune. Destaca-se que indivíduos sem doença óssea apresentaram níveis mais elevados de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e IL-6 em relação aos controles, sugerindo uma resposta inflamatória mais ativa que, no entanto, não se traduziu em perda óssea. Esses achados indicam que, mesmo sob viremia controlada, persistem sinais sutis de ativação imune que diferenciam as PVHA dos controles negativos, mas que não permitem apontar uma citocina isolada como marcador da perda óssea. Tal cenário reforça a complexidade da interface imuno-esquelética e sugere que a perda de massa óssea em PVHA decorre de mecanismos multifatoriais. Embora as tendências identificadas sejam relevantes, estudos adicionais com maior poder estatístico e abordagem longitudinal são necessários para esclarecer os mecanismos imunológicos envolvidos.

Nossos resultados mostraram que, em comparação ao grupo controle de indivíduos pareados por idade, os homens vivendo com HIV sem doença óssea apresentaram níveis elevados de IFN- $\gamma$  estatisticamente superiores, embora esses valores não tenham diferido em relação aos outros dois grupos avaliados, compostos por homens e mulheres com osteopenia. Esse achado ressalta a nuance da resposta celular mediada por essa citocina no contexto da infecção pelo HIV: ainda que sua expressão esteja aumentada em comparação à população não infectada da mesma faixa etária, ela se associa a um estado de preservação óssea nesse subgrupo, sugerindo uma ação protetora contra a reabsorção, em consonância com a literatura que descreve seus efeitos anti-osteoclastogênicos (Tanaka, 2019; Yang; Liu, 2021). Apesar da nuance de que a diferença foi observada apenas em relação a indivíduos sem HIV, dado que estamos comparando participantes em estabilidade clínica, o achado reforça essa relação ao evidenciar níveis elevados de IFN- $\gamma$  em pessoas sem comprometimento ósseo, sugerindo um papel protetor dessa citocina na manutenção da integridade óssea.

O eixo RANK/RANKL/OPG é um regulador essencial da remodelação óssea e da resposta inflamatória, e seu desequilíbrio tem sido associado tanto à perda de massa óssea quanto a condições inflamatórias crônicas (Kelesidis et al., 2013). A análise mostrou que os níveis séricos de RANKL estavam mais altos no grupo controle, enquanto se apresentaram reduzidos em PVHA, especialmente nos homens com osteopenia, ao passo que a OPG esteve aumentada em todos os grupos HIV+. Como consequência, a razão RANKL/OPG foi mais baixa nos homens com osteopenia em relação ao controle. Curiosamente, a presença de concentrações séricas elevadas de OPG entre homens com osteopenia parece contradizer seu papel esperado de proteção óssea, (Weitzmann; Ofotokun, 2016). Esses achados podem ser explicados, em parte, o RANKL pode estar sendo preferencialmente expresso e consumido localmente em sítios de inflamação crônica, remodelação óssea e aterosclerose, de modo que os níveis séricos reduzidos não refletem inatividade, mas sim maior utilização tecidual (Kelesidis et al., 2013). Esse achado sugere que outros fatores imunometabólicos podem estar interferindo nesse equilíbrio, uma hipótese respaldada por estudos (Li et al., 2007; Titanji et al., 2014). Assim, a menor concentração sérica de RANKL e a redução da razão RANKL/OPG não refletem

ausência de atividade, mas sim um desequilíbrio do eixo condicionado pela infecção pelo HIV.

A interface imunoesquelética tem sido amplamente estudada como uma via de interação complexa entre o sistema imune e o metabolismo ósseo. Com base nessa premissa, investigamos as correlações entre os mediadores osteoimunológicos RANKL e OPG com citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17, com o objetivo de compreender se essas interações poderiam refletir estados de comprometimento ósseo em PVHA (Chakravarti et al., 2008; Dolan; Kanter; Grinspoon, 2006; Fakruddin; Laurence, 2005; Titanji et al., 2014, 2018) (Ofotokun et al., 2015; Owens; Gallagher; Chambers, 1996; Titanji; Ofotokun; Weitzmann, 2020), (Evans; Fox, 2007; Lovibond et al., 2003), (Chakravarti et al., 2008; Relić et al., 2001), (Stenvinkel et al., 2005). A análise das correlações revelou padrões sugestivos, em particular, observamos correlação positiva entre IL-4 e RANKL tanto no grupo controle quanto em homens com osteopenia. No entanto, apenas no grupo de homens osteopênicos as concentrações de RANKL estavam reduzidas. Estudos prévios com modelos murinos demonstram que a IL-4 é capaz de inibir diretamente a osteoclastogênese, *in vitro*, bloqueando a ativação das vias de sinalização do RANKL em precursores osteoclásticos (Wei et al., 2002). O aumento da IL-4 pode estar relacionado à supressão da produção de RANKL nesse grupo, refletindo um mecanismo ligado à perda óssea. Embora o papel da IL-4 sobre a atividade osteoclástica ainda não esteja completamente elucidado, a IL-4 pode estar favorecendo o consumo e a compartimentalização do RANKL em tecidos, contribuindo para a perda óssea (Cheng et al., 2011). A correlação positiva observada entre IL-4 e RANKL reforça a necessidade de investigações adicionais sobre o papel desta citocina na imunorregulação óssea em PVHA.

A análise das redes de correlação de citocinas evidencia a complexidade da interface imunoesquelética, revelando múltiplos meandros de interação que, em conjunto, ajudam a compreender como diferentes mediadores podem convergir para modular o equilíbrio entre reabsorção e preservação óssea, especialmente em homens vivendo com HIV acima dos 40 anos (Tanaka, 2019; Yang; Liu, 2021). (Ofotokun et al., 2015; Owens; Gallagher; Chambers, 1996; Titanji; Ofotokun; Weitzmann, 2020). (Evans; Fox, 2007; Lovibond et al., 2003). (Chakravarti et al., 2008; Relić et al., 2001), (Stenvinkel et al., 2005). A IL-10 exerce efeito anti-

osteoclastogênico ao inibir a diferenciação de precursores, enquanto o TNF- $\alpha$  apresenta ação oposta, favorecendo a osteoclastogênese em sinergia com o RANKL e suprimindo a expressão de OPG (Yang; Liu, 2021) (McLean, 2009) (Cenci et al., 2000; Fuller et al., 2002; Lam et al., 2000; Weitzmann, 2013; Yang; Liu, 2021; Zhang et al., 2001). No presente estudo, a correlação positiva entre IL-10 e OPG, particularmente observada em homens com osteopenia, pode refletir um mecanismo imunológico compensatório voltado à limitação da progressão da perda óssea. Em contraste, a correlação negativa entre TNF- $\alpha$  e OPG nesse mesmo grupo não sugere uma interação direta entre essas moléculas, mas antes a ação pró-osteoclastogênica do TNF- $\alpha$ , que atua de forma paralela e sinérgica ao RANKL (Titanji et al., 2014; Zha et al., 2018). É importante destacar que os participantes estavam em estabilidade clínica e, exceto pelo IFN- $\gamma$ , as concentrações dessas citocinas permaneceram dentro da faixa de normalidade. Dessa forma, tais correlações provavelmente refletem mecanismos distintos, porém convergentes, que contribuem para o fenômeno da reabsorção óssea. Considerando que a perda óssea em PVHA é um processo lento e progressivo, mais estudos são necessários para esclarecer o papel dessas interações imunológicas na trajetória de comprometimento esquelético

Na rede de correlação referente às mulheres com osteopenia, observa-se um padrão caracterizado por múltiplas conexões entre as citocinas e o OPG apenas. OPG estabelece rede forte positiva com IL-2 e IFN- $\gamma$ . O interferon que parece bem reduzido também tem estabelece uma rede com IL-2 e IL-4, e uma conexão adicional IL-6 e TNF- $\alpha$ . Esse arranjo integrado é bem distinto do observado nos homens. Essa divergência pode estar relacionada a fatores hormonais, especialmente o hipoestrogenismo, que é amplamente reconhecido como determinante da desmineralização óssea em mulheres pós-menopausa (Leite-Silva et al., 2024), e possivelmente exerce influência mais relevante do que a ativação imunológica sistêmica (Titanji et al., 2014). Em síntese, a rede de correlação das mulheres osteopênicas sugere uma interface imuno-esquelética regulada de forma distinta, onde o papel de OPG se mostra central nas interações com citocinas, divergindo do padrão clássico descrito para PVHA e indicando que novas investigações são necessárias para esclarecer como a TARV e o estado hormonal modulam essa dinâmica (Titanji et al., 2014).

## **8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

Nosso estudo apresentou resultados muito promissores, entretanto, alguns desafios foram encontrados durante o desenvolvimento do projeto. A primeira é o nosso N amostral que podem fragilizar de certa forma nossos resultados, uma vez que o convite para participação foi realizado por conveniência com PVHA a partir de 40 anos de ambos os sexos. A segunda limitação foi especialmente no grupo controle sem doença óssea onde tivemos predominantemente homens, e não tivemos um grupo de mulheres para haver a comparação de forma mais homogênea.

Entretanto apesar das limitações encontradas, nosso estudo teve um grande achado e que poderá contribuir para futuras pesquisas científicas, ajudando a entender melhor a interface imuno-esquelética nas PVHA, apesar da limitação amostral, observamos que alguns resultados vão de encontro do que é visto na literatura, principalmente visto em modelos animais e também em estudos com humanos. Ademais, nossos resultados são bastantes promissores, e nos mostrou grandes possibilidades para pesquisas futuras.



## 9. CONCLUSÃO

À luz dos achados de que a perda óssea se configura como uma das comorbidades associadas ao envelhecimento das PVHA em uso regular da TARV, com destaque, no caso das mulheres, para o maior peso de fatores hormonais, nuances imunológicas caracterizadas por sinais discretos de ativação imune modulando a interface imunoesquelética, como as observadas neste estudo, reforçam que a perda óssea é um processo lento, multifatorial e silencioso, mesmo diante da supressão viral e de parâmetros clínico-laboratoriais estáveis.

Em nosso estudo, as PVHA com perda óssea encontravam-se em uso prolongado de TARV, incluindo tenofovir por mais de 10 anos, e apresentaram baixos níveis de vitamina D, além de alterações em PDW e MPV compatíveis com um estado de inflamação crônica. Esses achados reforçam que, mesmo em estabilidade clínica, a perda óssea é modulada por múltiplos fatores, inflamatórios, metabólicos e relacionados ao tratamento. Nesse contexto, a nuance observada nos homens sem doença óssea, marcada por sinais discretos de modulação imunológica, pode representar um mecanismo de proteção que atenua os efeitos deletérios da perda óssea no envelhecimento das PVHA.

O efeito protetor contra a perda óssea em homens vivendo com HIV pode estar relacionado à ação do IFN- $\gamma$ , cujos níveis mais elevados e a forte conectividade com IL-2, IL-10 e IL-17A, observados nas redes de correlação em homens sem doença óssea, sugerem um papel central na regulação da interface imunoesquelética. Por outro lado, nossos achados demonstram que a correlação negativa entre TNF- $\alpha$  e OPG em nível sérico e o desbalanço do eixo RANKL/OPG, caracterizado por níveis séricos reduzidos de RANKL e razão RANKL/OPG mais baixa em PVHA, refletem um mecanismo central da perda óssea nesta população, mesmo em estabilidade clínica.

Contudo, mais investigações são necessárias para tentar esclarecer totalmente esses mecanismos imunológicos e a sua importância clínica, principalmente considerando diferenças específicas de gênero.

## 10. CRONOGRAMA

ANO 1												
ATIVIDADES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Entrada com pedido de emendas ao comitê de ética da FMT	X	X	X									
2. Cursar disciplinas do mestrado	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3. Aquisição de material			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4. Coleta de amostras e experimentos								X	X	X	X	X
5. Qualificação do mestrado												X
ANO 2												
ATIVIDADES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Coleta de amostras experimentos	X	X	X	X	X	X	X	X				
2. Análise de resultados				X	X	X	X	X	X	X		
3. Participação de Congressos										X	X	X
4. Preparação de manuscrito para publicação									X	X	X	X
5. Defesa do mestrado											X	X

**Quadro 1**– Cronograma

## 11. EQUIPE DO PROJETO

<b>NOME</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>INSTITUIÇÃO</b>	<b>CONTRIBUIÇÃO</b>
Alanna Quésede Paiva da Silva	Mestranda	PPGIBA/UFAM	Mestranda, executora do projeto
Dr. Paulo Afonso Nogueira	Doutor	PPGIBA/UFAM/FIOCRUZ	Orientador
Dr. Yury Oliveira Chaves	Doutor	FIOCRUZ	Coorientador
Thaíssy dos Santos Xavier	Mestre	FIOCRUZ	Colaborador
Raimunda Sandra Pacheco	Mestre	FIOCRUZ	Colaborador
Ana Carolina Shuan Laco	Mestre	HEMOAM	Colaborador
Rebeca de Souza Pinheiro	Mestre	FIOCRUZ	Colaborador
Isabele Rodrigues Praxedes	Graduanda de Farmácia	FIOCRUZ	Colaborador

**Quadro 2** – Equipe do Projeto

## 12. REFERÊNCIAS

- ALCAMÍ, JOSÉ. Avances en la inmunopatología de la infección por el VIH / Advances in the immunopathology of HIV infection. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. v. 22, p. 486–496, 2004.
- ALTFELD, Marcus; GALE JR, Michael. Innate immunity against HIV-1 infection. *Nature Immunology*, v. 16, n. 6, p. 554–562, jun. 2015.
- ALVAREZ, Elena *et al.* Which HIV patients should be screened for osteoporosis: an international perspective. *Current Opinion in HIV and AIDS*, v. 11, n. 3, p. 268–276, maio 2016.
- AMOROSA, Valerianna; TEBAS, Pablo. Bone Disease and HIV Infection. *Clinical Infectious Diseases*, v. 42, n. 1, p. 108–114, 1 jan. 2006.
- AN, Ping; WINKLER, Cheryl A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends in Genetics*, v. 26, n. 3, p. 119–131, mar. 2010.
- AYOUBA, Ahidjo *et al.* HIV-1 Group O Infection in Cameroon, 1986 to 1998. *Emerging Infectious Diseases*, v. 7, n. 3, p. 466–467, jun. 2001.
- BARRÉ-SINOUSSE, F. *et al.* Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, n. 4599, p. 868–871, 20 maio 1983.
- BARTLETT, John G.; MOORE, Richard. A Comprehensive Plan for Managed Care of Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clinical Infectious Diseases*, v. 29, n. 1, p. 50–55, jul. 1999.
- BERGER, Edward A.; MURPHY, Philip M.; FARBER, Joshua M. CHEMOKINE RECEPTORS AS HIV-1 CORECEPTORS: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annual Review of Immunology*, v. 17, n. 1, p. 657–700, abr. 1999.
- BIANCOTTO, Angélique *et al.* Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood*, v. 109, n. 10, p. 4272–4279, 15 maio 2007.
- BIVER, Emmanuel. Osteoporosis and HIV Infection. *Calcified Tissue International*, v. 110, n. 5, p. 624–640, maio 2022.
- BOYLE, William J.; SIMONET, W. Scott; LACEY, David L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v. 423, n. 6937, p. 337–342, maio 2003.
- BRASIL. **Brasília, 13 de novembro de 1996; 175º da Independência e 108º da República.** Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l9313.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9313.htm)>. Acesso em: 30 set. 2022.
- BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos — Departamento de HIV, Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis.** Disponível em:

<[https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/pcdts/2013/hiv-aids/pcdt\\_manejo\\_adulto\\_12\\_2018\\_web.pdf/view](https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/pcdts/2013/hiv-aids/pcdt_manejo_adulto_12_2018_web.pdf/view)>. Acesso em: 19 jul. 2024.

BRASIL. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Módulo I. n. 1ª, 2024.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico - HIV e Aids 2024**. Disponível em: <[https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2024/boletim\\_hiv\\_aids\\_2024e.pdf/view](https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2024/boletim_hiv_aids_2024e.pdf/view)>. Acesso em: 3 fev. 2025.

BRENCHLEY, Jason M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nature Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1365–1371, dez. 2006.

BROWN, Todd T. *et al.* Loss of Bone Mineral Density After Antiretroviral Therapy Initiation, Independent of Antiretroviral Regimen. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 51, n. 5, p. 554–561, ago. 2009.

BRUERA, Dario *et al.* Decreased bone mineral density in HIV-infected patients is independent of antiretroviral therapy: **AIDS**, v. 17, n. 13, p. 1917–1923, set. 2003.

CENCI, Simone *et al.* Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- $\alpha$ . **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 10, p. 1229–1237, 15 nov. 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 30, n. 25, p. 305–308, 3 jul. 1981.

CHAKRABARTI, Lisa *et al.* Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. **Nature**, v. 328, n. 6130, p. 543–547, ago. 1987.

CHAKRAVARTI, Arpita *et al.* Normal human primary CD4+ T lymphocytes synthesize and release functional osteoprotegerin in vitro. **Laboratory Investigation**, v. 88, n. 2, p. 171–184, fev. 2008.

CHEN, Jingxian *et al.* The effect of age on CD4+ T-cell recovery in HIV-suppressed adult participants: a sub-study from AIDS Clinical Trial Group (ACTG) A5321 and the Bone Loss and Immune Reconstitution (BLIR) study. **Immunity & Ageing**, v. 19, n. 1, p. 4, dez. 2022.

CHENG, Jing *et al.* Interleukin-4 inhibits RANKL-induced NFATc1 expression via STAT6: A novel mechanism mediating its blockade of osteoclastogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 11, p. 3385–3392, nov. 2011.

CLAVEL, François *et al.* Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS. **Science**, v. 233, n. 4761, p. 343–346, 18 jul. 1986.

COMPSTON, J. HIV infection and bone disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 280, n. 4, p. 350–358, out. 2016.

COMPSTON, Juliet E.; MCCLUNG, Michael R.; LESLIE, William D. Osteoporosis. **The Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 364–376, jan. 2019.

COSMAN, F. *et al.* Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10, p. 2359–2381, out. 2014.

DAY, Cheryl L. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 350–354, 21 set. 2006.

DE MENEZES, Erika Grasiela Marques *et al.* Bone metabolism dysfunction mediated by the increase of proinflammatory cytokines in chronic HIV infection. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 35, n. 2, p. 234–242, mar. 2017.

DEEKS, Steven G. HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. **Annual Review of Medicine**, v. 62, n. 1, p. 141–155, 18 fev. 2011.

DOLAN, Sara E.; KANTER, Jenna R.; GRINSPOON, Steven. Longitudinal Analysis of Bone Density in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 8, p. 2938–2945, 1 ago. 2006.

DOMS, Robert W.; MOORE, John P. HIV-1 Membrane Fusion. **The Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 2, p. F9–F14, 16 out. 2000.

EVANS, Kathryn E.; FOX, Simon W. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. **BMC Cell Biology**, v. 8, n. 1, p. 4, dez. 2007.

FAKRUDDIN, J. M.; LAURENCE, J. HIV-1 Vpr enhances production of receptor of activated NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) via potentiation of glucocorticoid receptor activity. **Archives of Virology**, v. 150, n. 1, p. 67–78, jan. 2005.

FAVRE, David *et al.* Critical Loss of the Balance between Th17 and T Regulatory Cell Populations in Pathogenic SIV Infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 2, p. e1000295, 13 fev. 2009.

FERREIRA, Roberta Costa Santos; RIFFEL, Alessandro; SANT'ANA, Antônio Euzébio Goulart. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1743–1755, 2010.

FIUZA, Maria Luciana Teles *et al.* Adherence to antiretroviral treatment: comprehensive care based on the care model for chronic conditions. **Escola Anna Nery - Revista de Enfermagem**, v. 17, n. 4, 2013.

FONSECA, Leonardo Carvalho da *et al.* Evaluation of inadequate anti-retroviral treatment in patients with HIV/AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 151–155, abr. 2012.

FORSMAN, Anna; WEISS, Robin A. Why is HIV a pathogen? **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 555–560, dez. 2008.

FREED, Eric O. HIV-1 replication. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v. 26, n. 1/6, p. 13–33, 2001.

FRY, T. J. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 2983–2990, 15 maio 2001.

FULLER, Karen *et al.* TNF $\alpha$  Potently Activates Osteoclasts, through a Direct Action Independent of and Strongly Synergistic with RANKL. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 1108–1118, 1 mar. 2002.

GALLO, Robert C. *et al.* Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 500–503, 4 maio 1984.

GANDHI, Rajesh T.; WALKER, Bruce D. Immunologic Control of HIV-1. **Annual Review of Medicine**, v. 53, n. 1, p. 149–172, fev. 2002.

GESKUS, Ronald B. *et al.* The HIV RNA setpoint theory revisited. **Retrovirology**, v. 4, n. 1, p. 65, 2007.

GOH, S. S. L. *et al.* Reduced bone mineral density in human immunodeficiency virus-infected individuals: a meta-analysis of its prevalence and risk factors. **Osteoporosis International**, v. 29, n. 3, p. 595–613, mar. 2018.

GOMES, Raquel Regina de Freitas Magalhães *et al.* Utilização dos registros de dispensação da farmácia como indicador da não-adesão à terapia anti-retroviral em indivíduos infectados pelo HIV. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 3, p. 495–506, mar. 2009.

GRANT, Philip M.; COTTER, Aoife G. Tenofovir and bone health. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 11, n. 3, p. 326–332, maio 2016.

GREENE, Warner C. A history of AIDS: Looking back to see ahead. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. S1, p. S94–S102, nov. 2007.

GREGSON, Celia L. *et al.* Osteoporosis, Rather Than Sarcopenia, Is the Predominant Musculoskeletal Disease in a Rural South African Community Where Human Immunodeficiency Virus Prevalence Is High: A Cross-Sectional Study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 37, n. 2, p. 244–255, 1 dez. 2020.

GUYADER, Mireille *et al.* Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. **Nature**, v. 326, n. 6114, p. 662–669, abr. 1987.

HAASE, Ashley T. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 10, p. 783–792, out. 2005.

HAHN, Beatrice H. *et al.* AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 607–614, 28 jan. 2000.

HEMELAAR, Joris *et al.* Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 2, p. 143–155, fev. 2019.

HÖFT, Maxine A.; BURGERS, Wendy A.; RIOU, Catherine. The immune response to SARS-CoV-2 in people with HIV. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 21, n. 2, p. 184–196, fev. 2024.

HOY, Jennifer F. *et al.* Immediate Initiation of Antiretroviral Therapy for HIV Infection Accelerates Bone Loss Relative to Deferring Therapy: Findings from the START Bone Mineral Density Substudy, a Randomized Trial. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 9, p. 1945–1955, 1 dez. 2017.

JESPERSEN, Na *et al.* The burden of non-communicable diseases and mortality in people living with HIV (PLHIV) in the pre-, early- and late-HAART era. **HIV Medicine**, v. 22, n. 6, p. 478–490, jul. 2021.

JUSTICE, Amy C. HIV and Aging: Time for a New Paradigm. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 7, n. 2, p. 69–76, maio 2010.

KANWAL, Wajiha; REHMAN, Abdul. High prevalence of vitamin D deficiency in HIV-infected individuals in comparison with the general population across Punjab province, Pakistan. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, n. 1, p. 103484, jan. 2023.

KATZENSTEIN, TI *et al.* Virological and immunological profiles among patients with undetectable viral load followed prospectively for 24 months. **HIV Medicine**, v. 4, n. 1, p. 53–61, jan. 2003.

KELESIDIS, Theodoros *et al.* Perturbations of Circulating Levels of RANKL-Osteoprotegerin Axis in Relation to Lipids and Progression of Atherosclerosis in HIV-Infected and -Uninfected Adults: ACTG NWCS 332/A5078 Study. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 6, p. 938–948, jun. 2013.

KHOSLA, Sundeep. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5050–5055, dez. 2001.

KING, Elizabeth M. *et al.* Vitamin D intakes among women living with and without HIV in Canada. **HIV Medicine**, v. 24, n. 5, p. 628–639, maio 2023.

KUMAR, V. *et al.* **Patologia, bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda., 2010.

LAM, Jonathan *et al.* TNF- $\alpha$  induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 12, p. 1481–1488, 15 dez. 2000.

LEITE-SILVA, Paula R. *et al.* Bone mass, fracture risk, and associated factors in postmenopausal women living with HIV. **Menopause**, v. 31, n. 1, p. 46–51, jan. 2024.

LEMP, George F. Projections of AIDS Morbidity and Mortality in San Francisco. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 263, n. 11, p. 1497, 16 mar. 1990.



LI, Yan *et al.* B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3839–3848, 1 maio 2007.

LOVIBOND, Alison C. *et al.* TGF- $\beta$ -induced SOCS3 expression augments TNF- $\alpha$ -induced osteoclast formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, n. 4, p. 762–767, out. 2003.

MANCHES, Olivier *et al.* HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 10, p. 3431–3439, 1 out. 2008.

MANCHES, Olivier; FRLETA, Davor; BHARDWAJ, Nina. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 3, p. 114–122, mar. 2014.

MARTIN-GAYO, Enrique; YU, Xu G. Dendritic Cell Immune Responses in HIV-1 Controllers. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 14, n. 1, p. 1–7, fev. 2017.

MARTINS, Sueny da Silva; MARTINS, Tathiana Silva de Souza. Adesão ao tratamento antirretroviral: vivências de escolares. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 20, n. 1, p. 111–118, mar. 2011.

MARY-KRAUSE, Murielle *et al.* Prevalence of Low Bone Mineral Density in Men and Women Infected With Human Immunodeficiency Virus 1 and a Proposal for Screening Strategy. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 15, n. 4, p. 422–433, out. 2012.

MCCOMSEY, Grace A. *et al.* Bone Disease in HIV Infection: A Practical Review and Recommendations for HIV Care Providers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 8, p. 937–946, 15 out. 2010.

MCEL RATH, M. Juliana; HAYNES, Barton F. Induction of Immunity to Human Immunodeficiency Virus Type-1 by Vaccination. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 542–554, out. 2010.

MCLEAN, Robert R. Proinflammatory cytokines and osteoporosis. **Current Osteoporosis Reports**, v. 7, n. 4, p. 134–139, dez. 2009.

MCMICHAEL, Andrew J. *et al.* The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 1, p. 11–23, jan. 2010.

MOGENSEN, Trine H. *et al.* Innate immune recognition and activation during HIV infection. **Retrovirology**, v. 7, n. 1, p. 54, dez. 2010.

MOIR, Susan *et al.* Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 8, p. 1797–1805, 4 ago. 2008.

MOURA, Josely Pinto de; FARIA, Michele Rodrigues de. Caracterização e perfil epidemiológico das pessoas que vivem com hiv/aids. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, v. 11, n. 12, p. 5214, 17 dez. 2017.

NAIF, Hassan M. Pathogenesis of HIV infection. **Infectious Disease Reports**, v. 5, n. 11, p. e6, 6 jun. 2013.

NAPOLITANO, Laura A. *et al.* Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. **Nature Medicine**, v. 7, n. 1, p. 73–79, jan. 2001.

NASI, M. *et al.* Ageing and inflammation in patients with HIV infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 187, n. 1, p. 44–52, 18 dez. 2016.

OFOTOKUN, Ighovwerha *et al.* Role of T-cell reconstitution in HIV-1 antiretroviral therapy-induced bone loss. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 8282, 22 set. 2015.

OFOTOKUN, Ighovwerha *et al.* Antiretroviral therapy induces a rapid increase in bone resorption that is positively associated with the magnitude of immune reconstitution in HIV infection: **AIDS**, v. 30, n. 3, p. 405–414, jan. 2016.

OKAMOTO, Kazuo *et al.* Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 4, p. 1295–1349, 1 out. 2017.

OKOYE, Afam *et al.* Progressive CD4+ central-memory T cell decline results in CD4+ effector-memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 9, p. 2171–2185, 3 set. 2007.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. **HIV/aids - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/hivaids>>. Acesso em: 3 fev. 2025.

OWENS, J. M.; GALLAGHER, A. C.; CHAMBERS, T. J. IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 157, n. 2, p. 936–940, 15 jul. 1996.

PALELLA, Frank J. *et al.* Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 853–860, 26 mar. 1998.

PANTALEO, G.; FAUCI, A. S. IMMUNOPATHOGENESIS OF HIV INFECTION. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 825–854, out. 1996.

PATERSON, David L. *et al.* Adherence to Protease Inhibitor Therapy and Outcomes in Patients with HIV Infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 133, n. 1, p. 21, 4 jul. 2000.

PICELLI, Isabelle; DÍAZ-BERMÚDEZ, Ximena Pamela. Será que esse remédio vai valer a pena mesmo? Estudo antropológico sobre a adesão às terapias

antirretrovirais entre grupos de mútua ajuda de pessoas vivendo com HIV/aids. **Saúde e Sociedade**, v. 23, n. 2, p. 496–509, jun. 2014.

PISO, Rein Jan *et al.* Markers of Bone Turnover Are Elevated in Patients With Antiretroviral Treatment Independent of the Substance Used. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 56, n. 4, p. 320–324, abr. 2011.

PLANTIER, Jean-Christophe *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 871–872, ago. 2009.

POLEJACK, Larissa; SEIDL, Eliane Maria Fleury. Monitoramento e avaliação da adesão ao tratamento antirretroviral para HIV/aids: desafios e possibilidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. suppl 1, p. 1201–1208, jun. 2010.

POPOVIC, Mikulas *et al.* Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and Pre-AIDS. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 497–500, 4 maio 1984.

RAGGATT, Liza J.; PARTRIDGE, Nicola C. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, ago. 2010.

RAMDAS, Pavitra *et al.* From Entry to Egress: Strategic Exploitation of the Cellular Processes by HIV-1. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 559792, 4 dez. 2020.

RELIĆ, Biserka *et al.* IL-4 and IL-13, But Not IL-10, Protect Human Synoviocytes from Apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 4, p. 2775–2782, 15 fev. 2001.

ROMEU, Geysa Aguiar *et al.* Avaliação da adesão a terapia antirretroviral de pacientes portadores de HIV. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 3, n. 1, 2012.

ROQUES, Pierre *et al.* Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. **AIDS**, v. 18, n. 10, p. 1371–1381, 2 jul. 2004.

RUKUNI, Ruramayi *et al.* Effect of HIV infection on growth and bone density in peripubertal children in the era of antiretroviral therapy: a cross-sectional study in Zimbabwe. **The Lancet Child & Adolescent Health**, v. 5, n. 8, p. 569–581, ago. 2021.

SABATTÉ, Juan *et al.* Human Seminal Plasma Abrogates the Capture and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to CD4<sup>+</sup> T Cells Mediated by DC-SIGN. **Journal of Virology**, v. 81, n. 24, p. 13723–13734, 15 dez. 2007.

SAKURAGI, Jun-ichi. Morphogenesis of the Infectious HIV-1 Virion. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, 2011.

SCHERRER, Alexandra U. *et al.* Cohort Profile Update: The Swiss HIV Cohort Study (SHCS). **International Journal of Epidemiology**, v. 51, n. 1, p. 33–34j, 18 fev. 2022.

SHIAU, Stephanie *et al.* Incident fractures in HIV-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. **AIDS**, v. 27, n. 12, p. 1949–1957, 31 jul. 2013.

SIMON, François *et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nature Medicine**, v. 4, n. 9, p. 1032–1037, set. 1998.

SIRIS, E. S. *et al.* The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the National Bone Health Alliance Working Group. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 5, p. 1439–1443, maio 2014.

SMIT, Mikaela *et al.* Future challenges for clinical care of an ageing population infected with HIV: a modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 810–818, jul. 2015.

SRIVASTAVA, Rupesh K. Osteoimmunology The i Nexus i between bone and immune system. **Frontiers in Bioscience**, v. 23, n. 2, p. 464–492, 2018.

STAPRANS, S.; FEINBERG, Mark B. The roles of nonhuman primates in the preclinical evaluation of candidate AIDS vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 3, n. sup1, p. S5–S32, ago. 2004.

STECKBECK, Jonathan D.; KUHLMANN, Anne-Sophie; MONTELARO, Ronald C. C-terminal tail of human immunodeficiency virus gp41: functionally rich and structurally enigmatic. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 1, p. 1–19, 1 jan. 2013.

STENVINKEL, Peter *et al.* IL-10, IL-6, and TNF- $\alpha$ : Central factors in the altered cytokine network of uremia—The good, the bad, and the ugly. **Kidney International**, v. 67, n. 4, p. 1216–1233, abr. 2005.

TAKAYANAGI, Hiroshi. Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 5, n. 12, p. 667–676, dez. 2009.

TANAKA, Yoshiya. Clinical immunity in bone and joints. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 37, n. 1, p. 2–8, jan. 2019.

TEITELBAUM, Steven L. Bone Resorption by Osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504–1508, set. 2000.

TITANJI, Kehmia *et al.* Dysregulated B Cell Expression of RANKL and OPG Correlates with Loss of Bone Mineral Density in HIV Infection. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 11, p. e1004497, 13 nov. 2014.

TITANJI, Kehmia *et al.* T-cell receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand/osteoprotegerin imbalance is associated with HIV-induced bone loss in patients with higher CD4<sup>+</sup> T-cell counts. **AIDS**, v. 32, n. 7, p. 885–894, 24 abr. 2018.

TITANJI, Kehmia; OFOTOKUN, Ighowwerha; WEITZMANN, M. Neale. Immature/transitional B-cell expansion is associated with bone loss in HIV-infected individuals with severe CD4<sup>+</sup> T-cell lymphopenia. **AIDS**, v. 34, n. 10, p. 1475–1483, 1 ago. 2020.

TORALDO, Gianluca *et al.* IL-7 induces bone loss *in vivo* by induction of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand and tumor necrosis factor  $\alpha$  from T cells.

**Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 1, p. 125–130, 7 jan. 2003.

TREMBLAY-MCLEAN, Alexandra *et al.* Expression Profiles of Ligands for Activating Natural Killer Cell Receptors on HIV Infected and Uninfected CD4+ T Cells. **Viruses**, v. 9, n. 10, p. 295, 12 out. 2017.

TRINDADE, Felipe Ferraz *et al.* Perfil epidemiológico e análise de Tendência de HIV/AIDS/ Epidemiological profile and trend analysis of HIV/AIDS/ Perfil epidemiológico y análisis de tendencia del HIV/SIDA. **Journal Health NPEPS**, v. 4, n. 1, p. 153–165, 1 jun. 2019.

TURVILLE, Stuart G. *et al.* Bitter-sweet symphony: defining the role of dendritic cell gp120 receptors in HIV infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 22, n. 3, p. 229–239, out. 2001.

TURVILLE, Stuart G. *et al.* Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. **Nature Immunology**, v. 3, n. 10, p. 975–983, 1 out. 2002.

UNAIDS. **Estatísticas - UNAIDS Brasil**. , 2024. Disponível em: <<https://unids.org.br/estatisticas/>>. Acesso em: 3 fev. 2025

VAISHNAV, Yashwantra N.; WONG-STAAAL, Flossie. THE BIOCHEMISTRY OF AIDS. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 577–630, jun. 1991.

VALLARI, Ana *et al.* Confirmation of Putative HIV-1 Group P in Cameroon. **Journal of Virology**, v. 85, n. 3, p. 1403–1407, fev. 2011.

VIKULINA, Tatyana *et al.* Alterations in the immuno-skeletal interface drive bone destruction in HIV-1 transgenic rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 31, p. 13848–13853, 3 ago. 2010.

WAHEED, Abdul A.; FREED, Eric O. Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. **Virus Research**, v. 143, n. 2, p. 162–176, ago. 2009.

WARRINER, Amy H.; MUGAVERO, Michael; OVERTON, E. Turner. Bone Alterations Associated with HIV. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 11, n. 3, p. 233–240, set. 2014.

WEI, Shi *et al.* Interleukin-4 Reversibly Inhibits Osteoclastogenesis via Inhibition of NF- $\kappa$ B and Mitogen-activated Protein Kinase Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 8, p. 6622–6630, fev. 2002.

WEITZMANN, M. Neale. The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immun skeletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. **Scientifica**, v. 2013, p. 1–29, 2013.

WEITZMANN, M. Neale. Bone and the Immune System. **Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 7, p. 911–924, out. 2017.

WEITZMANN, M. Neale *et al.* Immune Reconstitution Bone Loss Exacerbates Bone Degeneration Due to Natural Aging in a Mouse Model. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 226, n. 1, p. 38–48, 12 ago. 2022.

WEITZMANN, M. Neale; OFOTOKUN, Ighowwerha. Physiological and pathophysiological bone turnover — role of the immune system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 9, p. 518–532, set. 2016.

YANG, Ning; LIU, Yao. The Role of the Immune Microenvironment in Bone Regeneration. **International Journal of Medical Sciences**, v. 18, n. 16, p. 3697–3707, 2021.

YUN, T. J. *et al.* OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 161, n. 11, p. 6113–6121, 1 dez. 1998.

ZHA, Li *et al.* TNF- $\alpha$  contributes to postmenopausal osteoporosis by synergistically promoting RANKL-induced osteoclast formation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 369–374, jun. 2018.

ZHANG, Yan-Hong *et al.* Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF) Stimulates RANKL-induced Osteoclastogenesis via Coupling of TNF Type 1 Receptor and RANK Signaling Pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 563–568, jan. 2001.