Edione Cristina dos Reis

**Perfil genômico da resposta ao HIV-1 e implicações para a vacina
terapêutica com células dendríticas contra o HIV-1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo
2015**

Edione Cristina dos Reis

**Perfil genômico da resposta ao HIV-1 e implicações para a vacina
terapêutica com células dendríticas contra o HIV-1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Alessandra Pontillo

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BCTD).

**São Paulo
2015**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Reis, Edione Cristina dos.

Perfil genômico da resposta ao HIV-1 e implicações para a vacina terapêutica com células dendríticas contra o HIV-1 / Edione Cristina dos Reis. – São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Alessandra Pontillo.

Tese (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunogenética.

Versão do título para o inglês: Genomic profile of anti-HIV response and outcome of dendritic cell-based therapeutic vaccine against HIV-1.

1. HIV-1 2. Imunoterapia 3. Células dendríticas 4. Ensaio clínico 5. Perfil genômico 6. Polimorfismos I. Pontillo, Profa. Dra. Alessandra II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB094/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Edione Cristina dos Reis.

Título da Dissertação: Perfil genômico da resposta ao HIV-1 e implicações para a vacina terapêutica com células dendríticas contra o HIV-1.

Orientador(a): Profa. Dra. Alessandra Pontillo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cap. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (11) 3091.7733 telefex: (55) (11) 3094-3405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 29 de outubro de 2013.

PARECER 1150/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, na reunião realizada no dia 23.10.2013, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Perfil genômico da resposta imune ao HIV-1 e implicações para a vacina terapêutica com Células dendríticas contra o HIV-1*" da pesquisadora **ALESSANDRA PONTILLO** e aluna **EDIONE CRISTINA DOS REIS**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, Item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site.icb.usp.br.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CFP em **23.10.2014**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Àquela cuja participação nessa dissertação e na minha formação foi de fundamental importância, minha orientadora Alessandra.

Ao laboratório de Imunogenética (Pamela, Juliana, Elaine, Jaíne, Alexandre) pela amizade, paciência, colaboração e convivência agradável.

Aos amigos do LIM-56 pela disposição do laboratório, dia a dia e bons momentos.

À Dra Telma Oshiro e seu grupo (Bruna, Wanessa, Laís, Denise, Nathália, Marcella, Alexandre, “Ana Paula e Alana”) por colocar a disposição reagentes, orientar experimentos e dividir comigo momentos de aprendizado e conhecimento e, acima de tudo, amizade .

Aos professores Dr. Niels Olsen e Dr. Condino pela disposição dos aparelhos utilizados em alguns dos meus experimentos.

Às agências de fomento: CAPES e FAPESP.

Aos meus pais pela dedicação e amor incondicional.

Aos meus irmãos pelo companheirismo.

Àquele que no decorrer dos últimos 2 anos passou de namorado, à noivo e marido sempre dando apoio, forças para continuar e acima de tudo muito amor.

Aos meus anjos de patas Glee, Bolinha e Barney por me darem apoio, alegria e esperança quando mais precisava.

Enfim, a todos que me ajudaram diretamente e indiretamente nessa etapa, o meu agradecimento!

“Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isso é ter tido sucesso.”

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

REIS, E. C. **Perfil genômico da resposta ao HIV-1 e implicações para a vacina terapêutica com células dendríticas contra o HIV-1.** 2015. 92 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A imunoterapia baseada em células dendríticas (DC) tem sido reportada com uma interessante ferramenta para induzir o controle da carga viral plasmática. Neste estudo, foram analisados genes em DC, utilizadas em um ensaio clínico brasileiro, e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) antes e após o tratamento, com o objetivo de identificar marcadores preditivos da resposta à terapia. Para isso, a expressão gênica de genes envolvidos na resposta anti-HIV foi avaliada em 6 pacientes HIV+ submetidos à imunoterapia as diferentes etapas de diferenciação de monócitos a DC de acordo com o protocolo. Após isso, a expressão diferencial de genes de resposta a vacina e de controle viral do HIV foram avaliados em PBMC obtidos de 6 pacientes HIV+ antes e após o tratamento. Para a expressão diferencial foram utilizados um arranjo de genes comercialmente disponível e um customizado (RT² Profiler PCR Array, *Qiagen*). O perfil de genes de monócitos a DC mostrou que as células podem ser classificadas em dois grupos, um desses grupos mostrou uma ampla modulação de genes anti-HIV que aparentemente correlacionam com o aumento na ativação ou estado de exaustão celular e, possivelmente, com um pior produto vacinal, ainda que essa assinatura gênica não tenha sido estatisticamente associada a uma baixa funcionalidade da DC, talvez pelo limitado número de amostras. As comparações da modulação de expressão gênica em PBMC de pacientes HIV+ antes e após o tratamento mostrou uma boa resposta à imunoterapia associada com uma baixa modulação de genes específicos da resposta Th1 e assinatura de IFNs, enquanto que uma má resposta estava associada a uma alta modulação de genes envolvidos na inibição de resposta imune específica e exaustão imune. Nossos dados sugerem que uma triagem baseada na genética poderia auxiliar na predição da capacidade estimulatória da DC e no sucesso da imunoterapia em pacientes HIV+.

Palavras-chave: HIV-1. Imunoterapia. Células dendríticas. Ensaio clínico. Perfil genômico. Polimorfismos.

ABSTRAT

REIS, E. C. **Genomic profile of anti-HIV-1 response and outcome of dendritic cell-based therapeutic vaccine against HIV-1.** 2015. 92 p. Masters Thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Dendritic cells (DC)-based immunotherapy has been reported as an interesting approach to induce a control of plasma viral load in HIV positive (HIV+) individuals, however successes in clinical trials have been limited. In the current study, expression of selected genes was analysed in DC implied in a Brazilian on-going clinical trial and in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) before and after the treatment, with the aim to identify a predictive marker for therapy responsiveness. For this purpose, differential expression of genes involved in host anti-HIV response was evaluated in 6 HIV+ patients submitted to immunotherapy in different steps of monocytes-to-DC preparation according to immunotherapy protocol. Then differential expression of long term non progressor genes, general response to vaccine genes and HIV viral load control genes was evaluated in PBMC obtained from 6 HIV+ patients before and after the treatment. Commercially available and custom RT² Profiler PCR Arrays (*Qiagen*) were used for differential expression analysis.

The genes profile of monocytes-to-DC revealed that cells can be classified into 2 groups, one with a larger modulation of a subset of anti HIV genes expression that apparently correlated with augmented cell activation/exhaustion state and possibly with a worse vaccine product, even if this gene signature was not statistically significant associated to a lower DC functionality, possibly due to the limited size of samples. Comparison of gene expression modulation in HIV+ patients PBMC after and before the treatment showed that a good response to immunotherapy associated with a low modulation of specific genes (Th1 response, type-I IFNs signature), whereas a bad response with a high modulation of genes involved in inhibition of specific immune response and immune exhaustion. Our data suggest that a genetic-based screen would help to predict DC-stimulatory capacity and success of immunotherapy in HIV+ patients.

Keywords: HIV-1. Immunotherapy. Dendritic cells. Clinical trial. Genomic profile. Polymorphisms.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl: microlitro

14 h - DC: células dendríticas após 4 horas do pulso viral e 10 horas do estímulo com coquetel de citocinas

24 h - DC: células dendríticas após 4 horas do pulso viral e 20 horas do estímulo com coquetel de citocinas

4 h - DC: células dendrítica após 4 horas do pulso viral

48 h - DC: células dendríticas maduras

ACTB: β-actina

ADEE – 3002: Ambulatório de Imunodeficiências Secundárias 3002

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

APOBEC3G: *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*

ART: Terapia antirretroviral

AT-2: Aldrithiol-2

B2M: β-2-microglobulina

CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CCL22: *Chemokine (C-C motif) ligand 22*

CCL3 (MIP-1a): *Chemokine (C-C motif) ligand 3*

CCL3L1: *Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1*

CCL4 (MIP-1β): *Chemokine (C-C motif) ligand 4*

CCL5: *Chemokine (C-C motif) ligand 5*

CCL7: *Chemokine (C-C motif) ligand 7*

CCR5: *Chemokine (C-C motif) receptor 5*

CCR7: *Chemokine (C-C motif) receptor 7*

CD14: *cluster of differentiation 14*

CD1a: *cluster of differentiation 1*

CD4+: *cluster of differentiation 4*

CD40 : *cluster of differentiation 40*

CD80: *cluster of differentiation 80*

CD83: *cluster of differentiation 83*

CD86: *cluster of differentiation 86*

cDNA: *complementary DNA*

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CGA: Análise de Gene Candidato

CNOT1: *CCR4-NOT transcription complex subunit 1*

CT: *cycle threshold*

CTL: Linfócito T citotóxico

CUL5: *cullin 5*

CVP: Carga Viral Plasmática

CXC12L: *Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12*

CXCR4 : *C-X-C chemokine receptor type 4*

DC: dendritic cell(s), célula(s) dendrítica(s)

DC-SIGN/CD209: *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DEFB1: *Beta-defensin 1*

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

FC: *Fold Change*

FDR: *False Discovery Rate*

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GWAS: Estudos de Associação Genômica Ampla

HDF: Fatores de dependência do HIV

HGDC: controle de contaminação com DNA genômico

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA: *Human Leukocyte Antigens*

HLA-DR: *Human leukocyte antigens-DR*

HLA-I: *Human Leukocyte Antigen Class I*

HPRT1: *Hypoxanthine Phosphoribosyl-transferase 1*

ICAM1: *Intercellular Adhesion Molecule 1*

iDC: dendrítica imatura

IFN γ : interferon gama

IL10: *Interleukin 10*

IL12B: *Interleukin 12*

IL-18: *Interleukin 18*

IL1B: *Interleukin-1 beta*

IL4: *Interleukin 4*

IL6: *Interleukin 6*
IRF-1: *Interferon regulatory factor 1*
IRF8: *Interferon regulatory factor 8*
LIM 56: Laboratório de Investigação Médica 56
MBL2: *Mannose-binding lectin 2*
NK: *Natural Killer*
NLRP3: *NLR Family, Pyrin Domain Containing 3*
NOS1: *Nitric oxide synthase 1*
NOS2A: *Nitric oxide synthase 2A*
PARD3B: *Par-3 partitioning defective 3 homolog B*
PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PPC: controle positivo da PCR
RNA: ácido ribonucleico
ROCK1: *Coiled-coil-containing protein kinase 1*
RPLP0: *Ribosomal Protein large P0*
RTC: *Reverse Transcription Control*
SDF-1: *Stromal cell-derived factor 1*
SIV: *Simian Immunodeficiency virus*
SNPs: polimorfismos de base única
SOCS3: *Suppressor of cytokine signaling 3*
STAT5A: *Signal transducer and activator of transcription 5A*
TCD4+: Linfócitos T
TLRs :*Toll-Like Receptors*
TNF : fator de necrose tumoral
TRIM5: *Tripartite motif-containing protein 5*
UFPE :Universidade Federal de Pernambuco
VLPs= *Virus like particle*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Fatores genéticos associados a infecção ao HIV-1 e progressão à AIDS	17
1.2 Perfil genômico de pacientes HIV+ e resposta à vacina.....	20
1.3 Genômica funcional / transcriptômica	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Casuística do ensaio clínico de imunoterapia.....	27
3.2 Desenho do estudo	28
3.3 Casuística utilizada nesse projeto	29
3.4 Obtenção de vírus HIV inativado	31
3.5 Obtenção de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos	32
3.6 Obtenção de PBMC para estudo da resposta à imunoterapia.....	32
3.7 Isolamento de RNA e retrotranscrição	32
3.8 Avaliação da expressão gênica durante a diferenciação monócitos-células dendríticas	33
3.9 Análise da expressão gênica em resposta à imunoterapia	33
3.10 Avaliação da expressão gênica com sondas fluorogênicas gene-específicas e tecnologia Taqman	35
3.11 Análise por heat map e agrupamento hierárquico.....	36
3.12 Análise <i>in silico</i> das funções biológicas	36
3.13 Genotipagem com sondas alelo-específicas e tecnologia Taqman	36
3.14 Avaliação fenotípica de células dendríticas	37
3.15 Avaliação da viabilidade celular	38
3.16 Análise funcional das células dendríticas: ensaios de co-cultivo	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO- PARTE I	40
4.1 Análise da expressão gênica em monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos.....	40
<i>4.1.1 Agrupamento hierárquico.....</i>	<i>40</i>
<i>4.1.2 Modulação da expressão gênica dentro dos grupos A e B.....</i>	<i>42</i>
<i>4.1.3 Modulação de genes relacionados com a morte celular e avaliação da viabilidade celular.....</i>	<i>46</i>
<i>4.1.4 Modulação de genes relacionados com a resposta imune contra o HIV-1.....</i>	<i>47</i>

4.1.5 Modulação da expressão dos genes do inflamassoma	48
4.1.6 Avaliação do fenótipo de maturação/ativação em monócitos e células dendríticas.....	50
4.1.7 Avaliação funcional de células dendríticas: capacidade de induzir produção de IFN- γ em ensaios de co-cultivo com linfócitos autólogos	51
4.2 Discussão: etapas de diferenciação celular de monócitos em células dendríticas.....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO- PARTE II.....	54
5.1 Análise da expressão gênica em PBMC de indivíduos submetidos à imunoterapia	54
5.2 Análise por heat map e agrupamento hierárquico.....	55
5.3 Genes modulados em resposta à imunoterapia e análise da função biológica ..	59
5.4 Modulação da expressão dos genes NOS1 e MBL2 em PBMC após a imunoterapia	64
5.5 Modulação da expressão dos genes do inflamassoma em PBMC após a imunoterapia	65
5.6 Discussão: PBMC de indivíduos submetidos à imunoterapia.....	66
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO- PARTE III	70
6.1 Genotipagem dos pacientes submetidos à imunoterapia	70
6.1.1 Polimorfismos de base única previamente associados à resposta a imunoterapia para indivíduos HIV+	70
6.1.2 Polimorfismos em fatores de restrição para o HIV-1	71
6.2 Discussão: genotipagem dos pacientes submetidos à imunoterapia.....	75
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICES	86
A - Perfil de expressão durante etapas de diferenciação de DC= P1-P6 (FC)	86
B - Perfil de expressão de leucócitos após a imunoterapia= P6-P11 (FC).....	88
C - Heat map do perfil de expressão dos leucócitos de 6 indivíduos HIV submetidos à imunoterapia nos tempos t1, t2 e t3	89
D - Resultados Genemania modulação oposta entre P7 e maus respondedores	89
ANEXOS	90
A - Arranjo de genes comercial usado nas etapas de diferenciação de DC.....	90
B - Arranjo de genes customizado usado em leucócitos antes/após imunoterapia ..	91

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que atualmente há aproximadamente 35,3 milhões de pessoas vivendo com o Vírus da Imunodeficiência Humana, (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) ou com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) em todo o mundo. Dessas pessoas, mais de 9,7 milhões estão sob terapia antirretroviral (ART, do inglês *Active Antiretroviral Therapy*). No Brasil, de acordo com o último boletim epidemiológico há atualmente 734 mil pessoas vivendo com HIV/AIDS (BRASIL, 2013; YOUNAI, 2013).

Nessas últimas três décadas de epidemia, avanços científicos contribuíram para um melhor entendimento da resposta imune do hospedeiro, fornecendo assim subsídios para o desenvolvimento de potentes agentes antirretrovirais (YOUNAI, 2013). E mesmo que o número de indivíduos infectados tenha permanecido elevado, o advento da terapia antirretroviral levou à uma diminuição da mortalidade e morbidade da doença (VAN VAERENBERGH, 2001).

Os antirretrovirais aprovados e comercialmente disponíveis agem em estágios da replicação do HIV e consistem em: inibidores nucleosídeos e nucleotídeos para transcriptase reversa; inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa; inibidores de protease; inibidores de fusão; inibidores de integrase; inibidores de entrada (antagonista de CCR5) e agentes combinados (CHEN; HOY; LEWIN, 2007; YOUNAI, 2013).

Na maioria dos indivíduos infectados pelo HIV-1 a administração de ART resulta no aumento da contagem de células TCD4⁺ e na redução da viremia plasmática que podem ser mantidos durante anos (CHEN et al., 2007; FINZI; SILICIANO, 1998).

Contudo, o sucesso da terapia antirretroviral é limitado pelo desenvolvimento de resistência, associada principalmente à interrupção da terapia que pode aumentar a replicação do HIV-1 presente em reservatórios latentes como células TCD4⁺ de memória (DAVEY et al., 1999).

São relatados também vários efeitos colaterais associados às interações medicamentosas com outros medicamentos e ao tempo de uso de ART prolongado, como complicações metabólicas (hiperglicemia, resistência insulínica, hiperlipidemia) e doenças cardiovasculares (CHEN et al., 2007; MURATA; HRUZ; MUECKLER, 2000).

É essencial nesse cenário desafiador o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, surge a utilização de células dendríticas (DC, do inglês

Dendritic Cells) na imunoterapia como uma alternativa complementar para o tratamento da infecção pelo HIV-1.

As DC constituem as mais potentes células apresentadoras de antígenos. São consideradas sentinelas naturais responsáveis por iniciar as respostas imunes mediadas por linfócitos T contra patógenos invasores e, desta forma, desempenhar um papel central na regulação imune (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Na infecção pelo HIV a quantidade de DC circulantes diminui drasticamente durante a progressão da doença (BARRON et al., 2003), dessa forma a administração de uma quantidade suficiente de DC estimuladas *in vitro* com antígenos de HIV representaria uma terapia complementar no controle da infecção, através do estímulo do sistema imune do próprio hospedeiro. Ou seja, as DC adequadamente ativadas poderiam melhorar a função deteriorada do sistema imune regulando importantes funções antivirais, tais como a mediação de anticorpos neutralizantes, citotoxicidade, lise dependente do complemento entre outras (PION et al., 2010). Os protocolos de vacinação terapêutica com DC têm como objetivo complementar o tratamento com antirretrovirais ao induzir o controle da carga viral plasmática em pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1. Além disso, constitui uma importante ferramenta na investigação de correlato de imunogenicidade nesses pacientes.

Foram publicados vários ensaios clínicos utilizando imunoterapia de DC em indivíduos HIV+ (tabela 1). Embora os ensaios apresentem diferentes desenhos de estudo (preparação do imunógeno, desenho do ensaio, acompanhamento imunológico), a maioria mostrou algum grau de resposta imune relacionada com o controle da carga viral plasmática, embora com uma grande variabilidade individual na resposta (GARCIA; ROUTY, 2011).

Tabela 1 - Ensaios clínicos baseados em imunoterapia com células dendríticas em indivíduos HIV+

Ensaio clínico	Sujeitos (n)	Tratamento	DCs	Maturação DCs	Antígeno de HIV	Rota	Resposta virológica	Resposta imunológica
Kundu, <i>et al.</i> , 1998	6	naive	2 – 8x10 ⁶	-	rHIV-1 MN gp160 ou gag, pol e env	IV 6 -9 doses	CV sem alteração	CTL
Lu, <i>et al.</i> , 2004	18	naive	3x10 ⁷	IL-1β, IL-6 e TNF-α	10 ⁹ HIV inativado AT-2	SC 3 doses	Queda CV (0,71log)	Aumento de TCD4 ⁺ e CTL
García, <i>et al.</i> , 2005	18	TARV	10 ⁶	IFN-α	10 ⁹ HIV inativado calor	SC 4 doses	CV sem alteração	Aumento de TCD4 ⁺ e CTL
Ide, <i>et al.</i> , 2006	4	TARV	0,7 – 1,8x10 ⁷	TNF-α	Peptídeos (gag, nef e env)	SC 6 doses	CV sem alteração	CTL
Connolly, <i>et al.</i> , 2008	18	TARV	9,1x10 ⁷	IL-1β, IL-6 e TNF-α	Peptídeos (gag, pol e env)	IV, SC 2 doses	TARV	CTL
Gandhi, <i>et al.</i> , 2009	29	TARV	1,5 – 6x10 ⁶	IL-6, IL-1β, TNG-α e PGE ₂	Vetor viral + peptídeos (gag, pol e env)	SC 3 doses	CV sem alteração	CTL
Kloverpris, <i>et al.</i> , 2009	12	naive	10 ⁷	IL-1β, IL-6, TNF-α e PGE ₂	Pool de peptídeos	SC 4 doses	CV sem alteração	-
Routy, <i>et al.</i> , 2010	10	TARV	10 ⁷	TNF-α, IFN-γ e PGE ₂	Peptídeos (gag, Vpr, rev e env)	ID 4 doses	TARV	TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ HIV-específicos
García, <i>et al.</i> , 2011	24	naive	8x10 ⁶	IL-1β, IL-6 e TNF-α	10 ⁹ HIV inativado calor	SC 3 doses	Queda CV (0,5log)	TCD8 ⁺ HIV-específicos
Routy, <i>et al.</i> , 2011	29	TARV	10 ⁷	TNF-α, IFN-γ e PGE ₂	Peptídeos (gag, Vpr, =rev e env)	ID 4 doses	Queda CV	CTL
García, <i>et al.</i> , 2013	23	TARV	10 ⁷	IL-1β, IL-6, TNF-α e PGE ₂	10 ⁹ HIV inativado calor	3 doses ID/SC	Queda CV	Aumento de TCD4 ⁺ CD38 ⁺

TARV: terapia antirretroviral; IV intravenosa; SC: subcutânea; ID: intradérmica; CV: carga viral; CTL: linfócitos T citotóxicos. (CONNOLLY *et al.*, 2008; GANDHI *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2005; IDE *et al.*, 2006; KLOVERPRIS *et al.*, 2009; KUNDU *et al.*, 1998; LU *et al.*, 2004; ROUTY *et al.*, 2010) Adaptado de (GARCIA; ROUTY, 2011).

Dentre esses estudos, um exemplo expressivo foi demonstrado por Lu *et al.* (2004). No entanto, antes disso o mesmo grupo (LU *et al.*, 2003) mostrou que uma vacina terapêutica constituída por DC pulsadas com SIV (do inglês, *Simian Immunodeficiency Virus*) inativado foi capaz de estimular uma resposta celular e humoral efetiva em macacos, promovendo o controle da replicação viral nos tecidos linfoides secundários e a redução da carga viral.

Posteriormente esse mesmo grupo, em colaboração com pesquisadores da UFPE, desenvolveu um ensaio clínico de fase I vacinando 18 pacientes brasileiros (procedentes da região metropolitana de Recife, PE) cronicamente infectados pelo HIV-1 (HIV+), sem uso de tratamento antirretroviral, com DC autólogas pulsadas *in vitro* com HIV-1 autólogo quimicamente inativado por aldrithiol-2 (LU *et al.*, 2004; ROSSIO *et al.*, 1998). Nesta primeira fase, 15 dos 18 indivíduos vacinados apresentaram uma desaceleração na progressão

da doença. Além disso, após um ano de tratamento 8 de 18 indivíduos apresentaram uma prolongada redução na carga viral plasmática, correlacionada a uma vigorosa resposta imune celular, com ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+, traduzida inclusive por um aumento dos linfócitos T CD4+ circulantes. O declínio da carga viral dos pacientes foi significativamente correlacionado com a expressão de perforina nas células T CD8+ HIV-1 gag-específicas e das células CD4+ T *helper* HIV-1-específicas (LU et al., 2004).

A segunda fase desse ensaio clínico (LU et al., 2004) foi desenvolvida pelo grupo da Dra. Telma M Oshiro do Laboratório de Investigação Médica/LIM-56 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/FMUSP liderado pelo Prof. Alberto JS Duarte. Nesse ensaio clínico foram vacinados outros 19 pacientes HIV+ brasileiros procedentes da região metropolitana de São Paulo. Além da vacinação terapêutica e acompanhamento clínico, estão ainda em andamento projetos de pesquisas relacionados que pretendem investigar várias questões relacionadas à utilização da vacina em pacientes HIV+. Dentre elas, a parcialidade da resposta entre os indivíduos vacinados observada na fase I, ou seja, o porquê de alguns pacientes terem um perfil de bom ou mau respondedor ao tratamento e quais fatores poderiam influenciar o resultado da terapia. A descrição de novos marcadores moleculares sugestivos da capacidade de resposta a esse tipo de tratamento também está sendo investigada.

O perfil de bom ou mau respondedor pode depender de vários fatores, como a qualidade da DC obtida *in vitro* a partir da diferenciação de monócitos do sangue periférico (perfil fenotípico, viabilidade, ativação completa e eficaz) e a habilidade do próprio sistema imune do paciente em ser ativado por essa DC manipulada. Considerando que a resposta imune dos indivíduos ao HIV é amplamente comprometida pela própria infecção, questões sobre a responsividade à vacina baseada em DC são estritamente correlacionadas com a habilidade de cada indivíduo em conter a infecção. Nesse sentido, informações sobre o histórico clínico do paciente HIV+ (carga viral plasmática/CVP, contagem de CD4+), assim como marcadores moleculares ainda desconhecidos podem ser úteis na seleção de possíveis indivíduos beneficiados com esse tipo de intervenção.

Enquanto o grupo da Dra. Telma Oshiro está pesquisando aspectos celulares da resposta à vacina, o nosso grupo está mais focado na caracterização do perfil genômico dessa resposta.

1.1 Fatores genéticos associados à infecção ao HIV-1 e progressão à AIDS

A identificação de genes que afetam a susceptibilidade e resistência ao HIV-1 pode ser a chave para descobrir importantes interações HIV-hospedeiro para o desenvolvimento de

tratamentos e vacinas.

Um exemplo disso ocorreu em 1996 quando foi descrita uma deleção de 32 pares de bases no gene do receptor de quimiocina tipo 5 CCR5 (CCR5 Δ 32) que confere proteção contra a infecção pelo HIV em homozigotos (DEAN et al., 1996; O'BRIEN; NELSON, 2004). Essa foi a primeira evidência convincente de que a transmissão de cepas de HIV, preferencialmente utiliza o correceptor CCR5 para entrada de célula. O que levou ao desenvolvimento de uma nova classe de medicamentos anti-HIV que inibe a entrada do vírus na célula (DEAN et al., 1996). Recentemente, um paciente HIV-1-positivo foi curado após o transplante de células tronco CCR5 Δ 32/ Δ 32 (HÜTTER et al., 2009). Esse caso isolado ilustra o potencial da pesquisa em genética translacional no combate ao HIV/AIDS.

Nos últimos anos tem sido intensificada a busca por fatores genéticos de restrição a infecção pelo HIV, dado que 30 anos após a descoberta do HIV ainda não se tem uma vacina eficaz. Ao contrário do HIV que pode desenvolver resistência através de mutações de escape, os hospedeiros são geneticamente estáveis e, por isso consistem em bons alvos de estudo.

Usando uma combinação de Análise de Gene Candidato (CGA) e Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS) foram identificadas variantes genéticas entre indivíduos infectados que explicam, em parte, a variação observada na susceptibilidade a HIV-1/AIDS. Estes genes são principalmente divididos em três classes: imunidade inata e adaptativa, fatores intrínsecos de restrição antiviral e fatores de dependência do HIV exigidos pelo HIV para replicação (AN; WINKLER, 2010).

A entrada do HIV-1 nas células é influenciada por várias interações com receptores e ligantes. Amplamente investigados, os receptores de quimiocinas e os seus ligantes desempenham um papel-chave na entrada do HIV nas células. O HIV-1 entra nas células CD4+ através da ligação a um dos dois principais correceptores: CCR5 utilizado por cepas transmitidas de HIV-1 (R5), ou CXCR4 utilizado por cepas X4 que surgem em cerca de 50% dos indivíduos durante a infecção tardia (MURAKAMI; YAMAMOTO, 2010).

Os polimorfismos no receptor de quimiocina CCR5 e a variação do número de cópias do gene que codifica o seu ligante (CCL3L1), importante para a função de supressão do HIV, são determinantes da susceptibilidade ao HIV-1/AIDS (GONZALEZ et al., 1999; MANGANO et al., 2001). As variações em *CCL3L1* e *CCR5* são classificadas como grupos de risco genético baixo, moderado e alto e podem interferir na patogênese da infecção pelo HIV. Essa interferência pode influenciar parâmetros que são dependentes da entrada viral (por exemplo, a carga viral plasmática) e os parâmetros que são independentes da entrada viral (por exemplo, resposta imune do hospedeiro) (DOLAN et al., 2007). As quimiocinas CCL5

(RANTES), CCL3 (MIP-1 α) e CCL4 (MIP-1 β) são ligantes do CCR5 e R5, inibindo competitivamente a entrada de HIV R5 nas células. CXCL12 (SDF-1) é ligante de CXCR4 e influencia a entrada do vírus HIV X4. Polimorfismos nos genes *CCL5* e *SDF-1* também foram respectivamente associados com a rápida e lenta progressão para AIDS (AN et al., 2002; WINKLER et al., 1998).

O HIV-1 utiliza os mecanismos de reconhecimento de patógenos do sistema imune para entrar na célula. As variações em receptores da imunidade inata como DC-SIGN/CD209, expresso pelas DC; MBL2, receptor solúvel responsável pela ativação do sistema do complemento e da fagocitose, e peptídeos antimicrobianos como as defensinas influenciam a entrada do vírus nas células e consequentemente a susceptibilidade ao HIV-1 e a taxa de progressão da doença (BONIOTTO et al., 2003; JI; GEWURZ; SPEAR, 2005; MILANESE et al., 2006).

Uma vez que o HIV-1 ganha acesso à célula alvo, outros mecanismos citoplasmáticos entram em ação, tais como as proteínas da família de citidinas deaminase APOBEC3G, proteínas envolvidas na ubiquitinação (cullin 5/CUL5, TRIM5) (AN; WINKLER, 2010) e receptores intracelulares que podem mediar a ativação de uma resposta imune inflamatória, como foi recentemente demonstrado para o *Nod-Like Receptor-3* (NLRP3) pelo nosso grupo de pesquisa (PONTILLO; SILVA; et al., 2012). Polimorfismos nestes genes também foram avaliados em relação a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e a progressão à AIDS (AN; WINKLER, 2010; PONTILLO et al., 2010; PONTILLO; OSHIRO; et al., 2012).

A resposta imune inflamatória responsável pela restrição da infecção também é afetada por variações genéticas em genes de citocinas e/ou receptores *IL1B*, (PONTILLO; OSHIRO; et al., 2012) *IL10*, *IFN γ* , *IRF-1*, *CXCR1* (AN; WINKLER, 2010).

A intersecção entre a imunidade inata e adquirida manifesta-se por efeitos interativos de HLA e dos receptores KIR das células *natural killer* (NK) sobre o HIV. Os alelos HLA de classe I (HLA-1) foram os primeiros fatores genéticos do hospedeiro identificados na susceptibilidade à AIDS. Genes do complexo HLA I codificam moléculas da superfície celular que apresentam diferencialmente epítomos antigênicos do vírus para os linfócitos T CD8 + citotóxicos (CTL). Alelos específicos de HLA-I, através da diferente ligação de epítomos do HIV, influenciam a eficácia da resposta do sistema imunológico, afetando assim a progressão à AIDS (CARRINGTON; MARTIN; VAN BERGEN, 2008; CARRINGTON; O'BRIEN, 2003). A morte das células infectadas mediada por CTL CD8+, após o reconhecimento de epítomos de HIV apresentados por receptores HLA-I, é essencial para o controle imunológico do HIV. Por outro lado mutações dos epítomos permitem ao HIV escape

deste controle. Homozigotos para HLA-I A, B, C, que reduzem o repertório de reconhecimento de epítomos (CARRINGTON et al., 1999; TANG et al., 2008), e o alelo B*35-Px, que reduz a força de ligação pelo epítomo (GAO et al., 2001), aceleram a progressão à AIDS. Do mesmo modo que a concordância de HLA-I limita o repertório de epítomos apresentados, também aumenta a transmissão do vírus (MACKELPRANG et al., 2008). Ao contrário, os alelos B*27 e B*57 impedem o escape imune do HIV e desaceleram a progressão à AIDS (CARRINGTON et al., 2008).

Uma estratégia de adaptação apresentada pelo HIV e outros vírus é a de regular negativamente a expressão de HLA-I, bloqueando assim a apresentação de epítomos virais e impedindo a lise das células infectadas pelos CTL. Uma função das células NK para contrariar esta estratégia é reconhecer e eliminar células que deixam de exibir níveis corretos de HLA-I através dos receptores KIR. Variações nos genes *KIR* também foram associadas com a progressão à AIDS (AN; WINKLER, 2010).

A susceptibilidade genética à infecção pelo HIV- 1 e à progressão da doença foi estudada por vários pesquisadores para identificar genes que poderiam modular as etapas da infecção viral e replicação, tentando esclarecer a variabilidade interpessoal da infecção pelo HIV-1. Na realidade, as consequências clínicas da exposição viral são variáveis, mostrando que alguns indivíduos podem ser repetidamente expostos ao vírus e permanecerem livres da infecção, ou podem ser infectados e manter-se sem manifestações clínicas da doença. Outros são infectados e rapidamente progridem para a AIDS. A susceptibilidade e a evolução da infecção pelo HIV são fenômenos complexos, resultado da interação de fatores ambientais e das informações genéticas do hospedeiro (CHATTERJEE et al., 2012).

1.2 Perfil genômico de pacientes HIV+ e resposta à vacina

Apesar de que as vacinas profiláticas sejam amplamente utilizadas na prática clínica, o conhecimento dos mecanismos subjacentes à indução de uma resposta imune protetora é ainda limitado. Nas últimas décadas a grande atenção sobre os componentes da imunidade inata e seu papel em dirigir a resposta imune adaptativa trouxe novo conhecimento sobre as ferramentas utilizadas pelo sistema imune para o reconhecimento de patógenos e a ativação duradoura e específica de linfócitos T e/ou B promovida por uma vacina (CHATTERJEE et al., 2012).

A biologia de sistemas (*systems biology*) oferece uma visão integrada dos mecanismos e das interações que acontecem na resposta à uma vacina considerando os três elementos

biológicos envolvidos: a vacina, a imunidade inata e a imunidade adaptativa. Esse tipo de análise é baseada em vários níveis: genética, transcriptômica e proteômica, cada um fornecendo uma “assinatura” do hospedeiro em resposta à uma vacina. O estudo dessas “assinaturas” biológicas, individualmente ou integradas, pode fornecer uma ferramenta potente para uma análise multiparamétrica de predição da imunogenicidade de uma vacina. A análise de polimorfismos genéticos representa um nível deste estudo complexo de fatores envolvidos na resposta do hospedeiro a antígenos, e consequentemente a resposta à uma vacina. Os polimorfismos podem afetar as proteínas do sistema imune ou a sua expressão e, deste modo, afetar também interações patógeno-hospedeiro e vias de sinalização molecular. Por exemplo, polimorfismos nos genes *Toll-Like Receptors (TLRs)*, receptores da imunidade inata envolvidos no reconhecimento de patógenos extra e intracelulares, foram associados à susceptibilidade à bactéria gram-negativa, a vírus como sarampo e rubéola e também a resposta à vacina contra sarampo, rubéola e pertussis (BUONAGURO; PULENDRAN, 2011).

Enquanto muita atenção tem sido dada para elucidar o impacto do genoma viral na propagação do HIV-1 e no desenvolvimento de uma vacina contra o HIV-1, pouco se sabe sobre o impacto de fatores do hospedeiro sobre esses eventos.

Apesar disso, alguns trabalhos tem sugerido uma relevante contribuição da genética do hospedeiro na propagação da infecção pelo HIV-1. Alguns autores sugeriram que as variações genéticas (ex. polimorfismos em *CCR5*, *CCL3L1*, *DC-SIGN*, *HLA-I*, *APOBEC3G*, *TRIM5*, *MBL2*, *DEFB1*, *NLRP3*) relacionadas com a susceptibilidade a infecção pelo HIV-1 e/ou com a progressão à AIDS poderiam estar associadas também a uma resposta diferencial a uma vacina anti-HIV-1 (BAKER et al., 2009). Além disso, a determinação da frequência destes alelos/genótipos de risco poderia ser utilizada para avaliar a eficácia de uma vacina numa população.

Através de um modelo matemático, Kulkarni e colaboradores (KULKARNI et al., 2008) propuseram que polimorfismos nos genes *CCR5* (principal correceptor do HIV - 1) e *CCL3L1* (ligante do CCR5 e quimiocina supressiva do HIV-1) seriam os determinantes mais conhecidos da susceptibilidade a HIV/AIDS e que poderiam afetar a eficácia de uma vacina contra o HIV-1. Partindo da mesma hipótese, Fellay (FELLAY et al., 2011) avaliou os determinantes genéticos específicos da resposta dos linfócitos T nos indivíduos do ensaio clínico da vacina MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef. Apesar de não atingir resultados estatisticamente significantes, esse estudo indicou alguns polimorfismos no complexo HLA de classe I como possivelmente associados com a resposta dos linfócitos T a proteína HIV-

gag.

Para tentar explicar as diferenças encontradas nos 18 pacientes HIV+ submetidos à primeira fase da vacina baseada em DC autólogas pulsadas com HIV-1 autólogo inativado (ensaio clínico com a coorte de Recife de Lu e colaboradores em 2004) (LU et al., 2004), o nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o Laboratório de Variabilidade Genética Humana da UFPE liderado pelo Prof. Sergio Crovella, participou do estudo genético ao caracterizar geneticamente a capacidade dos indivíduos de responder ou não ao tratamento.

Inicialmente os 18 indivíduos do ensaio clínico foram genotipados para 768 polimorfismos de base única (SNPs) distribuídos em 146 genes envolvidos na resposta imune. Esse estudo de associação mostrou que genes da resposta imune (*PLCB1*, *RHOC*, *ROCK1*, *NOS2A*, *PIK3R1*, *CCL7*, *IL4*), e especialmente da imunidade inata, *MBL2* e *NOS1*, estavam relacionados com a resposta à vacina, ou seja com a diminuição da carga viral plasmática (SEGAT et al., 2010).

Em seguida, outros dois trabalhos mostraram que o fator *CNOT1*, envolvido no controle pós-transcricional de genes inflamatórios e na replicação do HIV-1, estaria associado à resposta vacinal (MOURA et al., 2014), assim como o gene *PARD3B*, que codifica um dos fatores de restrição viral (PONTILLO et al., 2014).

Esses resultados sugerem que os pacientes HIV+ submetidos à primeira fase da vacina eram possivelmente indivíduos que conseguiam controlar a carga viral plasmática ao menos temporariamente. Assim, é possível que, entre estes indivíduos, alguns pudessem ter um genoma pouco suscetível ao HIV-1. Uma possível explicação da resposta à vacina de alguns pacientes HIV+ seria a presença de variações genéticas pouco “permissivas” à infecção/progressão a AIDS.

1.3 Genômica funcional / transcriptômica

A genômica funcional pode responder a outras questões em aberto sobre a imunoterapia, entre elas duas se destacam: o perfil de expressão gênica pode ser utilizado para avaliar a qualidade e funcionalidade das DC utilizadas na vacina? O estudo da variação na expressão gênica antes e após a vacina possibilitaria definir alguns marcadores específicos de resposta?

Em ensaios clínicos, o sucesso da utilização de células dendríticas em vacinas terapêuticas pode ter sido limitado, o que pode ser atribuído a uma falta de marcadores da qualidade das DC utilizadas. Vários grupos de pesquisa tentaram identificar marcadores de

funcionalidade das DC através do estudo do perfil de expressão gênica das DC estimuladas com diferentes antígenos, porém os dados são heterogêneos e dependentes do modelo (humano ou murino) e do desenho experimental utilizado (tabela 2).

Tabela 2 - Estudos baseados no perfil transcricional de células dendríticas

Estudo	Células e estímulos	Perfil de expressão	Metodologia
TORRI et al., 2010	DC murinas ativadas com estímulos pró-inflamatórios	<i>IL6</i> , <i>IL12B</i> , <i>IL1B</i> , <i>CCL22</i> , <i>CD40</i> , <i>CD83</i> , <i>CD86</i> , <i>ICAM1</i> , <i>CCR7</i> , <i>STAT5A</i> , <i>IRF8</i>	Affymetrix mouse MG-U74Av2 GeneChip
TUANA et al., 2011	DC de camundongo inflamada	<i>IL12B</i> , <i>CD40</i> e <i>SOCS3</i>	Affymetrix mouse array
LIU et al, 2012	DC humanas imaturas/pulsadas com antígenos tumorais	genes de TLRs, MHC de classe II	Illumina human HT12-v3
PONTILLO; SILVA; et al., 2012	DC diferenciadas a partir de monócitos de pacientes infectados pelo HIV	expressão basal de componentes do inflamassoma e de <i>IL-1β</i>	Ensaio Taqman
ARICO et al., 2005; BUONAGURO et al., 2008	DC pulsadas com partículas semelhantes ao vírus HIV-1 Pr55gag (HIV-VLPs)	genes envolvidos no controle celular (proliferação, diferenciação, migração e homeostase), apresentação de antígeno ($\beta 2$ microglobulina) e ativação de células T (IFN- γ , IL-18).	Microarray

Dentre esses estudos, o grupo de Torri identificou um perfil de expressão de DC murinas ativadas com estímulos pró-inflamatórios (TORRI et al., 2010) caracterizado pelos genes *IL6*, *IL12B*, *IL1B*, *CCL22*, *CD40*, *CD83*, *CD86*, *ICAM1*, *CCR7*, *STAT5A*, *IRF8* (Affymetrix mouse MG-U74Av2 GeneChip). Tuana e colaboradores (TUANA et al., 2011) reportaram que os genes *IL12B*, *CD40* e *SOCS3* são informativos para identificar uma DC inflamada em camundongo (Affymetrix mouse array).

Liu e colaboradores avaliaram a expressão de DC humanas imaturas ou pulsadas com antígenos tumorais por meio de microarray “*whole-genome*” (Illumina human HT12-v3) com

o objetivo de determinar um perfil genético das DC que poderia ser utilizado para prever a capacidade de resposta a estímulos tumorais. Os resultados mostraram que as DC podem ser divididas em dois grupos, com base na sua capacidade de aumentar os marcadores co-estimuladores e de desencadear respostas de células T. O perfil de uma DC de qualidade seria caracterizado por uma expressão diferencial de genes envolvidos na resposta imune inata e inflamatória, como os TLRs, e na apresentação do antígeno aos linfócitos T CD4+, como MHC de classe II.

Análises transcricionais de células alvos (TCD4, macrófagos) além de outras células (NK, linfócito B, DC) do HIV-1 revelaram a intensa modulação de genes envolvidos na desregulação imune, susceptibilidade à apoptose, replicação e persistência viral quando submetidas *in vitro* ou *in vivo* à exposição pelo HIV-1 ou por suas proteínas acessórias, colaborando no entendimento da correlação funcional da modulação genética na patogênese do HIV-1 *in vivo* (GIRI et al., 2006).

Os efeitos do HIV-1 na maturação das DC são controversos, com vários dados conflitantes na literatura.

O nosso grupo recentemente demonstrou que as DC diferenciadas a partir de monócitos de pacientes infectados pelo HIV apresentam um perfil de inflamação crônica com uma elevada expressão basal de componentes do inflamassoma e de *IL-1 β* , entretanto pouco responsivo ao pulso com HIV inativado (PONTILLO; SILVA; et al., 2012). Considerando o papel importante do inflamassoma e da *IL-1 β* na ativação das DC, este dado enfatizou a condição inflamatória dos pacientes HIV+, abrindo a questão sobre a utilização destas células em protocolos de imunoterapia.

Genes que codificam fatores de transcrição, fatores relacionados à apoptose, proteínas induzidas por estresse e proteínas antivirais foram descritos como diferencialmente expressos em DC imaturas tratadas com HIV ou transfectadas com o vetor adeno-Tat revelando um novo papel da proteína Tat na reprogramação da expressão genética que favorece a expansão da infecção viral (Affymetrix HU6800 array) (IZMAILOVA et al., 2003).

Alguns pesquisadores (ARICO et al., 2005; BUONAGURO et al., 2008) avaliaram o efeito das partículas semelhantes ao vírus HIV-1 Pr55gag (HIV-VLPs) sobre o perfil transcricional das DC, mostrando que elas são capazes de ativar as DC ao estimular a expressão de genes envolvidos no controle celular (proliferação, diferenciação, migração e homeostase), assim como na apresentação de antígeno (β 2 microglobulina) e ativação de células T (*IFN- γ* , *IL-18*).

Genes que codificam marcadores de maturação de DC são aqueles mais

diferencialmente expressos nas DC tratadas com HIV-1 vivo ou inativado com aldrithiol-2. O HIV-1 vivo estimularia mudanças maiores na expressão superficial dos marcadores de maturação quando comparado ao HIV-1 inativado. Provavelmente o HIV-1 inicia a maturação das DC o que pode agilizar uma transferência do vírus para os linfócitos T (HARMAN et al., 2006). Além disso, dependendo da via de infecção do HIV-1 (endocitose ou replicação intracelular) o perfil de expressão gênica na DC é diferente (HARMAN et al., 2009).

No contexto de uma vacina terapêutica aplicada a pacientes HIV+ vale salientar que até o presente nenhum estudo focou a atenção na caracterização de um perfil transcriptômico das DC, sobretudo em relação à resposta ao tratamento. Do mesmo modo, a literatura carece de uma avaliação das diferenças de expressão gênica em leucócitos circulantes antes e após a vacina.

Logo a hipótese principal do trabalho é se o perfil imunogenético de um indivíduo HIV+ pode afetar, conjuntamente a outros fatores (virais, ambientais), a resposta do mesmo à vacina terapêutica contra HIV-1. O aprofundamento destes aspectos, além de ser importante para a patogênese da infecção, é de grande interesse para identificar alguns marcadores genéticos de resposta à vacina. Sendo assim, os produtos deste trabalho serão de alta relevância e espera-se ao final comprovar a hipótese principal e, com isso, gerar subsídios técnicos necessários para a identificação e validação de marcadores genéticos de resposta à vacina terapêutica contra o HIV-1. Este trabalho poderá contribuir para o esclarecimento de alguns aspectos da resposta à vacina que ainda não foram investigados, e fornecer informações adicionais no contexto dos outros projetos em desenvolvimento no nosso laboratório em colaboração com o grupo coordenado pela Dra. Telma Oshiro, sob chefia do Prof. Alberto Duarte do laboratório LIM-56 da Faculdade de Medicina da USP.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a contribuição do perfil genético em pacientes HIV+ submetidos à imunoterapia no ensaio de fase I/II (FMUSP) e relacionar estes aspectos com a resposta ao tratamento.

2.2 Específicos

- 1 Avaliar a expressão de genes envolvidos na resposta a HIV-1 durante as etapas de diferenciação *in vitro* de monócitos-DC;
- 2 Avaliar a expressão de genes envolvidos na resposta ao HIV-1 e/ou a resposta à vacina em leucócitos isolados antes e após o tratamento;
- 3 Replicar o estudo de associação entre os polimorfismos nos genes de restrição ao HIV e a resposta à imunoterapia no ensaio de fase I/II.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística do ensaio clínico de imunoterapia

No desenvolvimento desse trabalho foi utilizado o material biológico dos pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1 submetidos à imunoterapia de acordo com o ensaio clínico de fase I/II e desenvolvido entre 2013 e 2014 no Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Resumidamente, 19 pacientes adultos e soropositivos (HIV+) há no mínimo 5 anos foram selecionados para submeter-se à imunoterapia. Como critério de inclusão deveriam apresentar contagem de células T CD4+ acima de 350 células/ μ L e carga viral plasmática (CVP) acima de 1000 cópias/ mL, sem variação significativa (25% do número absoluto de células T CD4+ e $> 0.5 \log_{10}$ (CVP) nos 6 meses anteriores à imunoterapia. Além disso, os pacientes deveriam ser virgens de tratamento antirretroviral. Foram excluídos do ensaio clínico mulheres grávidas, indivíduos com neoplasias ou infecções oportunistas até 6 meses antes, doenças autoimunes e imunodeficiências primárias. Os indivíduos selecionados foram submetidos à aférese para obtenção de uma quantidade de leucócitos suficiente tanto para o cultivo do vírus autólogo quanto para a preparação das DC do produto vacinal. Em seguida, as células mononucleadas do sangue periférico (PBMC, do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear cells*) foram separadas por meio de gradiente de densidade com Ficoll/Paque™ (GE Healthcare, Inglaterra) congeladas em 90 % de SBF e 10% de DMSO e posteriormente guardadas em nitrogênio líquido até o momento de serem utilizadas para obtenção *in vitro* das DC do produto vacinal.

Os 19 pacientes foram randomizados em 3 grupos, de acordo com a dose ou o tipo de DC administrada, sendo:

- grupo 1: 3×10^7 DC (grupo controle, inexistente no ensaio anterior (LU et al., 2004))
- grupo 2: 3×10^6 DC pulsadas com HIV-1 (inexistente no ensaio anterior (LU et al., 2004))
- grupo 3: 3×10^7 DC pulsadas com HIV-1 (réplica do ensaio anterior (LU et al., 2004))

A dose indicada para cada grupo foi administrada 3 vezes num intervalo de 2 semanas.

Os pacientes tratados foram acompanhados por até 6 meses após a aplicação da primeira dose. Os pacientes que tiveram que iniciar o tratamento antirretroviral devido a queda na contagem de CD4+ foram excluídos do estudo.

Os indivíduos incluídos na imunoterapia são pacientes acompanhados no Ambulatório ADEE - 3002 do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.2 Desenho do estudo

No desenho do estudo geral (figura 1), os focos de análises consistiam tanto no material utilizado na preparação da vacina terapêutica (monócitos e células dendríticas da etapa de manipulação *in vitro*) quanto nos PBMC isolados dos pacientes incluídos no ensaio clínico de fase I/II antes e após a administração da vacina, assim como a genotipagem de polimorfismos nos genes de restrição do HIV ou nos genes previamente associados à resposta a imunoterapia.

Figura 1 - Representação esquemática do trabalho. Os 19 pacientes foram classificados em 3 grupos, de acordo com a dose de vacina recebida/não. Foi feito para cada paciente o isolamento de monócitos para a diferenciação de DC e o isolamento do HIV do paciente para pulso das DC com o vírus inativado por AT-2 (aldrithiol-2). Em seguida foi visto o perfil de expressão para todas as etapas de manipulação *in vitro*. Por fim, a coleta de leucócitos dos pacientes antes e durante o seguimento vacinal para ver o perfil de expressão e análise do perfil genômico. Esses resultados foram correlacionados com a resposta à imunoterapia dos pacientes (bom e mau respondedor).

3.3 Casuística utilizada nesse projeto

Dos 19 pacientes submetidos à vacina terapêutica, quatro foram excluídos ao longo do acompanhamento e os dois controles (grupo 1) não representavam interesse em relação ao nosso estudo. Dos 13 indivíduos tratados que completaram o acompanhamento, tivemos a oportunidade de avaliar a expressão gênica e a frequência de polimorfismos selecionados em 11 (Figura 2). O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Parecer 1150/CEP) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP CAPPesq (0791/09).

Figura 2 - Esquema dos pacientes HIV+ incluídos no ensaio clínico e dos indivíduos estudados nesse trabalho

Os PBMC derivados de 6 pacientes (P1-P6) foram utilizados para o estudo de expressão gênica durante o protocolo de diferenciação monócitos-DC (objetivo 1 – resultados parte I). Esses indivíduos foram selecionados com base na disponibilidade de material biológico, sendo que a demanda de PBMC para obtenção do produto vacinal foi grande e o rendimento da aférese muito variável entre os pacientes.

Os PBMC de 6 pacientes (P6-P11) coletados antes e após a vacina, foram utilizados para o estudo da expressão gênica de resposta à vacina (objetivo 2 – resultados parte II).

Nesse caso, foram selecionados pacientes que teoricamente poderiam ter mais chance de responder ao tratamento (grupo 3: P6, P8-P11) ou que estavam respondendo ao tratamento após as primeiras semanas da vacina (P7 do grupo 2).

O DNA genômico dos 11 pacientes (P1-P11) foi isolado a partir dos PBMC coletados antes do tratamento.

Os dados demográficos (idade, sexo) e clínicos principais (CVP, contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+) dos pacientes estudados são reportados na tabela 3.

Tabela 3 – Dados demográficos e clínicos dos pacientes HIV+ estudados

PACIENTE	GRUPO	IDADE	SEXO	CVP (cópias de RNA/ mL; log ₁₀ (CVP))	CD4+ (células/ µl)	CD8+ (células/ µl)
P1	2	40	M	21420; 4.3	566	776
P2	2	35	M	38295; 4.6	500	1100
P3	2	27	M	5003; 3.7	502	1139
P4	2	24	M	24530; 4.4	569	868
P5	2	23	M	1342; 3.1	684	822
P6	3	39	F	3429; 3,5	480	1371
P7	2	27	M	400450; 5.6	353	877
P8	3	30	M	5121; 3.7	376	490
P9	3	38	M	59152; 4.8	471	1212
P10	3	35	F	16168; 4.2	580	1536
P11	3	30	M	15789; 4.2	423	785

Abreviações: M= masculino, F= feminino; CVP=carga viral plasmática; CD4+= linfócitos T CD4+; CD8+= linfócitos T CD8+.

Os dados relacionados com a variação de CVP e de níveis plasmáticos de linfócitos T CD4+ e CD8+ após a imunoterapia são reportados na tabela 4.

Tabela 4- Diferenças de CVP e dos níveis de linfócitos T após a imunoterapia

Tempos após o tratamento/ Dados clínicos	Pacientes HIV+										
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
<i>t1- 15 dias</i>											
$\Delta\text{CVP} (\log_{10}(\text{CVP}))$	0,24	0,04	0,2	0,14	0,19	0,32	-0,42	-0,41	0,01	0,43	-0,08
$\Delta\text{CD4+} (\text{células}/ \mu\text{l})$	-156	-103	-40	-213	50	-100	125	17	106	36	-82
$\Delta\text{CD8+} (\text{células}/ \mu\text{l})$	-144	-260	-64	-237	94	-257	213	2	160	163	-26
<i>t2- 30 dias</i>											
$\Delta\text{CVP} (\log_{10}(\text{CVP}))$	0,23	-0,15	0,04	-0,04	0,64	0,08	-1,09	-0,39	-0,38	0,38	0,58
$\Delta\text{CD4+} (\text{células}/ \mu\text{l})$	-94	-233	-14	-138	96	-138	162	-86	113	-82	-5
$\Delta\text{CD8+} (\text{células}/ \mu\text{l})$	-208	-402	-152	-159	140	-343	201	-50	33	-281	25
<i>t3 – 45 dias</i>											
$\Delta\text{CVP} (\log_{10}(\text{CVP}))$	0,32	0,03	0,2	0,64	0,24	-0,02	-1,49	-0,74	-0,35	0,24	0,46
$\Delta\text{CD4+} (\text{células}/ \mu\text{l})$	-24	-204	-32	-196	103	-86	133	-67	9	63	6
$\Delta\text{CD8+} (\text{células}/ \mu\text{l})$	-23	-354	-176	-219	181	-185	468	32	-81	48	32
<i>2 meses</i>											
$\Delta\text{CVP} (\log_{10}(\text{CVP}))$	0,33	-0,13	0,13	-0,04	0,03	0,13	-1,46	-	-0,04	0,43	0,83
$\Delta\text{CD4+} (\text{células}/ \mu\text{l})$	-66	-237	88	-163	117	-60	111	-376	74	44	-33
$\Delta\text{CD8+} (\text{células}/ \mu\text{l})$	-123	-442	150	58	332	-221	86	-490	-147	-35	40
<i>6 meses</i>											
$\Delta\text{CVP} (\log_{10}(\text{CVP}))$	0,46	-0,05	0,02	-0,13	-0,2	0,18	-3,83	-0,24	-0,08	0,39	0,44
$\Delta\text{CD4+} (\text{células}/ \mu\text{l})$	67	-87	57	-125	69	-69	267	12	-235	49	33
$\Delta\text{CD8+} (\text{células}/ \mu\text{l})$	109	-163	-89	10	-39	-422	-71	105	-869	78	63

Abreviações: ΔCVP = diferença da carga viral plasmática de t1, t2, t3, t4, t5, t6 – t0; $\Delta\text{CD4+}$ = diferença da contagem de linfócitos T CD4+ de t1, t2, t3, t4, t5, t6 – t0; $\Delta\text{CD8+}$ = diferença da contagem de linfócitos T CD8+ de t1, t2, t3, t4, t5, t6 – t0;

3.4 Obtenção de vírus HIV-1 inativado

A obtenção de vírus inativado por aldrithiol-2 (AT-2, Sigma-Aldrich, MO, EUA) foi realizada conforme protocolo descrito na literatura, a fim de se preservar intacta a conformação nativa do vírus e a atividade da gp120 em se fundir à célula (LU et al., 2004; ROSSIO et al., 1998). Para isso, os PBMC dos pacientes HIV+ foram estimulados com fitohemaglutinina e IL-2 e co-cultivados com células T CD4+ do mesmo indivíduo, previamente depletados de células T CD8+. Os isolados virais foram inativados com 250 μM de AT-2 por 1 hora a 37 °C.

3.5 Obtenção de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos

Os monócitos foram obtidos a partir de PBMC dos pacientes HIV+ (previamente isolados por aférese e congelados) por adesão em placa de cultura por 2h e, após lavagem, cultivados a $1.5 - 2 \times 10^6$ / ml em meio de cultura AIM-V (Gibco, Life Technologies, EUA). A diferenciação em DC foi obtida com cultivo dos monócitos em AIM-V na presença de 50 ng/ mL de IL-4 (Cell Genix, EUA) e 50 ng /mL de GM-CSF (Cell Genix) por 5 dias. No 5º dia de cultura as DC imaturas (iDC) foram pulsadas com HIV-1 inativado (1×10^9 partículas virais/30 x 10^6 células) por 4 horas. As DC pulsadas (4 h - DC) foram lavadas para retirar o vírus em excesso e incubadas na presença do “coquetel de maturação” (IL-4 50 ng/ mL, GM-CSF 50 ng/ mL, TNF 50 ng/ mL, IL-1 β 10 ng/ mL, IL-6 100 ng/ mL) (Cell Genix) por 10 horas (14 h - DC), 20 horas (24 h - DC) ou 44 horas (48 h - DC). As DC maduras, ou seja, as 48 h - DC representam o produto vacinal.

Em 6 momentos ao longo da diferenciação de monócitos a DC (monócitos, iDC, 4 h, 14 h , 24 h, 48 h - DC), as células foram utilizadas para a análise da expressão gênica e para os ensaios de caracterização fenotípica e funcional.

3.6 Obtenção de PBMC para estudo da resposta à imunoterapia

Foram utilizadas de cada um 6 pacientes, 4 alíquotas de PBMC isolados e congelados a partir de amostras de sangue coletadas antes e durante o ensaio clínico para análise de expressão gênica em resposta à imunoterapia. Essas amostras foram coletadas antes do tratamento (t0), após 15 dias da primeira dose (t1), após 30 dias da primeira dose e pouco antes da segunda dose (t2), após 45 dias da primeira dose e logo antes da terceira dose (t3).

3.7 Isolamento de RNA e retrotranscrição

O RNA total foi isolado das células utilizando o *RNAeasy*[®] *mini kit* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e quantidade do RNA foram avaliadas por meio de leitura por espectrofotometria (Thermo Scientific Nanodrop, EUA). Em seguida, 1 μ g de RNA total de cada amostra foi retrotranscrito utilizando o kit *RT2 PreAMP cDNA Synthesis Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Após a síntese do cDNA, o produto foi pré-amplificado através de uma mistura de *primers* em acordo com o grupo de genes a serem amplificados nos arranjos utilizados nos experimentos.

3.8 Avaliação da expressão gênica durante a diferenciação monócitos-células dendríticas

Foram avaliados 84 genes envolvidos na resposta anti-HIV do hospedeiro por meio de PCR em tempo real utilizando um arranjo comercial (*RT2 Profiler PCR “Host Genome Anti-HIV” Array*; *PAHS-051Y* (Qiagen) e o equipamento de PCR em tempo real *ABI 7300* (Applied Biosystems, EUA). Os 84 genes desse arranjo compreendem tanto genes de restrição para o HIV-1 quanto genes da imunidade previamente descritos como associados à resposta do hospedeiro ao HIV-1, mais 5 genes *housekeeping* (controles endógenos), 1 controle de contaminação de DNA genômico (HGDC), 3 controles de atividade da transcrição reversa (RTC) e 3 controles positivos da amplificação PCR (PPC). A lista completa dos genes e as informações detalhadas sobre cada gene estão listadas no anexo A. Após a amplificação, o software *ABI 7300 SDS* (Applied Biosystems) foi utilizado para obter os dados de cycle threshold (Ct) para cada gene utilizado na análise comparativa de expressão gênica. Os dados de $Ct > 35$ foram excluídos da análise.

Os dados de expressão dos genes foram analisados usando o método comparativo de Ct, proposto por (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Para normalização dos dados de Ct (ΔCt) foi utilizado um valor médio dos genes *housekeeping* (*ACTB* (β -actina), *B2M* (β -2-microglobulina), *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1) e *RPLP0* (ribosomal protein large P0) para cada experimento. As comparações para avaliação da modulação gênica (do inglês, *Fold change*, *FC*) foram feitas entre as etapas de diferenciação de DC e os monócitos (comparações pareadas, $2^{-\Delta\Delta Ct}$), ou entre as células do agrupamento hierárquico (comparação entre médias, $2^{-\Delta Ct}/2^{-\Delta Ct}$). O teste t foi utilizado para avaliar a significância da modulação de expressão gênica entre os grupos analisados. Nos gráficos e nas análises de agrupamento hierárquico foram utilizados os dados como $\log_2 FC$.

3.9 Análise da expressão gênica em resposta à imunoterapia

Para o perfil de expressão relativo a resposta dos pacientes à imunoterapia foi customizado pelo nosso laboratório um arranjo de genes com tecnologia *RT² PCR Profiler* (Custom Human PCR CAPH12563, Qiagen), contendo 86 genes alvos, mais 3 genes *housekeeping* (*ACTB*, *GAPDH*, *HPRT1*), 1 controle de contaminação de DNA genômico (HGDC), 3 controles de atividade da transcrição reversa (RTC) e 3 controles positivos da amplificação PCR (PPC). O esquema representativo encontra-se abaixo (figura 3) e a lista

detalhada dos genes encontra-se no anexo B.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	APOBEC3G	BAX	BCL2	BST2	CASP1	CASP3	CCL19	CCL2	CCL20	CCL3	CCL4	CCL5
B	CCR5	CCR6	CCR7	CD127	CD14	CD16	CD25	CD27	CD38	CD40L	CD45RO	CD56
C	CD69	CNOT1	CTLA-4	CXCL10	CXCL11	CXCL12	CXCL9	CXCR5	EOMES	FAS	FASL	FOXP3
D	GATA3	GZMA	GZMB	ICOS	IDO	IFI16	IFNA1	IFNG	IL10	IL13	IL15	IL17
E	IL1A	IL1B	IL22	IL23A	IL27	IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IRF3	IRF7
F	ISG15	KIR3DL1	KIR3DS1	LAG3	LAMP1	Mx1	Myd88	NKG2D	NKp44L	OAS1	PAR3B	PD1
G	PDL1	PPIA	PRF1	RORC	SLFN11	STAT1	TAP1	TBET	TGFB	TIM3	TNF	TNFSF10
H	TRIM5	XIAP	ACTB	GAPDH	HPRT1	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Figura 3 - Esquema representativo da placa utilizada para análise de expressão gênica em resposta à imunoterapia. São mostrados 86 genes de estudo. Também são representados os genes *housekeeping* (*ACTB*, *GAPDH* e *HPRT1*), o controle de contaminação com DNA genômico (HGDC), os controles da transcrição reversa (RTC) e os controles positivos (PPC).

A escolha dos 86 genes incluídos no arranjo baseou-se na literatura disponível quanto a resposta de PBMC a vacinas profiláticas anti-HIV-1 (DE GOEDE et al., 2015) ou a resposta genérica a desafio vacinal (HARALAMBIEVA et al., 2012; SCHERER et al., 2007; WOLF et al., 2012) ou a dados genéticos publicados pelo nosso grupo de pesquisa na fase I do mesmo ensaio clínico em estudo (MOURA et al., 2014; PONTILLO et al., 2014; SEGAT et al., 2010). Um resumo dos genes e das referências utilizadas na seleção são reportados na tabela 5.

Os dados de expressão dos genes foram analisados usando o método comparativo de Ct (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) como descrito anteriormente.

Para normalização (ΔCt) foi utilizado um valor médio dos 3 genes *housekeeping* para cada experimento. As comparações para avaliação da modulação gênica (FC) foram feitas entre as etapas de acompanhamento (t1, t2, t3) e os PBMC antes da terapia (t0) (comparações pareadas, $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Nos gráficos e na análise de agrupamento hierárquico foram utilizados os dados como $\log_2 FC$.

Tabela 5- Genes selecionados para customização do arranjo de genes RT² PCR Profiler (Custom Human PCR CAPH12563, Qiagen)

FUNÇÕES	GENES E REFERÊNCIAS
Marcadores de PBMC	
Monócitos	<i>CD14, CD16, IL1A, IL1B</i>
Linfócitos Th1	<i>TBET, IFNG; IL27</i> (SOGHOIAN <i>et al.</i> , 2012)
Linfócitos Th2	<i>IL13, IL4, IL5, IL10, TGFB; GATA3</i> (VETTER <i>et al.</i> , 2009)
Linfócitos Th17	<i>CCR6, IL17, IL122, IL23A, RORC</i>
Linfócitos Treg	<i>FOXP3, IL10, TGFB</i>
Linfócitos T citotóxicos	<i>GZMB, LAMP1, PRF1; GZMA</i> (SOGHOIAN <i>et al.</i> , 2012)
Linfócitos T foliculares	<i>CCR6, CXCR5, ICOS, PDI</i> (LARSSON <i>et al.</i> , 2013)
Linfócitos T de memória central	<i>CD27, CD45RO, CCR7</i> (SENNEPIN <i>et al.</i> , 2013)
Células NK	<i>CD16, CD107A, KIR3DL1, KIR3DS1, IFNG, NKG2D, NKp44L</i> (SENNEPIN <i>et al.</i> , 2013)
Moléculas linfocitárias associadas a resposta à vacina	<i>CD38, CD69, FOXP3; CD25</i> (RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 2014); <i>CD40L</i> (KORNBLUTH, 2000),
Marcadores de exaustão imune	<i>CD38; CTLA-4</i> (LARSSON <i>et al.</i> , 2013), <i>PDI, CD69, TIM3</i> (POONIA; PAUZA, 2014),
Proteínas ou genes modulados em resposta a vacinas	<i>OAS1, MX, STAT1, TAP1 e IRF7</i> (ROTGER <i>et al.</i> , 2010), <i>CCL20</i> (FONTAINE; POUDRIER; ROGER, 2011), <i>TNF, IL6, IL23A, IFNA1, FASL, GZMB, TNFSF10, EOMES</i> (POONIA; PAUZA, 2014), <i>ISG15</i> (RAPOSO <i>et al.</i> , 2013)
Resposta polifuncional	<i>CD25, CCL4, IFNG, TNF</i>
Receptores e ligantes do HIV-1	<i>CCL5, CCR5, CXCL12/SDF1; CCL2 e CCL4</i> (SAMSON <i>et al.</i> , 1996);
Fatores de restrição para HIV-1 relacionados com resposta à vacina	<i>APOBEC3G</i> (RAPOSO <i>et al.</i> , 2013); <i>BST2</i> (RAPOSO <i>et al.</i> , 2013); <i>PARD3B</i> (PONTILLO <i>et al.</i> , 2014); <i>PPIA, SLFN11, TRIM5</i> (RAPOSO <i>et al.</i> , 2013)
Apoptose	<i>BAX, BCL2, CASP3, CD40L, FAS, FASL, XIAP, TNFSF10</i>
Piroptose induzida por HIV-1	<i>CASP1, IFI16</i> (NISSEN <i>et al.</i> , 2014)
Quimiocinas relacionados com resposta à vacina	<i>IL8, CCR7, CXCL10, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL9</i> (FONTAINE <i>et al.</i> , 2011); <i>CXCR5</i> (BOSWELL <i>et al.</i> , 2014)
Outros genes relacionados com resposta à vacina	<i>CNOT1</i> (MOURA <i>et al.</i> , 2014), <i>IL7</i> (TANASKOVIC <i>et al.</i> , 2014), <i>LAG3</i> (PENA <i>et al.</i> , 2014)

3.10 Avaliação da expressão gênica com sondas fluorogênicas gene-específicas e tecnologia Taqman

Os genes *NLRP3*, *CASP1*, *IL18*, *NOS1* e *MBL2*, foram amplificados com sondas fluorogênicas gene-específicas e tecnologia TaqMan (Applied Biosystems) na plataforma ABI 7300 SDS (Applied Biosystems). A análise dos dados obtidos foi avaliada em acordo com Scmitten e Livak (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) como descrito acima.

3.11 Análise por heat map e agrupamento hierárquico

A análise por heat map foi realizada com o intuito de verificar a associação entre o perfil de expressão gênica e as etapas de diferenciação monócitos-DC ou resposta à imunoterapia. Esse tipo de representação e o agrupamento hierárquico resultante foram obtidos através dos dados de $\log_2$ FC pela função heatmap.2 do pacote “gplots” na plataforma matemático-estatística R versão 3.1.3 (<http://www.r-project.org>), utilizando-se a distância euclidiana. A Análise de Agrupamento foi realizada através do pacote “pvclust”, utilizado para calcular o p-valor aproximadamente não viesado (Approximately Unbiased – AU p-value) de cada grupo identificado. Essa abordagem permitiu determinar o nível de significância para cada agrupamento (dado não mostrado).

Os valores de $\log_2$ FC foram plotados de forma linear e com tons de verde ou vermelho atribuídos para cada valor, sendo que tons de verde indicam genes menos expressos e tons de vermelho indicam os mais expressos em relação à condição de comparação (monócitos pelas DC ou t0 pelos PBMC).

3.12 Análise *in silico* das funções biológicas

A ferramenta online Genemania (<http://www.genemania.org/>) foi usada para a análise *in silico* dos dados selecionados pela análise de FC. O Genemania utiliza bancos de dados públicos de co-expressão gênica como *Gene Expression Omnibus* (GEO), de interação física e genética como BioGRID; de predição de interação proteína-proteína como I2D, de vias de sinalização e/interação molecular, como *Pathway Commons*. Os resultados da análise são reportados com o respectivo valor de FDR (do inglês, *False Discovery Rate*).

3.13 Genotipagem com sondas alelo-específicas e tecnologia Taqman

O DNA genômico dos 11 pacientes estudados foi isolado das alíquotas de PBMC congeladas ao tempo t0 por meio do kit Gentra Puregene® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, e quantificado utilizando o espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific).

Foram analisados 22 polimorfismos em 13 genes de fatores de restrição para HIV-1 (*APOBEC3G*, *CCL4*, *CCL5*, *CCR5*, *CUL5*, *CXCR6*, *HLA-C*, *IFNG*, *PARD3B*, *PROX1*, *SDF1*, *TRIM5*, *ZNRD1*) enquanto associados a susceptibilidade ao HIV-1 e/ou progressão a AIDS, e

2 polimorfismos de base única (SNP) nos genes *NOS1* e *MBL2* como estudo de réplica da genotipagem dos indivíduos da fase I do ensaio clínico (PONTILLO et al., 2014; SEGAT et al., 2010).

Para a genotipagem dos polimorfismos selecionados, com exceção do $\Delta 32$ de CCR5, as amostras de DNA na concentração padrão de 100 ng/ μ l foram amplificadas por meio de sondas alelo-específicas e tecnologia Taqman (Applied Biosystems) no equipamento de PCR em tempo ABI 7300 (Applied Biosystems). Após a amplificação, o software ABI 7300 SDS (Applied Biosystems) foi utilizado para a discriminação alélica. Para genotipar o polimorfismo do $\Delta 32$ de CCR5 foi utilizada RLFP-PCR.

3.14 Avaliação fenotípica de células dendríticas

Para avaliar a diferenciação e ativação das DC obtidas *in vitro*, as células iDC e 48 h – DC foram analisadas por citometria de fluxo FACSCalibur (BD, Califórnia, EUA) com relação à expressão de moléculas de superfície características de DC (CD14⁺, CD11c, HLA-DR), marcadores da maturação da DC (CD83, CD40) e moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86). Foram empregados anticorpos monoclonais como marcadores de diferenciação e ativação e seus respectivos controles isotípicos (BD) de acordo com as instruções do fabricante (tabela 6). A coleta de dados foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur e incluiu um mínimo de 10.000 eventos determinados dentro do *gate* característico de tamanho e granulosidade de células dendríticas, excluindo-se a região de células mortas e seguindo a estratégia de análise descrita na figura 4. A análise dos dados empregou o programa FCS Express Version 3 (BD).

Figura 4 - Estratégia de análise dos dados de citometria de fluxo. Esquema de análise dos marcadores de superfície de iDC e 48 h - DC. Foi feito um *gate* no tamanho e granulosidade característico da célula a ser analisada. Após isso, foi selecionada a população positiva para CD11c e em cima dessa população foi vista a expressão dos outros marcadores.

Tabela 6 – Lista dos anticorpos monoclonais utilizados

Especificidade	Clone	Fluorocromo
CD14	M5E2	PE
CD11c	B-ly6	PeCy5
HLA-DR	L243	FITC
CD80	L307.4	PE
CD86	2331 (FUN-1)	FITC
CD40	B-ly6	FITC
CD83	HB15e	FITC

O teste *two-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni para grupos selecionados, foi utilizado para comparar as variáveis entre grupos diferentes. A análise estatística e os gráficos foram gerados com o auxílio do *software* GraphPad Prism®.(San Diego, CA, EUA). Diferenças com $p < 0.05$ foram consideradas significativas.

3.15 Avaliação da viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular das DC foi utilizado o kit BD Cell Viability Kit (BD), de acordo com as instruções do fabricante. O kit contém a solução laranja de tiazol para

marcar todas as células e iodeto de propídio para marcar apenas as células mortas, levando em consideração que as células vivas tem as membranas intactas e são impermeáveis a corantes como o iodeto de propídeo. O teste t, foi utilizado para comparar a viabilidade entre grupos diferentes. A análise estatística e os gráficos foram gerados com o auxílio do *software* GraphPad Prism®. Diferenças com $p < 0.05$ foram consideradas significativas.

3.16 Análise funcional das células dendríticas: ensaios de co-cultivo

A capacidade das DC de induzir a ativação de linfócitos T autólogos foi avaliada por meio de ensaios de co-cultivo DC-linfócitos T autólogos e determinação da indução da produção de IFN- γ nos linfócitos.

2×10^5 de PBMC autólogos (células não-aderentes após adesão em placa de cultura) foram co-cultivados com 0.4×10^5 DC/poço em uma placa de 96 poços por 96 horas. A avaliação dos linfócitos T produtores de IFN- γ (IFN+) foi feita através de marcação intracelular com anticorpo fluorogênico e citometria de fluxo. As células foram tratadas com 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BrefeldinA (Sigma-Aldrich) nas últimas 4 horas do período da cultura, para inibir a secreção proteica, lavadas e incubadas com anticorpos anti-CD3 marcados com PE (BD). Em seguida, as células foram permeabilizadas com a solução Cytofix/Cytoperm (BD) e marcadas com o anticorpo anti-IFN- γ marcado com PE (BD). A contagem dos linfócitos T IFN+ foi feita no citômetro de fluxo LRS Fortessa (BD). A estratégia de *gate* utilizada para análise está na Figura 5.

A estimulação com a enteroxina B do estafilocos (SEB) foi usada como controle positivo. Os dados foram reportados com uma porcentagem de células IFN- γ + CD3+ e analisadas por t- test no GraphPad Prism®.

Figura 5 - Estratégia de *gate* para definição de linfócitos T produtores de IFN- γ . A população de linfócitos foi determinada com base em SSC x FSC. Foram definidas as células CD3+. Após esta etapa, foram definidas as células produtoras de IFN- γ . A seleção de linfócitos positivos foi feita por comparação com amostras não estimuladas, ou seja, cultivadas sem a presença de DC pulsadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO- PARTE I

4.1 Análise da expressão gênica em monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos

A expressão relativa de genes envolvidos na resposta do hospedeiro contra o HIV-1 foi examinada nas várias etapas de diferenciação celular de monócitos em células dendríticas: monócitos, células dendríticas imaturas (iDC) e células dendríticas após a estimulação com o vírus HIV-1 inativado (AT-HIV) e coquetel de citocinas, de acordo com o protocolo do ensaio clínico, até a obtenção de células dendríticas maduras e ativadas (48 h - DC). Entre as etapas de iDC e (48 h - DC) foram escolhidos os seguintes tempos para avaliação da expressão gênica:

- após 4 horas da estimulação com AT-HIV (estimulação apenas com vírus): 4 h - DC
- após 14 horas da estimulação com AT-HIV (estimulação com vírus por 4 horas e coquetel de citocinas por mais 10 horas): 14 h - DC
- após 24 horas da estimulação com AT-HIV (estimulação com vírus por 4 horas e coquetel de citocinas por mais 20 horas): 24 h - DC

Essa escolha foi baseada na observação que os genes do ensaio *PCR array* possuem tempos de expressão diferentes (HUANG et al., 2001).

Os dados brutos obtidos da amplificação por RT2 PCR array (Ct) nas etapas de manipulação *in vitro* dos 6 pacientes HIV+ estudados (apêndice A), foram utilizados para calcular a modulação da expressão (FC) entre as 5 diferentes etapas de diferenciação (iDC, 4 h - DC, 14 h - DC, 24 h - DC e 48 h - DC) e os respectivos monócitos para cada indivíduo.

4.1.1 Agrupamento hierárquico

Com o intuito de verificar associação entre o perfil de expressão gênica e as etapas de diferenciação e/ou evidenciar diferenças entre os indivíduos submetidos à imunoterapia construiu-se uma matriz representada por um heat map, considerando-se todos os indivíduos e todas as etapas de diferenciação monócitos-DC avaliadas (Figura 6). Essa abordagem demonstrou que as etapas de diferenciação não apresentaram um padrão de acordo com o perfil de expressão gênica avaliado, no entanto os indivíduos apresentaram, independentemente das etapas do protocolo, diferenças no perfil de expressão, permitindo a segregação dos indivíduos analisados em 2 grupos de perfil de expressão gênica que

chamamos de A e B (A: P1, P5, P6 e B: P2, P3, P4). Esses grupos mostram perfis de expressão de genes anti-HIV diferentes, sendo possível observar, em geral, uma menor expressão na resposta anti-HIV no grupo A e um maior expressão no grupo B (Figura 6) comparado com os respectivos monócitos. Diante do exposto, as próximas análises do presente estudo considerarão essa divisão dos indivíduos nos grupos A e B.

Figura 6 – Heat map do perfil de expressão durante as etapas de diferenciação de monócitos em células dendríticas. Os valores de $\log_2$ FC foram plotados de forma linear com tons de verde, vermelho e preto atribuídos para cada valor, sendo que tons de verde indicam genes subexpressos ($\log_2$ FC < 0; FC < 1), tons de vermelho indicam os superexpressos ($\log_2$ FC > 0; FC > 1) e preto indica uma não modulação ou expressão ($\log_2$ FC = 0; FC = 1). O dendograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras.

O fato de encontrarmos grupos tão distintos é intrigante porque os critérios de seleção dos indivíduos a serem incluídos no ensaio clínico são bem específicos (ausência de tratamento, antirretroviral, contagem de CD4 > 350 células/ μ l, CVP > 3 log) e deveriam dessa forma uniformizar os pacientes.

Quando analisamos a correlação entre o perfil de expressão gênica e os dados clínicos dos pacientes, não encontramos nenhuma correlação significativa nem com CVP nem com os níveis plasmáticos de linfócitos T.

4.1.2 Modulação da expressão gênica dentro dos grupos A e B

Para analisar a modulação da expressão gênica dentro dos grupos obtidos com o agrupamento hierárquico, consideramos os valores médios de FC dos 3 pacientes pertencentes ao mesmo grupo, A ou B (Tabela 7).

Tabela 7 – Modulação da expressão gênica nos grupos A e B. São reportados valores de $\log_2$ FC resultantes da comparação entre DC e monócitos

Gene	Grupo A					Grupo B				
	iDC	4 h DC	14 h DC	24 h DC	48 h DC	iDC	4 h DC	14 h DC	24 h DC	48 h DC
<i>APEX1</i>	-1,87	-2,41	-1,6	-2,86	-3,62	3,51	3,32	3,41	3,16	5,37
<i>APOBEC3G</i>	NA	NA	-0,17	5,77	7,31	3,11	2,49	2,36	3,2	4,68
<i>BAD</i>	-12,45	-11,98	-6,03	-11,97	-10,98	4,28	4,06	4,01	4,13	2,74
<i>BANF1</i>	NA	NA	0,58	NA	6,02	2,8	2,84	2,82	2,6	4,89
<i>BAX</i>	-3,8	-3,52	-1,88	-3,85	-5,34	1,2	-0,24	0,79	1,02	5,62
<i>BCL2</i>	2,39	2,86	0,48	2,76	2,56	1,56	1,42	1,25	1,56	4,24
<i>CASP3</i>	NA	NA	-0,48	NA	NA	1,55	1,48	1,18	1,39	0,33
<i>CASP8</i>	-3,23	-2,17	-1,7	-3,89	-4,63	2,24	2,27	1,86	2,35	1,02
<i>CBX5</i>	NA	NA	-0,2	NA	NA	1,62	1,66	1,71	1,28	5,54
<i>CCL2</i>	-8,45	-5,96	-3,97	-9,04	-9,8	0,57	2,42	1,82	-0,57	-4,4
<i>CCL3</i>	NA	NA	2,53	NA	NA	3,5	4,1	4,28	4,01	4,64
<i>CCL4</i>	-4,19	-1,31	-1,33	-2,72	-5,1	2,71	1,4	1,53	2,65	4,66
<i>CCL5</i>	-6,86	-6,45	-1,25	-3,34	-3,36	2,08	0,79	2,44	2,75	-0,27
<i>CCL8</i>	-9,17	-7,11	-7,47	-7,22	-7,34	-7,78	-8,51	-6,15	-7,18	-4,87
<i>CCNT1</i>	-0,13	-0,31	-2,31	-0,57	-0,6	1,98	1,73	1,44	1,83	3,66
<i>CCR2</i>	NA	NA	-6,28	NA	NA	1,66	-0,33	-2,33	-1,02	-2,58
<i>CCR3</i>	NA	NA	-8,55	NA	NA	-0,7	-2,2	-2,57	-1,27	-2,88
<i>CCR4</i>	-4,84	-2,87	-3,93	-1,64	1,43	-4,04	-4,65	-3,46	-2	0,5
<i>CCR5</i>	0,62	0,65	-0,28	-0,93	-2,35	0,52	0,58	-0,24	-0,03	-2,65
<i>CD209</i>	-1,06	-0,33	-1,31	-1,94	-4,37	0,48	0,58	0,55	0,12	5,43
<i>CD4</i>	-0,73	0,14	-0,77	-2,23	-3,7	2,25	2,11	1,57	1,35	-3,14
<i>CD44</i>	-2,66	-2,34	-1,41	-2,35	-4,51	2,19	2,19	2,33	2,21	5,35

Gene	Grupo A					Grupo B				
	iDC	4 h DC	14 h DC	24 h DC	48 h DC	iDC	4 h DC	14 h DC	24 h DC	48 h DC
<i>CD74</i>	-1,05	-0,64	-0,28	-1,23	-1,58	1,81	1,75	1,77	1,72	2,15
<i>CDK7</i>	-3,87	-3,42	-3,34	-3,82	-4,25	2,49	2,34	2,15	2,59	4,98
<i>CDK9</i>	0,26	-1,01	-1,29	-0,53	0,26	1,45	0,84	1,37	1,37	3,77
<i>CDKN1A</i>	-2,54	-1,61	-2,87	-1,7	-4,13	-0,79	-0,61	-0,63	-0,51	3,38
<i>CEBPB</i>	-3,74	-3,57	-1,82	-2,93	-4,67	1,15	1,18	1,34	1,03	3,74
<i>CR2</i>	-4,43	-3,84	-5,52	-5,34	-4,99	0,29	0,04	-0,36	0,53	1,25
<i>CREBBP</i>	-2,06	-2,28	-1,79	-3,11	-2,95	1,59	1,24	0,98	1,41	-0,95
<i>CX3CL1</i>	NA	NA	-2,58	-5,73	-5,12	1,78	1,24	-2,04	-2,38	1,15
<i>CXCR4</i>	-0,52	-1,7	-0,96	1,77	1,13	1,56	0,68	2,62	3,17	6,05
<i>ELANE</i>	-6,83	-8,46	-9,09	-7,34	-6,22	-4,11	-4,28	-3,5	-3,85	-1,79
<i>EP300</i>	-4,45	-4,04	-2,99	-4,53	-5,07	2,69	2,63	2,28	2,56	4,86
<i>FCAR</i>	NA	NA	NA	NA	NA	-9,97	-9,3	-10,31	-12,83	-16,89
<i>GADD45A</i>	-1,26	-1,16	-0,72	0,49	1,11	2,82	2,75	3,6	4,53	6,21
<i>HCK</i>	-1,63	-2,9	-1,6	-1,51	-1,54	2,93	2,55	2,87	3,15	5,66
<i>FOS</i>	-5,9	-5,47	-3,26	-6,48	-8,03	1,62	1,48	1,54	0,99	2,86
<i>IFNB1</i>	NA	NA	-6,98	NA	-9,22	-3,81	-4,55	-3,09	-4,9	-4,59
<i>IL10</i>	-4,74	-3,7	-4,07	-5,86	-6,11	1,37	1,62	-0,53	-1,49	-2,22
<i>IL12B</i>	-0,55	-3,5	-1,61	1,58	NA	-4,18	-6,23	-0,67	2,07	2,02
<i>IL16</i>	-4,48	-4,28	-4,71	-6,93	-7,46	1,88	1,69	0,52	-0,18	1,3
<i>IL1B</i>	-8,88	-7,35	-3,61	-7,98	-8,39	-2,61	-2,62	0,86	-1,51	-5,94
<i>IL8</i>	-9,43	-7,16	-3,62	-4,96	-5,37	-1,48	-1,24	1,98	0,48	1,49
<i>IRF1</i>	-7,06	-5,43	-2,87	-5,04	-4,11	1,12	1,89	1,63	1,93	0,82
<i>IRF2</i>	-5,45	-5,03	-3,41	-5,21	-6,09	1,23	1,22	1,08	1,37	4,09
<i>LTBR</i>	-2,57	-2,37	-0,91	-3	-2,95	1,64	1,64	1,48	1,39	0,75
<i>MAP3K5</i>	-2,24	-2,49	-2,77	-3,57	-3,93	2,51	2,28	1,41	1,97	1,88
<i>MBL2</i>	-6,46	-6,48	-7,6	-5,39	-4,03	-6,91	-7,68	-4,91	-3,56	-2,04
<i>NFKBIA</i>	-1,22	-0,84	0,77	1,02	1,25	2,04	1,93	2,84	2,55	2,24
<i>PPIA</i>	NA	NA	-1,04	NA	NA	3,17	3,02	2,61	2,87	-0,01
<i>PRDX1</i>	0,16	0,06	-1,46	-0,08	0,33	2,79	2,44	2,68	2,99	3,33
<i>PTK2B</i>	-3,05	-3,67	-3,7	-3,84	-3,23	2,58	2,21	1,58	2,29	4,57
<i>RBL2</i>	NA	NA	-0,7	NA	NA	2,31	2,18	1,69	2,14	0,33
<i>SELL</i>	-4,63	-5,12	-5,3	-6,59	NA	0,13	-2,07	-1,82	-1,73	-4,32
<i>SERPINA1</i>	-5,62	-5,71	-4,98	-5,59	-6,92	-0,24	-0,6	-0,43	-0,39	1,25
<i>SERPINC1</i>	-0,29	-1,63	-4,1	-1,25	0,05	-1,92	-3,04	-2,52	-1,81	-3,39
<i>SLPI</i>	-10,42	-9,41	-10,22	-11,24	-10,97	-6,46	-6,82	-6,28	-6,2	-6,02
<i>SMARCB1</i>	-5,76	-5,26	-3,09	-5,41	-6,35	2,33	2,29	2,13	2,26	2,71
<i>STAT1</i>	-1,45	0	-1,29	-1,1	-1,54	1,52	1,69	1,37	1,49	0,06
<i>STAT3</i>	-1,17	-1,1	-0,33	-1,23	-0,51	2,6	2,5	2,45	2,66	2,04
<i>TFCP2</i>	-4,79	-4,44	-3,56	-5,02	-5,61	3,15	3,03	2,36	3,08	3,5
<i>TGFB1</i>	-3,82	-3,27	-2,03	-5,05	-7,09	1,93	2,02	1,99	1,48	3,9
<i>TNF</i>	-8,59	-7,56	-2,5	-6,44	-6,21	0,42	0,3	2,09	1,19	-0,73
<i>TNFRSF1B</i>	-7,13	-6,81	-3,24	-5,97	-6,64	0,83	0,8	0,78	0,86	2,92
<i>TNFSF10</i>	-7,63	-7,8	-7	-10,51	NA	-0,09	-1,19	-1,73	-2,61	-3,18

	Grupo A					Grupo B				
Gene	iDC	4 h DC	14 h DC	24 h DC	48 h DC	iDC	4 h DC	14 h DC	24 h DC	48 h DC
<i>TRIM5</i>	-5,12	-4,75	-3,98	-5,14	-5,57	2,02	1,94	1,48	1,67	2,47
<i>TSG101</i>	-4,95	-4,58	-3,15	-4,85	-5,87	1,82	1,75	1,63	1,84	2,63
<i>VPS4A</i>	-4,46	-3,83	-2,6	-4,28	-5,14	2,15	2,17	2,04	2,01	2,87
<i>XPO1</i>	-3,73	-3,08	-2,67	-3,7	-4,91	1,48	1,51	1,28	1,39	2,33
<i>YY1</i>	-1,95	-2,19	-0,93	-2,31	-2,37	1,75	1,72	1,53	1,63	2,05

Abreviações: NA não amplificado

Em seguida, foram comparadas as modulações da expressão gênica para cada gene entre os 2 grupos, A e B (t test) e os genes ordenados de acordo com o *p-value* resultante e com o valor absoluto de FC. Os genes com um *p-value* < 0.05 e um valor absoluto de FC > 4 ($\log_2 FC > 2$) foram selecionados como diferentemente expressos (tabela 8).

Tabela 8 - Genes diferentemente expressos em células dendríticas no grupo A e B

GRUPO A						GRUPO B					
Genes	iDC	4 h	14 h	24 h	48 h	Genes	iDC	4 h	14 h	24 h	48 h
RECEPTORES E LIGANTES NATURAIS DO HIV											
<i>CCL5</i>	-6.86	-6.45	-1.25*	-3.34*	-3.36*	<i>CCL2</i>	NA	2.42*	1.82	NA	-4.40
<i>CD4</i>	-0.73*	0.14*	-0.77*	-2.23	-3.70	<i>CXCR4</i>	1.56*	NA	2.62*	3.17*	6.05
RESPOSTA IMUNE INATA											
<i>IL1B</i>	-8,88	-7.35*	-3.61*	-7.98*	-8.39*	<i>FCAR</i>	-9,97	-9,3	-10,3	-12,8	-
<i>IL10</i>	-4.74*	-3.70*	-4.07*	-5.86*	-6,11	<i>IL1B</i>	-2.61*	-2.62*	NA	-1.51*	-5,94
<i>SELL</i>	-4.63*	-5.12*	-5,3	-6.59*	NA	<i>IL12B</i>	-4.18*	-6.23	NA	2.07*	2.02*
<i>TNFSF10</i>	-7,63	-7.80*	-7.00*	-10.51*	NA	<i>PRDX1</i>	2,79	2.44*	2,68	2,99	3,33
<i>TNF</i>	-8,59	-7.56*	-2.50*	-6.44*	-6.21*	<i>SELL</i>	NA	-2.07*	-1.82*	-1.73*	-4,32
PROTEÍNAS CELULARES INDUZIDAS OU ATIVADAS PELA INFECÇÃO DO HIV											
<i>BAD</i>	-12.45	-11.98	-6.03	-11.97	-10.98	<i>BAD</i>	4.28	4.06	4.01	4.13	2.74*
<i>CASP8</i>	-3.23*	-2.17*	-1.70	-3.89	-4.63*	<i>BAX</i>	1.20*	NA	NA	1.02*	5.62
<i>IRF1</i>	-7.06	-5.43*	-2.87*	-5.04*	-4.11*	<i>CASP8</i>	2.24	2.27	1.86	2.35	1.02*
						<i>COPS6</i>	2,19	2,15	1,96	2,04	4,41
						<i>GADD45A</i>	2,82	2.75*	3,6	4,53	6,21
CO-FATORES CELULARES ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO PELO HIV											
						<i>CBX5</i>	1.62*	1.66*	1.71*	1.28*	5,54
						<i>CDK7</i>	2.49*	2.34*	2.15*	2.59*	4,98
						<i>CDK9</i>	1.45	NA	1.37	1.37	3.77
						<i>EP300</i>	2.69*	2.63*	2.28	2.53*	4.86
						<i>HCK</i>	2,93	2,55	2,87	3,15	5,66
						<i>HTATSF1</i>	2.90	2.94	2.50	2.77	4.90
						<i>PTK2B</i>	2,58	2,21	1.58*	2.29*	4,57
						<i>RBL2</i>	2,31	2,18	1,69	2,14	NA
						<i>SMARCB1</i>	2.33	2.29	2.13	2.26	2.71
						<i>TFCP2</i>	3.15	3.03*	2.36*	3.08*	3.50
						<i>VPS4A</i>	2.15	2.17	2.04	2.01	2.87

($p < 0.05$, $FC > 4$, $\log_2 FC > 2$) *: $p > 0.05$, $FC > 4$, $\log_2 FC > 2$

Para a análise entre o grupo A e B foram consideradas as médias dos valores de $\log_2$ FC para cada gene em cada grupo. Em seguida, foi calculado o *p-value* relativo a cada comparação dentro de cada grupo. Dessa forma, em cada grupo, os genes foram ordenados de acordo com o *p-value* e com o valor absoluto de $\log_2$ FC (tabela 8). Os genes com um *p-value* < 0.05 e um valor absoluto de *fold change* (FC) > 4 foram selecionados como diferentemente expressos.

No grupo A apenas poucos genes estavam significativamente modulados. Os genes apoptóticos *BAD* e *CASP8* estavam menos expressos em todas as etapas de diferenciação em relação ao grupo B. De modo similar, genes da resposta imune, como *CCL5*, *IL1B*, *IL10*, *IRF1*, *SELL*, *TNF* e *TNFSF10*, estavam down-regulados em células dendríticas (iDC, 4 h - DC, 14 h - DC, 24 h - DC e 48 h - DC) quando comparados com monócitos. Em alguns pontos, a modulação gênica não atingiu um *p-value* estatisticamente significativo ($p > 0.05$), entretanto o valor de FC foi reportado com o objetivo de destacar que a direção da modulação gênica não mudou ao longo das etapas de diferenciação, nesse caso os valores foram representados com asterisco (tabela 8).

Por outro lado, nas células do grupo B foi observada a modulação estatisticamente significativa de 32 dos 84 genes em quase todos os tempos considerados. Nesse grupo, 28 desses 32 genes resultaram mais expressos comparados com os monócitos, enquanto que somente 4 genes estavam menos expressos (tabela 8).

É interessante ressaltar que 5 dos 84 genes estavam significativamente modulados em ambos os grupos *IL1B* e *SELL* foram mais expressos no grupo A e B, enquanto *BAD*, *CASP8* e *IRF1* estavam modulados de forma oposta, sendo menos expressos no grupo A e mais expressos com grupo B (tabela 8).

As células do grupo B parecem estar mais ativadas em termos de resposta anti- HIV, mostrando uma maior expressão de fatores de restrição quanto de co-fatores da infecção pelo HIV-1, mas sua expressão aumentada não variou de forma significativa ao longo da diferenciação, talvez devido a características intrínsecas desses pacientes e não devido ao protocolo de preparação de células dendríticas.

Em seguida analisamos a expressão relativa de alguns genes ao longo das etapas de diferenciação monócitos-DC.

4.1.3 Modulação de genes relacionados com a morte celular e avaliação da viabilidade celular

Quando consideramos a expressão relativa de genes modulados nos 2 grupos ao longo das etapas de diferenciação monócitos-DC, observamos que *BAD* e *CASP8* estão sempre menos expressos nas DC quando comparadas com monócitos no grupo A (Figura 7A) e mais expressos no grupo B independentemente da etapa de diferenciação analisada (Figura 7B). Porém enquanto *BAD* aumenta a sua expressão após a estimulação com o vírus (14 h - DC) nas células do grupo A, a expressão desse gene diminui nas DC do grupo B (48 h - DC).

Figura 7 - Expressão relativa de genes diferentemente modulados nas células de indivíduos dos grupos A e B ao longo das etapas de diferenciação. São mostrados no gráfico a expressão gênica de todas as etapas de diferenciação de monócitos a células dendríticas. São reportados valores de log₂ FC resultantes da comparação de células dendríticas contra os monócitos.

Esse achado não foi corroborado pelo ensaio de viabilidade celular. As 48h - DC de todos os pacientes parecem ser similarmente viáveis (grupo A: $80 \pm 7\%$ de células negativas para iodeto de propídio; grupo B: $75 \pm 4\%$; $p=0.338$), entretanto não se pode excluir que a morte celular possa acontecer após 48 horas.

Figura 8 - Ensaio de viabilidade celular das 48 h - DC do grupo A e B. São mostrados no gráfico no grupo A e B a porcentagem de células positivas para laranja de tiazol e negativas para PI (iodeto de propídio). A análise estatística foi feita no software GraphPad Prism®, mediante *t test*.

4.1.4 Modulação de genes relacionados com a resposta imune contra o HIV-1

Quando olhamos para os genes de resposta imune anti-HIV (Figura 9A), é possível observar que a expressão de *CCL5*, *IL1B*, *IL10*, *IRF1*, *SELL*, *TNF* e *TNFSF10* estava significativamente reprimida em células dendríticas do grupo A quando comparadas com monócitos. Entretanto os genes *CCL5*, *IL1B*, *IRF1* e *TNF* estavam positivamente modulados em 14 h - DC em relação a outros pontos, talvez devido ao efeito sinérgico do pulso viral e adição de citocinas usadas para a cultura celular.

No grupo B, as células dendríticas modularam significativamente os genes *FCAR*, *IL1B*, *IL12B*, *IRF1*, *IRF2*, *SELL* e *STAT1* (Figura 9B). Além disso, a expressão dos genes *IL12B* e *IRF2* aumentou entre 4 e 24 horas, respectivamente, mantendo-se até o fim do protocolo.

Figura 9 - Expressão relativa de genes relacionados à resposta imune contra o HIV-1 durante as etapas de diferenciação monócitos-DC dos indivíduos HIV+ do grupos A e B. São reportados valores de log₂FC resultantes da comparação de DC e monócitos.

4.1.5 Modulação da expressão dos genes do inflamassoma

Considerando o dado referente ao gene da interleucina 1 β , *IL1B*, (Tabela 7 e Figura 10), a importância da ativação do inflamassoma e da secreção de IL-1 β para a ativação das DC, e os resultados previamente reportados pelo nosso grupo sobre a expressão constitutiva dos genes do inflamassoma em DC de pacientes HIV+ (PONTILLO; SILVA; et al., 2012), foi avaliada a expressão dos genes do inflamassoma *NLRP3*, *CASP1* e *IL18* nas etapas de diferenciação de monócitos a DC com um ensaio de sonda específica.

Nenhuma diferença significativa foi observada na modulação de *NLRP3* ou *CASP1* em células dendríticas quando comparados com monócitos nos dois grupos (Figura 10), de acordo com dados previamente publicados (PONTILLO; SILVA; et al., 2012). Entretanto o

gene da *IL18* estava mais expresso nas DC do grupo A, a 14 h e 48 h (FC=5.19 e 3.85, respectivamente), mas não nas células do grupo B (FC= -1.23 e 1.34 respectivamente). A diferença entre a expressão de *IL18* em 48 h - DC dos grupos A e do B resultou numa diferença estatística significativa ($p<0.05$).

Figura 10 - Expressão relativa de genes do inflamassoma nas 14 h - DC e 48 h - DC. São reportados valores de $\log_2$ FC resultantes da comparação de células dendríticas contra os monócitos nas células dos indivíduos HIV+ do grupo A e B. Os dados foram analisados com Two-Way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações seleccionadas.

4.1.6 Avaliação do fenótipo de maturação/ativação em monócitos e células dendríticas

A caracterização fenotípica de DC imaturas e DC maduras foi realizada através da análise de expressão das seguintes moléculas de superfície celular: CD11c (marcador de células dendríticas mielóides); HLA-DR (antígeno leucocitário humano de classe II); CD80 e CD86 (moléculas co-estimuladoras B7-1 e B7-2, respectivamente); CD83 e CD40 (marcadores de maturação).

Figura 11 - Perfil fenotípico das células dendríticas imaturas e maduras. Os resultados representam a média de valores de cada grupo ($n=3$) $\pm$ desvio padrão. As DC foram analisadas de acordo com as características básicas de tamanho e granulosidade e marcadores específicos (CD11c, HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CD40). O CD14 foi usado como controle negativo de diferenciação de monócitos em DC. As barras brancas referem-se às células dendríticas imaturas do grupo A e as barras cinza às células dendríticas maduras do grupo A. As barras com listras representam as células dendríticas imaturas do grupo B e as barras pretas representam as células dendríticas maduras. A análise estatística foi feita no software GraphPad Prism®, mediante o teste two-way ANOVA.

Para os marcadores de superfície CD11c, HLA-DR, CD40, CD80, CD83 e CD86 (Figura 11) não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão desses marcadores entre o grupo A e B, entretanto quando a célula dendrítica madura foi comparada com a célula dendrítica imatura, ambos os grupos aumentaram a expressão de CD80 e CD83 de forma estatisticamente significativa, mas somente a célula dendrítica do grupo A aumentou a expressão de CD40 e CD86 ($p<0.05$), enfatizando mais uma vez o estado de ativação diferente das células dendríticas imaturas do grupo B.

4.1.7 Avaliação funcional de células dendríticas: capacidade de induzir produção de IFN- γ em ensaios de co-cultivo com linfócitos autólogos

Com o intuito de verificar uma eventual diferença na capacidade das DC em ativar uma resposta específica nos linfócitos dos grupos A e B, foi realizado um ensaio de co-cultivo entre as 48 h - DC e linfócitos autólogos. Para avaliar a ativação linfocitária foi vista a produção de IFN- γ através de marcação intracelular e citometria de fluxo. A marcação intracelular de IFN- γ em células T autólogas (CD3⁺ IFN- γ +) após o co-cultivo com DC revelou que ambos os grupos de DC, A e B, induziram a produção de IFN- γ de uma forma similar (grupo A: 1.030 ± 0.461 ; grupo B: 1.080 ± 1.644 ; $p > 0.05$) (figura 12).

Figura 12 –Linfócitos T produtores de IFN- γ após ensaio de co-cultivo DC-linfócitos. São reportadas as porcentagens de linfócitos marcados intracelularmente por IFN- γ (CD3⁺ IFN- γ +) . A seleção de linfócitos positivos foi feita por comparação com amostras não-estimuladas, ou seja, cultivadas sem a presença de DC pulsadas. A análise estatística foi feita no software GraphPad Prism®, mediante o t test.

4.2 Discussão: etapas de diferenciação celular de monócitos em células dendríticas

Tem sido demonstrado que o perfil de expressão de DC pode ser usado com um preditor de funcionalidade e um guia de referência para ensaios clínicos baseados em células dendríticas em terapias para câncer (LIU et al., 2012). Como uma proposta similar, nós investigamos um conjunto de genes envolvidos na resposta anti-HIV em monócitos e células dendríticas usadas no ensaio de fase I/II (FMUSP). A análise da modulação da expressão gênica revelou um perfil diferente de expressão gênica em monócitos e dendríticas ao longo do protocolo de diferenciação *in vitro* entre os indivíduos estudados (P1-P6). A análise de agrupamento hierárquico separou as células dos pacientes em 2 grupos distintos, que

indicamos como A e B. A segregação obtida não separou os indivíduos na base dos dados clínicos, como níveis plasmáticos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ou carga viral plasmática (tabela 4) ou genéticos disponíveis, sugerindo a necessidade de se investigar os marcadores de caracterização para DC no contexto de uma imunoterapia.

As DC do grupo B aparentemente estão mais ativadas em termos de resposta ao HIV, mostrando uma maior expressão tanto de fatores de restrição quanto de cofatores do HIV-1 (Tabela 8), mas esse aumento de expressão não varia significativamente ao longo da diferenciação, possivelmente devido a características intrínsecas desses pacientes e não em consequência do protocolo de diferenciação de DC.

Além disso, essas células pareciam estar mais propensas à morte celular programada do que o grupo A, já que vários genes pró-apoptóticos (*BAD*, *BAX*, *CASP8*) foram significativamente mais expressos no grupo B. De forma contrária, *BAD* e *CASP8* estavam menos expressos em células dendríticas do grupo A. Alguns pesquisadores mostraram que monócitos de indivíduos HIV⁺ são caracterizados por uma assinatura anti-apoptótica (GIRI et al., 2009), no entanto nenhum dado foi publicado em relação a DC derivadas de monócitos. Podemos hipotetizar que o protocolo de diferenciação de DC a partir de monócitos pode atuar de diferentes maneiras, de acordo com o perfil de expressão original de monócitos, sugerindo que o estado de ativação de monócitos poderia ser levado em conta como um preditor prévio de características de DC antes da maturação dessas células, que atualmente representa um dos principais dados de controle de qualidade da aplicação de DC em pacientes.

A expressão alta de *IRF1* foi previamente descrita com um fator que contribui para suscetibilidade a infecção pelo HIV-1 (GIRI et al., 2009). Nossos achados evidenciam uma diferente modulação de expressão nesse fator de transcrição nos dois grupos de células dendríticas, (Figura 9), enfatizando uma vez mais que o perfil genético também pode nos informar sobre a funcionalidade da DC.

O papel emergente da IL-18 na patogênese do HIV tem sido recentemente descrito, sugerindo que a IL-18 poderia ser protetora contra a replicação do HIV (PAULS et al., 2013). A IL-18 desempenha um importante papel na biologia das DC, sendo necessária na indução de células T efectoras (WONG et al., 2013) e células T de memória (KUPZ et al., 2012). Além disso, tem sido observado em DC que o níveis aumentados de IL-18 correlaciona inversamente com IL10 (RODRIGUEZ-GALAN et al., 2009), como foi visto também nos nosso experimentos (Tabela 8).

Todos esses achados apontam que os critérios utilizados atualmente para a seleção dos indivíduos HIV⁺ para imunoterapia (principalmente CVP e contagem de CD4⁺ e CD8⁺) não

garantem uma ativação genômica adequada das células dendríticas derivadas de monócitos. Entretanto em nossos experimentos, possivelmente devido ao número limitado de indivíduos estudados, as diferenças observadas na expressão gênica não levaram a diferenças significativas em marcadores comumente utilizados para verificar a funcionalidade dessas células, como moléculas de ativação e maturação, ou a habilidade *in vitro* de induzir a produção de IFN γ (Figura 12).

Próximo a finalização dessa primeira parte do projeto, tivemos os resultados de acompanhamento clínico dos pacientes, o quais apontaram que desses 6 indivíduos estudados nenhum respondeu de modo satisfatório à imunoterapia (Δ CVP <1 log). Desse modo, não foi possível correlacionar a diferença no perfil de expressão gênico das células dendríticas com a resposta ao tratamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO- PARTE II

Ao final do ensaio clínico, após 6 meses de seguimento apenas um indivíduo HIV+, o P7, apresentou uma boa resposta ($\Delta\text{CVP} < 1 \log$), entre os 11 submetidos à imunoterapia. Os demais vacinados foram classificados como maus respondedores (“weak or transient” responders) ($\Delta\text{CVP} > 1 \log$).

A modulação da expressão gênica nos leucócitos circulantes foi avaliada em 6 pacientes (P6-P11). A variação de CVP para os 6 pacientes durante a imunoterapia e o seguimento vacinal está reportada na figura 13.

Figura 13 - Dados da variação de carga viral plasmática após a imunoterapia. Nesse gráfico são mostrados os valores de ΔCVP ($\log_{10}$ (CVP)) após a intervenção terapêutica nos pacientes P6-P11 nos tempos t1, t2, t3 (15, 30 e 45 dias após a 1ª dose de imunoterapia, respectivamente) e também 2 e 6 meses após a imunoterapia. A linha tracejada indica variação de CVP de 1 log, valor de ΔCVP considerado como significativo.

5.1 Análise da expressão gênica em PBMC de indivíduos submetidos à imunoterapia

A modulação da expressão gênica após a imunoterapia foi avaliada nos PBMC de 6 pacientes (P6-P11) comparando as coletas após o tratamento (t1, t2, t3) com a coleta antes do tratamento (t0). Os dados de FC são reportados no final do trabalho (APÊNDICE B).

Como já descrito em Materiais e Métodos, lembramos que:

- t1: 15 dias após t0 – 15 dias após dose 1

- t2: 30 dias após t0 – 15 dias após dose 2
- t3: 45 dias após t0 – 15 dias após dose 3

Vale ressaltar que um intervalo de 15 dias após a administração das doses da vacina é considerado “grande” para poder encontrar modulações agudas da expressão gênica induzida pela imunoterapia (HAGAN et al., 2015; NAKAYA; PULENDRAN, 2015), no entanto o desenho do estudo clínico não permitiu incluir para os pacientes visitas extras e mais próximas à administração de cada dose. Considerando isso, a estratégia de análise dos dados foi alterada em comparação a análise feita na parte I como será descrito a seguir.

5.2 Análise por heat map e agrupamento hierárquico

Com o intuito de verificar a associação entre o perfil de expressão gênica e a resposta à imunoterapia, construiu-se uma matriz representada por heat map considerando-se os valores de $\log_2$ FC e os tempos de coletas dos 6 pacientes (todos, ou cada tempo t1, t2, t3) (APÊNDICE C). Essa abordagem demonstrou agrupamentos “aleatórios” tanto para tempo quanto para os indivíduos, não permitindo uma segregação evidente dos pacientes.

Diante disso, considerando que as amostras foram coletadas 15 dias após a administração de cada dose da imunoterapia (intervalo de tempo grande para poder evidenciar modulações gênicas induzidas pela imunoterapia) e baseando-se na literatura (HAGAN et al., 2015), hipotetizamos que os genes muito modulados em nossas amostras poderiam representar alterações na expressão gênica decorrentes de eventos agudos e não estar relacionados com o tratamento em si como, por exemplo, efeitos remanescentes de infecções, pequenos traumas ou mal estar.

Figura 14 - Expressão relativa dos 86 genes analisados nos PBMC após a imunoterapia. São reportados valores de $\log_2 FC$ resultantes da comparação dos PBMC após a imunoterapia (t1, t2, t3) contra os PBMC antes da terapia (t0) para cada indivíduo HIV+ estudado (P6-P11). A linha tracejada indica o intervalo $-2 < \log_2 FC < 2$ (equivalente a $-4 < FC < 4$).

Assim, decidimos construir uma matriz para cada coleta do acompanhamento vacinal (t1, t2, t3) apenas utilizando os genes com $-4 < FC < 4$, os quais, de acordo com a nossa hipótese, seriam os genes com uma modulação mais relacionada aos efeitos exclusivos da imunoterapia. Essa abordagem permitiu a segregação do perfil de expressão do único bom respondedor, o P7, e dos maus respondedores em grupos diferentes em quase todos os tempos analisados. As representações por heat map dessas matrizes são reportadas nas figuras 15, 16 e 17.

Diante do exposto, as próximas análises do presente estudo considerarão somente os genes modulados dentro desse intervalo de FC.

Figura 16 – Heat map e agrupamento hierárquico PBMC após a segunda dose da imunoterapia (t2) São reportados valores de log₂ FC resultantes da comparação dos PBMC após a imunoterapia (t2) contra os PBMC antes da terapia (t0) para cada indivíduo HIV+ estudado (P6-P11). Os espaços em branco referem-se aos genes excluídos da análise.

Figura 17 – Heat map e agrupamento hierárquico PBMC após a terceira dose da imunoterapia (t3) São reportados valores de $\log_2$ FC resultantes da comparação dos PBMC após a imunoterapia (t3) contra os PBMC antes da terapia (t0) para cada indivíduo HIV+ estudado (P6-P11). Os espaços em branco referem-se aos genes excluídos da análise.

5.3 Genes modulados em resposta à imunoterapia e análise da função biológica

Dentro dos genes modulados no intervalo $-4 < FC < 4$, avaliamos quais genes apresentaram uma modulação diferente no indivíduo caracterizado por ser um bom respondedor, P7, em relação aos maus respondedores para cada tempo estudado.

Ao analisar os genes modulados após 15 dias da primeira dose de imunoterapia (t1), vimos que no P7 praticamente todos os genes com exceção de 2 (*CD56* e *IL7*) apresentaram $-4 < FC < 4$ (Figura 15). Dentro desses destacam-se os genes *CCL4* (FC=1,38), *ICOS* (FC=1,55), *LAG3* (FC=0,97) *MX1* (FC=0,57) e *PDL1* (FC=0,59) (Tabela 8) que estão modulados de modo oposto no P7 comparado com os maus respondedores. Do outro lado resultou que os genes *RORC* (média de FC=2,32) e *CXCL9* (média de FC=2,12) estavam modulados apenas nos maus respondedores (Tabela 9).

Figura 18 - Expressão relativa dos 86 genes analisados nos pacientes P7, P8, P9, P10 e P11 após 15 dias da primeira dose de imunoterapia (t1). Os dados foram representados na forma de $\log_2 FC$. A linha tracejada indica o intervalo escolhido para análise ($-2 < \log_2 FC < 2$ equivalente a $-4 < FC < 4$).

Quinze dias após receber a primeira dose da imunoterapia (t1) (figura 18), de acordo com o Genemania (APÊNDICE D), houve uma expressão aumentada de genes relacionados à proliferação de linfócitos ($FDR: 4.25^{-4}$) e resposta imune adaptativa ($FDR: 3.14^{-3}$). Ao mesmo tempo estavam menos expressos genes relacionados a resposta viral baseada em interferon do tipo I ($FDR: 3,91^{-20}$).

Tabela 9 - Genes modulados após 15 dias da primeira dose de imunoterapia

Tipo de modulação	Genes regulados apenas nos maus respondedores	Genes regulados de maneira oposta P7 x maus respondedores
Up	<i>CXCL9, RORC</i>	<i>CCL4, ICOS</i>
Down		<i>LAG3, MX1, PDL1</i>

Após 15 dias da segunda dose de imunoterapia (t2), ainda a maioria dos genes do P7 (77/86) apresentaram $-4 < FC < 4$ (Figura 16). Os genes *CD25* ($FC=1,31$), *IFI16* ($FC=3,39$), *IL8* ($FC=2,75$), *ISG15* ($FC=2,28$), *STAT1* ($FC=1,69$), *TAP1* ($FC=1,78$), *IL7* ($FC=0,34$), *PDL1* ($FC=20,25$), *CD40L* ($FC=0,67$), *EOMES* ($FC=0,90$) estavam modulados de modo oposto no P7 comparado aos maus respondedores. Por outro lado, apenas os maus respondedores apresentaram a modulação para *ICOS* (média de $FC=4,30$) (Tabela 10).

Figura 19 - Expressão relativa dos 86 genes analisados nos pacientes P7, P8, P9, P10 e P11 após 30 dias da primeira dose de imunoterapia (t2). Os dados foram representados na forma de FC. A linha tracejada indica o intervalo escolhido para análise ($-2 < \log_2 FC < 2$ equivalente a $-4 < FC < 4$).

Tabela 10 - Genes modulados após 30 dias da primeira dose de imunoterapia

Tipo de modulação	Genes regulados apenas nos maus respondedores	Genes regulados de maneira oposta P7 x maus respondedores
Up	ICOS	BST2, CD14, CD25, IFI16, IL8, ISG15, STAT1, TAP1
Down		CD40L, EOMES, FASL, IL7, PD1

Após 30 dias da primeira dose (t2) (figura 19), de acordo com o Genemania (APÊNDICE D), ao contrário do que foi visto anteriormente, houve uma maior expressão de genes relacionados a resposta viral baseada em interferon do tipo I (FDR: $3,91^{-21}$) e uma menor expressão de genes relacionados a coestimulação de linfócitos (FDR: $3,19^{-13}$), regulação positiva e ativação de células (FDR: $2,8^{-12}$).

Em t3, após 15 dias da terceira dose de imunoterapia, (figura 20) os dados apresentaram-se mais dispersos em relação aos outros tempos, principalmente nos pacientes P7 (73/86), P9 (73/86) e P10 (58/86). Os genes *CCL4* (FC=1,56), *CCL5* (FC=2,60), *CCR7* (FC=4,38), *EOMES* (FC=1,46), *NKG2D* (FC=3,53) e *TIM3* (FC=3,78) estavam diferentemente modulados em P7 comparado aos maus respondedores. Os genes *CCL20* (média de FC=2,88) e *CNOT1* (FC=0,77) estavam modulados nos mau respondedores (Tabela 11). É interessante reparar que no paciente P7, o gene *CNOT1* tem um FC=0,16 que indica uma down regulação maior que maus respondedores e fora do nosso intervalo de análise.

Figura 20 - Expressão relativa dos 86 genes analisados nos pacientes P7, P8, P9, P10 e P11 após 45 dias da primeira dose de imunoterapia (t3). Os dados foram representados na forma de $\log_2 FC$. A linha tracejada indica o intervalo escolhido para análise ($-2 < \log_2 FC < 2$ equivalente a $-4 < FC < 4$).

Tabela 11 - Genes modulados após 45 dias da primeira dose de imunoterapia

Tipo de modulação	Genes regulados apenas nos maus respondedores	Genes regulados de maneira oposta P7 x maus respondedores
Up	CCL20	CCL4, CCL5, CCR7, EOMES, NKG2D, TIM3
Down	CNOT1*	-

*P7-FC=0,16.

Passados 45 dias da primeira intervenção (t3), foi vista no bom respondedor maior expressão de genes envolvidos na ativação de células T (FDR: $2,29^{-11}$), citotoxicidade mediada por NK (FDR: $2,29^{-11}$) e quimiotaxia de leucócitos (FDR: $2,29^{-11}$) (APÊNDICE D).

Para destacar a modulação dos genes selecionados ao longo do tratamento em P7 e nos maus respondedores, os dados de expressão relativa nos 3 tempos analisados (t1, t2, t3) foram reportados em heat maps (Figura 21). As setas brancas representam os dados fora do intervalo escolhido para análise, ou seja, valores $FC < -4$ e > 4 ($\log_2 FC < -2$ e > 2). Sendo que a seta para cima indica $FC > 4$ e seta para baixo, $FC < -4$.

Figura 21 – Heat map dos genes diferentemente expressos nos 3 tempos analisados. São reportados valores de log₂ FC resultantes da comparação dos PBMC após a imunoterapia (t1, t2 e t3) contra os PBMC antes da terapia (t0) para o paciente P7 e para os pacientes P6, P8, P9, P10 e P11. Abreviaturas - NA: não amplificou

O paciente P7 apresentou uma mudança de sentido na modulação da expressão gênica após t2, ou seja, os genes passaram de mais expressos para menos expressos e vice-versa, com exceção de *CCL4*, *CCL5*, *CCR7* e *TIM3*. Em quase todos os genes a modulação de t1 e t3 tiveram o mesmo sentido.

Em relação aos maus respondedores esse tipo de resposta contrária em t2 foi observada também.

Em relação aos genes que foram modulados apenas nos maus respondedores (Figura 22), vimos novamente esse tipo de resposta, onde o sentido da modulação muda em t2. Os pacientes apresentam muitas diferenças entre si, em destaque o paciente P10 que parece modular de forma diferente a maioria dos genes.

Figura 22 – Heat map dos genes diferentemente expressos apenas nos maus respondedores nos 3 tempos analisados . São reportados valores de log₂ FC resultantes da comparação dos PBMC após a imunoterapia (t1, t2 e t3) contra os PBMC antes da terapia (t0) para o paciente P7 e para os pacientes P6, P8, P9, P10 e P11.

5.4 Modulação da expressão dos genes *NOS1* e *MBL2* em PBMC após a imunoterapia

Considerando os resultados de associação entre SNP nos genes *NOS1* (rs693534) e *MBL2* (rs10824) e a resposta à imunoterapia do ensaio de fase I da UFPE (SEGAT et al., 2010), analisamos a expressão desses dois genes nos PBMC antes e após a imunoterapia, porém não conseguimos verificar a amplificação de *NOS1* e *MBL2* nas amostras de PBMC analisadas.

5.5 Modulação da expressão dos genes do inflamassoma em PBMC após a imunoterapia

Considerando dados previamente reportados sobre a expressão constitutiva de genes do inflamassoma em células dendríticas de pacientes HIV+ (PONTILLO; SILVA; et al., 2012) foi avaliada a expressão de genes do inflamassoma *IL1B*, *CASP1* e *IL18* nos leucócitos circulantes dos indivíduos submetidos à imunoterapia com um ensaio de sonda específica.

Figura 23 - Expressão gênica relativa de genes relacionados ao inflamassoma. São representados os valores de log2FC das amostras em t1. A análise estatística foi feita no software GraphPad Prism®, mediante o teste Two-Way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Foi observada a modulação de *IL1B*, *IL18* e *CASP1* em leucócitos dos pacientes submetidos à imunoterapia (figura 23), de acordo com dados previamente publicados (PONTILLO; SILVA; et al., 2012). O gene da *IL18* não mostrou diferenças entre os pacientes maus respondedores e o bom respondedor.

A avaliação da modulação da expressão gênica dos pacientes HIV+ submetidos à imunoterapia revelou que o P7, único bom respondedor do protocolo, não expressa nenhuma gene de modo exclusivo em nenhum dos tempos estudados, porém modula de forma diferente alguns genes comparado com os indivíduos que não responderam ao tratamento. De outro lado os maus respondedores modulam a expressão de alguns genes de modo exclusivo.

5.6 Discussão: PBMC de indivíduos submetidos à imunoterapia

Na segunda parte do projeto, avaliamos a modulação da expressão gênica nos PBMC de 6 pacientes submetidos à imunoterapia. Desses 6 pacientes (P6-P11), um único indivíduo, P7, resultou responsivo ao tratamento (bom respondedor, $\Delta\text{CVP} > 1 \log$).

Não esperando encontrar modulações agudas da expressão gênica induzida pela imunoterapia nos PBMC após 15 dias escolhemos uma estratégia de análise diferente em comparação a análise feita na parte I, em vez de modulação “extremas” ($|\text{FC}| > 4$), consideramos modulações menores ($|\text{FC}| < 4$), de acordo com trabalhos semelhantes (HAGAN et al., 2015; NAKAYA; PULENDRAN, 2015).

A análise de agrupamento hierárquico dos dados de expressão gênica mostrou a segregação do perfil dos PBMC do P7 em relação aos maus respondedores em todos os tempos analisados (Figuras 16,17,18), sugerindo que o perfil gênico avaliado está relacionado com a resposta à imunoterapia. Em nenhum dos tempos considerados, os PBMC do P7 apresentaram a expressão exclusiva de algum dos genes investigados, porém em cada tempo P7 apresentou alguns genes diferencialmente modulados comparado com os maus respondedores (Tabelas 9, 10 e 11).

Quinze dias após receber a primeira dose da imunoterapia (t1), nos PBMC de P7 foi vista uma aumentada expressão de *CCL4* e *ICOS*. *CCL4*/ MIP-1b é uma quimiocina capaz de se ligar à CCR5 e competir pela ligação com o vírus HIV-1 (COCCHI et al., 1995; SAMSON et al., 1996), sugerindo que o aumento de expressão observado no P7 seria importante para diminuir a replicação do HIV-1 nesse paciente. A sinalização de ICOS está relacionada com a expansão de células T efectoras (JURADO et al., 2012; LOKE; ALLISON, 2004), indicando que o P7 apresenta uma indução de genes associados a ativação de resposta imune específica. *LAG3*, *MX1* e *PDL1*, genes relacionados à resposta viral baseada em interferon do tipo I, encontram-se menos expressos em t1 comparado com t0. *LAG3* já foi relacionado com a exaustão de linfócitos T CD8+ na infecção pelo HIV-1 (YAMAMOTO et al., 2011). Uma vez que a expressão desse gene no P7 estava diminuída, isso poderia estar relacionado com uma menor exaustão do sistema imune nesse paciente, ou seja, com uma melhor capacidade de ativação imune. Por outro lado, Pena et al., (2014) viram que a expressão aumentada desse gene em células T CD8+ está correlacionada inversamente com a carga viral plasmática, sugerindo assim efeito de controle viral.

No t1, os pacientes maus respondedores (P6, P8, P9, P10 e P11) mostraram uma modulação exclusiva de 2 genes, *CXCL9* (expressão aumentada) e *RORC* (expressão

diminuída). O *CXCL9* é induzido na resposta anti-HIV (HYRCZA et al., 2007). A expressão aumentada de *RORC*, fator de transcrição específico para a subpopulação Th17, poderia indicar uma maior diferenciação de células T CD4⁺ para a subpopulação Th17 nesses pacientes. Em pacientes que progridem para AIDS sabe-se que ocorre uma grande perda de células Th17 (GUILLOT-DELOST et al., 2012), no entanto como essa subpopulação, de modo geral, pode estar associada tanto com respostas protetivas quanto prejudiciais e sua função na infecção pelo HIV-1 não está caracterizada completamente, esse aumento de expressão de *RORC* nos maus respondedores não é tão informativo.

Após 30 dias da primeira dose (t2), e após 15 dias da segunda dose, nos PBMC do P7 foi visto um aumento da expressão de genes relacionados à resposta viral baseada em interferon do tipo I (*BST-2/tetherin*, *CD14*, *CD25*, *IFI16*, *IL8*, *ISG15*, *STAT1*, *TAP1*), o mesmo não se observou nos maus respondedores. Uma expressão elevada de *CD14* na superfície celular foi previamente associada a uma capacidade de controlar a replicação do HIV-1 em controladores de elite (KRISHNAN et al., 2014), sugerindo que a maior expressão do gene *CD14* vista em P7 poderia estar associada a um controle melhor da carga viral nesse paciente. Raposo et al., (2013) viram uma alta indução da expressão de *BST-2/tetherin* e *ISG15* em PBMC de doadores saudáveis ativados *in vitro* com o vírus HIV-1. Além disso, foi visto que a expressão de *BST-2* correlaciona negativamente com a infectividade do HIV-1 (KUHL et al., 2010). A alta carga viral em pacientes HIV⁺ estaria associada a uma menor expressão de *CD25* em Treg e isso poderia afetar a capacidade de expansão dessas células em resposta ao IL-2 produzido por células T CD4⁺ (READ et al., 2006). Em nossos dados, o paciente de melhor resposta à imunoterapia, mostrou uma alta expressão do gene *CD25*, o que poderia estar relacionado com uma função de Treg mais preservada.

IFI16 é uma proteína sensor de DNA induzível pelo IFN- γ capaz de induzir a transcrição de genes de IFNs de tipo I e também a ativação do inflamassoma. Recentes estudos mostraram que o nível de expressão do *IFI16* está aumentado em pacientes HIV⁺ naíves de tratamento antirretroviral (NISSEN et al., 2014) e que *IFI16* medeia a morte inflamassoma-dependente dos linfócitos CD4⁺ infectados por HIV-1 (MONROE et al., 2014). O indivíduo P7 apresentou um aumento na expressão desse gene em t2, sugerindo que isso pode estar ligado tanto com o aumento observado dos genes da assinatura de interferon (Tabela 10), tanto com a ativação do inflamassoma. Esse dado está em acordo com o resultado da expressão de outros genes do inflamassoma analisados, *IL1B*, *IL18* (Figura 23) que se encontra aumentada exclusivamente nesse paciente.

STAT1 é conhecido por mediar a expressão de outros genes envolvidos na viabilidade

celular, enquanto *TAP1* está envolvido na apresentação de antígenos para linfócitos. Em nossos dados, *STAT1* e *TAP1* estavam mais expressos em P7, sugerindo uma melhor conservação das funções imunes nesse paciente.

No t2, P7 mostrou uma diminuição da expressão de *CD40L*, *EOMES*, *FASL*, *IL7*, *PD1*. A expressão de superfície aumentada de CD40L e PD1 foi vista em controladores de elite (WHITTALL et al., 2011), no entanto quando consideramos os outros tempos, vimos que essa diminuição da expressão foi apenas transitória e possivelmente não está relacionada com aumento de progressão da doença. A expressão de *FASL*, relacionado à capacidade citotóxica, também apresentou o mesmo comportamento, ou seja, teve uma diminuição apenas em t2. Olhando os demais tempos, não houve co-expressão com *FAS* no PBMC desse paciente, sugerindo que a apoptose não parece estar aumentada nesse paciente. A *IL-7* é conhecida por seus efeitos anti-apoptóticos e proliferativos em células. Na infecção pelo HIV-1 os níveis dessa citocina encontram-se altos e isso pode contribuir para a diminuição da expressão do seu receptor CD127 (O'CONNOR; CRAWLEY; ANGEL, 2010). Em relação à expressão gênica, *IL7* estava menos expresso no bom respondedor, mostrando um padrão mais próximo a indivíduos não infectados.

Em t2, os maus respondedores mostraram um aumento exclusivo da expressão de *ICOS*, o que em t1 foi visto apenas em P7.

Passados 45 dias da primeira intervenção e após 15 dias da terceira dose (t3), foi vista no bom respondedor uma aumentada expressão dos genes *EOMES* e *TIM3*, envolvidos na ativação de células T, *NKG2D*, que medeia a citotoxicidade mediada por NK e *CCL4*, *CCL5*, *CCR7*. Como já foi mencionado acima, um aumento de *CCL4* e *CCL5*, quimiocinas que competem com HIV-1 para a ligação com o correceptor *CCR5*, seria um bom prognóstico com relação ao controle viral (COCCHI et al., 1995; SAMSON et al., 1996).

Em 2014, pesquisadores viram que o HIV-1+ diminui a expressão de superfície de *CCR7*, o que compromete a migração e a sinalização quimiotática em células T CD4+ (RAMIREZ et al., 2014). Essa aumentada expressão do *CCR7* pode sugerir que o P7 consegue manter características importantes para a função do sistema imune ao contrário dos outros pacientes.

Indivíduos HIV+ não-progressores e controladores de elite apresentam células NK com uma alta expressão de *NKG2D* (MARRAS et al., 2013). Dessa forma a expressão desse gene seria benéfica, o que é consistente com a aumentada expressão de *NKG2D* observada no P7 ao t3.

O paciente P7 mostrou uma diminuição (t2) e um aumento (t3) da expressão de *EOMES* ao longo do seguimento vacinal. A diminuída expressão de *EOMES* foi associada com o declínio de células T CD8+ funcionais (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2012). No entanto a função desse marcador ainda não está bem esclarecida, e em nossos dados não conseguimos entender a modulação desse gene em relação com a resposta a imunoterapia.

Em relação a TIM3, células que expressam essa molécula apresentam um disfunção na proliferação e produção de citocinas (ZHANG et al., 2015). Essa exaustão relacionada a TIM3 não seria interessante em termos de resposta à imunoterapia, de modo que não conseguimos explicar um aumento de expressão do gene *TIM3* no P7.

Em t3, os maus respondedores mostraram a expressão exclusiva de 2 genes *CCL20* (aumentada) e *CNOT1* (diminuída). O gene *CNOT1* já foi correlacionado com uma má resposta ao tratamento nos pacientes submetidos à imunoterapia de Lu et al. (2004) (MOURA et al., 2014). Em nossos pacientes maus respondedores, foram vistos baixos níveis de expressão desse gene, no entanto no P7 essa expressão era menor ainda ($FC < -4$), o que seria benéfico em nosso contexto.

É importante ressaltar que alguns genes diferencialmente expressos no P7 e nos maus respondedores foram também relacionados com resposta à vacinas preventivas. A vacina de varíola induz a expressão dos genes *CCL20*, *ISG15*, *FASL* em *PBMC* (HARALAMBIEVA et al., 2012) que também foram modulados na imunoterapia. Em resposta às vacinações com o vírus vaccínia e o vírus da febre amarela (SCHERER et al., 2007) foram vistos aumentos de expressão nos genes *STAT1* e *ISG15*.

Em estudos de resposta a diferentes tipos de imunoterapia, como a utilizada em paciente com câncer, também observou-se a modulação de genes expressos nos nossos pacientes. O aumento de expressão dos genes *CCL4* e *CCL5* foi visto em linfócitos do sangue periférico de pacientes com carcinoma renal tratados com imunoterapia (WOLF et al., 2012), indicando uma modulação da expressão dos *PBMC* não relacionada diretamente com a imunoterapia contra o HIV-1, mas a um mecanismo mais geral de resposta imune.

Apesar de sugerir todas essas relações entre nossos resultados e o efeito em pacientes HIV-1+, é importante considerar que o uso de *PBMCs* pode limitar interpretações por causa da diluição e pode não refletir o perfil gênico das subpopulações individuais (BRYANT et al., 2009).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO- PARTE III

6.1 Genotipagem dos pacientes submetidos à imunoterapia

6.1.1 Polimorfismos de base única previamente associados à resposta a imunoterapia para indivíduos HIV+

Considerando resultados anteriores do nosso grupo em relação ao perfil genômico da resposta à imunoterapia e a identificação de polimorfismos em genes da imunidade inata (*NOS1*, *MBL2*) associados com a resposta ao tratamento (SEGAT et al., 2010), foram analisados os polimorfismos rs693534 no gene *NOS1* e rs10824 no gene *MBL2* nos 11 indivíduos HIV+ estudados (P1-P11). As características dos SNPs estão reportados na tabela 12.

Tabela 12 - Descrição dos genes avaliados nesse trabalho

Genes	Polimorfismo	Alelos	MAF*
<i>NOS1</i>	rs693534	G>A	A : 0.36
<i>MBL2</i>	rs10824	C>T	T: -

*Minor allele frequency

A genotipagem resultou nos dados apresentados na tabela 13. Apenas para o indivíduo P11 não temos todos os dados de amplificação apesar de ter repetido o experimento várias vezes.

Tabela 13 - Polimorfismos previamente associados à resposta a imunoterapia nos 11 pacientes utilizados no trabalho

Genes	SNP ID	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
<i>NOS1</i>	rs693534	A/G	A/A	A/G	G/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G
<i>MBL2</i>	rs10824	C/T	C/C	C/T	C/T	C/T	C/C	C/T	C/T	C/T	C/C	C/T

O P7 carrega um alelo polimórfico dos 2 SNPs, no entanto os outros pacientes HIV+ que não responderam à imunoterapia também carregam, sendo assim não dá para confirmar o dado de associação entre esses dois SNPs e a resposta a imunoterapia (SEGAT et al., 2010).

Quando tentamos associar esses dados com a variação de CD4+ e CVP (Figura 24),

vimos que o SNP rs693534 no gene *NOS1* mostrou uma associação entre o genótipo A/G e um aumento na contagem de linfócitos T CD4+ e uma diminuição na CVP nos pacientes vacinados. Da mesma forma o SNP rs10824 no gene *MBL2* mostrou a mesma associação. No entanto essas associações não foram estatisticamente significantes.

Figura 24 – Nível plasmático de linfócitos CD4+ e redução da carga viral plasmática (CVP) em 11 pacientes em t3 em acordo com os genótipos de *NOS1* rs693534 e *MBL2* rs10824 . Os dados foram analisados com t-test. * $p < 0,05$.

6.1.2 Polimorfismos em fatores de restrição para o HIV-1

Nos 11 indivíduos HIV+ estudados foram analisados polimorfismos para fatores de restrição para o HIV-1 (*APOBEC3G*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CCR5*, *CUL5*, *CXCR6*, *HLA-C*, *IFNG*, *PARD3B*, *PROX1*, *CXCR6*, *CXCL12*, *TRIM5*, *ZNRD1*) previamente analisados na fase I do mesmo ensaio clínico de Lu et al. (2004) (PONTILLO et al., 2014). As características dos polimorfismos são reportados na tabela 14.

Tabela 14 - Descrição dos polimorfismos em fatores de restrição para o HIV-1

Genes	Polimorfismo	Alelos	MAF*
<i>APOBEC3G</i>	rs3736685	T>C	C: 0.03
	rs2294367	G>C	C: 0.42
<i>CCL3</i>	rs1719134	G>A	A: 0.24
<i>CCL4</i>	rs1719153	A>T	T: 0.28
<i>CCL5</i>	rs2280789	A>G	G: 0.10
	rs2107538	C>T	T: 0.18
<i>CCR5</i>	$\Delta 32$	Wt> $\Delta 32$	-
<i>CUL5</i>	rs7117111	G>A	A: 0.40
	rs11212495	A>G	G: 0.12
	rs7103534	C>T	C: 0.13
<i>CXCR6</i>	rs2234358	T>G	T: 0.41
<i>HLA – C</i>	rs10484554	C>T	T: 0.13
	rs9264942	T>C	C: 0.34
<i>IFNG</i>	rs2069709	A>C	A: - 0.06
<i>PARD3B</i>	rs11884476	C>G	G: 0.04
<i>PROX1</i>	rs17762192	G >C	C: 0.42
<i>CXCL12</i>	rs1801157	T>C	C: 0.40
<i>TRIM5</i>	rs16934386	A>G	-
	rs10838525	C>T	T: 0.37
	rs3740996	G >A	A: 0.13
<i>ZNRD1</i>	rs3869068	C >T	T: 0.08

*Minor allele frequency

Na tabela 15 são reportados os resultados da genotipagem. Para o indivíduo P11 não temos todos os dados de amplificação apesar de ter repetido o experimento várias vezes.

Tabela 15 - Polimorfismos em genes de fatores de restrição ao HIV nos 11 pacientes utilizados no trabalho

Genes	Polimorfismo	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
<i>APOBEC3G</i>	rs3736685	T/T	T/T	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/T	C/T	N
	rs2294367	C/G	C/G	C/G	C/G	G/G	C/C	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G
<i>CCL3</i>	rs1719134	A/G	G/G	A/G	G/G	G/G	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	N
<i>CCL4</i>	rs1719153	T/T	A/A	A/T	A/T	A/T	T/T	A/T	A/T	A/T	A/T	N
<i>CCL5</i>	rs2280789	A/G	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	A/G	A/A	A/A	N
	rs2107538	C/T	C/T	C/C	C/T	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	C/T	N
<i>CCR5</i>	$\Delta 32$	wt/wt	wt/wt	wt/wt	wt/wt	wt/wt	wt/wt	wt/wt	wt/wt	wt/wt	wt/wt	wt/wt
<i>CUL5</i>	rs7117111	A/G	A/G	A/G	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	A/G	A/A	N
	rs11212495	A/A	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	N
	rs7103534	T/T	T/T	T/T	C/T	C/T	T/T	T/T	T/T	C/T	C/T	N
<i>CXCR6</i>	rs2234358	T/T	T/T	G/G	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/G	G/T	N
<i>HLA – C</i>	rs10484554	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C	N
	rs9264942	C/T	C/T	C/T	C/C	C/T	C/T	C/T	C/C	C/T	T/T	N
<i>IFNG</i>	rs2069709	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	N
<i>PARD3B</i>	rs11884476	C/C	C/G	C/C	C/C	C/C	C/C	C/G	C/C	C/C	C/C	N
<i>PROX1</i>	rs17762192	G/G	G/G	C/C	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	G/G	C/G	N
<i>CXCL12</i>	rs1801157	C/C	C/C	C/T	C/T	C/T	C/T	C/C	T/T	C/T	C/C	N
<i>TRIM5</i>	rs16934386	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	N
	rs10838525	C/T	C/C	C/C	T/T	C/T	C/C	C/C	T/T	C/T	C/C	N
	rs3740996	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/G	G/G	N
<i>ZNRD1</i>	rs3869068	CT	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	N

O indivíduo P7, único bom respondedor, carrega em homozigose os polimorfismos de *CCL5*, rs2280789 e rs2107538, e de *CXCL12/SDF1*, rs1801157, porém apenas o rs2280789 é exclusivo do P7. A quimiocina *CCL5* é considerada um fator de suscetibilidade ao HIV-1, pela ligação competitiva e downregulação de *CCR5*, ou seja, pode inibir a entrada do vírus e a replicação. O alelo polimórfico T do SNP rs2107538 tem sido reportado como aumentar a transcrição de *CCL5*, podendo levar a uma alta concentração plasmática (LI; LIU; HONG, 2014). No entanto, o alelo polimórfico G de rs2280789 está relacionado com baixa expressão de *CCL5*, favorecendo a infecção pelo HIV-1 e a progressão da doença (AN et al., 2002).

Um outro dado que queremos destacar é a heterozigose de P7 pelo SNP de *PARD3B* rs11884476. Esse dado replica os nossos resultados de genotipagem dos pacientes submetidos à imunoterapia na fase I do ensaio clínico, aonde o mesmo SNP, de acordo com um modelo over-dominante, estava também associado à uma boa resposta ao tratamento (PONTILLO et al., 2014).

Figura 25 - - Contagem de CD4+ em 11 pacientes em t3 em acordo com os genótipos dos polimorfismos analisados. A análise estatística foi feita no software GraphPad Prism®, mediante t test. * $p < 0,05$.

Quando tentamos associar os dados de genotipagem com a variação de CD4+ (Figura 25) ou a variação de CVP (Figura 26) vimos que não houve nenhuma associação significativa com a variação de carga viral ou CD4+. Os gráficos dos demais polimorfismos não foram mostrados.

Figura 26 - Redução da carga viral plasmática (CVP) em 11 pacientes em t3 em acordo com os genótipos dos polimorfismos analisados. A análise estatística foi feita no software GraphPad Prism®, mediante t test.

6.2 Discussão: genotipagem dos pacientes submetidos à imunoterapia

O nosso grupo de pesquisa hipotetizou que o background genético do paciente submetido à imunoterapia pode afetar a resposta ao tratamento.

Os resultados obtidos com relação a genotipagem dos SNPs de *MBL2* e *NOS1* não foram suficientes para replicar os dados observados no ensaio clínico de fase I desenvolvido na UFPE (SEGAT et al., 2010).

A análise dos polimorfismos nos fatores de restrição mostrou a presença no P7 dos SNPs de *CCL5*, rs2280789 e rs2107538. No ensaio clínico de fase I, foi visto por Pontillo et al. (2014) que em indivíduos com uma boa resposta estavam presentes os genótipos C/C e A/A para os SNPs de *CCL5* rs2107538 e rs2280789, respectivamente, mas é importante considerar que essa associação não foi significativa. O fato do bom respondedor desse estudo atual ter apresentado genótipos diferentes não permite maiores conclusões, já que antes era analisado um grupo de bons respondedores e agora apenas 1 indivíduo.

Por outro lado, o P7 resultou heterozigose pelo SNP de *PAR3B* rs11884476. Esse dado replica os nossos resultados de genotipagem dos pacientes submetidos à imunoterapia na

fase I do ensaio clínico, aonde o mesmo SNP, de acordo com um modelo over-dominante, estava também associado à uma boa resposta ao tratamento (PONTILLO et al., 2014).

Esses dados reforçam a hipótese de que indivíduos com um perfil genético menos permissivo à infecção ou replicação viral poderiam responder melhor à imunoterapia.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo avaliamos a contribuição do perfil genético de pacientes HIV+ submetidos à imunoterapia no ensaio de fase I/II tanto como *background* genético quanto como modulação de expressão gênica nas etapas de diferenciação *in vitro* de monócitos-DC e em PMBC isolados antes e após o tratamento. Esse estudo pertence a um amplo trabalho que objetivou explorar esse *background* genético da resposta à imunoterapia e identificar marcadores preditivos de sucesso ao tratamento. O nosso grupo de pesquisa está convencido de que a resposta à imunoterapia baseada em células dendríticas pode ser considerada com um traço multifatorial, onde fatores genéticos devem ser levados em consideração e que, futuramente, esses marcadores possam ser considerados para outros ensaios clínicos.

Os nossos resultados apontaram que:

- existe diferenças no perfil de expressão de genes envolvidos na resposta a HIV-1 nas DC dos pacientes incluídos no ensaio clínico de modo independente das etapas de diferenciação *in vitro* de monócitos-DC. Essa diferença observada, aparentemente não correlacionou com características fenotípicas ou funcionais das DC nem com a resposta à imunoterapia já que nenhum dos pacientes analisados respondeu ao tratamento;
- apesar de apenas um indivíduo responder bem à imunoterapia, o P7 mostrou um perfil de expressão gênica específico relacionado com um maior controle de replicação viral e uma resposta polarizada para Th1. Porém não podemos descartar que essa boa resposta à imunoterapia possa ser decorrente de fatores intrínsecos do paciente relacionados com a capacidade dele de controlar a infecção.
- o único paciente que responde à imunoterapia carrega um polimorfismo associado, previamente no ensaio clínico de fase I (UFPE), a uma boa resposta. Isso confirma a hipótese que o *background* genético possa afetar a resposta ao tratamento de modo semelhante à resposta a infecção por HIV-1/progressão a AIDS.

Desta forma, também considerando que os resultados são limitados pelo número de amostras analisadas, podemos sugerir que a avaliação do perfil genômico deveria ser considerada importante no desenho dos ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS*

- AN, P. et al. Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, n. 15, p. 10002-10007, Jul 23 2002.
- AN, P.; WINKLER, C. A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. **Trends Genet.**, v. 26, n. 3, p. 119-131, Mar 2010.
- ARICO, E. et al. Immature monocyte derived dendritic cells gene expression profile in response to Virus-Like Particles stimulation. **J. Transl. Med.**, v. 3, p. 45, 2005.
- BAKER, B. M. et al. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v. 9, n. 1, p. 55-69, Jan 2009.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, Mar 19 1998.
- BARRON, M. A. et al. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 1, p. 26-37, Jan 1 2003.
- BONIOTTO, M. et al. MBL2 polymorphisms are involved in HIV-1 infection in Brazilian perinatally infected children. **AIDS**, v. 17, n. 5, p. 779-80, Mar 28 2003.
- BOSWELL, K. L. et al. Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 1, p. e1003853, Jan 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **AIDS Boletim Epidemiológico: AIDS/DST**, 2013.
- BRYANT, P. A. et al. Detection of gene expression in an individual cell type within a cell mixture using microarray analysis. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4427, 2009.
- BUONAGURO, L. et al. Gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells in response to HIV-VLPs stimulation. **BMC Bioinformatics**, v. 9 Suppl 2, p. S5, 2008.
- BUONAGURO, L.; PULENDRAN, B. Immunogenomics and systems biology of vaccines. **Immunol. Rev.**, v. 239, n. 1, p. 197-208, Jan 2011.
- CARRINGTON, M.; MARTIN, M. P.; VAN BERGEN, J. KIR-HLA intercourse in HIV disease. **Trends Microbiol.**, v. 16, n. 12, p. 620-627, Dez 2008.
- CARRINGTON, M. et al. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. **Science**, v. 283, n. 5408, p. 1748-1752, Mar 12 1999.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CARRINGTON, M.; O'BRIEN, S. J. The influence of HLA genotype on AIDS. **Annu. Ver. Med.**, v. 54, p. 535-551, 2003.

CHATTERJEE, A. et al. Chemokines and chemokine receptors in susceptibility to HIV-1 infection and progression to AIDS. **Dis. Markers**, v. 32, n. 3, p. 143-151, 2012.

CHEN, L. F.; HOY, J.; LEWIN, S. R. Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. **Med. J. Aust.**, v. 186, n. 3, p. 146-151, Feb 5 2007.

COCCHI, F. et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. **Science**, v. 270, n. 5243, p. 1811-1815, Dez 15 1995.

CONNOLLY, N. C. et al. Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, n. 2, p. 284-92, Feb 2008.

DAVEY, R. T., JR. et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 26, p. 15109-15114, Dez 21 1999.

DE GOEDE, A. L. et al. DC immunotherapy in HIV-1 infection induces a major blood transcriptome shift. **Vaccine**, v. 33, n. 25, p. 2922-2929, Jun 9 2015.

DEAN, M. et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. **Science**, v. 273, n. 5283, p. 1856-1862, Set 27 1996.

DOLAN, M. J. et al. CCL3L1 and CCR5 influence cell-mediated immunity and affect HIV-AIDS pathogenesis via viral entry-independent mechanisms. **Nat. Immunol.**, v. 8, n. 12, p. 1324-1336, Dec 2007.

FELLAY, J. et al. Host genetic determinants of T cell responses to the MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef vaccine in the step trial. **J. Infect. Dis.**, v. 203, n. 6, p. 773-779, Mar 15 2011.

FINZI, D.; SILICIANO, R. F. Viral Dynamics in HIV-1 Infection. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 665-671, 5/29/ 1998.

FONTAINE, J.; POUDRIER, J.; ROGER, M. Short communication: persistence of high blood levels of the chemokines CCL2, CCL19, and CCL20 during the course of HIV infection. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 27, n. 6, p. 655-7, Jun 2011.

GANDHI, R. T. et al. A randomized therapeutic vaccine trial of canarypox-HIV-pulsed dendritic cells vs. canarypox-HIV alone in HIV-1-infected patients on antiretroviral therapy. **Vaccine**, v. 27, n. 43, p. 6088-6094, Out 9 2009.

GAO, X. et al. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 22, p. 1668-16675, Maio 31 2001.

GARCIA, F. et al. A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection. **J. Infect. Dis.**, v. 203, n. 4, p. 473-478, Feb 15 2011.

GARCIA, F.; ROUTY, J. P. Challenges in dendritic cells-based therapeutic vaccination in HIV-1 infection Workshop in dendritic cell-based vaccine clinical trials in HIV-1. **Vaccine**, v. 29, n. 38, p. 6454-6463, Set 2 2011.

GARCIA, F. et al. Immunotherapy and therapeutic vaccines in HIV infection. **Enferm. Infect. Microbiol. Clin.**, v. 23 Suppl 2, p. 84-104, Jul 2005.

GIRI, M. S. et al. Microarray data on gene modulation by HIV-1 in immune cells: 2000-2006. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, n. 5, p. 1031-1043, Nov 2006.

GIRI, M. S. et al. Circulating monocytes in HIV-1-infected viremic subjects exhibit an antiapoptosis gene signature and virus- and host-mediated apoptosis resistance. **J. Immunol.**, v. 182, n. 7, p. 4459-4470, Abr 1 2009.

GONZALEZ, E. et al. Race-specific HIV-1 disease-modifying effects associated with CCR5 haplotypes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 21, p. 12004-12009, Out 12 1999.

GUILLOT-DELOST, M. et al. Human CD90 identifies Th17/Tc17 T cell subsets that are depleted in HIV-infected patients. **J. Immunol.**, v. 188, n. 3, p. 981-991, Feb 1 2012.

HAGAN, T. et al. Systems vaccinology: Enabling rational vaccine design with systems biological approaches. **Vaccine**, Apr 6 2015.

HARALAMBIEVA, I. H. et al. High-dimensional gene expression profiling studies in high and low responders to primary smallpox vaccination. **J. Infect. Dis.**, v. 206, n. 10, p. 1512-1520, Nov 15 2012.

HARMAN, A. N. et al. HIV-1-infected dendritic cells show 2 phases of gene expression changes, with lysosomal enzyme activity decreased during the second phase. **Blood**, v. 114, n. 1, p. 85-94, Jul 2 2009.

HARMAN, A. N. et al. HIV induces maturation of monocyte-derived dendritic cells and Langerhans cells. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 7103-7113, Nov 15 2006.

HUANG, Q. et al. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 870-5, Out 26 2001.

HÜTTER, G. et al. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 7, p. 692-698, 2009.

HYRCZA, M. D. et al. Distinct transcriptional profiles in ex vivo CD4+ and CD8+ T cells are established early in human immunodeficiency virus type 1 infection and are characterized by a chronic interferon response as well as extensive transcriptional changes in CD8+ T cells. **J Virol**, v. 81, n. 7, p. 3477-3486, Apr 2007.

IDE, F. et al. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: a phase 1 trial. **J. Med. Virol.**, v. 78, n. 6, p. 711-718, Jun 2006.

IZMAILOVA, E. et al. HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. **Nat. Med.**, v. 9, n. 2, p. 191-197, Feb 2003.

JI, X.; GEWURZ, H.; SPEAR, G. T. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. **Mol. Immunol.**, v. 42, n. 2, p. 145-152, Feb 2005.

JURADO, J. O. et al. ICOS, SLAM and PD-1 expression and regulation on T lymphocytes reflect the immune dysregulation in patients with HIV-related illness with pulmonary tuberculosis. **J. Int. AIDS So.c**, v. 15, n. 2, p. 17428, 2012.

KLOVERPRIS, H. et al. Induction of novel CD8+ T-cell responses during chronic untreated HIV-1 infection by immunization with subdominant cytotoxic T-lymphocyte epitopes. **Aids**, v. 23, n. 11, p. 1329-1340, Jul 17 2009.

KORNBLUTH, R. S. The emerging role of CD40 ligand in HIV infection. **J. Leukoc. Biol.**, v. 68, n. 3, p. 373-382, Set 2000.

KRISHNAN, S. et al. Evidence for innate immune system activation in HIV type 1-infected elite controllers. **J. Infect. Dis.**, v. 209, n. 6, p. 931-939, Mar 2014.

KUHL, B. D. et al. Tetherin restricts direct cell-to-cell infection of HIV-1. **Retrovirology**, v. 7, p. 115, 2010.

KULKARNI, H. et al. Role of CCL3L1-CCR5 genotypes in the epidemic spread of HIV-1 and evaluation of vaccine efficacy. **PLoS One**, v. 3, n. 11, p. e3671, 2008.

KUNDU, S. K. et al. A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 14, n. 7, p. 551-60, Maio 1 1998.

KUPZ, A. et al. NLRC4 inflammasomes in dendritic cells regulate noncognate effector function by memory CD8(+) T cells. **Nat. Immunol.**, v. 13, n. 2, p. 162-169, Feb 2012.

LARSSON, M. et al. Molecular signatures of T-cell inhibition in HIV-1 infection. **Retrovirology**, v. 10, p. 31, 2013.

LI, H.; LIU, T.-J.; HONG, Z.-H. Gene polymorphisms in CCR5, CCR2, SDF1 and RANTES among Chinese Han population with HIV-1 infection. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 24, n. 0, p. 99-104, 6// 2014.

LIU, W. M. et al. The gene expression profile of unstimulated dendritic cells can be used as a predictor of function. **Int. J. Cancer**, v. 130, n. 4, p. 979-990, Feb 15 2012.

LOKE, P.; ALLISON, J. P. Emerging mechanisms of immune regulation: the extended B7 family and regulatory T cells. **Arthritis Res. Ther.**, v. 6, n. 5, p. 208-214, 2004.

LU, W. et al. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. **Nat Med**, v. 10, n. 12, p. 1359-1365, Dez 2004.

LU, W. et al. Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS. **Nat. Med.**, v. 9, n. 1, p. 27-32, Jan 2003.

MACKELPRANG, R. D. et al. Maternal HLA homozygosity and mother-child HLA concordance increase the risk of vertical transmission of HIV-1. **J. Infect. Dis.**, v. 197, n. 8, p. 1156-61, Abr 15 2008.

MANGANO, A. et al. Concordance between the CC chemokine receptor 5 genetic determinants that alter risks of transmission and disease progression in children exposed perinatally to human immunodeficiency virus. **J. Infect. Dis.**, v. 183, n. 11, p. 1574-1585, Jun 1 2001.

MARRAS, F. et al. Natural killer cells in HIV controller patients express an activated effector phenotype and do not up-regulate NKp44 on IL-2 stimulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 110, n. 29, p. 11970-11975, Jul 16 2013.

MILANESE, M. et al. DEFB1 gene polymorphisms and increased risk of HIV-1 infection in Brazilian children. **AIDS**, v. 20, n. 12, p. 1673-5, Aug 1 2006.

MONROE, K. M. et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. **Science**, v. 343, n. 6169, p. 428-432, Jan 24 2014.

MOURA, R. et al. Exome analysis of HIV patients submitted to dendritic cells therapeutic vaccine reveals an association of CNOT1 gene with response to the treatment. **J. Int. AIDS Soc.**, v. 17, p. 18938, 2014.

MURAKAMI, T.; YAMAMOTO, N. Role of CXCR4 in HIV infection and its potential as a therapeutic target. **Future Microbiol.**, v. 5, n. 7, p. 1025-1039, Jul 2010.

MURATA, H.; HRUZ, P. W.; MUECKLER, M. The mechanism of insulin resistance caused by HIV protease inhibitor therapy. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 27, p. 20251-20254, Jul 7 2000.

NAKAYA, H. I.; PULENDRAN, B. Vaccinology in the era of high-throughput biology. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 370, n. 1671, Jun 19 2015.

NISSEN, S. K. et al. Innate DNA sensing is impaired in HIV patients and IFI16 expression correlates with chronic immune activation. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 177, n. 1, p. 295-309, Jul 2014.

O'BRIEN, S. J.; NELSON, G. W. Human genes that limit AIDS. **Nat. Genet.**, v. 36, n. 6, p. 565-74, Jun 2004.

O'CONNOR, A. M.; CRAWLEY, A. M.; ANGEL, J. B. Interleukin-7 enhances memory CD8(+) T-cell recall responses in health but its activity is impaired in human immunodeficiency virus infection. **Immunology**, v. 131, n. 4, p. 525-536, Dez 2010.

PAULS, E. et al. Restriction of HIV-1 replication in primary macrophages by IL-12 and IL-18 through the upregulation of SAMHD1. **J. Immunol.**, v. 190, n. 9, p. 4736-4741, Maio 1 2013.

PENA, J. et al. Lymphocyte activation gene-3 expression defines a discrete subset of HIV-specific CD8⁺ T cells that is associated with lower viral load. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 30, n. 6, p. 535-541, Jun 2014.

PION, M. et al. Phenotype and functional analysis of human monocytes-derived dendritic cells loaded with a carbosilane dendrimer. **Biomaterials**, v. 31, n. 33, p. 8749-5878, Nov 2010.

PONTILLO, A. et al. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 54, n. 3, p. 236-240, Jul 2010.

PONTILLO, A. et al. Host genomic HIV restriction factors modulate the response to dendritic cell-based treatment against HIV-1. **Hum. Vaccin. Immunother.**, v. 10, n. 2, p. 512-518, Feb 1 2014.

PONTILLO, A. et al. Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 59, n. 2, p. 121-125, Feb 1 2012.

PONTILLO, A. et al. HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1beta secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients. **AIDS**, v. 26, n. 1, p. 11-18, Jan 2 2012.

POONIA, B.; PAUZA, C. D. Levels of CD56⁺TIM-3⁻ effector CD8 T cells distinguish HIV natural virus suppressors from patients receiving antiretroviral therapy. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88884, 2014.

RAMIREZ, P. W. et al. Downmodulation of CCR7 by HIV-1 Vpu results in impaired migration and chemotactic signaling within CD4(+) T cells. **Cell Rep.**, v. 7, n. 6, p. 2019-2030, Jun 26 2014.

RAPOSO, R. A. et al. Effects of cellular activation on anti-HIV-1 restriction factor expression profile in primary cells. **J. Virol.**, v. 87, n. 21, p. 11924-11929, Nov 2013.

READ, S. W. et al. Decreased CD127 expression on T Cells in HIV-1-infected adults receiving antiretroviral therapy with or without intermittent IL-2 therapy. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 42, n. 5, p. 537-544, Ago 15 2006.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, P. et al. Chronic HIV infection affects the expression of the 2 transcription factors required for CD8 T-cell differentiation into cytolytic effectors. **Blood**, v. 119, n. 21, p. 4928-38, Maio 24 2012.

RODRIGUEZ-GALAN, M. C. et al. Coexpression of IL-18 strongly attenuates IL-12-induced systemic toxicity through a rapid induction of IL-10 without affecting its antitumor capacity. **J Immunol.**, v. 183, n. 1, p. 740-748, Jul 1 2009.

RODRIGUEZ, A. R. et al. T cell interleukin-15 surface expression in chimpanzees infected with human immunodeficiency virus. **Cell Immunol.**, v. 288, n. 1-2, p. 24-30, Mar-Apr 2014.

ROSSIO, J. L. et al. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. **J. Virol.**, v. 72, n. 10, p. 7992-8001, Out 1998.

ROTGER, M. et al. Genome-wide mRNA expression correlates of viral control in CD4+ T-cells from HIV-1-infected individuals. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 2, p. e1000781, Fev 2010.

ROUTY, J. P. et al. Immunologic activity and safety of autologous HIV RNA-electroporated dendritic cells in HIV-1 infected patients receiving antiretroviral therapy. **Clin. Immunol.**, v. 134, n. 2, p. 140-147, Fev 2010.

SAMSON, M. et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. **Nature**, v. 382, n. 6593, p. 722-7225, Ago 22 1996.

SCHERER, C. A. et al. Distinct gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients infected with vaccinia virus, yellow fever 17D virus, or upper respiratory infections. **Vaccine**, v. 25, n. 35, p. 6458-6473, Ago 29 2007.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat. Protoc.**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SEGAT, L. et al. Polymorphisms in innate immunity genes and patients response to dendritic cell-based HIV immuno-treatment. **Vaccine**, v. 28, n. 10, p. 2201-2206, Mar 2 2010.

SENNEPIN, A. et al. NKp44L expression on CD4+ T cells is associated with impaired immunological recovery in HIV-infected patients under highly active antiretroviral therapy. **AIDS**, v. 27, n. 12, p. 1857-1866, Jul 31 2013.

SOGHOIAN, D. Z. et al. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. **Sci. Transl. Med.**, v. 4, n. 123, p. 123ra25, Feb 29 2012.

TANASKOVIC, S. et al. Interleukin-7 signalling defects in naive CD4+ T cells of HIV patients with CD4+ T-cell deficiency on antiretroviral therapy are associated with T-cell activation and senescence. **AIDS**, v. 28, n. 6, p. 8218-30, Mar 27 2014.

TANG, J. et al. Human leukocyte antigen class I genotypes in relation to heterosexual HIV type 1 transmission within discordant couples. **J. Immunol.**, v. 181, n. 4, p. 2626-2635, Ago 15 2008.

TORRI, A. et al. Gene expression profiles identify inflammatory signatures in dendritic cells. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9404, 2010.

TUANA, G. et al. Classification of dendritic cell phenotypes from gene expression data. **BMC Immunol.**, v. 12, p. 50, 2011.

VAN VAERENBERGH, K. Study of the impact of HIV genotypic drug resistance testing on therapy efficacy. **Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.**, v. 63, n. 5, p. 447-473, 2001.

VETTER, M. L. et al. Differences in APOBEC3G expression in CD4⁺ T helper lymphocyte subtypes modulate HIV-1 infectivity. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 2, p. e1000292, Feb 2009.

WHITTALL, T. et al. Immunogenic and tolerogenic signatures in human immunodeficiency virus (HIV)-infected controllers compared with progressors and a conversion strategy of virus control. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 166, n. 2, p. 208-217, Nov 2011.

WINKLER, C. et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). **Science**, v. 279, n. 5349, p. 389-593, Jan 16 1998.

WOLF, B. et al. Gene expression profile of peripheral blood lymphocytes from renal cell carcinoma patients treated with IL-2, interferon-alpha and dendritic cell vaccine. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e50221, 2012.

WONG, J. L. et al. IL-18-primed helper NK cells collaborate with dendritic cells to promote recruitment of effector CD8⁺ T cells to the tumor microenvironment. **Cancer Res.**, v. 73, n. 15, p. 4653-4662, Ago 1 2013.

YAMAMOTO, T. et al. Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8⁺ T-cell exhaustion in HIV infection. **Blood**, v. 117, n. 18, p. 4805-4815, Maio 5 2011.

YOUNAI, F. S. Thirty years of the human immunodeficiency virus epidemic and beyond. **Int. J. Oral. Sci.**, v. 5, n. 4, p. 191-199, Dez 2013.

ZHANG, Z.-N. et al. Elevation of Tim-3 and PD-1 Expression on T Cells Appears Early in HIV Infection, and Differential Tim-3 and PD-1 Expression Patterns Can Be Induced by Common γ -Chain Cytokines. **BioMed. Research International**, v. 2015, p. 11, 2015.

APÊNDICE A - Perfil de expressão durante etapas de diferenciação de DC= P1-P6 (FC)

row.names	P1_iDC	P2_iDC	P4_iDC	P3_iDC	P5_iDC	P6_iDC	P1_4h	P2_4h	P4_4h	P3_4h	P5_4h	P6_4h
APEX1	-2,62	3,54	5,12	1,86	-2,94	-0,04	-2,08	3,48	4,92	1,57	-3,34	-1,82
APOBEC3G	0	3,77	4,61	0,95	0,59	0	0	3,63	4,21	-0,37	0,38	0
BAD	-17,57	5,28	5,78	1,79	-4	-15,78	-16,13	5,06	5,53	1,6	-4,09	-15,71
BANF1	0	3,63	4,3	0,48	0,43	0	0	3,58	4,32	0,62	0,43	0
BAX	-2,39	-2,94	4,62	1,92	-4,14	-4,86	-1,41	-7,28	4,57	1,98	-4,48	-4,67
BCL2	1,49	-0,17	3,88	0,97	-2,58	8,26	2,67	-0,39	3,65	0,99	-2,36	8,28
CASP3	0	0,98	2,23	1,43	-1,65	0	0	0,99	2,15	1,3	-1,57	0
CASP8	-5,95	2,56	2,75	1,42	-0,51	0	-3,8	2,73	2,52	1,57	-0,53	0
CBX5	0	-0,31	3,47	1,71	-1,41	0	0	0,66	3,29	1,03	-1,46	0
CCL2	-9,33	4,25	-0,87	-1,67	-5,85	-10,17	-6,27	4,1	3,08	0,08	-4,27	-7,33
CCL3	0	0	4,67	2,32	-0,34	0	0	0	5,44	2,75	0,2	0
CCL4	-4,37	0,26	5,71	2,17	-4,8	-3,4	0,19	0,19	0	2,61	-3,93	-0,2
CCL5	-6,96	0,88	4,69	0,67	-2,91	-10,72	-8,27	-2,58	4,7	0,24	-3,3	-7,77
CCL8	-5,68	-2,26	-9,06	-12,02	-12,66	0	-1,53	-0,25	-13,72	-11,57	-12,69	0
CCNT1	-3,63	1,25	4,26	0,43	-3,33	6,58	-2,42	1,24	4,16	-0,22	-3,31	4,79
CCR2	0	4,54	2,9	-2,47	-5,53	0	0	3,21	-0,07	-4,13	-6,79	0
CCR3	0	5,47	-1,16	-6,41	-6,74	0	0	3,97	-2,43	-8,14	-6,64	0
CCR4	-1,6	0,4	-4,82	-7,69	-8,09	0	1,52	-1,96	-3,51	-8,47	-7,27	0
CCR5	2,39	0,62	0,67	0,28	-1,15	0	2,58	0,52	0,69	0,53	-1,28	0
CD209	-0,19	0	-0,78	1,74	-2,82	-0,17	0,67	0	-0,78	1,93	-2,46	0,8
CD4	-1,22	3,48	3,02	0,24	-0,25	0	0,59	3,35	3,09	-0,1	-0,32	0
CD44	-1,34	0,43	3,7	2,43	-2,8	-3,84	-0,67	0,42	3,6	2,55	-3,14	-3,2
CD74	-4,67	0,84	4,84	-0,24	2,63	-1,11	-3,7	0,73	4,64	-0,13	2,5	-0,72
CDK7	-4,49	2,79	4,22	0,47	-5,31	-1,81	-4,04	2,46	4,09	0,47	-5,27	-0,94
CDK9	-2,94	1,62	0,73	2	-2,42	6,13	-1,98	1,73	0,54	0,26	-2,68	1,64
CDKN1A	0,83	0,81	-1,5	-1,68	-4,44	-4,01	1,68	0,81	-1,18	-1,45	-4,1	-2,41
CEBPB	-5,15	0,48	0,93	2,04	-3,32	-2,74	-3,18	0,53	0,94	2,08	-3,53	-3,99
COP56	-4,06	3,33	1,91	1,34	-4,82	-2,67	-3,57	3,19	1,88	1,37	-5,03	-2,7
CR2	-7,45	2,25	1,48	-2,87	-5,81	-0,04	-5,94	1,94	1,24	-3,06	-5,61	0,03
CREBBP	-3,01	1,23	2,81	0,74	-1,1	0	-3,49	1,2	2,61	-0,09	-1,07	0
CX3CL1	0	10,12	-0,73	-4,04	-1,73	0	0	9,87	-0,63	-5,53	-2,26	0
CXCL12	-14,3	4,32	0	0	0	-11,64	-14,8	0	-13,66	-20,81	-14,36	-2,38
CXCR4	-4,22	-1,35	4,61	1,41	-2,69	5,35	-4,1	-1,85	4,04	-0,16	-3,61	2,62
ELANE	-7,23	3,06	-4,65	-10,73	-9,19	-4,08	-7,36	3,6	-4,77	-11,68	-9,59	-8,43
EP300	-5,4	1,31	5,21	1,54	-4,88	-3,07	-4,33	1,34	5,12	1,42	-4,73	-3,05
FCAR	0	-8,19	-7,68	-14,04	-16,7	0	0	-8,81	-5,32	-13,77	-13,87	0
FOS	-5,55	0,98	2,53	1,36	-5,69	-6,45	-4,65	0,79	2,31	1,33	-6,42	-5,35
GADD45A	-3,85	4,44	2,79	1,23	-2,77	2,85	-1,61	4,56	3,89	-0,21	-2	0,14
HCK	-3,44	3,27	3,01	2,51	-3,14	1,7	-3,56	3,18	2,87	1,61	-3,66	-1,47
HMGAI	-6,25	1,85	1,01	-4,14	-6,28	1,96	-4,1	1,3	0,7	-5,55	-6,27	0,19
HTATSF1	-4,4	3,4	2,62	2,67	-5,04	-3,4	-3,68	3,45	2,54	2,82	-5,03	-2,89
IFNA1	0	-0,11	-3,58	-8,01	-10,93	0	0	-0,5	-3,74	-7,87	-11,46	0
IFNB1	0	1,36	-3,1	-9,68	-9,29	0	0	0,12	-3,99	-9,78	-9,18	0
IL10	-5,78	2,29	2,94	-1,12	-2,28	-6,17	-3,7	2,36	3,55	-1,05	-1,93	-5,46
IL12B	-1,98	-0,69	-3,69	-8,15	-4,53	4,87	-3,07	-1,26	-6,68	-10,75	-6,52	-0,92
IL16	-6,89	1,33	4,05	0,26	-5,16	-1,38	-5,14	1,14	4,18	-0,26	-5,15	-2,54
IL18	-10,18	-5,3	0,58	-3,11	-7,58	0	-7,34	-7,18	2,58	-3,27	-7,35	0
IL8	-10,41	-3,84	1,91	-2,5	-10,3	-7,57	-7,09	-5,94	4,02	-1,8	-9,47	-4,91
IRF1	-10,7	-0,06	2,82	0,59	-2,41	-8,08	-7,25	1,47	2,92	1,27	-1,71	-7,32
IRF2	-4,52	0,67	1,82	1,2	-6,12	-5,7	-3,77	0,57	1,75	1,33	-6,19	-5,14
LTBR	-4,41	2,94	0,44	1,54	-0,03	-3,26	-4,23	2,93	0,33	1,65	-0,32	-2,57
MAP3K5	-2,72	4,02	2,13	1,38	-4,13	0,14	-1,88	3,95	1,95	0,93	-4,39	-1,19
MBL2	-2,67	-0,75	-6,74	-13,23	-10,64	-6,07	-1,65	-0,03	-5,83	-17,18	-12,57	-5,23
NFKBIA	-5,49	0,21	4,48	1,43	1,07	0,77	-4,77	-0,03	4,52	1,3	0,61	1,63
PPIA	0	3,17	5,15	1,2	-1,72	0	0	2,95	5,12	0,98	-1,58	0
PRDX1	-2,2	2,95	4,16	1,27	-3,61	6,3	-1,82	2,98	3,92	0,41	-3,48	5,49
PTK2B	-5,77	1,78	4,16	1,8	-4,28	0,91	-5,74	1,59	3,68	1,36	-4,6	-0,68
RBL2	0	2,91	2,33	1,69	-1,75	0	0	2,56	2,24	1,73	-1,94	0
SELL	-5,61	1,03	1,15	-1,79	-3,64	0	-5,84	-1,31	-0,72	-4,17	-4,4	0
SERPINA1	-2,71	-0,02	0,99	-1,7	-8,06	-6,09	-2,71	-1,01	0,79	-1,59	-8,64	-5,79
SERPINC1	1,29	2,2	-2,38	-5,57	-6,27	4,12	1,18	2,6	-4,21	-7,51	-6,05	-0,01
SLPI	-12,3	-2,85	-6,19	-10,35	-14,16	-4,79	-11,88	-3,55	-6,22	-10,7	-12,8	-3,56
SMARCB1	-5,67	3,26	2,05	1,68	-5,89	-5,71	-4,41	3,04	2,01	1,82	-6,13	-5,25
STAT1	-7,9	1,38	1,17	2,02	0,51	3,04	-5,22	1,72	1,09	2,27	0,61	4,6
STAT3	-2,47	0,86	5,41	1,54	0,12	0	-2,05	1,06	5,3	1,14	-0,16	0
TFCP2	-4,87	3,68	4,43	1,33	-5,72	-3,78	-4,36	3,37	4,27	1,44	-5,73	-3,22
TGFB1	-3,27	0,71	3,2	1,88	-3,48	-4,7	-1,8	0,79	3,25	2,03	-3,58	-4,42
TNF	-8,54	-0,74	3,51	-1,51	-5,84	-11,4	-7,39	-0,98	3,67	-1,78	-5,8	-9,5
TNFRSF1B	-7,96	0,43	0,37	1,68	-6,09	-7,35	-5,63	0,39	0,46	1,56	-5,88	-8,92
TNFSF10	-9,54	-0,5	2,76	-2,54	-5,72	0	-9,25	-0,74	0,6	-3,42	-6,35	0
TRIM5	-6,32	2,62	3,36	0,07	-5,83	-3,21	-5,04	2,49	3,31	0,01	-6,18	-3,02
TSG101	-2,94	2,66	1,63	1,18	-6,18	-5,74	-3	2,36	1,58	1,31	-6,16	-4,58
VPS4A	-5,24	2,75	1,75	1,94	-4,96	-3,19	-3,86	2,69	1,76	2,05	-5,15	-2,49
XPO1	-2,99	2,46	0,45	1,54	-4,96	-3,24	-2,09	2,34	0,49	1,71	-4,99	-2,17
YY1	-2,91	2,04	1,14	2,07	-0,98	0	-3,19	2,09	0,95	2,12	-1,18	0

row.names																			
APEX1	P1_14h	P2_14h	P4_14h	P3_14h	P5_14h	P6_14h	P1_24h	P2_24h	P4_24h	P3_24h	P5_24h	P6_24h	P1_48h	P2_48h	P4_48h	P3_48h	P5_48h	P6_48h	
APOBEC3G	-3,24	3,21	5,06	1,96	-3,53	-1,4	-3,33	2,85	4,79	1,84	-3,84	-1,41	-0,93	7,87	6,54	1,7	-4,28	-5,65	
BAD	0	3,65	4,18	-0,74	0,4	0	0	3,52	4,68	1,39	1,08	10,46	10,95	6,24	6,49	1,31	1,32	9,66	
BANF1	-16	4,89	5,48	1,65	-3,75	-15,22	-16,33	4,72	5,86	1,8	-4,12	-15,45	-15,41	2,92	3,03	2,26	-3,74	-13,78	
BAX	0	3,42	4,3	0,75	0,42	0	0	3,23	4,22	0,36	-0,05	0	12,83	8,3	5,86	0,5	-0,78	0	
BCL2	-3,72	-4,4	4,57	2,2	-4,13	-6,26	-1,51	-3,36	4,57	1,85	-4,09	-5,96	-0,44	7,67	7,1	2,11	-4,34	-11,23	
CASP3	3,24	-0,02	3,43	0,35	-2,16	8,19	3,12	-0,09	3,76	1	-2,76	7,92	4,05	5,72	5,58	1,43	-2,69	6,32	
CASP8	0	0,47	2,25	0,81	-1,76	0	0	0,51	2,19	1,47	-1,53	0	0	0,23	-0,93	1,7	-1,65	0	
CBX5	-4,99	3,02	2,09	0,46	-0,58	0	-6,84	3,32	2,48	1,24	-0,93	0	-7,65	7,14	-5,46	1,38	-1,61	0	
CCL2	0	-0,12	3,82	1,44	-1,84	0	0	-2,51	3,44	2,92	-1,49	0	0	8,96	5,31	2,36	-1,18	0	
CCL3	-5,66	4,28	0,84	0,34	-6,58	-7,99	-9,72	3,82	-1,95	-3,58	-9,13	-8,27	-10,69	-3,81	-3,03	-6,36	-10,36	-8,34	
CCL4	0	0	5,55	3,01	2,04	0	0	0	5,35	2,66	1,09	0	0	3,34	8,16	2,43	0,85	0	
CCL5	-3,92	0,2	0	2,85	-2,93	-0,33	-0,8	-0,68	6,18	2,44	-4,87	-2,5	-1,47	5,42	7,5	1,07	-6,04	-7,8	
CCL8	-3,17	1,1	5,62	0,59	-1,16	-3,9	-4,34	1,38	5,31	1,57	-0,66	-5,02	-2,01	-1,79	0,72	0,26	-1,19	-6,88	
CCNT1	0,22	-0,4	-8,29	-9,75	-12,87	0	-3,47	0,76	-8,02	-14,27	-10,97	0	-3,68	3,38	-7,33	-10,66	-11	0	
CCR2	-2,25	1,17	4,03	-0,88	-3,81	5,5	-3,63	1,24	3,81	0,44	-3,84	5,76	-0,98	5,99	5,17	-0,17	-4,21	3,38	
CCR3	0	0,63	-2,32	-5,31	-7,24	0	0	1,65	-0,5	-4,22	-6,51	0	0	-0,57	-2,07	-5,09	-7,46	0	
CCR4	0	3,77	-3,26	-8,21	-8,88	0	0	4,79	-2,12	-6,48	-7,28	0	0	3,24	-4,65	-7,24	-4,89	0	
CCR5	2,98	0,01	-2,73	-7,66	-7,12	0	3,01	1,63	-2,54	-5,1	-6,3	0	5,99	5,79	1,55	-5,85	-3,13	0	
CD209	0,94	-0,43	0,09	-0,37	-1,42	0	0,07	-0,4	0,44	-0,13	-1,93	0	-1,51	-2,33	-5,02	-0,6	-3,19	0	
CD4	-3,49	0	-0,95	2,04	-2,49	-1,15	-0,96	0	-1,26	1,5	-3,2	-1,65	-1,11	15,15	0,19	0,94	-5,3	-6,71	
CD44	-1,28	2,59	2,47	-0,35	-0,68	0	-2,27	2,08	2,3	-0,34	-2,19	0	-3,62	-1,29	-6,17	-1,96	-3,78	0	
CD74	-4,26	0,59	3,69	2,72	-2,68	-3,81	-0,23	0,32	3,77	2,53	-2,83	-3,99	1,33	6,98	6,93	2,14	-3,19	-11,67	
CDK7	-3,95	0,76	4,53	0,02	3,08	-1,5	-4,68	0,47	4,77	-0,08	2,56	-1,58	-3,75	1,31	5,85	-0,72	1,55	-2,53	
CDK9	-4,68	2,78	3,94	-0,27	-5,06	-1,99	-4,16	2,79	4,25	0,73	-4,81	-2,49	-3,01	8,37	5,96	0,61	-4,69	-5,06	
CDKN1A	-1,69	1,57	1,04	1,51	-3,69	5,36	-4,06	1,66	0,28	2,16	-3,84	6,32	1,48	6,28	2,86	2,17	-2,66	1,95	
CEBPB	-3,82	0,95	-1,37	-1,46	-3,32	-3,42	1,57	0,77	-1,1	-1,2	-3,06	-3,62	2,72	8,38	2,98	-1,22	-2,82	-12,3	
COPS6	-4,75	0,47	1,06	2,5	-3,22	-3,7	-2,63	0,11	0,95	2,03	-3,52	-2,64	0,15	5,54	3,52	2,15	-4,6	-9,56	
CR2	-4,25	2,96	1,9	1,02	-5,01	-3,88	-3,53	2,95	1,86	1,3	-5,09	-3,55	-2,39	8,34	3,62	1,27	-5,45	-7,03	
CREBBP	-6,42	2,65	1,08	-4,81	-5,32	-1,74	-7,64	2,6	1,71	-2,72	-5,54	-2,83	-5,69	7,4	1,86	-5,51	-6,24	-3,05	
CX3CL1	-3,64	0,94	2,38	-0,38	-1,35	0	-4,44	1,02	2,22	0,99	-1,77	0	-4,06	-1,01	-2,77	0,92	-1,84	0	
CXCL12	0	0	-0,87	-3,2	-1,97	-10,34	0	0	-0,97	-3,79	-2,65	-8,81	0	11,35	-4,88	-3,02	-3,3	-6,95	
CXCR4	-13,03	4,47	0	0	0	0	0	6,43	-7,93	-20,97	-13,6	-6,34	-13,96	9,76	-2,17	-11,16	-9,16	-3,15	
ELANE	-2,44	0,56	5,54	1,76	-2,2	6,91	-1,53	1,02	5,52	2,98	-1,08	7,93	2,81	6,52	8,49	3,14	-0,55	1,12	
EP300	-8,55	3,35	-5,33	-8,53	-10,2	-4,69	-8,02	3,83	-5,74	-9,64	-9,33	-4,66	-6,54	5,78	-1,01	-10,14	-8,43	-3,69	
FCAR	-4,73	1,2	4,99	0,65	-4,89	-3,75	-5,01	1,13	4,99	1,57	-4,93	-3,65	-3,08	6,29	6,72	1,58	-5,28	-6,85	
FOS	0	-12,22	-8,39	0	0	0	0	-5,76	-10,1	-22,64	-17,67	0	0	0	-16,89	0	-23,4	0	
GADD45A	-5,56	-0,04	2,27	2,4	-6,63	-7,98	-4,67	-0,23	2,26	0,94	-6,72	-8,05	-4,52	5,1	2,82	0,68	-8,91	-10,66	
HCK	-1,51	5,32	4,27	1,22	-1,87	3,95	-2,4	6,23	3,93	3,44	-0,8	4,67	2,61	9,33	6,34	2,97	-0,28	0,99	
HMGAI	-3,84	3,16	3,13	2,31	-3,27	1,43	-4,27	3,51	3,03	2,91	-2,57	2,3	-0,03	8,25	5,87	2,87	-1,67	-2,91	
HTATSF1	-3,76	0,96	0,17	-5,32	-7	0,36	-5,37	1,41	-0,18	-3,23	-6,66	0,82	-2,47	6,43	1,79	-3,33	-7,17	0,24	
IFNA1	-4,49	3,31	2,38	1,82	-5,38	-4,43	-4,25	3,21	2,49	2,62	-5,52	-4,46	-3,07	8,62	3,64	2,45	-6,22	-7,52	
IFNB1	0	-1,94	-6,53	-9,39	-11,65	0	0	-1,25	-5,68	-8,53	-11,35	0	0	3,69	-9,88	-9,96	-15,01	0	
IL10	-7,37	-0,77	-3,96	-4,54	-9,02	0	0	-0,69	-4,84	-9,17	-9,6	0	-6,77	4,02	-8,06	-9,74	-11,66	0	
IL12B	-6,58	-0,41	0,86	-2,03	-3,59	-7,7	-7,64	-2,02	0,67	-3,13	-4,97	-4,96	-2,75	0,03	-4,25	-2,42	-5,87	-9,7	
IL4	4,49	2,35	2,12	-6,49	-2,84	9,83	4,72	4,9	3,82	-2,52	-1,56	0	0	0	6,03	-2	0,68	0	
IL16	-5,95	-0,72	2,42	-0,13	-8,06	-5,21	-7,45	-0,97	2,09	-1,66	-8,79	-4,56	-6,28	3,63	2,3	-2,03	-10,54	-5,56	
IL1B	-3,14	-2,81	4,8	0,58	-8,28	0	-6,48	-4,36	2,9	-3,08	-9,47	0	-6,55	-8,65	-4,13	-5,03	-10,23	0	
IL8	-4,43	-1,12	4,9	2,16	-8,6	0,91	-5,55	-2,03	3,81	-0,35	-9,06	-0,27	-0,05	0,89	5,11	-1,52	-9,06	-6,99	
IRF1	-8,23	0,85	2,85	1,18	-1,55	-6,98	-7,57	1,18	3,21	1,39	-1,21	-6,33	-5,36	-0,52	1,24	1,75	-0,97	-6,01	
IRF2	-4,77	0,67	1,73	0,85	-6,32	-6,39	-3,84	0,97	1,87	1,27	-5,77	-6,03	-2,02	6,47	4,19	1,62	-5,76	-10,49	
LTBR	-4,13	2,64	0,4	1,41	0	-3,71	-4,73	2,34	0,36	1,47	-0,18	-4,09	-4,69	2,16	-1,26	1,35	-0,34	-3,83	
MAP3K5	-3,3	2,58	1,42	0,24	-5,26	-2,08	-3,76	3,17	1,73	1	-5,15	-1,79	-1,94	0	3,06	0,7	-5,51	-4,35	
MBL2	-1,04	1,33	-4,73	-11,32	-10,43	-5,73	-0,4	2,21	-3,19	-9,71	-10,69	-5,07	-1,08	6,24	-0,5	-11,85	-12,15	1,15	
NFKBIA	-3,19	0,88	5,03	2,62	2,89	2,39	-3,43	0,7	5	1,96	3,1	3,39	-2,85	0,32	4,39	2,02	3,26	3,34	
PPIA	0	2,74	5,02	0,07	-2,14	0	0	2,73	4,81	1,07	-2,33	0	0	0,48	-0,71	0,2	-2	0	
PRDX1	-1,22	3,08	4,4	0,57	-3,73	6,28	-2,72	2,91	4,09	1,96	-3,56	6,04	-0,2	0	5,98	0,68	-2,56	3,74	
PTK2B	-6,05	0,75	3,59	0,39	-5,45	-1,13	-6,09	1,26	3,85	1,76	-5,22	-0,22	-3,74	6,44	5,87	1,42	-4,3	-1,64	
RBL2	0	2,43	1,83	0,81	-2,22	0	0	2,71	2,16	1,54	-2,41	0	0	0,84	-1,49	1,65	-2,51	0	
SELL	-6,63	-0,33	-1,19	-3,94	-5,33	0	-8,28	0,2	-1,55	-3,83	-4,89	0	0	-2,95	-4,52	-5,49	-6,59	0	
SERPINA1	-4,72	-0,3	0,85	-1,85	-8,38	-5,51	-3,27	-0,22	0,75	-1,7	-8,56	-4,93	-3,18	5,21	1,81	-3,26	-9,03	-8,55	
SERPINC1	2,56	2,24	-2,67	-7,12	-7,75	3,73	-0,46	2,86	-3,98	-4,3	-7,69	4,41	4,21	0	-1,43	-5,34	-6,37	2,32	
SLPI	-11,92	-3,62	-9,33	-5,88	-12,86	-6,23	-13,84	-2,32	-5,53	-10,74	-13,96	-5,91	-11,45	0,41	-5,84	-12,63	-16,45	-5	
SMARCB1	-4,83	3,17	2	1,22	-5,67	-6,02	-3,97	2,95	2,06	1,77	-6,06	-6,21	-3,06	0	3,43	1,98	-6,69	-9,31	
STAT1	-6,31	1,22	1,23	1,67	0,77	1,57	-6,25	1,11	1,22	2,13	0,61	2,33	-6,81	-0,27	-1,64	2,09	-0,03	2,22	
STAT3	-1,97	0,87	5,49	1	-0,02	0	-2,79	1,1	5,32	1,55	0,32	0	-1,99	0,61	3,93	1,57	0,96	0	
TFCP2	-4,56	3,32	3,97	-0,21	-5,92	-4,87	-4,22	3,47	4,31	1,45	-5,79	-5,05	-3,73	0	5,42	1,58	-6,3	-6,79	
TGFB1	-4,76	0,6	3,24	2,12	-3,46	-6,09	-2,9	-0,15	2,95	1,64	-5,03	-7,23	-2,08	5,69	4,61	1,39	-7,01	-12,19	
TNF	-6,19	-0,52	4,28	2,51	-3,82	-9,02	-7,35	-0,98	4,38	0,17	-4,11	-7,87	-5,9	-2,1	0,81	-0,9	-4,04	-8,68	
TNFRSF1B	-5,33	0,49	0,58	1,26	-5,64	-7,04	-5,79	0,47	0,37	1,74	-5,68	-6,45	-2,09	4,82	2,26	1,68	-6,99	-10,83	
TNFSF10	-8,48	-2,12	0,82	-3,89	-8,64	0	-12,15	-1,36	-1,05	-5,41	-8,88	0	0	-0,41	-2,73	-6,4	-9,59	0	
TRIM5	-5,12	2,31	3,19	-1,06	-5,75	-3,61	-5,74	1,54	3,4	0,08	-5,97	-3,7	-3,32	0	4,79	0,16	-6,61	-6,77	
TSG101</																			

APÊNDICE B - Perfil de expressão de leucócitos após a imunoterapia= P6-11 (FC)

	P6- t1	P6- t2	P6- t3	P7- t1	P7- t2	P7- t3	P8- t1	P8- t3	P9- t1	P9- t2	P9- t3	P10- t1	P10- t2	P10- t3	P11- t1	P11- t2	P11- t3
<i>APOBEC3G</i>	1,26	0,99	1,03	0,86	1,74	1,04	0,86	0,50	0,99	0,73	0,74	1,54	0,46	2,17	0,82	0,48	0,00
<i>BAX</i>	1,27	1,11	0,76	2,07	0,39	3,58	0,78	0,69	1,25	0,91	0,89	1,32	0,55	1,93	0,95	0,89	1,15
<i>BCL2</i>	2,16	1,51	0,37	0,76	0,75	5,03	1,27	0,88	1,87	1,53	0,84	0,38	3,12	2,16	1,40	0,31	1,05
<i>BST2</i>	1,88	0,80	1,27	4,53	0,21	1,32	0,78	0,77	4,32	0,26	6,59	1,61	0,73	1,39	0,67	1,43	0,59
<i>CASP1</i>	1,59	0,76	1,26	11,39	0,09	2,23	0,82	0,65	1,60	0,28	3,12	0,80	1,34	0,78	0,55	3,68	0,63
<i>CASP3</i>	1,65	0,70	0,95	1,88	0,35	3,81	0,81	0,44	1,58	0,80	0,47	1,43	0,97	1,95	1,85	0,71	1,27
<i>CCl19</i>	3,46	0,00	0,86	0,00	0,31	243,88	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,28	1,18	0,00	0,00	0,00
<i>CCL2</i>	1,23	0,74	0,00	0,03	8,94	1,61	0,29	0,18	0,95	1,40	0,79	1,28	1,18	0,32	0,29	6,96	0,00
<i>CCL20</i>	2,27	0,59	2,31	0,00	21,86	1,02	0,23	0,00	0,54	0,28	1,09	0,04	0,51	2,60	0,00	0,00	0,00
<i>CCL3</i>	1,22	0,44	0,75	0,09	9,71	0,84	1,23	1,54	0,87	2,97	0,16	1,73	0,59	1,68	0,66	1,33	3,81
<i>CCLA</i>	0,99	1,03	0,64	0,28	9,06	0,09	0,65	0,29	0,47	5,39	0,02	0,82	1,60	0,56	1,38	2,04	1,56
<i>CCL5</i>	0,90	1,52	0,75	1,08	1,71	0,12	1,23	0,86	0,68	5,43	0,10	0,66	2,03	0,43	0,63	10,93	2,60
<i>CCR5</i>	1,13	1,43	0,85	1,46	0,63	2,22	0,71	0,73	1,25	0,58	1,43	0,98	1,05	1,08	0,70	2,23	1,12
<i>CCR6</i>	1,20	1,52	0,59	0,93	0,58	1,79	1,64	1,06	0,41	1,57	0,42	1,28	0,95	0,97	1,96	0,74	0,00
<i>CCR7</i>	1,29	1,45	0,50	0,05	19,43	0,04	1,11	0,42	1,96	2,04	0,10	0,73	2,13	0,86	2,38	2,36	4,38
<i>CD127</i>	0,86	1,56	0,32	0,69	2,64	0,22	2,01	0,90	2,66	1,04	0,48	0,55	3,12	0,63	1,67	7,16	0,61
<i>CD14</i>	1,20	0,66	1,80	18,38	0,04	9,38	0,47	0,34	3,23	0,30	3,46	1,69	0,47	1,34	0,69	1,27	0,44
<i>CD16</i>	1,87	0,81	0,75	12,55	0,05	12,38	0,66	0,61	15,14	0,03	34,06	4,29	0,20	4,14	0,69	2,14	5,13
<i>CD25</i>	1,79	0,71	0,94	1,05	0,72	0,29	0,86	0,76	1,23	0,69	2,20	1,01	0,82	1,57	0,61	1,31	0,18
<i>CD27</i>	1,62	5,13	0,00	0,52	0,60	48,50	0,45	0,88	1,24	0,90	0,97	0,74	0,85	1,80	0,99	0,89	16,80
<i>CD38</i>	1,44	1,05	0,58	1,28	0,51	2,10	1,36	0,43	0,57	2,13	0,19	1,93	0,87	2,03	0,99	1,97	0,49
<i>CD40L</i>	1,21	1,36	0,54	0,44	2,04	12,73	1,23	0,75	1,10	1,01	0,28	0,84	1,67	0,72	1,32	0,67	2,20
<i>CD45RO</i>	1,39	0,75	0,62	0,82	1,96	0,66	0,92	1,02	0,93	0,82	0,85	1,22	1,13	1,09	1,04	0,76	2,81
<i>CD56</i>	0,99	1,73	0,23	2,28	1,57	5,31	2,03	2,01	0,10	1,46	0,25	1,11	0,77	1,55	4,03	0,55	0,00
<i>CD69</i>	1,31	0,51	0,32	0,74	2,38	0,14	0,64	0,41	0,12	8,28	0,18	0,57	0,97	2,30	1,21	1,01	1,36
<i>CNOT1</i>	1,48	0,75	0,44	1,54	0,66	0,58	1,21	0,67	0,71	1,47	0,26	0,86	1,84	0,97	1,25	1,64	0,16
<i>CTLA-4</i>	2,07	0,76	0,35	0,38	2,58	1,78	1,56	0,88	0,29	2,58	0,31	0,72	1,19	2,00	1,74	0,47	0,00
<i>CXCL10</i>	1,53	2,00	0,84	1,48	0,84	18,90	0,58	0,34	3,18	0,12	4,11	0,73	1,42	0,51	0,48	2,69	0,00
<i>CXCL11</i>	2,81	4,03	0,58	4,26	0,28	113,77	0,51	0,44	0,00	0,09	5,86	0,82	0,79	2,07	2,85	0,00	0,00
<i>CXCL12</i>	3,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,36	4,41	0,00	0,00	0,00
<i>CXCL9</i>	1,65	0,96	1,88	3,92	0,17	2149,82	2,83	1,43	1,22	0,20	1,75	1,10	0,68	1,12	0,00	0,00	30,27
<i>CXCR5</i>	1,53	0,97	0,21	0,36	1,44	1,12	1,56	2,11	0,78	1,85	0,27	0,93	0,58	1,62	0,51	0,87	0,00
<i>EOMES</i>	1,16	1,48	0,62	0,72	1,42	0,85	0,94	0,75	1,00	2,68	0,14	1,04	1,52	0,82	1,48	0,90	1,46
<i>FAS</i>	1,51	0,78	1,13	6,82	0,28	1,46	0,94	0,50	3,48	0,14	6,11	1,22	0,88	1,54	0,74	11,71	0,23
<i>FASL</i>	1,60	1,34	1,11	0,03	9,78	3,94	0,97	0,51	0,27	2,16	0,16	0,24	1,06	3,05	1,88	0,40	5,78
<i>FOXP3</i>	1,52	1,32	0,32	1,14	1,02	139,10	1,46	0,90	1,25	0,39	0,97	0,54	1,54	0,75	0,49	1,19	2,60
<i>GATA3</i>	1,10	1,12	0,37	0,66	2,16	11,63	1,29	0,93	2,30	1,04	0,21	0,71	0,93	2,93	1,27	1,19	0,00
<i>GZMA</i>	0,85	1,09	0,55	9,00	0,25	3,51	1,11	0,88	0,50	3,27	0,10	1,02	1,22	0,92	1,12	1,73	0,37
<i>GZMB</i>	1,06	1,71	0,56	0,29	2,55	1,27	1,13	0,97	0,29	4,72	0,15	0,63	1,16	0,71	0,69	1,05	2,04
<i>ICOS</i>	0,78	1,11	0,21	0,31	10,56	0,48	0,64	0,27	0,23	2,85	0,08	0,63	2,69	1,25	1,55	0,00	1,66
<i>IDO</i>	2,95	0,47	0,99	11,00	0,03	48,50	0,82	0,36	10,34	0,03	93,05	0,00	0,00	0,00	0,90	0,36	6,96
<i>IF16</i>	1,65	0,81	1,23	6,02	0,17	3,36	0,77	0,64	1,62	0,34	3,61	1,35	0,80	1,29	0,45	3,39	0,43
<i>IFNA1</i>	3,51	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,35	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	1,37	0,00	0,00	0,00
<i>IFNG</i>	1,34	1,30	0,12	0,68	5,31	1,12	1,15	0,62	0,44	2,45	0,07	0,88	0,89	2,03	0,80	0,89	3,51
<i>IL10</i>	1,57	4,47	0,54	0,28	0,86	34,54	1,21	0,80	0,65	0,78	0,52	0,39	0,65	2,68	1,61	0,46	0,00
<i>IL13</i>	2,23	0,25	0,24	6,02	0,28	2957,17	1,64	2,62	0,88	0,22	1,11	3,14	0,23	2,55	0,97	0,00	78,25
<i>IL15</i>	1,65	1,30	0,51	8,46	0,10	9,32	1,14	0,55	0,63	0,87	0,67	0,65	1,71	0,78	0,62	1,31	1,53
<i>IL17</i>	2,38	0,00	0,75	0,00	0,00	282,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	1,06	0,00	0,00	0,00
<i>IL1A</i>	1,13	0,00	0,23	0,00	6,28	33,82	0,49	0,08	0,00	0,41	0,48	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>IL1B</i>	1,43	0,85	3,05	0,18	1,95	0,33	0,82	1,05	0,96	0,55	1,23	0,66	2,00	0,78	0,38	1,99	0,00
<i>IL22</i>	0,93	1,30	0,51	4,32	0,34	1871,53	0,71	0,59	3,25	0,21	2,73	0,05	0,62	1,93	0,65	1,89	7,89
<i>IL23A</i>	1,59	2,28	0,24	0,09	5,24	0,46	0,73	0,72	1,53	0,45	1,92	1,22	0,22	1,69	1,87	1,15	31,56
<i>IL27</i>	3,01	0,67	0,76	10,20	0,07	744,43	0,93	0,47	11,24	0,02	49,52	3,07	0,21	6,45	1,11	0,00	19,03
<i>IL4</i>	2,23	0,79	1,79	0,00	0,33	501,46	0,43	1,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	1,46	0,00	0,00	0,00
<i>IL5</i>	2,00	4,92	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58	0,73	0,00	0,54	2,11	0,80	2,13	4,50
<i>IL6</i>	1,39	0,35	0,20	0,13	3,66	5,03	0,10	0,00	0,00	3,10	0,10	0,78	0,20	2,58	1,99	0,21	0,00
<i>IL7</i>	1,85	1,93	0,59	0,57	1,85	3,03	4,44	2,41	0,30	1,34	0,30	0,38	1,93	1,16	5,86	0,34	0,00
<i>IL8</i>	1,09	0,16	0,16	2,30	0,99	2,08	0,43	0,46	4,44	0,59	1,79	0,80	0,62	2,89	0,55	2,75	0,43
<i>IRF3</i>	1,66	1,17	0,71	2,38	0,38	2,53	1,16	0,95	1,48	1,07	0,95	0,81	1,72	0,86	0,72	1,44	0,97
<i>IRF7</i>	2,64	1,16	0,67	1,26	0,38	1,72	0,60	0,35	2,99	0,21	6,02	1,41	0,41	3,34	0,65	0,93	0,00
<i>ISG15</i>	2,79	0,71	0,97	2,83	0,33	0,35	0,81	0,48	5,74	0,21	6,73	0,84	0,99	1,05	0,38	2,28	0,00
<i>KIR3DL1</i>	1,24	1,24	0,69	0,28	1,13	12,64	1,05	0,67	0,85	0,34	0,85	0,39	3,12	0,92	0,90	7,26	7,62
<i>KIR3DS1</i>	1,04	1,72	0,38	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	0,39	2,14	0,18	3,16	0,21	0,00	1,01	1,31	1,57
<i>LAG3</i>	1,26	1,09	0,50	1,11	1,30	0,72	1,84	0,86	1,28	1,22	0,61	2,14	0,46	2,48	0,97	1,05	1,93
<i>LAMP1</i>	1,39	0,92	1,06	1,43	0,51	1,01	0,85	0,70	1,88	0,64	2,57	2,11	0,32	3,46	0,73	0,80	0,41
<i>Mx1</i>	3,03	0,76	1,28	10,63	0,06	2,48	1,14	0,66	3,56	0,37	2,79	1,10	0,96	1,38	0,57	4,17	0,07
<i>Myd88</i>	1,54	0,63	2,45	2,62	0,30	1,23	0,85	0,73	1,04	0,76	1,56	0,75	1,16	0,73	0,72	1,12	0,51
<i>NKG2D</i>	1,30	1,21	0,59	3,78	0,48	0,68	0,82	0,54	0,53	4,92	0,06	0,58	1,74	0,62	0,67	4,92	3,53
<i>NKp44L</i>	1,46	0,83	0,54	1,47	0,52	2,38	1,34	0,71	0,81	2,71	0,18	0,77	2,23	1,06	1,09	2,87	0,25
<i>OAS1</i>	2,23	1,02	1,07	10,48	0,11	1,62	0,88	0,57	5,03	0,16	8,17	1,53	0,61	1,64	0,48	4,59	0,20
<i>PARDB3</i>	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,69	2,13	0,22	1,65	0,0		

APÊNDICE C - Heat map do perfil de expressão dos leucócitos de 6 indivíduos HIV submetidos à imunoterapia nos tempos t1, t2 e t3

Figura 27 – Heat map do perfil de expressão dos leucócitos de 6 indivíduos HIV submetidos à imunoterapia nos tempos t1, t2 e t3. Os valores de $\log_2$ de FC foram plotados de forma linear com tons de verde, vermelho e preto atribuídos para cada valor, sendo que tons de verde indicam genes subexpressos (com valores de $\log_2$ FC negativos) , tons de vermelho indicam os superexpressos (com valores de $\log_2$ de FC positivos) e preto indica uma não modulação ou expressão. O dendograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras.

APÊNDICE D - Resultados Genemania modulação oposta entre P7 e maus respondedores

FUNÇÕES					
t1		t2		t3	
Up-regulated		Up-regulated		Up-regulated	
Proliferação de células T ativadas	4.25e-4	Resposta a interferon do tipo I	3.49e-21	Ativação de células T	2.29e-11
Resposta imune adaptativa	3.14e-3	Resposta celular de interferon do tipo I	3.49e-21	Citotoxicidade mediada por NK	2.29e-11
Resposta imune adaptativa baseada na recombinação somática	9.88e-4	Via de sinalização de interferon do tipo I	3.49e-21	Imunidade mediada por NK	2.29e-11
Ativação celular de T alfa-beta	4.59e-3	Regulação da replicação do genoma viral	9.48e-14	Ligação de receptor a quimiocina CCR	2.29e-11
Ativação celular de T alfa-beta envolvido na resposta imune	4.01e-2	Resposta a vírus	1.49e-13	Regulação da quimiotaxia de leucócitos	2.29e-11
Down-regulated		Down-regulated			
Resposta celular de interferon do tipo I	3.91e-20	Coestimulação de linfócitos	3.19e-13		
Via de sinalização de interferon do tipo I	3.91e-20	Coestimulação de células T	3.19e-13		
Resposta de interferon do tipo I	3.91e-20	Regulação positiva da ativação de células T	2.8e-12		
Resposta a vírus	7.11e-11	Regulação positiva da ativação de linfócitos	1.17e-11		
Regulação negativa do processo	4.27e-7	Ativação de células T	1.34e-11		

ANEXO A - Arranjo de genes comercial usado nas etapas de diferenciação de DC

PCR Array Catalog #:		PAHS-051Y				
Position	Unigene	Refseq	Symbol	Description	Gname	RT2 Catalog
A01	Hs.73722	NM_080649	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzy	APE/APE1/APEN/AP	PPH02201A
A02	Hs.660143	NM_021822	APobec3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalyti	A3G/ARCD/ARP-9/AR	PPH06904A
A03	Hs.370254	NM_004322	BAD	BCL2-associated agonist of cell death	BBC2/BCL2L8	PPH00075C
A04	Hs.433759	NM_003860	BANF1	Barrier to autointegration factor 1	BAF/BCRP1/D14S146	PPH02258A
A05	Hs.624291	NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein	BCL2L4	PPH00078B
A06	Hs.709690	NM_022898	BCL11B	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)	ATL1/ATL1-alpha/ATL	PPH06946A
A07	Hs.150749	NM_000633	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2/PPP1R50	PPH00079B
A08	Hs.643802	NM_033637	BTRC	Beta-transducin repeat containing	BETA-TRCP/FBW1A/	PPH02771C
A09	Hs.141125	NM_004346	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	CPP32/CPP32B/SCA	PPH00107C
A10	Hs.599762	NM_001228	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	ALPS2B/CAP4/Casp8	PPH00359F
A11	Hs.349283	NM_012117	CBX5	Chromobox homolog 5	HEL25/HP1/HP1A	PPH06920A
A12	Hs.303649	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	GDCCF-2/HC11/HSMC	PPH00192F
B01	Hs.514107	NM_002983	CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	GO519-1/LD78ALPHA	PPH00566F
B02	Hs.75703	NM_002984	CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	ACT2/AT744.1/G-26/H	PPH00563B
B03	Hs.514821	NM_002985	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	D17S136E/RANTES/S	PPH00703B
B04	Hs.271387	NM_005623	CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	HC14/MCP-2/MCP2/S	PPH01167B
B05	Hs.92308	NM_001240	CCNT1	Cyclin T1	CCNT/CYCT1/HIVE1	PPH06901A
B06	Hs.705362	NM_00123396	CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	CC-CR2/CCR-2/CCR	PPH00612F
B07	Hs.506190	NM_001837	CCR3	Chemokine (C-C motif) receptor 3	CC-CR3/CD193/CK4	PPH00613B
B08	Hs.184926	NM_005508	CCR4	Chemokine (C-C motif) receptor 4	CC-CR4/CD194/CK5	PPH00614A
B09	Hs.450802	NM_000579	CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5	CC-CR5-5/CCR5/CR5	PPH00615F
B10	Hs.278694	NM_002155	CD209	CD209 molecule	CDSIGN/CLEC4L/DC	PPH05577A
B11	Hs.156445	NM_000734	CD247	CD247 molecule	CD3-ZETA/CD3H/CD3	PPH01484E
B12	Hs.631659	NM_000616	CD4	CD4 molecule	CD4mut	PPH01629C
C01	Hs.502328	NM_000610	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	CDW44/CSPG8/ECM	PPH00114A
C02	Hs.208854	NM_001781	CD69	CD69 molecule	AIM/BL-AC/P26/CLEC	PPH00831F
C03	Hs.436568	NM_004355	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex	DHLA/G/HLA-DG/IIa-G	PPH05587B
C04	Hs.184298	NM_001799	CDK7	Cyclin-dependent kinase 7	CAK1/CDKN7/HCAK/	PPH00935F
C05	Hs.706809	NM_001261	CDK9	Cyclin-dependent kinase 9	C-2k/CDK2L4/CTK1/P	PPH05680A
C06	Hs.732576	NM_000389	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CAP20/CDKN1/CIP1/P	PPH00211E
C07	Hs.719041	NM_005194	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	C/EBP-beta/CRP2/IL6	PPH00991A
C08	Hs.15591	NM_006833	COP56	COP9 constitutive photomorphogenic homolog su	CNS6/MOV34-34KD	PPH06882A
C09	Hs.445757	NM_001877	CR2	Complement component (3d/Epstein Barr virus) r	C3DR/CD21/CR/CVID	PPH06243A
C10	Hs.459759	NM_004380	CREBBP	CREB binding protein	CBP/KAT3A/RSTS	PPH00324F
C11	Hs.531668	NM_002996	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	ABCD-3/CX3kine/CXC	PPH00689C
C12	Hs.522891	NM_000609	CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	IRH/PBSF/SCYB12/S	PPH00528B
D01	Hs.593413	NM_003467	CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	CD184/D2S201E/FB2	PPH00621A
D02	Hs.99863	NM_001972	ELANE	Elastase, neutrophil expressed	ELA2/GE/HLE/HNE/M	PPH01057A
D03	Hs.655211	NM_001429	EP300	E1A binding protein p300	KAT3B/RSTS2/p300	PPH00319A
D04	Hs.659872	NM_002000	FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for	CD89	PPH00841B
D05	Hs.25647	NM_005252	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolo	AP-1/C-FOS/p55	PPH00094A
D06	Hs.80409	NM_001924	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	DDIT1/GADD45	PPH00148B
D07	Hs.855210	NM_002110	HCK	Hemopoietic cell kinase	JTK9/p59Hck/p61Hck	PPH00160A
D08	Hs.204475	NM_014500	HTATSF1	HIV-1 Tat specific factor 1	TAT-SF1/TATSF1/dJ1	PPH06889A
D09	Hs.37026	NM_024013	IFNA1	Interferon, alpha 1	IFL/IFN/IFN-ALPHA/IF	PPH01321B
D10	Hs.93177	NM_002176	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	IFB/IFF/IFNB	PPH00384F
D11	Hs.856	NM_000619	IFNG	Interferon, gamma	IFG/IFI	PPH00380C
D12	Hs.193717	NM_000572	IL10	Interleukin 10	CSIF/GVHDS/IL-10/IL	PPH00572C
E01	Hs.674	NM_002187	IL12B	Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory fact	CLMF/CLMF2/IL-12B/	PPH00545A
E02	Hs.459095	NM_004513	IL16	Interleukin 16	LCF/NIL16/PRIL16/prl	PPH00586A
E03	Hs.126256	NM_000576	IL1B	Interleukin 1, beta	IL-1/IL1-BETA/IL1F2	PPH00171C
E04	Hs.89679	NM_000586	IL2	Interleukin 2	IL-2/TCGF/lymphokine	PPH00172C
E05	Hs.624	NM_000584	IL8	Interleukin 8	CXCL8/GCP-1/GCP1/	PPH00568A
E06	Hs.436061	NM_002198	IRF1	Interferon regulatory factor 1	IRF-1/MAR	PPH00320F
E07	Hs.654566	NM_002199	IRF2	Interferon regulatory factor 2	IRF-2	PPH02031A
E08	Hs.562457	NM_002262	KLRD1	Killer cell lectin-like receptor subfamily D, memb	CD94	PPH06926B
E09	Hs.1116	NM_002342	LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, m	CD18/D12S370/LT-BE	PPH00816C
E10	Hs.186486	NM_005923	MAP3K5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	ASK1/MAKPKK5/ME	PPH00744A
E11	Hs.499674	NM_000242	MBL2	Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble	COLEC1/HSMBP/CM	PPH07136I
E12	Hs.701518	NM_172390	NFATC1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, c	NF-ATC/NFAT2/NFAT	PPH00277C
F01	Hs.618430	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene en	EBP-1/KB1/NF-kB1/	PPH00204F
F02	Hs.81328	NM_002529	NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene en	IKBA/MAD-3/NFKB1	PPH00170F
F03	Hs.356331	NM_002130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	CYPA/CYPH/HEL-S-S	PPH01319G
F04	Hs.731900	NM_002574	PRDX1	Peroxiredoxin 1	MSP23/NKEF-A/NKE	PPH01700F
F05	Hs.735450	NM_004103	PTK2B	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	CADTK/CAKB/FADK2	PPH02523A
F06	Hs.513609	NM_005611	RBL2	Retinoblastoma-like 2 (p130)	P130/Rb2	PPH00364C
F07	Hs.728756	NM_000655	SELL	Selectin L	CD62L/LAM1/LECAM	PPH00677E
F08	Hs.525557	NM_000295	SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antip	A1A/A1AT/AA1/P1PI	PPH06905E
F09	Hs.75599	NM_000488	SERPINC1	Serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin)	AT3/AT3D/ATIII/THP	PPH01134A
F10	Hs.517070	NM_003064	SLPI	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	ALK1/ALP/BLP/HUS1	PPH02863A
F11	Hs.534350	NM_003073	SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin deper	BAF47/INI1/MRD15/R	PPH06945E
F12	Hs.743244	NM_007315	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	CANDF7/ISGF-3/STA	PPH00811C
G01	Hs.463059	NM_003150	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	APRF/HIES	PPH00708F
G02	Hs.48849	NM_005653	TFCP2	Transcription factor CP2	LBP1C/LSF/LSF1/S	PPH00250A
G03	Hs.645227	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	CED/DPD1/LAP/TGFB	PPH00508A
G04	Hs.241570	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor	DIF/TNF-alpha/TNFA/	PPH00341F
G05	Hs.256278	NM_001066	TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, mem	CD120b/TBPI/TNFR-R	PPH00348A
G06	Hs.478275	NM_003810	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, mem	APO2L/Apo-2L/CD253	PPH00242F
G07	Hs.125300	NM_033093	TRIM5	Tripartite motif containing 5	RNF88/TRIM5alpha	PPH17464A
G08	Hs.523512	NM_006292	TSG101	Tumor susceptibility gene 101	TSG10/VPS23	PPH06937E
G09	Hs.128420	NM_013245	VPS4A	Vacuolar protein sorting 4 homolog A (S. cerevisi	SKD1/SKD1A/SKD2/	PPH06944A
G10	Hs.546295	NM_002995	XCL1	Chemokine (C motif) ligand 1	ATAC/LPTN/LTN/SCN	PPH00702B
G11	Hs.370770	NM_003400	XPO1	Exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)	CRM1/emb/exp1	PPH06883A
G12	Hs.603118	NM_003403	YY1	YY1 transcription factor	DELTA/INO80S/NF-E	PPH00440F
H01	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	BRWS1/PS1TP5BP1	PPH00073G
H02	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	-	PPH01094E
H03	Hs.544577	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD	PPH00150F
H04	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HGPRT/HPRT	PPH01018C
H05	Hs.546285	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	L10E/LP0/P0/PRLP0	PPH21138F
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination	HIGX1A	
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC	
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC	
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC	
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC	
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC	
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC	

ANEXO B - Arranjo de genes customizado usado em leucócitos antes/após imunoterapia

Product Specification Sheet

RT² Profiler™ PCR Array: CAPH12563 Custom Human RT²Profiler™ PCR Array

Array Layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	APOBEC3G	BAX	BCL2	BST2	CASP1	CASP3	CCL19	CCL2	CCL20	CCL3	CCL4	CCL5
B	CCR5	CCR6	CCR7	IL7R	CD14	FCGR3B	ISG20	CD27	CD38	CD40LG	PTPRC	NCAM1
C	CD69	CNOT1	CTLA4	CXCL10	CXCL11	CXCL12	CXCL9	CXCR5	EOMES	FAS	FASLG	FOXP3
D	GATA3	GZMA	GZMB	ICOS	IDO1	IFI16	IFNA1	IFNG	IL10	IL13	IL15	IL17A
E	IL1A	IL1B	IL22	IL23A	IL27	IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IRF3	IRF7
F	ISG15	KIR3DL1	KIR3DS1	LAG3	LAMP1	MX1	MYD88	KLRK1	KMT2E	OAS1	PARD3B	PDCD1
G	CD274	PPIA	PRF1	RORC	SLFN11	STAT1	TAP1	TBX21	TGFB1	HAVCR2	TNF	TNFSF10
H	TRIM5	XIAP	ACTB	GAPDH	HPRT1	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Gene Table

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description
A01	Hs.660143	NM_021822	APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
A02	Hs.624291	NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein
A03	Hs.150749	NM_000633	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
A04	Hs.118110	NM_004335	BST2	Bone marrow stromal cell antigen 2
A05	Hs.2490	NM_033292	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
A06	Hs.141125	NM_004346	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
A07	Hs.50002	NM_006274	CCL19	Chemokine (C-C motif) ligand 19
A08	Hs.303649	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
A09	Hs.75498	NM_004591	CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
A10	Hs.514107	NM_002983	CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
A11	Hs.75703	NM_002984	CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
A12	Hs.514821	NM_002985	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
B01	Hs.450802	NM_000579	CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5
B02	Hs.46468	NM_004367	CCR6	Chemokine (C-C motif) receptor 6
B03	Hs.370036	NM_001838	CCR7	Chemokine (C-C motif) receptor 7
B04	Hs.591742	NM_002185	IL7R	Interleukin 7 receptor
B05	Hs.163867	NM_000591	CD14	CD14 molecule
B06	Hs.372679	NM_000570	FCGR3B	Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor (CD16b)
B07	Hs.459265	NM_002201	ISG20	Interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
B08	Hs.355307	NM_001242	CD27	CD27 molecule
B09	Hs.479214	NM_001775	CD38	CD38 molecule
B10	Hs.592244	NM_000074	CD40LG	CD40 ligand
B11	Hs.654514	NM_002838	PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
B12	Hs.711235	NM_000615	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1
C01	Hs.208854	NM_001781	CD69	CD69 molecule
C02	Hs.731691	NM_016284	CNOT1	CCR4-NOT transcription complex, subunit 1
C03	Hs.247824	NM_005214	CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
* C04	Hs.632586	NM_001565	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
C05	Hs.632592	NM_005409	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
C06	Hs.522891	NM_000609	CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
C07	Hs.77367	NM_002416	CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
C08	Hs.113916	NM_001716	CXCR5	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5
C09	Hs.734211	NM_005442	EOMES	Eomesodermin
C10	Hs.244139	NM_000043	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description
C11	Hs.2007	NM_000639	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
C12	Hs.247700	NM_014009	FOXP3	Forkhead box P3
D01	Hs.524134	NM_002051	GATA3	GATA binding protein 3
D02	Hs.90708	NM_006144	GZMA	Granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)
D03	Hs.1051	NM_004131	GZMB	Granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)
D04	Hs.56247	NM_012092	ICOS	Inducible T-cell co-stimulator
D05	Hs.840	NM_002164	IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1
D06	Hs.380250	NM_005531	IFI16	Interferon, gamma-inducible protein 16
D07	Hs.37026	NM_024013	IFNA1	Interferon, alpha 1
D08	Hs.856	NM_000619	IFNG	Interferon, gamma
D09	Hs.193717	NM_000572	IL10	Interleukin 10
D10	Hs.845	NM_002188	IL13	Interleukin 13
D11	Hs.602618	NM_000585	IL15	Interleukin 15
D12	Hs.41724	NM_002190	IL17A	Interleukin 17A
E01	Hs.1722	NM_000575	IL1A	Interleukin 1, alpha
E02	Hs.126256	NM_000576	IL1B	Interleukin 1, beta
E03	Hs.287369	NM_020525	IL22	Interleukin 22
E04	Hs.591803	NM_016584	IL23A	Interleukin 23, alpha subunit p19
E05	Hs.528111	NM_145659	IL27	Interleukin 27
E06	Hs.73917	NM_000589	IL4	Interleukin 4
E07	Hs.2247	NM_000879	IL5	Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
E08	Hs.654458	NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
E09	Hs.591873	NM_000880	IL7	Interleukin 7
E10	Hs.624	NM_000584	IL8	Interleukin 8
E11	Hs.289052	NM_001571	IRF3	Interferon regulatory factor 3
E12	Hs.166120	NM_001572	IRF7	Interferon regulatory factor 7
F01	Hs.458485	NM_005101	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier
F02	Hs.645228	NM_013289	KIR3DL1	Killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 1
F03	Hs.743496	NM_001083539	KIR3DS1	Killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, short cytoplasmic tail, 1
F04	Hs.409523	NM_002286	LAG3	Lymphocyte-activation gene 3
F05	Hs.494419	NM_005561	LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
F06	Hs.517307	NM_002462	MX1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)
F07	Hs.82116	NM_002468	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
F08	Hs.387787	NM_007360	KLRK1	Killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1
F09	Hs.592262	NM_182931	KMT2E	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5 (trithorax homolog, Drosophila)
F10	Hs.524760	NM_002534	OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
F11	Hs.657382	NM_057177	PAR3B	Par-3 partitioning defective 3 homolog B (C. elegans)
F12	Hs.158297	NM_005018	PDCD1	Programmed cell death 1
G01	Hs.521989	NM_014143	CD274	CD274 molecule
G02	Hs.356331	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
G03	Hs.2200	NM_005041	PRF1	Perforin 1 (pore forming protein)
G04	Hs.607993	NM_005060	RORC	RAR-related orphan receptor C
G05	Hs.745059	NM_152270	SLFN11	Schlafen family member 11
G06	Hs.743244	NM_007315	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
G07	Hs.352018	NM_000593	TAP1	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
G08	Hs.272409	NM_013351	TBX21	T-box 21
G09	Hs.645227	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
G10	Hs.710500	NM_032782	HAVCR2	Hepatitis A virus cellular receptor 2
G11	Hs.241570	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor
G12	Hs.478275	NM_003810	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
H01	Hs.125300	NM_033093	TRIM5	Tripartite motif containing 5
H02	Hs.736565	NM_001167	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
H03	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H04	Hs.544577	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H05	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control