LUANDA MARA DA SILVA OLIVEIRA

**Avaliação fenotípica das células T CD4+ reguladoras, Th17,
Th22 e Tc22 nos indivíduos expostos não infectados por HIV-1**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof^{fa} Dr^a. Maria Notomi Sato

São Paulo
2016

LUANDA MARA DA SILVA OLIVEIRA

**Avaliação fenotípica das células T CD4+ reguladoras, Th17,
Th22 e Tc22 nos indivíduos expostos não infectados por HIV-1**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof^{fa} Dr^a. Maria Notomi Sato

São Paulo
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Luanda Mara da Silva

Avaliação fenotípica das células T CD4+ reguladoras, Th17, Th22 e Tc22 nos indivíduos expostos não infectados por HIV-1 / Luanda Mara da Silva Oliveira. – São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Dermatologia.

Orientadora: Maria Notomi Sato.

Descritores: 1.HIV 2.Genes gag 3.Linfócitos T 4.Imunidade adaptativa 5.Citocinas 6.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-052/16

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, meu pai Antonio, minha mãe Vera Lucia, meu irmão Antonio Junior e ao meu namorado Enio por todo amor, carinho e força para para trilhar os caminhos da vida.

Agradecimentos

A minha orientadora Dra Maria Notomi Sato, por todo apoio intelectual, paciência e incentivo para a execução deste trabalho.

Ao Prof Alberto Duarte pelo apoio institucional.

Em especial aos colaboradores do Projeto Sorodiscordante: Josenilson e Cesar

Aos amigos da experimental: Rosana, Kelly, Camila (Lollo), Vanessa, Raquel, Gabriel, Tiago Titz, Jefferson, Fábio, Luana, Anna Cláudia, Natalli, Marília, Marina, Franciane e Raíssa por toda amizade, companherismo, almoços no Coseas e pelo “koppinhos”.

A Noemia, Rosangela e Patricia do setor de Citometria de Fluxo, pela amizade e apoio na execução deste trabalho.

Ao José Eduardo (setor da Carga Viral), Tatiana (setor de Cultura Celular), Luiz, Lucio, Edna, Evelyn e Cristina (secretaria), Anderson (TI), Daniel (coleta), Silvia e Adriana (limpeza e lavagem) e a todos amigos do LIM56 que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos médicos infectologistas: Dr Jorge Casseb (HC-FMUSP), Dr Marcelo Mendonça (IIER) e Dr Marcello Magri (CRT/Aids) para toda ajuda com os pacientes.

Aos membros da Banca de Qualificação: Dr Gil Benard, Dra Paula Rigato e Dr José Angelo, pela contribuição neste trabalho.

Aos pacientes que aceitaram participar deste projeto.

A todos familiares que mesmo de longe sempre me apoiaram.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação: 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1.Introdução	1
1.1 Epidemiologia e características da infecção pelo HIV-1	2
1.2 Características morfologias, genéticas, moleculares e biológicas do HIV	4
1.3 Transmissão do vírus na mucosa vaginal e intestinal	5
1.4 Mecanismos de infecção e disseminação do HIV-1	6
1.5 Fatores que conferem resistência à infecção pelo HIV-1	7
1.6 Células T na infecção pelo HIV-1	9
1.6.1 Células Th17	10
1.6.2 Células Th22/Tc22	11
1.6.3 Células T Citotóxicas	13
1.6.4 Células T polifuncionais.....	14
1.6.5 Células T reguladoras.....	14
1.6.6 Diferenciação, ativação e exaustão de células T	16
2.Objetivos.....	19
3.Métodos	21
3.1 Casuística	22
3.2 Coleta das amostras	23
3.3 Avaliação de marcadores em células T do sangue periférico por citometria de fluxo	23

3.4	Obtenção de células mononucleares (CMN)	24
3.5	Quantificação de células T reguladoras por citometria de fluxo	25
3.6	Avaliação de células T efectoras e citotóxicas por citometria de fluxo	27
3.7	Análise estatística	29
4.	Resultados.....	30
4.1	Resultados referentes a análise funcional das células T	31
4.2	Resultados referentes a análise do perfil fenotípico de células T	45
4.3	Características demográficas dos grupos de estudo.....	46
4.4	Análise da expressão dos marcadores de migração para o intestino em células T do sangue periférico.....	47
4.5	Perfil de ativação/diferenciação, exaustão celular e maturação em células T CD4+ e T CD8+ no sangue periférico.	50
4.6	Análise da expressão simultânea de marcadores de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD4+ e T CD8+ no sangue periférico.....	57
4.7	Perfil fenotípico de células T reguladoras e marcadores de ativação e exaustão celular no sangue periférico	59
5.	Discussão	62
6.	Conclusão	70
7.	Anexos	72
8.	Referências	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ADEE 3002 - Ambulatório de Imunodeficiências Secundárias do HC/FMUSP
AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APCs – Células apresentadoras de antígeno
APOBEC3G – *Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic Polypeptide-like 3G*
A-SAA – Proteína sérica amiloide A
 $\alpha 4\beta 7$ – Integrinas que permitem a migração de células T para o intestino
CCL3 – beta quimiocina conhecida alternativamente com MIP-1 α ,
CCL3L1 – beta quimiocina conhecida alternativamente como MIP-1 α P,
CCL4 - beta quimiocina conhecida alternativamente como MIP-1 β ,
CCL5 – beta quimiocina conhecida alternativamente como RANTES,
CCR5 – Receptor da família das betas-quimiocinas e co-receptor para HIV-1
CCR9 – Receptor da quimiocina CCL25
CD – *Cluster Differentiation*
CD4 – Células T CD4 auxiliador
CD8 – Células T CD8 citotóxico
CD28 – Molécula coestimuladora de células T
CD38 – Ectoenzima usada como marcador de ativação crônica
CD39 - *ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1*
CD56^{bright} – População de células NK com maior potencial de secreção de citocinas
CD56^{dim} – População de células NK com maior potencial citotóxico
CD57 – Marcador de senescência de células T diferenciadas
CD69 – Marcador de ativação precoce
CD95 – Molécula Fas
CD95L – Molécula Fas ligante
CD107a – Marcador de desgranulação
CD127 – Cadeia α do Receptor de IL-7
CD178 – Calda citoplasmática do CD95L
CMN – Células Mononucleares
CMV – Citomegalovírus
CTL – Controle saudável
CTLA-4 – *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*
CV – Carga viral
CXCL12 – beta quimiocina conhecida alternativamente como SDF-1,
CXCR4 - Receptor da família das betas-quimiocinas
DCs – Células dendríticas
 $\Delta 32$ – Deleção de 32 pares de base do gene do receptor da quimiocina CCR5
EBV – Vírus Epstein-Barr
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
ENI – Expostos não infectados por HIV-1
env – gene do envelope viral

FMO – *Fluorescence Minus One*

FoxP3 – *forkhead box P3*

GALT – Tecido linfóide associado ao intestino

Gag – Proteína do core do HIV-1 codificada pelo gene *gag*

gag – gene estrutural do HIV-1

gp41 – Proteína do capsídeo do HIV-1 que se origina da clivagem da gp160

gp120 – Proteína do capsídeo do HIV-1 que se origina da clivagem da gp160

gp160 – Proteína do capsídeo do HIV-1 codificada pelo gene *env*

HAART – *Highly Active Antiretroviral Therapy*

HC/FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HIV-1 – Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1

HIV-2 – Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 2

HLA-DR – Antígeno leucocitário humano

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-2 – Interleucina 2

IL-6 Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-15 – Interleucina 15

IL-17 – Interleucina 17

IL-21 – Interleucina 21

IL-22 – Interleucina 22

IL-23 – Interleucina 23

IL-26 – Interleucina 26

IFN α – Interferon alpha

IFN β – Interferon beta

IFN γ – Interferon gamma

KIR – Receptor de células NK tipo imunoglobulina

LAP – Proteína associada a latência

LFA-1 – Antígeno associado a função linfocitária

LPS – Lipolissacarídeo

MadCAM – Molécula de adesão celular da mucosa

nef – *Negative Factor HIV-1 gene*

NIH – *National Institutes of Health*

NK – Células Natural Killer

NKG2C – Subunidade do receptor de ativação expresso por células NK

NOD – *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*

PD-1 – Proteína de Morte Programada

PD-L1 – Ligante da Proteína de Morte Programada 1

PL – Indivíduos infectados por HIV-1 com Progressão Lenta para aids

pol – gene da polimerase do HIV-1

PR – Indivíduos infectados pelo HIV-1 com uma Progressão Rápida para aids
PT – Indivíduos infectado pelo HIV-1 com uma Progressão Típica para aids
p15 – Proteína do core localizada na região do gene *gag* do HIV-1
p17 – Proteína do core localizada na região do gene *gag* do HIV-1
p24 – Proteína do core localizada na região do gene *gag* do HIV-1
rev – *Response Element HIV-1 gene*
RNA – Ácido Ribonucleico
ROR γ t – *RAR-Related Orphan Receptor gamma*
sCD14 – Forma solúvel da molécula CD14
SEB – Enterotoxina B do *Staphylococcus aureus*
SIV – Vírus da Imunodeficiência Simian
STING – Genes estimuladore de Interferons
tat – *Transactivating Regulatory HIV-1 gene*
TCR – Receptor de células T
Tc22 – Célula T CD8 citotóxica secretora de IL-22
TGF- β – Fator de crescimento transformante beta
Th17 – Células T CD4 auxiliadora secretora de IL-17
Th22 – Células T CD4 auxiliadora secretora de IL-12
TLR – Receptores tipo Toll
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg – Célula T Reguladora
TRIM5 α – *Tripartite motif-containing protein 5*
VCAM – Proteína de adesão celular vascular
vif – *Viral Infectivity Factor HIV-1 gene*
vpu – *Viral Protein Unique HIV-1 gene*
vpr – *Viral Protein R HIV-1 gene*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
µg	Micrograma
µL	Microlitro
≤	Menor ou igual a
<	Menor que
>	Maior que
+	Positivo
-	Negativo
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de análise para as moléculas de migração para o intestino	48
Figura 2. Frequência de células T CD4+ e T CD8+ que expressam moléculas de migração para o intestino do sangue periférico de indivíduos controles, ENI e HIV.	49
Figura 3. Correlação entre células T CD4+ e T CD8+ que expressam $\alpha 4\beta 7+$ e células Th22 e Tc22 de ENI e HIV.	50
Figura 4. Estratégia de análise para os marcadores de ativação/diferenciação e exaustão de células T.	51
Figura 5. Perfil de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD4+ no sangue periférico de indivíduos controles, ENI e HIV.	52
Figura 6. Perfil de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD8+ no sangue periférico de indivíduos controles, ENI e HIV.	53
Figura 7. Perfil de marcadores de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD4+ do sangue periférico de acordo com a maturação celular de indivíduos controles, ENI e HIV.	55
Figura 8. Perfil de marcadores de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD8+ do sangue periférico de acordo com a maturação celular de indivíduos controles, ENI e HIV.	56
Figura 9. Estratégia de análise para expressão simultânea de CD28, CD95, PD-1 e CD127.	58
Figura 10. Expressão simultânea dos marcadores de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD4+ do sangue periférico de indivíduos controles, ENI e HIV.	58
Figura 11. Expressão simultânea dos marcadores de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD8+ do sangue periférico de indivíduos controles, ENI e HIV.	59
Figura 13. Frequência de células T reguladoras no sangue periférico de indivíduos controles, ENI e HIV.	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Anticorpos do painel de memória, ativação/diferenciação e exaustão das células T.....	24
Quadro 2 – Anticorpos do painel de moléculas de migração para o intestino em células T	24
Quadro 3- Anticorpos utilizados no painel de células T reguladoras com marcadores de exaustão	26
Quadro 4- Anticorpos utilizados no painel de células T reguladoras com marcadores de ativação	26
Quadro 5- Anticorpos utilizados no painel de células T secretoras de citocinas	28
Quadro 6- Anticorpos utilizados no painel de células T citotóxicas	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos	47
Tabela 2. Dados demográficos individuais dos pacientes	74

Resumo

Oliveira LMS. Avaliação fenotípica das células T CD4⁺ reguladoras, Th17, Th22 e Tc22 nos indivíduos expostos não infectados por HIV-1 [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: A infecção por HIV-1 é um grave problema de saúde pública causando elevada taxa de morbidade e mortalidade. Entretanto, alguns indivíduos são considerados resistentes à infecção por HIV-1, mesmo após repetidas exposições ao vírus. Vários fatores imunológicos e genéticos podem estar associados a resistência à infecção, como ativação de componentes da imunidade inata e também devido ao baixo perfil de ativação das células T. É possível que nos indivíduos expostos e não infectados por HIV-1 (ENI) ocorra uma importante atuação das células T secretoras de IL-17 e IL-22, e também as células T reguladoras, pois são necessárias para a manutenção e homeostase das mucosas associadas ao intestino (GALT). **OBJETIVO:** Avaliar o fenótipo e a função de células TCD4⁺ e TCD8⁺ em casais sorodiscordantes ao HIV-1, compostos por indivíduos ENI e os parceiros infectados por HIV-1. **MÉTODOS:** Os casais sorodiscordantes ao HIV-1, consistiam de 23 indivíduos expostos não-infectados (ENI), 14 mulheres e 9 homens, com mediana de 41 anos e 21 parceiros infectados por HIV-1 (HIV), 20 homens e 1 mulher com mediana de 41 anos. Os controles saudáveis foram 24 indivíduos (14 mulheres e 10 homens) com mediana de 37 anos. Os casais sorodiscordantes foram compostos por 16 heterossexuais e 7 homossexuais, com tempo de relacionamento de 13 anos. As frequências de células Th17, Th22 e Tc22, as células T polifuncionais foram analisadas em células mononucleares (CMNs) do sangue periférico, estimulados com peptídeos da região Gag do HIV-1 e da enterotoxina B do *Staphylococcus aureus* (SEB), a frequência de células T reguladoras, o perfil fenotípico de exaustão/diferenciação e a expressão da integrina $\alpha 4\beta 7$ e CCR9 em células T, foram realizados por citometria de fluxo. **RESULTADOS:** No grupo HIV, as células T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico mostrou maior frequência de CD95 e PD-1 e baixa expressão de CD127 comparado ao grupo ENI e controle. A frequência de células Th17 em CMNs aumentou nos grupos ENI e HIV-1 na condição sem estímulo, contudo, após estímulo com os peptídeos da região p24 da Gag do HIV-1 induziu resposta somente no grupo HIV-1. O grupo ENI mostrou resposta antígeno-específica somente para IL-22. Além disto, avaliando as células Tc22 e Th22, foi verificado aumento da resposta aos peptídeos da Gag e também ao SEB, nos grupos HIV e ENI. A presença de células T polifuncionais antígeno-específicas, secretoras de 5-4 citocinas, foi detectada apenas em células T CD38⁺ no grupo HIV, enquanto os indivíduos ENI mostraram resposta polifuncional por células T CD38⁻ somente ao estímulo policlonal por SEB. Uma diminuição do número absoluto de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}/Foxp3⁺) foi detectada no grupo HIV comparado ao ENI e controle, com maior expressão de moléculas HLA-DR e CD95. Além disto, foi detectado diminuição na frequência de células TCD8⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ no grupo ENI e de células TCD4⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ nos grupos ENI e HIV. Houve uma correlação positiva entre as células Tc22 e Th22 com as células TCD8⁺ e TCD4⁺ que expressam $\alpha 4\beta 7$, no grupo ENI e HIV-1. **CONCLUSÃO:** Os indivíduos ENI são capazes de desenvolver

resposta antígeno-específicas relacionadas com a IL-22, que possui importante função na imunidade de mucosas. Além disto, mostram presença de células T polifuncionais com baixo perfil de ativação a estímulo policlonal. Os dados evidenciam que os indivíduos ENI, mostram indução de células Tc22, aumento de expressão de moléculas de migração para o intestino e equilíbrio entre as células efectoras e Treg, que em conjunto, devem exercer importante papel para a resistência à infecção por HIV-1.

Descritores: HIV, Genes gag, Linfócitos T, Imunidade Adaptativa, Citocinas, Citometria de Fluxo

Abstract

Oliveira LMS. Phenotypic evaluation of regulatory CD4⁺ T cells, Th17, Th22 and Tc22 in HIV-1-exposed uninfected individuals [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

INTRODUCTION: The HIV-1 infection is a major public health problem causing high morbidity and mortality. However, some individuals are considered resistant to HIV-1 infection even after repeated HIV-1 exposures. Several immunologic and genetic factors could be associated with the resistance to infection, such as activation of innate immunity components and due to the low profile of T-cell activation. It is possible that in HIV-1 exposed uninfected individuals (EU) occurs an important activity of the T cells secreting IL-17 and IL-22, including regulatory T cells, which are necessary to maintenance of homeostasis of gut-associated lymphoid tissue (GALT). **AIM:** To evaluate the phenotype and function of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in HIV-1-serodiscordant couples, composed by the EU individuals and the infected HIV-1 partners. **METHODS:** The HIV-1-serodiscordant couples consisted of 23 EU individuals, 14 women and 9 men, with a median age of 41 years and 21 partners infected by HIV-1, 20 men and 1 woman, with a median of 41 years. Healthy controls consisted of 24 individuals (14 women and 10 men) with a median age of 37 years. The serodiscordant couples were composed by 16 homosexuals and 7 heterosexuals, reporting a median relationship duration of 13 years with a single partner. The frequency of Th17, Th22 and Tc22 cells, the polyfunctional T cells were assessed in mononuclear cells (MNCs) from peripheral blood, stimulated with the peptides from the gag region of HIV-1 and enterotoxin B from *Staphylococcus aureus* (SEB), the frequency of regulatory T cells and the exhaustion/differentiation phenotypic profile and expression of integrin $\alpha 4\beta 7$ and CCR9 in T cells were assessed by flow cytometry. **RESULTS:** In HIV group, CD4⁺ and CD8⁺ T cells from peripheral blood showed a higher frequency of PD-1, and CD95 and low expression of CD127 compared to ENI and control groups. The frequency of Th17 cells in MNCs increased in ENI and HIV-1 groups in the unstimulated conditions, however, upon stimulation with p24 peptides of HIV-1 Gag induced response only in HIV-1 group. The ENI group showed antigen-specific response only for IL-22. Moreover, evaluating the Tc22 and Th22 cells, it was found increased response to Gag peptides and also for SEB in both, HIV and ENI groups. The presence of polyfunctional antigen-specific T cells secreting 5-4 cytokines, was only detected in CD38⁺ T cells from HIV group, while ENI individuals showed polyfunctional CD38⁻ T cells response only with the polyclonal stimulus with SEB. A decreased absolute number of regulatory T cells (CD4⁺ + CD25⁺ + CD127^{low} /-Foxp3⁺) was detected in HIV group compared to the EU and control groups, with higher expression of HLA-DR and CD95 molecules. In addition, it was detected decreased frequency of CD8⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ T cells in the ENI group and CD4⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ T cells in both, ENI and HIV groups. There was a positive correlation between Tc22 and Th22 cells with the CD8⁺ and CD4⁺ T cells expressing $\alpha 4\beta 7$, in the ENI and HIV-1 groups. **CONCLUSION:** The EU individuals are able to develop antigen-specific response related to IL-22, which has an important function in the mucosal immunity. In addition, showed

presence of polyfunctional T cells with low activation profile to polyclonal stimuli. The data show that the EU individuals, showed induction of Tc22 cells, increased expression of homing molecules into the intestine and balance between effector cells and Treg cells, which together, must play an important role in the HIV-1 resistance.

Descriptors: HIV; genes gag; T-lymphocytes; adaptive immunity; cytokines; flow cytometry.

1.Introdução

1.1 Epidemiologia e características da infecção pelo HIV-1

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), causada pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), é um fator agravante de saúde pública devido a elevada taxa de morbidade e mortalidade. No mundo estima-se que há 36,9 milhões de pessoas vivendo com o HIV-1 e cerca de 2 milhões de novas infecções ocorreram em 2014, com um total de 1,2 milhões de óbito relacionado a AIDS. A África Subsaariana é a região de maior prevalência, cerca de 25,5 milhões de infectados (1). No Brasil, já foram registrados mais de 798 mil casos de AIDS, representando uma taxa de prevalência de 0,4% na população geral. A taxa de mortalidade no Brasil teve uma queda de 5,0% nos últimos 10 anos com 6,0 óbitos a cada 100 mil habitantes em 2005 para 5,7 em 2014 (2).

Os mecanismos que regem a patogênese da infecção pelo HIV-1, ou mesmo a resistência à infecção, resultam da interação entre o sistema imune e o vírus (3). Com base nesse princípio, os infectados pelo HIV-1, originam três grupos que se distinguem pela cinética da progressão para AIDS: os Progressores Rápidos (PR) cujo curso da doença evolui com uma rapidez pouco usual de 3 a 4 anos que representam 5 a 10% dos infectados, os Progressores Típicos (PT) onde a progressão ocorre em cerca de 8 a 10 anos da infecção, representados por 80 a 90% dos infectados e o grupo dos Progressores Lentos (PL) cuja característica é o retardo pouco comum da progressão da doença, onde mesmo na ausência do tratamento antirretroviral os indivíduos se mantêm sem sinais da progressão por mais de 10 anos (4). Um subgrupo dentro dos progressores lentos são os Controladores de Elite e sua característica é a manutenção do número de células T CD4⁺ no sangue periférico acima de 500 células/mm³, além de reduzida carga viral por mais de 10 anos na ausência de tratamento (5).

Contudo, há aqueles indivíduos que se expõem e não se infectam com HIV-1, esse grupo é conhecido como Expostos não Infectados (ENI). Não existem informações a respeito da frequência desses indivíduos em escala mundial. Em alguns países africanos, entre os casais heterossexuais sorodiscordantes, a mulher é cerca de duas vezes mais exposta do que o homem, representando uma população mais vulnerável (6).

Os indivíduos ENI são conhecidos desde o final da década de 80 onde mantêm-se soronegativos apesar de repetidas exposições ao HIV-1 (7). O efeito foi inicialmente observado em trabalhadoras do sexo em Nairóbi no Quênia, mas em diversos países do mundo são observados mulheres e homens com o mesmo perfil (8, 9). No entanto, indivíduos ENI representam um risco elevado de se tornarem infectados. Na África, cerca de 10% dos indivíduos ENI, que vivem relacionamentos estáveis, se infectam ao longo de 1 ano com repetidas exposições HIV-1 (9) e mostram ser a principal fonte de novas infecções pelo HIV-1 neste continente (10).

Na busca por um mecanismo que explicasse esse fenômeno, os estudos iniciais sugeriram que a coorte de trabalhadoras do sexo de Nairobi com sorologia negativa para o HIV-1, mostrava resposta das células T CD4⁺ específicas para as proteínas do envelope e do *core* viral (11). Estudos posteriores confirmaram essa resposta das células T CD4⁺ HIV-1-específicas, e a hipótese era que a soroconversão não ocorria nos indivíduos ENI porque a exposição ao vírus primária as células T produzindo uma resposta “protetora” nesses indivíduos. Posteriormente, um novo conceito foi proposto, o de “resistência” a infecção pelo HIV-1 nos indivíduos ENI, com a evidência observada em trabalhadoras do sexo de Nairóbi que parte delas se tornaram infectadas por HIV-1 ao longo de um ano (7).

A exposição ao HIV-1 sem infecção também é observada em recém-nascidos filhos de mães infectadas pelo HIV-1 (12), em indivíduos expostos intravenosamente, como trabalhadores da saúde (13), hemofílicos transfundidos (14) e usuários de drogas intravenosas (15). No entanto, a exposição sexual possui um papel importante no contexto da infecção, pois é a principal rota de exposição das novas infecções em adultos (16). Contudo, são necessário os estudos entre a relação das características imunológicas do hospedeiro e a proteção ao HIV-1.

1.2 Características morfologias, genéticas, moleculares e biológicas do HIV

O HIV é um membro da família dos retrovírus que pode ser subdividido em HIV-1 e HIV-2, que diferem quanto à estrutura genômica e distribuição geográfica. Ambos causam síndromes semelhantes, embora o HIV-2 possua menor potencial patogênico. Os isolados de HIV-1 são classificados em três grupos M (*major*), O (*outlier*), N (não M/não O) com variabilidade genética de até 30% entre eles. (17).

A superfície viral é constituída por um envoltório glicoproteico originado da membrana das células hospedeiras e que recobre o capsídeo viral. Na parte externa do envelope viral são encontradas espículas glicoproteicas, responsáveis pela ligação do vírus aos receptores celulares. As glicoproteínas gp41 (transmembrana) e a gp120 (glicoproteína de superfície) são derivadas da gp160, que é clivada no complexo de golgi da célula hospedeira (18).

O HIV-1 é formado por duas fitas simples de RNA, sua estrutura é formada pela *gag* (proteína do core), *pol* (polimerase/transcriptase reversa) e *env* (proteínas do envelope). Há também os genes adicionais como *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef* que

participam do processo de replicação viral e exercem atividade reguladora positiva ou negativa (17).

Os receptores de quimiocinas, o CCR5 e o CXCR4, expressos em macrófagos, monócitos, células dendríticas (DCs) e células T, funcionam como co-receptores do HIV-1. (19). As quimiocinas CCL3 (MIP-1 α), CCL3L1 (MIP-1 α P), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) e o SDF-1 (CXCL-12) ligante exclusivo do CXCR4 podem bloquear a entrada do HIV na célula do hospedeiro, pois competem com o mesmo sítio de ligação que o vírus (19). Variantes genéticas de quimiocinas e seus receptores que naturalmente ocorrem no hospedeiro influenciam a progressão da infecção pelo HIV-1 para a AIDS e a resposta imune ao HIV (20).

1.3 Transmissão do vírus na mucosa vaginal e intestinal

A relação sexual é o mecanismo mais comum para adquirir o vírus HIV-1 e a maioria das transmissões ocorrem através da superfície da mucosa. O contato do vírus com a mucosa epitelial genital, orofaringe e trato gastrointestinal é o primeiro passo para o estabelecer a infecção sistêmica. Na relação sexual, o risco de infecção é muito maior para os homens do que para as mulheres, considerando que a exposição sem proteção na prática anal oferece um risco até 10 vezes maior do que a relação vaginal (21) (22).

A combinação das barreiras físicas inatas no epitélio vaginal, como as *tight junctions*, o muco, as barreiras químicas pelos peptídeos antimicrobianos e os fatores de restrição antiviral contribuem para a proteção inata da mucosa. No entanto, rupturas na barreira da mucosa devido as coinfeções virais e bacterianas favorecem a infecção por HIV no trato genital feminino (23). A mucosa colo-retal é a principal via de infecção

pelo HIV-1 em homens homossexuais a relação sexual anal sem proteção pode gerar pequenos traumas no epitélio facilitando a entrada do vírus na mucosa, onde há muitas células-alvos da infecção, ocorrendo uma rápida disseminação (24). Estudar mecanismos de proteção à mucosas é importante fator para evitar e/ou controlar a disseminação viral.

1.4 Mecanismos de infecção e disseminação do HIV-1

O processo de infecção das células susceptíveis pelo HIV-1 é iniciado quando há a ligação da glicoproteína do envelope viral gp120 com a molécula CD4 e com um correceptor, o CCR5 ou CXCR4, da célula hospedeira. Após essa ligação há uma mudança conformacional que permite que outro componente do envelope viral, a gp41, possa iniciar o processo de fusão viral nessa célula (17).

A integrina $\alpha 4\beta 7$ é expressa em células T ativadas, com perfil efetora e/ou memória, que migram para o tecido linfóide associado ao intestino (GALT). A gp120 do HIV-1 pode ligar-se à integrina $\alpha 4\beta 7$ dos linfócitos, este engajamento ocorre na região conservada da alça V2 que mimetiza os três ligantes naturais da integrina $\alpha 4\beta 7$, MadCAM, VCAM e fibronectina, induz a ativação de LFA-1, contribuindo para a infecção das células T CD4 no GALT, pois essa interação gera sinapses virológica, facilitando a disseminação viral através do contato célula-célula (25).

A consequência da depleção das células T CD4⁺ no GALT é o comprometimento da integridade da membrana intestinal que possibilita a translocação de produtos microbianos comensais do lúmen do intestino para a circulação periférica, este mecanismo é sugerido ser responsável pela persistente ativação imunológica nos indivíduos infectados crônicos (26). Os principais produtos bacterianos e fúngicos que

translocam são: os peptideoglicano, ácido lipotecóico, lipopolissacarídeos (LPS) e flagelina. Na circulação esses produtos geram uma potente resposta pró-inflamatória pela ativação de receptores NOD e TLR (receptores tipo Toll) nas células da imunidade inata levando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, TNF e interferons do tipo I (IFN α e IFN β) (27).

Os níveis de LPS circulantes estão aumentados nos pacientes infectados pelo HIV-1 crônicos e em estágio de AIDS e em menores níveis nos controladores de elite com carga viral indetectável (26). Outros marcadores de translocação bacteriana como o CD14 solúvel (sCD14) (28) e o 16S rDNA também estão aumentando em indivíduos infectados crônicos (29).

A terapia antiretroviral é capaz de reconstituir parcialmente a mucosa gastrointestinal, assim se o tratamento iniciar-se na fase aguda da infecção esses danos a membrana poderão ser amenizados (30).

1.5 Fatores que conferem resistência à infecção pelo HIV-1

A interação dos retrovírus com o hospedeiro humano pode induzir a expressão de genes denominados de fatores de restrição viral, ou simplesmente fatores antivirais que atuam em fases distintas do ciclo viral (31).

Alguns fatores antivirais são capazes de bloquear o ciclo de replicação viral antes ou no processo de transcrição reversa, como APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*) e TRIM5 α (*Tripartite motif-containing protein 5*). Os indivíduos ENIs com alta exposição ao HIV-1, mostram elevada expressão de APOBEC3G, contudo, esta expressão é amenizada em casais com reduzida frequência de exposição ao HIV-1 (32). O TRIM5 α está associado a redução da

susceptibilidade à infecção por HIV-1 apenas quando sua expressão é elevada (33). Além disto, as defensinas 1, 2 e 3 são fortemente expressas por células T do sangue e células do epitélio da mucosa genital de mulheres ENIs (34).

O STING (*stimulator of interferon genes*) é uma molécula de sinalização de resposta inata aos ligantes citossólicos de ácido nucleico. Em conjunto, esses fatores de restrição viral foram detectados em elevados níveis de expressão em células de cordão umbilical de mães infectadas por HIV, bem como em outros compartimentos como tecido placentário e em células do leite (35).

A deleção de 32 pares de base no gene do receptor de quimiocina CCR5 ($\Delta 32$), é uma característica genética, predominante em caucasianos, que gera resistência à infecção pelo HIV-1, se o indivíduo expressar a deleção de maneira heterozigota à proteção é parcial, porém se for homozigota a proteção é total para o vírus com tropismo R5 (36) (37) (38).

Outros fatores genéticos estão relacionados com o perfil de progressão da infecção pelo HIV-1, como o polimorfismo dos genes do HLA de classe I (*human leucocyte antigen*), como os alelos de HLA-B*5701, HLA-B*5801 e HLA-B*2705 são frequentemente associados à progressores lentos e indivíduos expostos não-infectados pelo HIV-1 (39) (40). Já os alelos HLA-B*35 e HLA-B*07 estão presente em indivíduos infectados pelo HIV-1 que progridem rapidamente (41) (42).

Os receptores de células NK tipo imunoglobulina (KIR), mais especificamente o alelo KIR3DS1 está relacionado com a lenta progressão da infecção pelo HIV-1 (39). Em indivíduos expostos não-infectados pelo HIV-1 homozigotos para KIR3DS1, apresentou para maior atividade funcional das células NK, o que pode contribuir para a maior resistência a infecção (15).

A imunidade adaptativa também exerce importante função na resistência a infecção pelo HIV-1, a resposta humoral mediada pelos anticorpos anti-HIV está relacionada ao reconhecimento de epitopos específicos de glicoproteínas do envelope viral ou autoanticorpos contra CD4 ou CCR5 interferindo na entrada do vírus na célula hospedeira (43).

Anticorpos neutralizantes são gerados após 3 a 12 meses de infecção pelo HIV-1, porém não são eficientes para o controle da viremia (22). Em primatas, foi demonstrado que a administração intravenosa de anticorpos induziu proteção após desafio com SIV via mucosa vaginal (44). Em humanos, numa coorte de ENI foi detectado resposta IgG e IgA contra epitopos do envelope viral, entretanto não foi possível definir se foi pela exposição ao vírus ou se foi anticorpos polirreativos naturais, sugerindo que é necessário melhor investigação da especificidade e função dos anticorpos (45).

Além das características genéticas do hospedeiro, dos fatores da imunidade inata e da produção de anticorpos neutralizantes, as células T tem desempenhado importante função na proteção contra o HIV-1.

1.6 Células T na infecção pelo HIV-1

A imunidade celular mediada pelas células T é fundamental para o controle da viremia dos indivíduos infectados por HIV-1 (46). Os mecanismos imunológicos relacionados à proteção nos indivíduos ENI mostram que há presença de resposta mediada por células T-específicas a epitopos do envelope viral e as proteínas do core do HIV-1 (11)

As células T CD4⁺ são as células preferencialmente infectadas e eliminadas na infecção pelo HIV-1. Já as células T CD8⁺ citotóxicas são reconhecidas pelo seu potencial citotóxico na resposta antiviral. Contudo, as células T CD4⁺ estão sendo implicadas como as células essenciais no estágio precoce da infecção do HIV, por suprimir a replicação viral, e assim, retardar o aparecimento da doença (47).

Desta forma, iremos explorar o fenótipo e a função das células T CD4⁺ e suas subpopulações, que são alvos na infecção por HIV-1, mas exercem importante função na proteção de mucosas como as células Th17 e Th22, junto com as células T CD8⁺, explorar o perfil polifuncional das células T, e o perfil das células T reguladoras.

1.6.1 Células Th17

A célula Th17 mantém a integridade da superfície da mucosa intestinal induzindo a proliferação de enterócitos, além de recrutar neutrófilos, para atuar em infecções bacterianas e fúngicas, mediando a ativação e produção de defensinas antimicrobianas (48) (49). O fator transformador de crescimento (TGF)- β , IL-1 β , IL-6 e IL-23 parecem ser os fatores determinantes envolvidos na transformação das células T *naive* no fenótipo Th17 através do fator de transcrição ROR γ t, estas produzem IL-17a, IL-17f, IL-21, IL-22, IL-26, IFN- γ e TNF- α sob condições inflamatórias (50).

Os indivíduos infectados por HIV-1 com progressão lenta que não fazem um uso de terapia anti-retroviral mostram uma maior frequência de células Th17 no sangue periférico quando comparado aos progressores típicos, isso sugere que o controle da replicação viral pode ser devido ao baixo estado de ativação imunológica e assim, a menor translocação bacteriana, por preservação da mucosa intestinal (51) (52).

A terapia anti-retroviral é capaz de reconstituir, em partes, as células Th17 do GALT, (53) e apesar da reconstituição, a normalização da função da Th17 requer tempo de tratamento, enfatizando a necessidade de estratégias para preservar a membrana da mucosa intestinal (54).

A frequência de células Th17 é maior na cérvix do que no sangue periférico, expressam os receptores CCR5 e $\alpha 4\beta 7$ além de produzirem maior quantidade de IFN γ e IL-22. Em mulheres infectadas por HIV-1, trabalhadoras do sexo, as células Th17 estavam intesamente depletadas (55). As trabalhadoras do sexo, expostas não-infectadas por HIV-1, mostram redução na secreção de IL-17 e IL-22 na mucosa genital e em células mononucleares cultivadas com mitógenos, sugerindo que a menor quantidade destas citocinas estão relacionadas com baixo perfil de ativação e exercendo um papel protetor nesta coorte (56). No prepúcio de homens expostos não infectados por HIV-1, a frequência de células Th17 é baixa, isso sugere uma menor existência de células alvos no sítio de exposição, o que não contribui para a não infecção pelo HIV-1 (57).

Embora as células Th17 são importantes para a proteção na mucosa intestinal, através do recrutamento de células e indução de fatores da imunidade inata, são células-alvo na infecção por HIV-1, sendo necessárias estratégias para preservação dessas as células neste sítio.

1.6.2 Células Th22/Tc22

A IL-22 é uma citocina que pertence a família da IL-10 e é secretada por células NK e linfócitos T (58). A IL-22 liga-se a um receptor heterodimérico expresso por células não-hematopoiéticas como as células epiteliais da mucosa intestinal e da pele. Seu efeito nas células epiteliais consiste na indução da expressão de genes envolvidos

na defesa antimicrobiana como as proteínas S100, defensinas, mucinas e proteínas da família RegIII. (59).

As células T CD4⁺ denominadas Th22 produzem IL-22 mas não secretam IFN γ e IL-17a (60). As células T CD8⁺ também são capazes de produzir IL-22 na ausência de IFN γ e IL-17a e são definidas como Tc22 e foram descritas em doenças de pele com a psoríase e dermatite atópica (61) (62), porém ainda é pouco explorada no contexto do HIV-1.

As Th22 circulantes em indivíduos saudáveis expressam altos níveis de CCR5 e de $\alpha 4\beta 7$ e na infecção por HIV-1 há uma diminuição desta população celular, devido sua susceptibilidade na infecção pelo vírus. As Th22 e outras células produtoras de IL-22 são depletadas na mucosa intestinal em todos os estágios da infecção pelo HIV. O seu papel protetor e reparador de enterócitos é evidenciado em estudo *in vitro*, que mostra que a adição exógena de IL-22 ameniza os danos epiteliais gerados pelo HIV (63).

Longo tempo de tratamento com antiretroviral é capaz de reconstituir as células produtoras de IL-22 na mucosa de indivíduos infectados por HIV-1 crônicos (64). A frequência de células Th22 no GALT foi semelhante entre controles saudáveis, infectados por HIV-1 em tratamento e controladores de elite, sem tratamento (65).

Elevados níveis de IL-22, foram detectados em expostos não infectados por HIV-1, junto com proteína amilóide sérica A (A-SAA), sugerindo que a IL-22 pode envolvida numa cascata que gera resistência a infecção pelo HIV-1 (66).

1.6.3 Células T Citotóxicas

As células T CD4+, T CD8+ e células Natural Killer (NK) podem eliminar as células infectadas através de mecanismos citotóxicos, como a interação do Fas ligante (CD95L/CD178) com seu cognato receptor Fas (CD95) na célula-alvo, (67), outro mecanismo é através de moléculas tóxicas, como perforina e granzimas, ambas vias induzem a morte das células-alvo pela ativação das vias pró-apoptóticas (68).

A presença de células T CD4 com perfil citotóxico mostra ser importante para o controle de várias infecções virais persistentes: como pelo Epstein-Barr (EBV) (69) , Hepatite C (HCV) (70) e HIV-1 (71).

A capacidade citolítica de células T CD8+ através da secreção de grânulos citotóxicos como granzimas e perforinas é fundamental para eliminar células T CD4+ infectadas por HIV-1 (72), além de conferir resistência a infecção em indivíduos expostos não infectados ao HIV-1 (73) (74).

A expansão de células T CD4+ citotóxicas que secretam granzima A em resposta antiviral durante a fase aguda da infecção pelo HIV-1 contribui para o controle da replicação viral e pode ser considerado um marcador imunológico de progressão da doença e do *set point* viral (47)

Infectados por HIV-1 que progridem lentamente mostram maior resposta de células T citotóxicas do que progressores típicos, este fato é atribuído ao controle da replicação viral, o que deve ter contribuído para a reduzida alteração da mucosa intestinal (75).

1.6.4 Células T polifuncionais

A capacidade de uma célula secretar duas ou mais citocinas refere-se ao perfil polifuncional. Nos indivíduos que controlam de forma espontânea a viremia, as células T CD4⁺ são mais polifuncionais e secretam TNF- α , IL-2 e IFN- γ comparadas com indivíduos que progridem normalmente (76) (77).

A polifuncionalidade de células T CD8⁺ está presente em coortes de indivíduos que progridem lentamente (78) e também está relacionado ao melhor controle viral (79). Indivíduos expostos ao HIV-1 não infectados podem responder a Gag com aumento da frequência de células T CD8⁺ polifuncionais, e ainda com capacidade para lisar células alvo que apresentam epítomos cognatos (80).

Outras infecções virais, como o citomegalovírus (CMV), os indivíduos cronicamente infectados apresentam expansão e maior polifuncionalidade de células T CD8⁺ em resposta ao superantígeno SEB (Enterotoxina B do *Staphylococcus aureus*), sugerindo que este perfil pode conferir uma vantagem imunológica a repostas para outros vírus (81).

Embora a polifuncionalidade de células T apresentem bom prognóstico no contexto da infecção pelo HIV-1, é necessário melhor investigação destas células no contexto da proteção da infecção.

1.6.5 Células T reguladoras

As células T reguladoras (Treg) estão presentes naturalmente no sistema imunológico e são indispensáveis para manter tolerância própria e a homeostase do

sistema imune (82). Estas células podem suprimir a ativação, proliferação e funções efetoras de várias células do sistema imune (83).

Contudo, os estudos das Treg na infecção por HIV são controversos, na fase aguda da infecção por HIV-1 o número absoluto de células Treg está aumentado devido à intensa resposta imune (84). Na fase crônica o aumento das células Treg pode favorecer a replicação viral inibindo a resposta de células HIV-específicas além de suprimir a atividade citolítica e não-citolítica de células T CD8 HIV-específicas (85) (86). O aumento das células Treg também pode estar associado com falha da reconstituição imunológica durante a terapia antiretroviral (87).

Um estudo em mulheres trabalhadoras do sexo expostas não-infectadas, mostrou o aumento na frequência das células Tregs e diminuição da ativação celular quando comparado com mulheres saudáveis e com infectadas pelo HIV (88). Por outro lado, foi evidenciado que indivíduos progressores lentos, expostos não-infectados e controles não infectados possuem níveis semelhantes de Treg, mas em pacientes com AIDS estão diminuídos (89).

A transmissão vertical do HIV de mães infectadas na ausência de tratamento antiretroviral, é de somente 3 -15% por exposição *in utero* sendo que a maioria dos infantes permanece não infectada. As crianças expostas ao HIV e não infectadas exibem altos níveis de células T CD4+ CD25+ CD127- e baixos níveis de ativação de células T CD4+ e CD8+ no cordão umbilical (90)

Contudo, ainda há variações quanto ao uso de marcadores para identificação da população T reguladora, porém é necessário aprofundar a investigação funcional destas células para a compreensão no contexto da proteção da infecção pelo HIV-1.

1.6.6 Diferenciação, ativação e exaustão de células T

Os linfócitos T podem ser classificados de acordo com o estágio de diferenciação como: células *naive*, memória central, memória efetora e memória efetora CD45RA+. Os linfócitos T *naive*, ou virgens, ainda não interagiram com antígenos e podem ser caracterizados fenotipicamente pelos marcadores CD45RA+ e CCR7+. Os linfócitos T de memória central recirculam como células *naive* em órgãos linfóides e proliferam para gerar células efetoras CCR7- CD45RA- e células CCR7+ e CD45RA- de memória central em infecções secundárias. As células T de memória efetora possuem características de células efetoras e circulam em órgãos não linfóides com capacidade de produção rápida de citocinas. Já as células T de memória RA são pouco exploradas em especial para as células CD4+ (91).

O receptor de IL-7, CD127 é expresso em células T *naive* e diminui sua expressão quando ocorre ativação celular e sinalização via TCR (92), em indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1 a frequência de células T CD4+CD127-CD25- é aumentada em relação aos indivíduos saudáveis, o que correlaciona positivamente com o aumento da imunoativação (93). A expressão de CD127 é diminuída em células T CD4+ e T CD8+ de pacientes crônicos e que fazem uso de terapia antiretroviral, da mesma forma, a expressão dos marcadores de exaustão celular PD-1 e senescência CD57 estão elevados em todos os estágios da maturação das células T no sangue periférico (94).

A molécula PD-1 é um receptor com função inibidora que atua na exaustão celular na presença persistente de antígenos, o seu ligante PD-L1 é expresso, principalmente em células apresentadora de antígeno (APCs) (95). Quando as células T estão exaustas, apresentam defeitos na função efetora, como a diminuição da

proliferação, citotoxicidade e produção de citocinas (96). O bloqueio de PD-L1 em pacientes infectados por HIV-1 é capaz de aumentar a proliferação de células T CD8+ HIV-específicas (97). O aumento de PD-1 em estágios precoces de maturação de células T CD4+, representa uma população mais funcional, porém mais susceptível a infecção pelo HIV-1 devido a alta expressão de correceptores como o CCR5 (98).

A elevada frequência da molécula Fas (CD95) em células T naive pode atuar de forma negativa na ativação e proliferação celular quando estimuladas via TCR, pois vírus aumentam a expressão de CD95L em APCs, suprimindo a resposta imunológica e favorecendo a evasão viral (99). O aumento expressão de CD95 em células T CD4+ está relacionada com uma maior apoptose destas células em indivíduos infectados pelo HIV-1 (100), assim como, as células T CD8+ HIV-específicas são mais sensíveis a apoptose via CD95 induzida pelo CD95L expresso nas células infectadas (101).

A queda na expressão da molécula coestimuladora CD28, importante molécula na ativação de células T, pode ocorrer em casos de ativação crônica antígeno-específica como em infecções virais pelo CMV, EBV e HIV-1 (102). Em contrapartida, o acúmulo de linfócitos T CD28- é uma característica importante em indivíduos infectados pelo HIV-1, pois aumenta as propriedades funcionais e pode melhorar a resposta antígeno-específica. Os indivíduos infectados de forma crônica mostram um aumento da resposta anti-HIV e anti-CMV em células T, sob o efeito da IL-15 e IL-21 em linfócitos T CD28- (103).

As células T CD28- de infectados por HIV-1, sob terapia antiretroviral e sem viremia apresentam uma diminuída sensibilidade à apoptose e alta capacidade de proliferação após estímulo TCR, já aqueles com alta viremia mostram um perfil inverso (104). No entanto, o controle da replicação viral é um importante fator para a sobrevivência e ativação da células T CD28-.

A expressão da molécula CD38 nas células T está relacionada com a ativação crônica na infecção por HIV-1, pois a expressão de CD38 em célula T CD8⁺ é uma marca de progressão da doença independente da contagem de células T CD4⁺ ou da carga viral plasmática (105) (106) .

O perfil de baixa ativação de células T CD4⁺ é um bom prognóstico contra a infecção, em coortes de indivíduos expostos não infectados por HIV-1 a queda da ativação celular está relacionado a maior resistência a infecção (107). Além disto, em mulheres altamente expostas mas não infectadas pelo HIV-1 a proteção a infecção está atribuída a queda da produção de citocinas pró-inflamatórias e menor expressão de genes relacionados a ativação celular (108).

Contudo, estudar as populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ secretoras de citocinas e correlacionar o estado de ativação celular, o balanço com as células T reguladoras, bem como, o perfil de diferenciação/exaustão dessas células em pacientes expostos e não infectados por HIV-1, pode ser fundamental para compreensão do mecanismo envolvido na resistência destes indivíduos.

2.Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar o fenótipo e a função de células TCD4⁺ e TCD8⁺ em casais sorodiscordantes, composto por indivíduos expostos não infectados e infectados pelo HIV-1.

Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ secretoras de IL-17a e IL-22, estimuladas por peptídeos da Gag do HIV e por enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB);
- Avaliar a frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ secretoras de IL-17a, IL-22, IL-2, IFN- γ e MIP-1 β , simultâneas, estimuladas por peptídeos da Gag do HIV e por SEB;
- Avaliar a frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ citotóxicas estimuladas por peptídeos da Gag do HIV e por SEB;
- Avaliar a expressão das moléculas de migração para o intestino, $\alpha_4\beta_7$ e CCR9, em células T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico;
- Avaliar o perfil de ativação e exaustão nos estágios de maturação de células T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico;
- Avaliar a frequência e o fenótipo de células T CD4⁺ reguladoras

3.Métodos

3.1 Casuística

Os casais sorodiscordantes foram provenientes do Ambulatório de Vulneráveis do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, do Ambulatório de Imunodeficiências Secundárias (ADEE 3002) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP) e do Centro de Referência em Tratamento de DST/AIDS. Foram incluídos indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos com pelo menos 1 ano de relacionamento estável com o parceiro atual. O grupo de controle sadio (CTL) foi proveniente do complexo HC/FMUSP, foram incluídos indivíduos 24 saudáveis, sendo 14 mulheres e 10 homens, e casais sorodiscordantes composto por 23 indivíduos de expostos não-infectados (ENI), 14 mulheres e 9 homens e 21 de parceiros infectados (HIV-1), sendo 1 mulher e 20 homens.

Como critérios de exclusão, foram excluídos casais com múltiplos parceiros, indivíduos com coinfeções oportunistas ativas, indivíduos que estavam fazendo uso de imunossupressores ou imunomoduladores, gravidez, ou co-morbidades que alterassem o status de ativação do sistema imune.

Todos foram informados do conteúdo da pesquisa, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3) aprovado pela Comitê de Ética de ambas instituições, CAPPesq 0708/11 (Anexo 1), também foi aplicado um questionário sobre o comportamento sexual dos casais sorodiscordantes no momento da coleta (Anexo 4).

3.2 Coleta das amostras

Aproximadamente 30 mL de sangue periférico foram coletados em tubos com heparina, 5ml de tubo de EDTA e 5 mL para coleta de soro. O soro foi coletado e estocado a -70° C até a utilização.

3.3 Avaliação de marcadores em células T do sangue periférico por citometria de fluxo

A avaliação dos perfis de memória, ativação e exaustão e de expressão de moléculas de migração para o intestino das células T foi realizada em sangue periférico coletado em tubo contendo EDTA. A marcação foi realizada em 100µl de sangue, utilizando os anticorpos de acordo com os Quadros descritos abaixo, por 20 minutos em proteção da luz à temperatura ambiente. Após a incubação, as hemácias foram lisadas com 900µl de solução BD FACS Lysing (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) por 15 minutos protegido da luz. Após duas lavagens com solução isotônica Facs Flow (BD Biosciences) por 5 minutos a 1.500 rpm. As células foram ressuspensas em solução isotônica (Facs Flow) e 300.000 eventos foram adquiridos em aparelho de citometria de fluxo (LSRFortessa – BD Biosciences) utilizando o programa FACSDiva (BD Biosciences). Para avaliação dos dados foi utilizado o programa FlowJo versão v.10 (Tree Star, Inc.). O controle da fluorescência (FMO – *Fluorescence Minus One*) foi realizado para todos os anticorpos do painel, para avaliar a compensação e definir os eventos positivos.

Quadro 1 – Anticorpos do painel de memória, ativação/diferenciação e exaustão das células T

Anticorpo	Fluorógeno	Marca	Clone
CD3	Brilliant Violet 605	BD Biosciences	SK7
CD4	Horizon V500	BD Biosciences	RPA-T4
CD8	Percep-cy5.5	BD Biosciences	RPA-T8
CD28	FITC	BD Biosciences	CD28.2
CD95	Horizon V450	BD Biosciences	DX2
CD127	PE-cy7	BD Biosciences	HIL-7R-M21
PD-1	PE	BD Biosciences	MIH4
CD45RA	APC-H7	BD Biosciences	HI100
CCR7	Alexa Fluor 647	BD Biosciences	3D12

Quadro 2 – Anticorpos do painel de moléculas de migração para o intestino em células T

Anticorpo	Fluorógeno	Marca	Clone
CD3	Brilliant Violet 605	BD Biosciences	SK7
CD4	Horizon V500	BD Biosciences	RPA-T4
CD8	Alexa Fluor 700	BD Biosciences	RPA-T8
CD49d ($\alpha 4$)	FITC	BD Biosciences	9F10
BETA7	PE-cy5	BD Biosciences	FIB504
CCR5	APC-cy7	BD Biosciences	2D7/CCR5
CCR9	PE	BD Biosciences	112509

3.4 Obtenção de células mononucleares (CMN)

As amostras de sangue periférico foram diluídas em solução fisiológica em proporção de 1:2 em tubos cônicos. As suspensões das células mononucleares do

sangue periférico (CMN) foram obtidas após centrifugação por 20 minutos a 2200 rpm através de gradiente de Ficoll-hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). As células obtidas foram quantificadas em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada de acordo com o ensaio realizado.

3.5 Quantificação de células T reguladoras por citometria de fluxo

A avaliação das células T reguladoras foi realizada em células mononucleares de acordo com as instruções do fabricante do kit de FoxP3 (eBioscience, San Diego, CA, EUA). Resumidamente, cerca de $1,5 \times 10^6$ de CMNs foram marcadas com os anticorpos, de acordo com os quadros abaixo, por 20 minutos a 4°C protegido da luz. Posteriormente, as células foram lavadas com solução salina por 5 minutos a 1.500 rpm e incubadas com o tampão de fixação do kit por 30 minutos a 4°C, lavadas com tampão de permeabilização por 5 minutos a 1.500 rpm e incubadas por 30 minutos com anticorpos anti-Foxp3. Após a incubação as células foram lavadas e ressuspensas em solução isotônica FACS Flow (BD Biosciences). Foram adquiridos 500.000 eventos em aparelho de citometria de fluxo (LSRFortessa - BD Bioscience) utilizando o software FACSDiva (BD Bioscience). Para avaliação dos dados foi utilizado o programa FlowJo versão v.10 (Tree Star, Inc.). O controle da fluorescência (FMO – *Fluorescence Minus One*) foi realizado para todos os anticorpos do painel, para avaliar a compensação e definir os eventos positivos.

Quadro 3- Anticorpos utilizados no painel de células T reguladoras com marcadores de exaustão

Anticorpo	Fluorógeno	Marca	Clone
CD3	Brilliant Violet 605	BD Biosciences	SK7
CD4	Horizon V500	BD Biosciences	RPA-T4
CD8	Alexa Fluor 700	BD Biosciences	RPA-T8
CD25	FITC	BD Biosciences	M-A251
CD127	PE-cy7	BD Biosciences	HIL-7R-M21
CD95	Horizon V450	BD Biosciences	DX2
PD-1	Percep-cy5.5	BD Biosciences	HIL-7R-M21
Foxp3	PE	eBiosciences	PCH101

Quadro 4- Anticorpos utilizados no painel de células T reguladoras com marcadores de ativação

Anticorpo	Fluorógeno	Marca	Clone
CD3	Brilliant Violet 605	BD Biosciences	SK7
CD4	Horizon V500	BD Biosciences	RPA-T4
CD8	Alexa Fluor 700	BD Biosciences	RPA-T8
CD25	FITC	BD Biosciences	M-A251
CD127	PE-cy7	BD Biosciences	HIL-7R-M21
CD152	Horizon V450	BD Biosciences	BNI3
CD39	APC	BD Biosciences	TU66
HLA-DR	APC-H7	BD Biosciences	G46-6
LAP	PE-CF594	BD Biosciences	TW4-2F8
Foxp3	PE	eBiosciences	PCH101

3.6 Avaliação de células T efectoras e citotóxicas por citometria de fluxo

Para avaliar a capacidade de secreção citocinas e moléculas citolíticas em células T CD4⁺ e T CD8⁺, cerca de $1,5 \times 10^6$ células/orifício foram distribuídas em microplacas de 48 orifícios (Costar, Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura RPMI-S (Gibco, Carlsbad, CA) contendo 10% de soro AB humano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com gentamicina (10 µg/mL, Novafarma, SP, Brasil). Os estímulos utilizados foram: 1 µg/mL de enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5 µg/mL de peptídeos da Gag do HIV-1 (com overlap de 11 resíduos de 15-mers do HIV-1 HXB2; NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) que foram separados em 3 pools de peptídeos, correspondente com a sequência da região da p17 (Gag 1, 33 peptideos, 7872-7904), para a região da p24 (Gag 2, 59 peptideos, 7904 - 7962) e para a região da p15 (Gag 3, 33 peptideos, 7962- 7994). Foi utilizado os co-estímulos com os anticorpos anti-CD28 e anti-CD49d (1 µg/mL, BD Bioscience) e na presença do anticorpo CD107a PE-cy5 em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 6 horas. Após 2 horas de estímulo foi acrescentada a Brefeldina A (10 µg/mL, Sigma-Aldrich).

Posteriormente, as células foram coletadas, lavadas e ressuspensas em tampão fosfato (PBS) com o marcador de viabilidade LIVE/DEAD Fixable Red Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, em proteção da luz. Em seguida, as células foram lavadas e fixadas com o tampão Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 20 minutos a 4°C. Logo após as células foram lavadas com a solução Perm/Wash e ressuspensas em 50 µL da mesma solução na presença dos anticorpos, como descritos no quadro abaixo, e incubadas por 20 minutos a 4°C protegidas da luz, após este período as células foram lavadas e

resuspendidas em solução isotônica FACS Flow (BD Biosciences). Foram adquiridos 500.000 eventos em aparelho de citometria de fluxo (LSRFortessa - BD Bioscience) utilizando o software FACSDiva (BD Bioscience). Para avaliação dos dados foi utilizado o programa FlowJo versão v.10 (Tree Star, Inc.).

O controle da fluorescência (FMO – *Fluorescence Minus One*) foi realizado para todos os anticorpos do painel, para avaliar a compensação e definir os eventos positivos. Para a análise polifuncional da células T, foi utilizado a estratégia de *gate* booleana realizada no programa FlowJo, de acordo como descrito por Dembek *et al* (109).

Quadro 5- Anticorpos utilizados no painel de células T secretoras de citocinas

Anticorpo	Fluorógeno	Marca	Clone
Live/Dead	Texas Red	Invitrogen	-
CD3	Brilliant Violet 605	BD Biosciences	SK7
CD4	Horizon V500	BD Biosciences	RPA-T4
CD8	Percep-cy5.5	BD Biosciences	RPA-T8
CD38	Alexa Fluor 700	BD Biosciences	HIT2
IL-17a	Alexa Fluor 488	eBiosciences	eBio64DEC17
IL-22	PE	eBiosciences	22URTI
IFN γ	Horizon V450	BD Biosciences	B27
IL-2	Pe-cy7	BD Biosciences	MQ1-17H12
MIP-1 β	APC-H7	BD Biosciences	D21-1351

Quadro 6- Anticorpos utilizados no painel de células T citotóxicas

Anticorpo	Fluorógeno	Marca	Clone
Live/Dead	Texas Red	Invitrogen	-
CD3	Brilliant Violet 605	BD Biosciences	SK7

CD4	Horizon V500	BD Biosciences	RPA-T4
CD8	Alexa Fluor 700	BD Biosciences	RPA-T8
CD107a	PE-cy5	BD Biosciences	H4A3
Granzima B	Horizon V450	BD Biosciences	GB11

3.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados e a construção dos respectivos gráficos, foi através do programa *Graph Pad Prism 5* (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA). O teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparar os três grupos de dados. A correlação entre os dados foi estabelecida pelo teste de correlação não-paramétrica de Spearman. A diferença entre os grupos analisados foi considerada estatisticamente significativa, quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

4. Resultados

4.1 Resultados referentes a análise funcional das células T

Artigo publicado na revista Scientific Reports em Setembro de 2015

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Increased frequency of circulating Tc22/Th22 cells and polyfunctional CD38⁺ T cells in HIV-exposed uninfected subjects

received: 16 February 2015

accepted: 13 August 2015

Published: 08 September 2015

Luanda M. S. Oliveira¹, Josenilson F. Lima¹, Cesar A. C. Cervantes¹, Jorge S. Casseb^{2,3}, Marcelo Mendonça³, Alberto J. S. Duarte¹ & Maria N. Sato¹

Some individuals are resistant to HIV-1 infection despite repeated exposure to the virus, suggesting the presence of a complex antiviral response. Innate factors like IL-22 exert gut mucosal protection and polyfunctional T cells have been associated with low progression in HIV infection; therefore, we evaluated the frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ T cell-secreting cytokines, including Tc22/Th22 cells and polyfunctional T cells in HIV-1-exposed uninfected individuals (EUs), their HIV-1-infected partners and healthy controls. EUs exhibited an increased frequency of p15 Gag CD4⁺ IL-22⁺ secreting T cells, whereas HIV-infected partners demonstrated a high frequency of CD4⁺ IL-17⁺ T cells in response to p24. Similar responses of Th22 and Tc22 cells to Gag peptides and Staphylococcal enterotoxin B (SEB) stimulation were detected in the serodiscordant couples. However, polyfunctionality in HIV subjects was associated with an HIV Gag response of CD38⁺ T cells, whereas polyfunctionality for EUs was induced upon SEB stimulation by CD38⁺ T cells. EUs demonstrated the presence of Tc22/Th22 cells and polyfunctional CD38⁺ T cells with a low activation profile. These data suggest that SEB-induced polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells together with Tc22/Th22 cells in EU individuals can provide an immunological advantage in the response to pathogens such as HIV-1.

Currently, approximately 35 million people are infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) worldwide¹. Susceptibility to HIV-1 infection differs among individuals, and a small number of subjects that are exposed to HIV-1 do not become infected; these individuals are called HIV-exposed uninfected individuals (EUs)². These EUs belong to various risk groups, such as sex workers, health professionals, hemophiliacs who receive HIV-1-infected blood, drug users, children of HIV-1-infected mothers and individuals in stable relationships with partners that are HIV-1-infected^{2–4}.

Some factors contribute to the decreased susceptibility to HIV-1 infection observed in EUs, including genetic homozygosity for the deletion of 32 base pairs of the CCR5 chemokine receptor⁵, antiviral innate immunity factors⁶, secretion of chemokines and cytokines, the activity of natural killer cells⁴, IgA or IgG³ antibody production against envelope proteins^{7,8}, responses of T cells that are specific for HIV-1⁹, cytotoxic responses of polyfunctional CD8 T cells¹⁰ and low-level activation of CD4 T cells¹¹. In addition to innate anti-HIV-1 factors, IL-22 has been described as inducing the production of acute phase proteins that are able to inhibit HIV infection *in vitro*¹². The functionality of IL-22 is associated with gut mucosal protection during HIV infection^{13,14}. However, decreased IL-22 secretion in the genital mucosae and in the blood compartment induced by staphylococcal enterotoxin stimulation has

¹Laboratory of Dermatology and Immunodeficiencies, LIM-56, Department of Dermatology, Tropical Medicine Institute of São Paulo, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ²Ambulatory Service of the Secondary Immunodeficiency Clinic of the Clinical Hospital, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil.

³Emílio Ribas Infectious Diseases Institute in São Paulo, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.N.S. (email: marisato@usp.br)

Figure 1. Circulating Gag-specific and SEB-induced CD4+ T cells secreting IL-22 in EU subjects.

PBMCs from healthy controls (HC, $n = 15$), EUs ($n = 16$) and HIV-infected individuals ($n = 15$) were cultivated with medium (baseline), HIV Gag peptide pools [Gag1 (p17), Gag2 (p24), and Gag3 (p15)], or SEB for 6h and Brefeldin A for 4h. CD4+ T cells secreting IL-17a (A) and IL-22 (B) were assessed using flow cytometry. Frequency of CD4+ T cells was subtracted from baseline. The results are expressed as medians and IQRs. * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$, adjusted for multiple comparisons.

been described in female EU sex workers¹⁵. In addition, EU sex workers in Kenya have demonstrated decreased IL-17 production in both blood and genital mucosal cells, indicating that resistance to infection could be related to a decreased proinflammatory response¹⁵. The cytokines IL-17 and IL-22 are secreted by several cells, including Th17 and Th22 cells, and by a subset of CD8+ T cells, termed Tc22 cells, that have not yet been investigated in EU individuals.

EU subjects are characterized by reduced immune activation with decreased CD4+ T cell frequency and the expression of activation markers such as HLA-DR, CD38 and CD70¹¹. CD4+ T cells in EU sex workers demonstrate apparent reduced activation that may contribute to host resistance to HIV-1¹⁶.

The role of CD8+ T cells in the co-production of cytokines and cytotoxic molecules is important for viral control in HIV-1 infection¹⁷. A high frequency of HIV-specific polyfunctional CD8+ T lymphocytes in the blood of patients who control the virus, such as long-term non-progressors or elite controllers, is associated with spontaneous control of viral replication^{18,19}.

Furthermore, the capacity of a specific subset of CD4+ T cells to secrete several cytokines to control viral replication and clearance, designated polyfunctional cells, represents another resistance mechanism for HIV-1 infection²⁰. Additionally, CD8+ T cells in EU individuals produce a cytotoxic and polyfunctional response specific to HIV-1 that might confer protection against HIV-1 infection¹⁰.

In this study, we investigated IL-22- and IL-17-secreting T cell profiles in serodiscordant couples for HIV-1 in response to the p17, p24 and p15 regions of HIV-1 Gag protein or Staphylococcal enterotoxin B (SEB). We observed increased frequencies of Th22 and Tc22 cells in both HIV and EU individuals compared to the healthy control (HC) group. Interestingly, although we identified some immunological similarities between EU and HIV-infected partners, a distinct polyfunctional T cell profile was evident in EU individuals.

Results

Frequency of circulating CD4+ T cells secreting IL-17a or IL-22 in response to Gag in serodiscordant couples. IL-17 and IL-22 protein levels were significantly reduced in EU female sex workers in Kenya compared to controls¹⁵. However, the frequency of Gag response by CD4+ or CD8+ T cells secreting IL-17 and IL-22 in EU is unknown. We enrolled serodiscordant couples (EU and HIV-infected) and uninfected individuals to assess the presence of CD4+ and CD8+ T cells secreting IL-17a and IL-22 among PBMCs upon stimulation with HIV Gag peptides and SEB using flow cytometry. Because the presence of p24 Gag-induced CD4+ T cells is associated with nonprogression in HIV-1 infection²¹ we decide to evaluate the 3 pools of HIV-Gag peptides comprising p17, p24 and p15, respectively. The gating strategy is shown in Supplementary Figure 1.

An increased frequency of CD4+ IL-17+ T cells at baseline level was detected in both EU and HIV-infected subjects compared to the HC group (Fig. 1A). Only HIV-1-infected individuals demonstrated an expansion of CD4+ IL-17+ T cells induced by Gag2 (p24) stimulation. The frequency of CD4+ T cells secreting IL-22 in response to Gag3 (p15) peptide stimulation and for SEB was markedly increased in EUs compared to HC individuals (Fig. 1B).

Next, to verify whether the IL-22 response of CD4+ T cells was related to Th22 cells, we evaluated IL-22 expression, excluding IFN- γ - and IL-17 secreting cells in CD4+ T cells as previously described, to identify Th22 cells. The gating strategy is shown in Supplementary Figure 2. Curiously, p15-specific stimulation induced increased frequencies of Th22 cells in both HIV-1 and EU subjects compared to the HC

Figure 2. Presence of circulating Th22 and Tc22 cells in EUs and HIV-1-infected subjects. PBMCs of HCs (n= 15), EUs (n= 16) and HIV-1-infected individuals (n= 15) were cultivated with medium (baseline), HIV Gag peptide pools [Gag1 (p17), Gag2 (p24), and Gag3 (p15)], or SEB for 6 h and Brefeldin A for 4 h. Th22 and Tc22 cell frequencies were obtained by excluding IFN- γ and IL-17a. **(A)** Th22 and **(B)** Tc22 cell frequencies were assessed using flow cytometry. Frequencies of Th22 or Tc22 cells were subtracted from baseline levels. The results are shown as medians and IQRs. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$, adjusted for multiple comparisons.

group (Fig. 2A), and p24 induced Th22 expansion in HIV-1 individuals (Fig. 2A). Again, an increased frequency of Th22 cells was induced only in the EU group with SEB stimulation.

The frequencies of CD8+ T cells secreting IL-22 (Tc22) were increased in the EU and HIV-1 groups for stimulation with the Gag3 peptide pools and for SEB compared to the HC group (Fig. 2B). This finding indicates that in the EU group, CD8+ IL-22+ IFN- γ - IL-17- T cells have a broad Gag-induced response compared to CD4+ T cells.

The cytotoxic profiles of CD4+ and CD8+ T cells were evaluated based on the expression of two degranulating markers, CD107a and granzyme B. CD4+ CD107a+ T cells and CD8+ granzyme B+ T cells were detected at increased baseline levels or upon SEB stimulation in HIV-1-infected individuals compared to the HC group (Supplementary Figure 3). Moreover, no differences in the frequencies of CD4+ T cells secreting IL-17 or IL-22 were detected when HIV-1-infected individuals were analyzed based on their CD4 T cell counts or on detectable VLs; the same findings were observed in the respective EU partners.

Figure 3. SEB-induced polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells as features of EUs. The simultaneous secretion of IFN- γ , IL-2, IL-17a, IL-22 and MIP-1 β by CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T cells induced by Gag1 (p17), Gag2 (p24), or SEB from HC (n = 15), EU (n = 16) and HIV (n = 15) individuals was assessed using flow cytometry. Frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ T cells were subtracted from baseline values. Bars represent the medians and IQRs. *p $\leq$ 0.05 and **p $\leq$ 0.01, adjusted for multiple comparisons.

These data demonstrate that EU individuals expressed higher frequencies of Th22 and Tc22 cells in response to Gag and SEB stimulation.

Polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by Gag and SEB in EU subjects. Next, we verified the polyfunctional profile of CD4⁺ T cells that secrete IFN- γ , IL-2, IL-17a, IL-22 and MIP-1 β induced by Gag and SEB stimulation in EUs and HIV-infected individuals. The gating strategy to detect simultaneous cytokine production in CD4⁺ T cells is shown in Supplementary Figure 4. Because the Boolean strategy generates several combinations, we show here only those data that yielded significant differences.

A polyfunctional CD4⁺ T cell response to Gag stimulation was detected only in the HIV-infected group (Fig. 3). Increased frequency of CD4⁺ T cells secreting 5 cytokines were detected in response to Gag2 stimulation, or 4 cytokines in combination induced by Gag2 (excluding IL-22 or IL-17) and Gag1 (excluding IL-2) stimulation (Fig. 3A). In contrast, EU subjects demonstrated a polyfunctional response compared to the HIV-infected group only in response to SEB stimulation, for example, the secretion of 4 cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-17a, and IL-22) or a combination of 3 cytokines (including IFN- γ , IL-2 and IL-22).

In the HIV-1 group, a polyfunctional CD8⁺ T cell response consisting of a combination of 4 cytokines, IFN- γ , IL-2, IL-22, and MIP-1 β , was detected in response to Gag1 and Gag2 stimulation as well as a response consisting of IL-2, IL-22, and MIP-1 β (Fig. 3B). Similarly CD4⁺ T cells, a polyfunctional CD8⁺ T cell response was induced by SEB stimulation in the EU group compared to the HC group.

To verify whether the CD4⁺ T cell response to HIV Gag induction could be related to the expression of chronic activation markers, we analyzed IFN- γ , IL-2, IL-17a, IL-22 and MIP-1 β secretion in the presence of CD38 expression in CD4⁺ T cells. The gating strategy is shown in Supplementary Figure 4.

We observed that polyfunctional CD4⁺ CD38⁺ T cell Gag-response was only generated in the HIV group (Fig. 4A). Increased frequency of CD4⁺CD38⁺ cells secreting a combination of 5 cytokines in response to Gag2 was verified, and a combination of 3 cytokines, specifically IL-2, IL-22 and MIP-1 β , in response to Gag2 stimulation was observed compared to HC subjects. Interestingly, a SEB-induced polyfunctional CD4⁺ CD38⁺ T cell response consisting of a combination of 4 (IFN- γ , IL-2, IL-22, and MIP-1 β) or 3 (IFN- γ , IL-17a, and MIP-1 β) cytokines was observed in the HIV group.

Figure 4. Distinct polyfunctionality profiles of CD4+ and CD8+ T cells based on CD38 expression in EUs and HIV-infected subjects. The simultaneous secretion of IFN- γ , IL-2, IL-17a, IL-22, and MIP-1 β by CD4+ (A) and CD8+ T (B) cells expressing CD38 or not expressing CD38, induced by Gag1 (p17), Gag2 (p24), Gag3 (p15) or SEB, from HCs (n = 15), EUs (n = 16) and HIV-infected individuals (n = 15) was assessed using flow cytometry. (C) Pie chart representations of the capacity of CD4+CD38+ and CD4+CD38- T cells to secrete 5, 4 or 3 cytokines (IL-17a, IL-22, IFN- γ , MIP-1 β and IL-2) induced by SEB. Frequencies of CD4+ and CD8+ T cells were subtracted from baseline values. Bars represent the medians and IQRs. *p $\leq$ 0.05 and **p $\leq$ 0.01, adjusted for multiple comparisons.

However, polyfunctional CD4+ CD38- T cell response was detected only in the EU group in response to SEB, consisting of 2 combinations of 3 cytokines (IFN- γ , IL-2, and IL-17a or IFN- γ , IL-2, and IL-22), compared to the HIV group (Fig. 4A).

Figure 4B shows that HIV-infected subjects demonstrated polyfunctional CD8+ CD38+ T cells in response to SEB stimulation, as evidenced by the secretion of 2 combinations of 4 cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-22, and MIP-1 β or IFN- γ , IL-17, IL-22, and MIP-1 β) or a combination of 3 cytokines (IL-17, IL-22, and MIP-1 β). However, in the absence of CD38, only the EU group developed polyfunctional CD8+ T cells inducible by SEB, secreting a combination of 4 or 5 (IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-22 and MIP-1 β) cytokines (Fig. 4B).

Our findings indicated a differential polyfunctional CD4+ T cell response and a CD8+ T cell response independent of stimulation. Polyfunctionality of CD4+ and CD8+ T cells induced by Gag was observed in CD38+ T cells in HIV-infected individuals, whereas in EU partners, the polyfunctionality was in CD38- T cells induced by nonspecific stimulation.

Discussion

Here, we evaluated IL-22-secreting cells and HIV-specific or SEB-induced polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in EU subjects. Our results showed an expansion of circulating Gag response of Th22 and Tc22 in EU subjects. Importantly, we found that polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in EU subjects were evident only upon SEB stimulation, whereas the polyfunctional T cell responses in HIV-infected partners were induced by Gag. Moreover, in EU subjects, CD4+ T cell polyfunctionality occurred in the CD38- cells, in contrast to in the HIV partners. The findings revealed an expansion of SEB-induced polyfunctional T cells with a low chronic activation profile in EU subjects.

Interestingly, the cohort of serodiscordant couples in this study reported an average of more than 13 years in relationships, in which the majority of HIV-infected partners were successfully treated with ART. This period is longer than the time of HIV diagnosis and treatment (10.2 years), which indicates

that the uninfected partner had been highly exposed for some period while the partner had detectable viremia, before ART. During the relationship period, these serodiscordant couples have persistent despite low sexual HIV exposure.

Indeed, HIV-1 infected individuals demonstrated an increased frequency of CD4⁺ T cells secreting IL-17 and IL-22 upon Gag stimulation. It is possible that the increased frequency of Th22 and Th17 cells in the peripheral blood could be related to the immunological status of these individuals, who were all ART-suppressed patients, with CD4⁺ T cells counts of 618.2 cells/mm³. In addition, no correlation was verified with viral load or CD4⁺ T cell counts with the frequency of Th17 and Th22/Tc22 cells. Moreover, Th17 cells are a primary target during HIV infection, and their loss and dysregulation partially recovers after successful ART²². The depletion of Th22 cells also occurs in the intestinal mucosa of chronically infected individuals¹⁴. The lower counts of Th17/Th22 cells in the peripheral blood could be the result of primary CD4⁺ T cells depletion in the intestinal tissues. In persistently SIV-infected animals, a depletion of Th17 cells as well as Th22 cells in blood and intestine has been observed²³. Moreover, the numbers of Th17 in blood and gut mucosal are preserved in long-term nonprogressors²⁴.

Some similarities were detected between EU subjects and their HIV partners that did not distinguish between the effects of pathogen exposure and HIV infection. As we verified, EUs had higher frequencies of p15 Gag-induced CD4⁺ IL-22⁺ T cells, whereas HIV-infected subjects demonstrated a broader IL-22 response, including p15 and p24 responses. Additionally, similar IL-22 frequencies of both Gag and SEB were induced by CD8⁺ T cells in EU subjects and HIV partners. Notably, exposure to HIV-1 did not induce an IL-17 Gag response but was able to induce IL-22 secretion by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. To our knowledge, there are no published data evaluating Tc22 cells in HIV-1 infection.

The role of IL-22 in EU subjects has been controversial. It has been suggested that the increased serum levels of IL-22 and acute-phase proteins in EU subjects could be associated with resistance to infection¹². However, a lower degree of activation could be related to resistance to HIV infection in female sex workers in Kenya, who demonstrated decreased IL-22 secretion by PBMCs stimulated with SEB or left unstimulated and suppressed IL-22 expression in cervical cells¹⁵. In contrast, since IL-22 secretion may occur from several types of cells, we evaluated IL-22 secretion by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and verified an increased frequency of Th22/Tc22 induced by SEB and Gag peptides in EU subjects compared to HC. This suggest a protective role at mucosal sites. Selective loss of Th22 cells and a reduction in IL-22 cytokine secretion by CD4 T cells occurred in patients with untreated HIV-1 infection, which was restored in part by ART²⁵. The loss of Th22 cells and disruption in the balance of Th22 and T regulatory cells may contribute toward systemic immune activation and mucosal immune deficiency during HIV-1 infection²⁵. Considering that EU subjects are HIV-exposed but uninfected, the increment of Th22/Tc22 cells in peripheral blood may suggest a protective strategy in the HIV infection. A more detailed investigation is necessary to determine whether the presence of circulating Gag-induced IL-22-secreting T cells in EU individuals contributes to the control of HIV-1 infection.

Although we identified Gag-induced Th22 and Tc22 cells in EU subjects, polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells were generated only upon SEB stimulation. In contrast, HIV-1 partners demonstrated expansions of both p17 and p24 Gag polyfunctional responses (4-5 combinations, including IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-22, and MIP-1 β), as expected. Polyfunctionality by CD4⁺ T cells in response to p17 and p24 has been associated with viremic controllers in the absence of ART²⁰ and HIV nonprogressors that have demonstrated recovered polyfunctionality of CD8⁺ T cells for CD107a, IFN- γ , IL-2, MIP-1 β and TNF- α ; these observations could represent one factor that prevents disease progression¹⁷. Our results showed that HIV-infected individuals who are successfully ART-treated demonstrate recovered HIV Gag polyfunctional T cell function. To better verify these immunological changes, we chose to investigate couples rather than non-related HIV-infected individuals.

The robust, non-specific SEB-induced polyfunctional response of circulating CD4⁺ and CD8⁺ T cells in EU subjects, despite HIV-1 exposure, could also occur in response to exposure to other viruses, such as cytomegalovirus (CMV). In fact, previously we verified 100% frequency of CMV seropositivity in EU individuals, similarly to HIV, whereas only 65% seropositivity is found in healthy control individuals²⁶. Indeed, CMV seropositive donors have higher numbers of polyfunctional CD8⁺ T cells associated with the expansion of polyfunctional CD8⁺ CD57⁺ T cells, indicating that CMV improves the CD8 response to SEB²⁷. This increase in polyfunctionality, which can provide an immunological advantage in response to other pathogens, is attributable to CD8⁺ CD57⁺ T cell expansion in CMV-seropositive individuals²⁷. We have not determined the serology for other viruses that we know are prevalent in HIV-infected individuals and can be sexually transmitted to EU partners; the question of whether SEB-induced polyfunctional T cells have a role in acute HIV infection could be interesting to explore.

Another intriguing finding in EU subjects was related to CD38 expression in polyfunctional T cells. We verified that the polyfunctionality of CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by Gag was observed in CD38⁺ cells in HIV-infected individuals, whereas in EUs, polyfunctionality was observed in CD38⁻ T cells in response to SEB. The expression levels of CD38 in CD8⁺ T cells declined steadily in HIV-positive subjects after the beginning of ART but increased transiently in parallel with episodes of viral replication²⁸. Usually, polyfunctionality indicates good prognosis of HIV infection, whereas we found polyfunctionality only in activated CD38⁺ T cells. This finding suggests that polyfunctional T cells in ART-treated HIV individuals do not reach the similar polyfunctional status as verified in the healthy control and EU groups, in which polyfunctional T cells are CD38⁻. Moreover, HIV controllers show CD38⁻/HLA-DR⁺

HIV-specific CD8⁺ T cell cytotoxicity²⁹. Despite the lack of infection in EUs, they present low activation in CD4⁺ T cells^{11,30}. Our findings indicate that this activation profile, represented by the CD38 expression marker, could be an interesting marker for monitoring HIV infection, and the absence of CD38 expression indicates low activation status in HIV-exposed individuals^{11,30}. In this context, less activation of CD4⁺ T cells is associated with lower susceptibility to HIV infection. Additionally, CD38- HLA- DR⁺ CD8⁺ T cells in HIV controllers are related to a moderate state of activation that leads to a good cytotoxic response and prevents deleterious effects on immune chronic activation²⁹. Our results show that polyfunctional T cells with low activation profiles could be one of the factors associated with lack of infection in EU individuals.

Materials and Methods

Study subjects. HIV-1-serodiscordant couples from an outpatient clinic at the Emílio Ribas Infectious Diseases Institute in São Paulo, the Ambulatory Service of the Secondary Immunodeficiency Clinic of the Clinical Hospital, University of São Paulo Medical School (HC/FMUSP) and the Reference Center and Treatment in STD-AIDS in São Paulo, Brazil were enrolled. The EU group (n= 16) consisted of 8 males and 8 females, with a mean age of 40.6 years (range 25 – 57); the HIV-infected individuals (n= 15) consisted of 14 males and 1 female, with a mean age of 41.3 years (range 28 – 53). Healthy donors (n= 15) consisted of 8 males and 7 females, with a mean age of 37.0 years (range 27 – 54 years), who were seronegative for HIV-1. Homosexual (n= 7) and heterosexual couples (n= 9) reported a mean relationship duration of 13 years (range 2 – 26) with a single partner. Couples reported participating in vaginal, anal and oral sex, including 5 episodes of unprotected sexual intercourse at a frequency of 3 – 4 times per month^{29,31}. The inclusion criteria included being over 18 years of age, reported participation in unprotected sex and having a single partner for over 1 year. Exclusion criteria included the use of immunosuppressant or immune-modifying drugs and pregnancy. The EU cohort was seronegative at the studied time point. The majority (14/15) of HIV-1-infected individuals were receiving antiretroviral therapy (ART) treatment; detectable viral loads (VLs) were verified in 5/15 individuals (51, 181, 16,561, 17,511 and 50,930 copies of RNA/mL). The average absolute CD4 count for the EU group was $1,234 \pm 85.7$ cells/mm³ (mean $\pm$ SEM), whereas that of the HIV-infected group was 618.2 ± 94.1 cells/mm³ and that of the healthy control group was 969.4 ± 68.9 cells/mm³. This study was approved by the São Paulo University Institutional Use Committee (10459312.8.3001.0061) and informed consent was obtained from all subjects. All experimental protocols within this study were performed in accordance with the Ethics Committee of this institution.

Cell culture and flow cytometry. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized venous blood via Ficoll-Hypaque gradient centrifugation (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) and were diluted in RPMI medium supplemented with 10% AB human serum (Sigma, St. Louis, MO, USA). Cultures consisting of 1.5×10^6 cells/mL were incubated in 48-well plates (Costar, Cambridge, MA, USA) in the absence of a stimulus or with 1 μ g/mL SEB (Sigma), 5 μ g/mL of 3 pools of HIV-Gag peptides (15-mers of the HIV-1 HXB2 Gag peptide, with overlaps of 11 residues; NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) or CD107a PE-Cy5 Ab (5 μ L, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 6 h at 37 °C in 5% CO₂. The Gag peptides (a total of 123 peptides) were divided into 3 groups according to the amino acid sequence alignments for the p17 Gag region (Gag1, 33 peptides, 7872 – 7904), the p24 Gag region (Gag2, 59 peptides, 7904-7962) and the p15 Gag region (Gag 3, 33 peptides, 7962-7994). After 2 h of incubation, Brefeldin A (10 μ g/mL, Sigma) was added to the cultures, and the cultures were incubated for another 4 h.

After incubation, the cells were washed and incubated with LIVE/DEAD Fixable Red Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 30 min at room temperature, followed by fixation with Cytofix/Cytoperm solution (BD Bioscience) for 20 min and permeabilization with Perm/Wash solution for 20 min at 4 °C. The cells were then stained with CD3 BV605 (SK7), CD4 V500 (RPA-T4), CD8 PerCP-cy5.5 (RPA-T8), CD38 Alexa Fluor 700 (HIT2), IFN- γ V450 (B27), IL-2 Pe-Cy7 (MQ1-17H12), MIP-1 β APC-H7 (D21-1351), IL-17a Alexa Fluor 488 (eBiosciences, San Diego, CA, USA), IL-22 PE, (eBiosciences) and Granzyme B V450 (GB11); all antibodies were purchased from BD Biosciences (San José, CA, USA). Next, the samples were washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences) and diluted in isotonic solution. A total of 500,000 events were collected and analyzed by flow cytometry (LSR Fortessa, BD Biosciences, USA) using FACS-Diva (BD Bioscience) and FlowJo 10.0.6 (Tree Star, Ashland, OR, USA) software programs. Fluorescence Minus One (FMO) controls were performed for all antibody panels to confirm proper compensation and define positive signals. Boolean gate arrays were created using FlowJo software. These analyses determined the expression frequency of each cytokine based on all possible combinations of the 5 different cytokines. Analysis of polychromatic flow cytometry data was performed with the SPICE Program (version 2.9, Vaccine Research Center, NIAID, USA).

Statistical analysis. All cytokine measurements were background subtracted, taking into account the frequency of cells producing cytokines in the absence of antigenic stimulation. Kruskal – Wallis tests

with Dunn's post-tests were used to evaluate differences among HIV-infected individuals, EU subjects and healthy controls. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

References

- UNAIDS. *Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic 2013*. (2013), Available at: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_Global_Report_2013_en_1.pdf (Accessed: 16th September 2014).
- Horton, R. E., McLaren, P. J., Fowke, K., Kimani, J. & Ball, T. B. Cohorts for the study of HIV-1-exposed but uninfected individuals: benefits and limitations. *J Infect Dis* **202 Suppl 3**, S377 – 381, doi: 10.1086/655971 (2010).
- Shearer, G. & Clerici, M. Historical perspective on HIV-exposed seronegative individuals: has nature done the experiment for us? *J Infect Dis* **202 Suppl 3**, S329 – 332, doi: 10.1086/655974 (2010).
- Pancino, G., Saez-Cirion, A., Scott-Algara, D. & Paul, P. Natural resistance to HIV infection: lessons learned from HIV-exposed uninfected individuals. *J Infect Dis* **202 Suppl 3**, S345 – 350, doi: 10.1086/655973 (2010).
- Liu, R. *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367 – 377 (1996).
- Lederman, M. M. *et al.* Determinants of protection among HIV-exposed seronegative persons: an overview. *J Infect Dis* **202 Suppl 3**, S333 – 338, doi: 10.1086/655967 (2010).
- Clerici, M. *et al.* Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41. *AIDS* **16**, 1731 – 1741 (2002).
- Carrillo, J. *et al.* HIV exposed seronegative individuals show antibodies specifically recognizing native HIV envelope glycoprotein. *AIDS* **27**, 1375 – 1385, doi: 10.1097/QAD.0b013e32835fac08 (2013).
- Murashv, B. V. *et al.* The high frequency of HIV type 1-specific cellular immune responses in seronegative individuals with parenteral and/or heterosexual HIV type 1 exposure. *AIDS Res Hum Retroviruses* **28**, 1598 – 1605, doi: 10.1089/AID.2011.0335 (2012).
- Erickson, A. L. *et al.* Potentially exposed but uninfected individuals produce cytotoxic and polyfunctional human immunodeficiency virus type 1-specific CD8(+) T-cell responses which can be defined to the epitope level. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 1745 – 1748, doi: 10.1128/CD.00247-08 (2008).
- Koning, F. A. *et al.* Low-level CD4+ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection. *J Immunol* **175**, 6117 – 6122 (2005).
- Missé, D. *et al.* IL-22 participates in an innate anti-HIV-1 host-resistance network through acute-phase protein induction. *J Immunol* **178**, 407 – 415 (2007).
- Kim, C. J. *et al.* A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis. *Mucosal Immunol* **5**, 670 – 680, doi: 10.1038/mi.2012.72 (2012).
- Fernandes, S. M. *et al.* Enteric Mucosa Integrity in the Presence of a Preserved Innate Interleukin 22 Compartment in HIV Type 1-Treated Individuals. *J Infect Dis* **210**, 630 – 640, doi: 10.1093/infdis/jiu126 (2014).
- Chege, D. *et al.* Blunted IL17/IL22 and pro-inflammatory cytokine responses in the genital tract and blood of HIV-exposed, seronegative female sex workers in Kenya. *PLoS One* **7**, e43670, doi: 10.1371/journal.pone.0043670 (2012).
- McLaren, P. J. *et al.* HIV-exposed seronegative commercial sex workers show a quiescent phenotype in the CD4+ T cell compartment and reduced expression of HIV-dependent host factors. *J Infect Dis* **202 Suppl 3**, S339 – 344, doi: 10.1086/655968 (2010).
- Betts, M. R. *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* **107**, 4781 – 4789, doi: 10.1182/blood-2005-12-4818 (2006).
- Ferre, A. L. *et al.* Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood* **113**, 3978 – 3989, doi: 10.1182/blood-2008-10-182709 (2009).
- Brandt, L. *et al.* HIV-1-infected individuals in antiretroviral therapy react specifically with polyfunctional T-cell responses to Gag p24. *J Acquir Immune Defic Syndr* **63**, 418 – 427, doi: 10.1097/QAI.0b013e32831828fa22b (2013).
- Van Braeckel, E. *et al.* Polyfunctional CD4(+) T cell responses in HIV-1-infected viral controllers compared with those in healthy recipients of an adjuvanted polyprotein HIV-1 vaccine. *Vaccine* **31**, 3739 – 3746, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.021 (2013).
- Boaz, M. J., Waters, A., Murad, S., Easterbrook, P. J. & Vyakarnam, A. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol* **169**, 6376 – 6385 (2002).
- Bixler, S. L. & Mattapallil, J. J. Loss and dysregulation of Th17 cells during HIV infection. *Clin Dev Immunol* **2013**, 852418, doi: 10.1155/2013/852418 (2013).
- Xu, H., Wang, X. & Veazey, R. S. Th17 Cells Coordinate with Th22 Cells in Maintaining Homeostasis of Intestinal Tissues and both are Depleted in SIV-Infected Macaques. *J AIDS Clin Res* **5**, doi: 10.4172/2155-6113.1000302 (2014).
- Ciccione, E. J. *et al.* CD4+ T cells, including Th17 and cycling subsets, are intact in the gut mucosa of HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J Virol* **85**, 5880 – 5888, doi: 10.1128/JVI.02643-10 (2011).
- Page, E. E. *et al.* Loss of Th22 cells is associated with increased immune activation and IDO-1 activity in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **67**, 227 – 235, doi: 10.1097/QAI.0000000000000294 (2014).
- Lima, J. F. *et al.* Distinct Natural Killer cells in HIV-exposed seronegative subjects with effector cytotoxic CD56dim and CD56bright cells and memory-like CD57+NKG2C+CD56dim cells. *J Acquir Immune Defic Syndr*, doi:10.1097/QAI.0000000000000350 (2014).
- Pera, A. *et al.* CMV latent infection improves CD8+ T response to SEB due to expansion of polyfunctional CD57+ cells in young individuals. *PLoS One* **9**, e88538, doi: 10.1371/journal.pone.0088538 (2014).
- Benito, J. M. *et al.* CD38 expression on CD8 T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 227 – 233, doi: 10.1089/088922204773004950 (2004).
- Hua, S. *et al.* Potential role for HIV-specific CD38-/HLA-DR+ CD8+ T cells in viral suppression and cytotoxicity in HIV controllers. *PLoS One* **9**, e101920, doi: 10.1371/journal.pone.0101920 (2014).
- Bégaud, E. *et al.* Reduced CD4 T cell activation and *in vitro* susceptibility to HIV-1 infection in exposed uninfected Central Africans. *Retrovirology* **3**, 35, doi: 10.1186/1742-4690-3-35 (2006).
- Suy, A. *et al.* Immunological profile of heterosexual highly HIV-exposed uninfected individuals: predominant role of CD4 and CD8 T-cell activation. *J Infect Dis* **196**, 1191 – 1201, doi: 10.1086/521193 (2007).

Acknowledgements

We are grateful to all the individuals who participated in the study. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (2015/00263-7) and the Laboratório de Investigação Médica, Unidade 56 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo.

Author Contributions

Performed experiments: L.M.S.O., J.F.L. and C.A.C.C.; recruited the patients: J.S.C. and M.M.; participated in designing research: L.M.S.O., A.J.S.D. and M.N.S.; wrote the paper: L.M.S.O. and M.N.S.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Oliveira, L. M. S. *et al.* Increased frequency of circulating Tc22/Th22 cells and polyfunctional CD38⁺ T cells in HIV-exposed uninfected subjects. *Sci. Rep.* **5**, 13883; doi: 10.1038/srep13883 (2015).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. T

Title: Increased frequency of circulating Tc22/Th22 cells and polyfunctional CD38⁻ T cells in HIV-exposed uninfected subjects

Authors: Luanda M. S. Oliveira¹, Josenilson F. Lima¹, Cesar A.C. Cervantes¹, Jorge Simão Casseb^{1,2}, Marcelo Mendonça³, Alberto J.S. Duarte¹, Maria N. Sato¹.

Supplementary Figure 1. Gating strategy to evaluate CD4⁺ T cells secreting cytokines. The initial gate utilized was side scatter area (SSC-A) versus side scatter height (SSC-H) to exclude doublets. Next, lymphocytes were selected in the SSC-A versus forward scatter area (FSC-A), and dead cells were excluded with LIVE/DEAD staining. CD3⁺ T cells were selected, and CD4⁺ T cells secreting IFN- γ , IL-17a and IL-22 were individually assessed.

Supplementary Figure 2. Gating strategy to evaluate Th22 and Tc22 cells. The initial gate utilized was side scatter area (SSC-A) versus side scatter height (SSC-H) to exclude doublets. Next, lymphocytes were selected in the SSC-A versus forward scatter area (FSC-A), and dead cells were excluded with LIVE/DEAD staining. CD3⁺ T cells were selected, and CD4⁺ or CD8⁺ T cells were also selected, excluding IFN- γ and IL-17a, and were evaluated for IL-22 production.

Supplementary Figure 3. Cytotoxic CD4+ and CD8+ T cells in EUs and HIV-infected subjects. PBMCs from HCs (n=15), EUs (n=16) and HIV-infected individuals (n=15) were cultivated with medium (baseline), HIV Gag peptide pools[Gag1 (p17), Gag2 (p24), and Gag3 (p15)], or SEB for 6 h and Brefeldin A for 4 h. TCD4+ (A) and TCD8+ (B) cells expressing CD107a and granzyme B were assessed by flow cytometry. Frequency of CD4+ or CD8+ T cells was subtracted from baseline. The results are expressed as medians and IQRs. * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$.

Supplementary Figure 4. Gate strategy for polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The expression of each cytokine was selected for in CD3⁺ T cells, followed by CD4⁺ T or CD8⁺ cells in the same combination. Next, Boolean evaluation of several combinations of secreted cytokines was performed, and CD38 expression was assessed.^{4.2}

4.2 Resultados referentes a análise do perfil fenotípico de células T

4.3 Características demográficas dos grupos de estudo

O grupo controle saudável (CTL) foi composto por 24 indivíduos, sendo 14 mulheres e 10 homens, com mediana de idade de 37 anos, o grupo dos expostos não-infectados por HIV-1 (ENI) foi composto por 23 indivíduos, 14 mulheres e 9 homens, a mediana de idade de 41 anos e o grupo dos parceiros infectados por HIV-1 (HIV) foi composto por 21 indivíduos, 1 mulher e 20 homens, com idade mediana de 43 anos. Os casais sorodiscordantes foram compostos de 16 heterossexuais e 7 homossexuais, o tempo de relacionamento foi de 13 anos e o tempo de diagnóstico do HIV-1 foi de 10 anos.

Os casais relataram histórico de relação sexual vaginal, anal e oral com e sem uso de preservativo numa frequência de 10 a 15 vezes, em média, nos últimos 3 meses antes da coleta. A maioria dos indivíduos infectados (20/21) estavam recebendo terapia antiretroviral quando participaram do estudo e apenas 6 indivíduos apresentaram carga viral detectável (51; 179; 181; 16.561; 17.511 e 50.930 cópias/mL).

Foi realizada a contagem do valor absoluto das células T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico de todos os indivíduos incluídos no estudo. Os grupos ENI ($p \leq 0.001$) e controle ($p \leq 0.05$) apresentaram maior contagem das células T CD4⁺ em relação ao grupo HIV. A contagem das células T CD8⁺ não diferiu entre os grupos. Todos os indivíduos expostos não-infectados apresentaram sorologia negativa para HIV-1 no momento da coleta.

Tabela 1. Dados demográficos

Grupo	n	Sexo M/F	Idade (anos) [#]	Tempo Diagnós- tico (anos) [#]	Tempo relaciona- mento (anos) [#]	CD4/mL [#]	CD8/mL [#]	CV
Controle	24	10/14	37 (32– 42.7)	-	-	982 (781 – 1180)	594 (391.3 – 833.3)	-
ENI	23	9/14	41 (35 - 47)	-	13 (5.7 -18.5)	1238 (981 – 1441)	606 (489 – 1015)	-
HIV	21	20/1	41 (37- 49.5)	10 (3 -15)	-	623 (269 – 952.5)	675 (498.5 – 1165)	>50 cópias/ ml*

*apenas 6 indivíduos tiveram CV detectável.

[#]os resultados estão expressos em mediana e interquartis.

4.4 Análise da expressão dos marcadores de migração para o intestino em células T do sangue periférico

As integrinas $\alpha_4\beta_7$ são moléculas essenciais para a migração dos linfócitos aos sítios da mucosa intestinal onde há maior número de células T CD4+ CCR5+ e maior disseminação do HIV-1. Além disso, essas integrinas formam um complexo com a molécula CD4, tornando as células mais susceptíveis à infecção pelo HIV-1 (110). Desta forma, avaliamos a frequência de expressão das integrinas $\alpha_4\beta_7$ e do receptor de quimiocina CCR9 em linfócitos T CD4+ e T CD8+ no sangue periférico por citometria de fluxo. Os grupos ENI e HIV mostraram uma queda na frequência de células T CD4+ $\alpha_4\beta_7$ + em relação ao grupo CTL (Figura 2A). Já a frequência de células T CD4+ $\alpha_4\beta_7$ + CCR9+ está aumentado apenas no grupo HIV (Figura 2B). As células T CD8+ $\alpha_4\beta_7$ + do sangue periférico mostraram diminuição da frequência no grupo ENI quando comparado ao grupo CTL (Figura 2C).

Figura 1. Estratégia de análise para as moléculas de migração para o intestino. Inicialmente, foi selecionado os *singlets*, após a população de linfócitos e as células T CD3+. Após as células T CD4+ e CCR5+, e as células T CD8+, em seguida a dupla expressão de $\alpha 4\beta 7$ e logo após, a expressão de CCR9.

Figura 2. Frequência de células T CD4+ e T CD8+ que expressam moléculas de migração para o intestino do sangue periférico de indivíduos controles, ENI e HIV. A expressão de de moléculas de migração α 4 β 7 e CCR9 foram avaliadas em células T CD4 e CD8 no sangue periférico dos grupos controle (CTL, n=22), ENI (n=22) e HIV-1 (n=20) por citometria de fluxo. Os dados estão representados em mediana e interquartis. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Dados prévios mostraram aumento da frequência das células Th22 e Tc22, tanto em resposta aos peptídeos da Gag como em resposta policlonal ao SEB no sangue periférico de ENI e de seu parceiro HIV (111). Para verificar se estas células correlacionam com as células que expressam moléculas de migração para o intestino, realizamos uma análise de correlação. Pode-se observar que há correlação positiva entre as células Th22 com as células T CD4+ α 4 β 7+ no grupo HIV, já as células Tc22 mostra correlação positiva com as células T CD8+ α 4 β 7+ do ENI (Figura 3).

Os dados mostram que há uma diminuição na frequência de células que expressam marcador de migração para o intestino no sangue periférico de ENI e HIV, o que sugere a migração das células a mucosa intestinal.

Figura 3. Correlação entre células T CD4⁺ e T CD8⁺ que expressam $\alpha 4\beta 7+$ e células Th22 e Tc22 de ENI e HIV. A frequência de células TCD4⁺ $\alpha 4\beta 7+$ e TCD8⁺ $\alpha 4\beta 7+$ entre a percentagem de populações de Th22 e Tc22 estimuladas com SEB, respectivamente, em ENI (n=15) e HIV (n=14).

4.5 Perfil de ativação/diferenciação, exaustão celular e maturação em células T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico.

A persistente exposição antigênica pode levar à exaustão celular, assim como o estado de ativação imunológica está relacionado com a maior depleção de células T CD4⁺ e aumento da disseminação do HIV-1 (112). Para avaliar o perfil de expressão de

moléculas de ativação e de exaustão celular no casal sorodiscordante, avaliamos a expressão de CD28, CD127, CD95 e PD-1 em linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico, conforme a estratégia de *gate* na Figura 4.

A frequência de células T CD4+ CD127+ diminuiu no grupo HIV em relação aos grupos CTL e ENI (Figura 5B). Como já esperado a frequência de células TCD4+ que expressam a molécula PD-1 estava aumentada apenas no grupo HIV (Figura 5D).

Nas células T CD8+, houve uma diminuição na frequência do marcador de ativação CD127 no grupo HIV em relação ao CTL (Figura 6B), enquanto que os marcadores de exaustão celular CD95 e PD-1 estavam aumentados (Figura 6C e D).

Figura 4. Estratégia de análise para os marcadores de ativação/diferenciação e exaustão de células T. Inicialmente, foi selecionado os *singlets*, após a população de linfócitos e as células T CD3+. Após as células T CD4+ ou T CD8+, em seguida a expressão de CD28, CD95, PD-1 e CD127, e a expressão destes marcadores dentro de cada população de memória de acordo com a expressão de CD45RA e CCR7.

Figura 5. Perfil de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD4+ no sangue periférico de indivíduos controles, ENI e HIV. Os marcadores de ativação CD28 (A) e CD127 (B) e exaustão celular CD95 (C) e PD-1 (D) foram avaliados em células T CD4+ do sangue periférico dos grupos CTL (n=22), ENI (n=22) e HIV-1 (n=20) por citometria de fluxo. Os dados estão representados em mediana e interquartis. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Figura 6. Perfil de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD8+ no sangue periférico de indivíduos controles, ENI e HIV. Os marcadores de ativação CD28 (A) e CD127 (B) e exaustão celular CD95 (C) e PD-1 (D) foram avaliados em células T CD8+ do sangue periférico dos grupos CTL (n=22), ENI (n=22) e HIV-1 (n=20) por citometria de fluxo. Os dados estão representados em mediana e interquartis. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

A expressão das moléculas CD28, CD127, CD95 e PD-1 também foi avaliada de acordo com o estágio de maturação/diferenciação celular em T CD4+ e CD8+, baseado na expressão de marcadores CCR7 e CD45RA: naive (CCR7+CD45RA+), memória central (CCR7+CD45RA-), efetora (CCR7-CD45RA-) e memória efetora RA (CCR7-CD45RA+). Para o marcador CD28 não houve diferença entre os grupos nos estágios de maturação celular para as células T CD4+ e CD8+ (Figura 7A e 8A). Uma queda na expressão de CD127 foi observada no grupo HIV em todos os estágios da maturação celular das células T CD4+ (Figura 7B), já para as células T CD8+ CD127+ houve

redução da frequência nos estágios naïve e memória efetora RA em relação ao grupo CTL (Figura 8B).

O marcador de exaustão celular CD95 em células TCD4+ estava aumentado no grupo HIV no estágio naïve (Figura 7C) enquanto que para as células T CD8+ (Figura 8C), aumentou nos estágios naïve, memória efetora e memória efetora RA (Figura 8C). O grupo HIV mostrou elevada expressão de PD-1 em todos os estágios da maturação das células T CD4+, enquanto o grupo ENI estava elevado nos estágios naïve e memória efetora RA (Figura 7D). De maneira similar, células TCD8+PD-1+ mostraram estava aumento em todos os estágios de maturação para o grupo HIV e no grupo ENI somente no estágio naïve (Figura 8D).

Os dados mostram que o grupo ENI possui alterações na expressão de marcadores de ativação CD127 e de exaustão PD-1 em estágios de maturação precoce em células T do sangue periférico.

Figura 7. Perfil de marcadores de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD4⁺ do sangue periférico de acordo com a maturação celular de indivíduos controles, ENI e HIV. Os marcadores de ativação CD28 (A) e CD127 (B) e exaustão celular CD95 (C) e PD-1 (D) foram avaliados em células T CD4 de acordo com o estágio de maturação celular pela expressão de CD45RA e CCR7 do sangue periférico dos grupos CTL (n=22), ENI (n=22) e HIV (n=20) por citometria de fluxo. Os dados estão representados em mediana e interquartil. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Figura 8. Perfil de marcadores de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD8⁺ do sangue periférico de acordo com a maturação celular de indivíduos controles, ENI e HIV. Os marcadores de ativação CD28 (A) e CD127 (B) e exaustão celular CD95 (C) e PD-1 (D) foram avaliados em células T CD8 de acordo com o estágio de maturação celular pela expressão de CD45RA e CCR7 no sangue periférico dos grupos CTL (n=22), ENI (n=22) e HIV (n=20) por citometria de fluxo. Os dados estão representados em mediana e interquartil. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

4.6 Análise da expressão simultânea de marcadores de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD4+ e T CD8+ no sangue periférico

Para verificar se há relação entre a ativação/diferenciação e exaustão celular, analisamos a expressão simultânea dos marcadores de ativação e exaustão CD28, CD95, CD127 e PD-1 foi analisada utilizando a estratégia de análise booleana, conforme a estratégia ilustrada na Figura 9. A frequência de células T CD4+ na combinação de 4 marcadores CD28+CD95+CD127+PD-1+ está elevada no grupo HIV em relação aos grupos ENI e CTL. Da mesma forma, para as combinações de CD28+CD95+CD127-PD-1+ e CD28+CD95+CD127-PD-1-. Para a combinação de CD28+CD95-CD127-PD-1+ o grupo HIV mostrou-se elevado em relação ao grupo CTL e para a positividade apenas para CD95 está elevado no grupo HIV em relação ao ENI (Figura 10).

Para as células T CD8+ a combinação dos marcadores de exaustão e ativação estavam diminuídas no grupo HIV CD28+CD95+CD127+PD-1- e CD28+CD95-CD127+PD-1- em relação ao grupo CTL. Na ausência da expressão de CD28 o grupo HIV mostrou maior frequência do que o ENI para duas populações CD28-CD95+CD127+PD-1+ e CD28-CD95+CD127-PD-1+ . Similarmente, às células T CD4+ a expressão única de CD95 está elevada no grupo HIV (Figura 11).

Os dados mostram que há presença de populações celulares que expressam associadamente marcadores ativação e de exaustão, sendo que as alterações mais pronunciadas foram encontradas no grupo HIV, já os grupo ENI e CTL mostraram perfis similares de expressão simultânea.

Figura 9. Estratégia de análise para expressão simultânea de CD28, CD95, PD-1 e CD127. Para a expressão simultânea foi utilizado a estratégia booleana. Inicialmente, foi selecionado os *singlets*, após a população de linfócitos e as células T CD3+ combinando com cada molécula, utilizando a função “*Make OR*”. Após foi selecionado T CD4+ e T CD8+ combinando, novamente, com cada molécula. Em seguida, foi definido a frequência de cada moléculas CD28, CD95, PD-1 e CD127, de acordo com o FMO e criado a combinação em “*Create boolean*”.

Figura 10. Expressão simultânea dos marcadores de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD4+ do sangue periférico de indivíduos controles, ENI e HIV. A frequência da expressão simultânea dos marcadores de ativação CD28 e CD127

e de exaustão celular CD95 e PD-1 em células T CD4+ do sangue periférico foi analisado no grupo CTL (n=22), ENI (n=22) e HIV (n=20) por citometria de fluxo. Os dados estão representados em mediana e interquartis. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Figura 11. Expressão simultânea dos marcadores de ativação/diferenciação e exaustão em células T CD8+ do sangue periférico de indivíduos controles, ENI e HIV. A frequência da expressão simultânea dos marcadores de ativação CD28 e CD127 e de exaustão celular CD95 e PD-1 em células T CD8 do sangue periférico foi analisado em grupo CTL (n=22), ENI (n=22) e HIV (n=20) por citometria de fluxo. Os dados estão representados em mediana e interquartis. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

4.7 Perfil fenotípico de células T reguladoras e marcadores de ativação e exaustão celular no sangue periférico

Prosseguindo a análise de células efetoras T CD4+, analisamos também a frequência de células T reguladoras, $CD3+CD4+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low/-}}\text{Foxp3}^+$ e da expressão de marcadores de ativação e exaustão celular CD95, PD-1, CD39, HLA-DR, CTLA-4 e LAP foram analisadas em CMN por citometria de fluxo multiparamétrica.

A Figura 9A, mostra que a frequência das células Treg ($CD3+CD4+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low/-}}\text{Foxp3}^+$) está elevada no grupo HIV em relação ao

ENI, porém quando avaliamos o valor absoluto de células T CD4+, houve uma inversão, diminuição das células Treg no grupo HIV em relação ao ENI (Figura 9B). Para os marcadores de exaustão celular, o grupo HIV teve maior frequência de CD95 comparado ao grupo CTL (Figura 13C), similarmente, para os marcadores de ativação, o HLA-DR foi aumentado no grupo HIV (Figura 13F).

Os dados mostram redução numérica das células Treg no grupo HIV, e que o grupo ENI é semelhante ao grupo CTL.

Figura 12 Estratégia de análise para as células T reguladoras. Inicialmente, foi selecionado os *singlets*, após a população de linfócitos e as células T CD3+, logo após as células T CD4+CD25^{high} e em seguida, as células Foxp3+CD127^{low/-}. Após a seleção das células Treg, foi analisado a expressão de CD95, PD-1, CTLA-4, LAP, CD39 e HLA-DR.

Figura 13. Frequência de células T reguladoras no sangue periférico de indivíduos controles, ENI e HIV. (A) A frequência de células T reguladoras CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Foxp3⁺ foi avaliada em CMNs de grupos CTL (n=18), ENI (n=19) e HIV (n=17), (B) número absoluto de T CD4⁺/mL e (C) marcadores de exaustão CD95, (D) PD-1 e (E) ativação CD39, (F) HLA-DR, (G) CTLA-4 e (H) LAP por citometria de fluxo. Os dados estão representados em mediana e interquartil. * p≤0.05 e **p≤0.01.

5. Discussão

Após 3 décadas da identificação do HIV-1, ainda há grande morbidade e mortalidade, acometendo quase 37 milhões de pessoas mundialmente. A exposição ao HIV sem infecção é um fato descrito há anos e vários fatores, sejam imunológicos e/ou genéticos parecem contribuir para a proteção à infecção (11) (7) (20). A imunidade inata tem sido abordada pelo grupo de pesquisa, que detectou populações distintas de células Natural Killer, efectoras citotóxicas $CD56^{\text{dim}}$ e $CD56^{\text{bright}}$, como também as de memória-like $CD57^+NKG2C^+CD56^{\text{dim}}$ no sangue periférico dos indivíduos ENI (113).

Em nosso trabalho, descrito em partes nos resultados, no conjunto, selecionou 23 indivíduos expostos não infectados e 21 parceiros infectados com HIV-1. Os casais apresentavam 13 anos de relacionamento estável. O parceiro infectado por HIV-1, tinha diagnóstico da doença há 10 anos, o que evidencia uma exposição de longo prazo dos parceiros, até mesmo antes do tratamento antiretroviral.

Inicialmente, verificamos que as células T $CD4^+$ são capazes de produzir IL-22, assim como aumento na frequência de células Th22/Tc22 no casal sorodiscordante, ENI e HIV, induzidas pelo estímulo com peptídeos da região Gag do HIV-1 (114). Esses resultados mostram que os indivíduos ENI são capazes de responder aos estímulos específico ao HIV-1, com uma produção de IL-22, uma citocina essencial na imunidade inata. Já para as células T $CD4^+$ produtoras de IL-17a, apesar do aumento na frequência na condição basal no casal, somente o grupo HIV mostrou resposta para os peptídeos da p24 da Gag do HIV. As células produtoras de IL-17 e IL-22 são importantes para manter a integridade epitelial da mucosa do intestino e tecidos associados (GALT), que são preferencialmente depletadas logo após a infecção (115) (63).

Embora não pudemos investigar as células da mucosa intestinal, o aumento na quantidade de células produtoras de IL-22, específicas ao HIV-1, demonstra que os ENIs após exposição ao vírus, elícita IL-22 para maior preservação da mucosa, o que

também pode estar contribuindo para resistência ao HIV-1. Em controladores de elite a frequência de células Th17 da mucosa intestinal encontravam-se elevada quando comparado a controles saudáveis e infectados por HIV sem uso de HAART (65). Já as células Th22 estava aumentada em relação aos infectados, sem uso de HAART, mas em níveis similares ao controles saudáveis. Além disto, no sítio de mucosa, evidenciaram maior quantidade de células TCD4⁺ polifuncionais, sugerindo que houve preservação da membrana e menos translocação bacteriana. A polifuncionalidade de células Th17 é perdida com a progressão da infecção por HIV-1 e o tratamento com HAART é capaz de reverter esta situação (54).

A polifuncionalidade das células T que detectamos nos indivíduos ENI, foram somente com estímulo policlonal (SEB), mesmo incluindo entre as citocinas analisadas a IL-22. Além disto, o grupo ENI mostrou que as células T polifuncionais possuem baixo perfil de ativação, ou seja, não expressam CD38, em contraste ao grupo HIV-1. Em contraste, foi relatado que indivíduos ENI, com baixa, mas contínua, exposição ao HIV-1 são capazes de induzir resposta de células T antígeno-específicas produtoras de IFN γ e MIP-1 β , porém com aumento da expressão de CD38 em células T CD4⁺ e T CD8⁺, sugerindo que mesmo com baixa exposição pode ocorrer a imunoativação (116). Outros autores evidenciaram que a baixa ativação celular nos ENI pode ser atribuída à menor suscetibilidade a infecção pelo HIV-1 (107).

Na coorte de ENI que avaliamos, possuem um perfil de baixa exposição ao vírus, somente 5 parceiros infectados por HIV-1, possuíam CV detectável, considerando que no momento da análise todos os infectados faziam uso de HAART, além disto, o uso de profilaxia pré-exposição não era comum entre esses indivíduos.

A depleção de células T CD4⁺ no GALT é uma das principais consequências da infecção por HIV-1, local onde há maior disseminação viral. A gp120 do HIV-1 liga-se

ao $\alpha 4\beta 7$ das células através de uma região conservada da alça V2, facilitando a infecção das células T CD4⁺ no GALT, pois essa interação gera sinapse virológica, favorecendo a disseminação viral através do contato célula-célula (25). As células T CD4⁺ de memória que expressam $\alpha 4\beta 7$, na maioria são Th17, são as células preferencialmente infectadas e eliminadas na fase precoce da infecção, como observado em modelo de primata infectado com SIVmac251, por via intravenosa (117). Porém a maioria das células T CD4⁺ que são eliminadas, cerca de 60 a 99%, não estão infectadas por HIV-1, encontram-se em estado de repouso e sofrem efeito *bystander* das infectadas que as induzem à apoptose (118).

Isolados de células T CD4⁺ da cérvix uterina e do sangue periférico que expressam $\alpha 4\beta 7$, de mulheres saudáveis, são mais susceptíveis à infecção *in vitro* por HIV-1 (119). Além disto, as células T CD4⁺ da cérvix de trabalhadoras do sexo não infectadas pelo HIV-1, mostram um perfil susceptível à infecção pelo HIV-1, devido a expressão de CCR5, $\alpha 4\beta 7$, CD69, em contraste as mulheres infectadas por HIV-1 mostram depleção destas células (55). A investigação dessas células em mucosas, pode contribuir em novas estratégias para a prevenção do HIV-1 em mulheres expostas (55).

Nossos resultados sobre a expressão dos marcadores de migração para a mucosa do intestino, $\alpha 4\beta 7$ e CCR9, mostraram menor frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ que expressam $\alpha 4\beta 7$ no grupo ENI, e de células T CD4⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ no grupo HIV. No trabalho inicial verificamos aumento da frequência de células Th22/Tc22 específicas aos peptídeos da Gag do HIV-1 no ENI e HIV (114). Considerando que a IL-22 é uma importante citocina para a homeostase de mucosas, reparação tecidual e indução de fatores da imunidade inata (59), realizamos uma correlação da frequência das células T CD4⁺/T CD8⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ com as populações Th22/Tc22, respectivamente. Houve uma correlação positiva, sugerindo que as células com potencial de migração para o GALT

também produzem IL-22. Embora não pudemos avaliar se as células T CD4⁺/T CD8⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ são produtoras de IL-22, e nos detemos ao sangue periférico e não em tecidos da mucosa genital e intestinal, é possível que as células T CD4⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ nos ENI, tenha um papel relevante na proteção das mucosas.

Outros marcadores avaliados como o CD127, marcador de ativação e diferenciação foi avaliado no casal sorodiscordante. O receptor de IL-7, CD127 é expresso em células T naíves e diminui sua expressão quando ocorre ativação celular e sinalização via TCR (92). Nossos dados mostraram queda da frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ CD127⁺ no grupo HIV e o grupo ENI mostrou um perfil semelhante ao grupo controle. Os nossos dados nos parceiros infectados por HIV-1, corroboram com os dados de aumento na frequência de células T CD4⁺CD127⁻CD25⁻ de indivíduos infectados crônicos, devido ao aumento da imunoativação (93). Além disto, foi descrito que a expressão de CD127 está diminuída nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes com infecção crônica por HIV-1, em uso de HAART, em paralelo ao aumento da expressão dos marcadores de exaustão celular, PD-1, e de senescência, CD57, em todos os estágios de maturação das células T no sangue periférico (94).

Nossos dados evidenciaram que o grupo HIV possui expressão elevada de PD-1 em todos os estágios da maturação das células T, enquanto que o ENI mostra aumento apenas no estágio naíve. Este dado sugere que as células T do grupo ENI, estão funcionais, principalmente nos estágios de efectoras/memória. O aumento da expressão de PD-1 em estágios precoces de maturação de células T CD4⁺, é descrito como uma população mais funcional, porém mais susceptível à infecção pelo HIV-1, devido a maior frequência de expressão de CCR5 (98).

No grupo HIV, identificamos aumento na expressão de Fas (CD95) mais proeminente em células T CD8+ quando comparado aos outros grupos. A expressão de CD95 em células T naive pode regular negativamente a ativação e proliferação celular quando estimuladas via TCR, pois o vírus aumenta a expressão de CD95L em APCs, o qual suprime a resposta imunológica, favorecendo a evasão viral (99). Em células T CD4+ e T CD8+ o aumento de CD95 está relacionado com a maior apoptose em indivíduos infectados crônicos pelo HIV-1, devido ao expressão de CD95L em células infectadas (100) (101)

Com o intuito de observar o perfil de exaustão de acordo com a maturação das células, analisamos a expressão simultânea de CD28, CD95, CD127 e PD-1 nas células T do casal sorodiscordante. O grupo HIV mostrou maior frequência para combinações de células T CD4+ na presença do CD28 e ausência de CD127, sugerindo um perfil mais ativado além da presença de CD95 e/ou PD-1, corroborando seu perfil de exaustão comparados aos outros grupos. Já as células T CD8+ que expressam CD28 e CD127 dos infectados por HIV, mostrou queda na frequência quando comparado ao grupo controle, contudo, elevaram-se quando estavam associadas com a expressão de PD-1 e/ou CD95. Estes dados sugerem que as células T CD8+ do grupo HIV são mais ativadas, senescentes, e com tendência a apoptose.

Além do perfil de células efectoras, avaliamos a frequência das células Treg no sangue periférico do casal sorodiscordante. Apesar do maior percentual de células Treg no grupo HIV, os níveis absolutos estão diminuídos, em reflexo da diminuição das células T CD4+ totais. Apesar do contraste de resultados, os valores absolutos parecem ser mais representativos na quantificação das células Treg na infecção crônica por HIV-1. Contudo, o papel das células Treg permanece controverso na infecção pelo HIV-1 e

depende do estágio da infecção. Na fase aguda o aumento de células Treg é capaz de suprimir a resposta imune excessiva evitando um menor prejuízo no sítio da infecção (84). Já na fase crônica o aumento na frequência da Treg pode favorecer a replicação viral, por inibir a resposta mediada por células T antígeno-específicas (86) (85, 120).

Além disto, observamos que as células Treg no grupo HIV mostram maior expressão de CD95 e de HLA-DR. As células Treg, em especial as de memória, são capazes de induzir a apoptose via CD95L em células T efectoras (121) e são menos sensíveis à morte celular do que as células T efectoras (122). A expressão do HLA-DR em células Treg parece delinear uma população terminalmente diferenciada e com alta capacidade supressora (123). Contudo, não avaliamos o aspecto funcional das células Treg, o que poderia esclarecer se apesar da queda de células Treg, elas são funcionais nos parceiros infectados crônicos.

Em contraste, verificamos similar frequência de células Treg no ENI em relação ao grupo controle, é possível que estas diferenças possam estar relacionada com as características dos parceiros HIV-1, ou seja o nível de exposição ao vírus é baixa, porém persistente. Além disto, o equilíbrio das células Treg pode estar relacionado com o baixo perfil de ativação das células T nos ENI mostrando um importante controle na ativação imunológica.

Em trabalhadoras do sexo, do Quênia, a frequência de células Treg no sangue periférico está aumentada comparado aos controles saudáveis e diminuídas nas mulheres infectadas pelo HIV (88). Outro grupo de ENI, crianças expostas ao HIV e não infectadas exibem altos níveis de células Treg e baixos níveis de ativação de células T CD4+ e T CD8+ no cordão umbilical (90).

Nosso trabalho mostrou que o grupo ENI, possui evidências de resposta HIV-específica, em especial de citocinas que desempenham importante papel de imunidade em mucosas, como a IL-22. Além disto, geração de células Th22/Tc22, com potencial de migração às mucosas. Há também células T polifuncionais com baixo perfil de ativação, mas a estímulos policlonais. Os dados mostram nos ENI, equilíbrio das células efectoras e Treg, que associadamente, devem ser importantes para baixa ativação celular e a resistência à infecção por HIV-1.

6. Conclusão

- Os indivíduos ENI são capazes de produzir IL-22 em resposta aos peptídeos da região Gag do HIV-1, por células T CD4+, Th22 e Tc22, de perfil similar aos parceiros infectados por HIV-1,
- A resposta polifuncional aos peptídeos da região Gag do HIV-1 foi observada somente em células T CD38+ nos indivíduos HIV, enquanto que os ENI mostraram resposta polifuncional ao estímulo não específico com baixo perfil de ativação,
- O aumento na frequência de células Th22 mostrou correlação positiva com as células T CD4+ $\alpha\beta$ 7+ nos parceiros HIV-1 e com a frequência de células Tc22 nos indivíduos ENI, com provável potencial de migração destas células para à mucosa intestinal,
- O indivíduo infectado por HIV-1 mostrou maior expressão de marcadores de exaustão em células T, incluindo as células T reguladoras, em paralelo a resposta polifuncional ao Gag do HIV-1,
- Os dados evidenciam que os indivíduos ENI são capazes de produzir resposta antígeno-específica ao HIV, relacionado com a IL-22, citocina associada às mucosas e além disso, um baixo potencial de ativação das células T efectoras.

7. Anexos

ANEXO 1

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0708/11

Título: AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS T CD4+ REGULADORAS E EFETORAS TH17 E TH22 NOS INDIVÍDUOS EXPOSTOS NÃO INFECTADOS PELO HIV-1

Pesquisador Responsável: Maria Notomi Sato

Pesquisador Executante: Luanda Mara da Silva Oliveira

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Départamento: DERMATOLOGIA

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** em 02/02/2012, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 23/01/12 - Mudança de Finalidade Acadêmica para Doutorado

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 03 de Fevereiro de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO 2

Tabela 2. Dados demográficos individuais dos pacientes

Paciente	Sexo	Relaciona- mento	Idade	CD4/ μ L	CD8/ μ L	Tempo de relaciona- mento (anos)	Tempo de diagnóstico (anos)	CV/ml
CTL005	M	Hetero	47	1164	640	-	-	-
CTL006	M	Hetero	32	612	414	-	-	-
CTL007	F	Hetero	41	870	363	-	-	-
CTL008	F	Hetero	38	1408	1408	-	-	-
CTL009	F	Hetero	58	1560	858	-	-	-
CTL010	F	Hetero	56	1679	368	-	-	-
CTL011	F	Hetero	40	803	410	-	-	-
CTL012	F	Hetero	36	1224	428	-	-	-
CTL013	F	Hetero	43	1535	1102	-	-	-
CTL014	F	Hetero	33	545	378	-	-	-
CTL015	F	Hetero	37	1092	469	-	-	-
CTL016	F	Hetero	46	1008	337	-	-	-
CTL017	F	Hetero	22	890	1272	-	-	-
CTL018	F	Hetero	38	1033	341	-	-	-
CTL019	F	Hetero	32	1021	591	-	-	-
CTL020	F	Hetero	41	1185	759	-	-	-
CTL021	M	Hetero	53	711	385	-	-	-
CTL022	M	Hetero	30	1121	993	-	-	-
CTL023	M	Hetero	32	687	597	-	-	-
CTL024	M	Hetero	32	721	616	-	-	-
CTL025	M	Hetero	24	774	629	-	-	-
CTL026	M	Hetero	31	812	913	-	-	-
CTL027	M	Hetero	30	823	705	-	-	-
CTL028	M	Hetero	27	956	566	-	-	-
ENI004	F	Hetero	41	1297	545	18	-	< 50
ENI005	F	Hetero	40	1137	490	1	-	< 50
ENI006	F	Hetero	43	1514	1691	20	-	< 50
ENI007	F	Hetero	46	1396	611	12	-	< 50
ENI009	F	Hetero	38	1152	691	5	-	< 50
ENI010	F	Hetero	66	858	370	-	-	< 50
ENI011	F	Hetero	45	940	844	14	-	< 50
ENI012	F	Hetero	39	981	606	18	-	< 50
ENI013	F	Hetero	49	1735	880	20	-	< 50
ENI014	M	Homo	57	1010	515	17	-	< 50
ENI015	F	Hetero	55	1594	1805	22	-	< 50
ENI016	M	Homo	47	1570	1298	15	-	< 50
ENI017	F	Hetero	46	1441	489	21	-	< 50
ENI018	M	Homo	35	1312	868	2	-	< 50
ENI019	M	Hetero	33	990	322	10	-	< 50
ENI020	M	Hetero	35	1263	588	3	-	< 50
ENI021	M	Homo	33	1272	1042	12	-	< 50
ENI022	M	Homo	25	1224	1015	2	-	< 50
ENI023	F	Hetero	26	925	525	6	-	< 50
ENI024	M	Homo	40	1787	1341	10	-	< 50
ENI025	F	Hetero	47	899	297	26	-	< 50

ENI026	M	Homo	46	505	342	7	-	< 50
ENI027	F	Hetero	37	1238	471	17	-	< 50
HIV004	M	Hetero	41	169	941	18	1	< 50
HIV005	M	Hetero	43	623	471	1	-	< 50
HIV006	M	Hetero	53	1561	633	20	3	< 50
HIV007	M	Hetero	46	451	1061	12	15	179
HIV010	M	Hetero	59	402	381	-	-	< 50
HIV011	M	Hetero	44	626	526	14	14	< 50
HIV012	M	Hetero	39	174	2120	18	9	50930
HIV013	M	Hetero	53	415	559	20	19	< 50
HIV015	M	Hetero	51	1032	1270	22	12	< 50
HIV016	M	Homo	47	1205	862	15	16	< 50
HIV017	M	Hetero	40	971	1743	21	18	< 50
HIV018	M	Homo	36	640	748	2	3	< 50
HIV019	F	Hetero	36	273	366	10	14	51
HIV020	M	Hetero	40	212	673	3	1.5	< 50
HIV021	M	Homo	38	934	1187	12	10	< 50
HIV022	M	Homo	28	1001	675	2	2	17511
HIV023	M	Hetero	36	182	419	6	14	16561
HIV024	M	Homo	40	407	612	10	3	< 50
HIV025	M	Hetero	48	265	1279	26	5	181
HIV026	M	Homo	37	918	1143	7	6	< 50
HIV027	M	Hetero	51	644	464	17	21	< 50

CTL= Controle, ENI= Exposto não infectado, HIV= Infectado, M= Masculino, F= Feminino, Hetero= Heterossexual, Homo= Homossexual, CV= carga viral, - = não tem informações

ANEXO 3**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP / INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL****1. NOME:**DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº..... APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA** “Avaliação das Células T CD4+ reguladoras e Th17 e Th22 Efetoras nos Indivíduos Expostos Não infectados Pelo HIV-1”.

PESQUISADOR : Luanda Mara da Silva Oliveira

CARGO/FUNÇÃO: Aluna de Doutorado

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia

ORIENTADOR(A): Dra Maria Notomi Sato INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL Nº 1690

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:RISCO MÍNIMO ☒ X RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐**4. DURAÇÃO DA PESQUISA** : 04 anos

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP / INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS**

1 – Desenho do estudo e os objetivos dessas informações. As informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar em células do sangue de indivíduos expostos e não infectados pelo HIV-1 e seu parceiro(a) infectado(a), bem como de indivíduos não expostos ao HIV-1, a capacidade de produção de proteínas que atuam combatendo o vírus. Assim o objetivo será identificar possíveis fatores correlacionados com a proteção contra a infecção pelo HIV-1 nos indivíduos que se expõem, mas não se infectam com o vírus;

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros. Realizar-se-á análises experimentais, não rotineiras, para avaliar a resposta imunológica anti-viral, por meio de ensaios de cultura celular para análise da produção de proteínas extra e intracelulares com o uso do aparelho citômetro de fluxo;

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados. Em cada indivíduo será realizada uma única coleta de 40 mL de sangue por punção periférica da veia do antebraço (tubos heparinizados - total de 30 mL, tubos com o anti-coagulante EDTA - total de 5mL e um tubo seco - total de 5mL);

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3. A picada da agulha pode levar a um leve desconforto, podendo evoluir para uma mancha roxa em torno da picada, que tende a desaparecer em poucos dias sem maiores problemas;

5 – Benefícios para o participante. Não há benefício direto para o participante, pois se trata de um estudo experimental onde será testada a capacidade de resposta imunológica possivelmente relacionada com a proteção contra a infecção pelo HIV;

6 – Garantia de acesso as informações aos(as) participantes. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Luanda Mara da Silva Oliveira que pode ser encontrado no seguinte endereço: Instituto de Medicina Tropical, Prédio II, Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar, nº500, CEP 05403-000, telefone(s) (11)3061-7499 / 3061-7457. Em caso de dúvidas quanto a ética da pesquisa o paciente pode entrar em contato com o CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) do IIER pelo telefone (11) 3896-1406.

7 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu atendimento na Instituição;

8 – Direito de confidencialidade. As amostras obtidas serão reunidas e analisadas. A identificação dos pacientes não será divulgada;

9 – Despesas e compensações. Está prevista uma ajuda de custo de R\$20,00 por paciente/por visita para despesas para alimentação e transporte. Não está prevista nenhuma outra remuneração por sua participação neste estudo.

10 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Os pesquisadores se comprometem em utilizar os dados e as amostras coletadas apenas para o desenvolvimento desse projeto. Não haverá estocagem de material biológico.

11- **Consentimento.** Acredito ter sido suficientemente informado a respeito dos itens que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Avaliação das Células T CD4+ Reguladoras e Th17 e Th22 Efetoras nos Indivíduos Expostos Não Infectados Pelo HIV-1"

Eu discuti com o pesquisador sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

ANEXO 4

HOSPITAL DAS CLÍNICAS/FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS

LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO EM DERMATOLOGIA E IMUNODEFICIÊNCIAS - LIM-56

Questionário de Pesquisa

I-Identificação:

II-Data da Entrevista:/...../.....

III-Nascimento:/...../.....

1-Sexo – [] **a.** Masculino [] **b.** Feminino [] **c.** Transgêneros [] **d.** Prefere não responder

2-Vida Sexual Ativa – [] **a.** NÃO, nunca teve relações [] **b.** SIM, há menos de 6 meses []
c. SIM, há menos de 1 ano [] **d.** SIM, há mais de 1 ano [] **e.** Prefere não responder

3-Comportamento Sexual – [] **a.** Heterossexual (HSM/MSH) [] **b.** Homossexual (HSH/MSM)
 [] **c.** Bissexual (HSH/M; MSM/H) [] **d.** Prefere não responder

4-Números de Parceiros Sexuais nos Últimos 6 Meses – [] **a.** Um a dois [] **b.** Três a cinco []
c. Seis a dez [] **d.** Mais de dez

5-Tipo de Exposição nos Últimos Meses – [] **a.** Relação sexual desprotegida [] **b.** Usuário de drogas
 injetáveis [] **c.** Transfusão de sangue ou hemoderivados [] **d.** Acidente ocupacional [] **e.** Acidente
 comunitário [] **f.** NÃO, nenhuma [] **g.** Prefere não responder [] **h.** OUTRO

6-Prática Sexual nos Últimos Três Meses – [] **a.** Oral insertivo [] **b.** Oral receptivo [] **c.** Oral
 insertivo e receptivo [] **d.** Vaginal insertivo [] **e.** Vaginal receptivo [] **f.** Anal insertivo [] **g.**
 Anal receptivo

7-Uso de Preservativo nos Últimos Três Meses – [] **a.** Sempre [] **b.** Quase sempre [] **c.** Nunca
 [] **d.** Prefere não responder

8-Frequência de Relação Sem Proteção nos Últimos Três Meses – [] **a.** 1 - 5 [] **b.** 5 - 10 [] **c.** 10
 – 15 **d.** mais de 15 [] **e.** Prefere não responder

9-Tempo de Infecção pelo HIV-1–

10-Uso de Medicação anti HIV-1 Atualmente – [] **a.** SIM, atualmente faço uso do HAART [] **b.**
 NÃO, atualmente não faço mais uso de medicação [] **c.** NÃO, nunca fiz uso de medicação

11-Se Faz Uso de Medicação anti HIV-1, Qual(ais) Medicação(ões) Usa?

12-Por quanto tempo usa?

13-Uso Constante de Outra Medicação, Qual? Por quanto tempo?

14 -Alguma Outra Infecção, Qual?

8. Referências

1. UNAIDS. GLOBAL STATISTICS 2015
2. Brasil, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico de Aids 2015
3. Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*. 2010;7:54.
4. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. 2007;27(3):406-16.
5. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF, et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1995;332(4):209-16.
6. Hugonnet S, Mosha F, Todd J, Mugeye K, Klokke A, Ndeki L, et al. Incidence of HIV infection in stable sexual partnerships: a retrospective cohort study of 1802 couples in Mwanza Region, Tanzania. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002;30(1):73-80.
7. Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, Bwayo JJ, et al. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet*. 1996;348(9038):1347-51.
8. Carpenter LM, Kamali A, Ruberantwari A, Malamba SS, Whitworth JA. Rates of HIV-1 transmission within marriage in rural Uganda in relation to the HIV sero-status of the partners. *AIDS*. 1999;13(9):1083-9.
9. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med*. 2000;342(13):921-9.
10. Dunkle KL, Stephenson R, Karita E, Chomba E, Kayitenkore K, Vwalika C, et al. New heterosexually transmitted HIV infections in married or cohabiting couples in urban Zambia and Rwanda: an analysis of survey and clinical data. *Lancet*. 2008;371(9631):2183-91.
11. Ranki A, Mattinen S, Yarchoan R, Broder S, Ghayeb J, Lähdevirta J, et al. T-cell response towards HIV in infected individuals with and without zidovudine therapy, and in HIV-exposed sexual partners. *AIDS*. 1989;3(2):63-9.
12. Ballan WM, Vu BA, Long BR, Loo CP, Michaëlsson J, Barbour JD, et al. Natural killer cells in perinatally HIV-1-infected children exhibit less degranulation compared to HIV-1-exposed uninfected children and their expression of KIR2DL3, NKG2C, and NKp46 correlates with disease severity. *J Immunol*. 2007;179(5):3362-70.
13. Pinto LA, Sullivan J, Berzofsky JA, Clerici M, Kessler HA, Landay AL, et al. ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids. *J Clin Invest*. 1995;96(2):867-76.

14. Kroner BL, Rosenberg PS, Aledort LM, Alvord WG, Goedert JJ. HIV-1 infection incidence among persons with hemophilia in the United States and western Europe, 1978-1990. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1994;7(3):279-86.
15. Boulet S, Kleyman M, Kim JY, Kamya P, Sharafi S, Simic N, et al. A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. *AIDS*. 2008;22(12):1487-91.
16. Savasi V, Ferrazzi E, Fiore S. Reproductive assistance for infected couples with bloodborne viruses. *Placenta*. 2008;29 Suppl B:160-5.
17. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*. 1998;280(5371):1884-8.
18. Ozel M, Pauli G, Gelderblom HR. The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch Virol*. 1988;100(3-4):255-66.
19. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:657-700.
20. Reiche EM, Bonametti AM, Voltarelli JC, Morimoto HK, Watanabe MA. Genetic polymorphisms in the chemokine and chemokine receptors: impact on clinical course and therapy of the human immunodeficiency virus type 1 infection (HIV-1). *Curr Med Chem*. 2007;14(12):1325-34.
21. Baggaley RF, White RG, Boily MC. HIV transmission risk through anal intercourse: systematic review, meta-analysis and implications for HIV prevention. *Int J Epidemiol*. 2010;39(4):1048-63.
22. Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, Wabwire-Mangen F, et al. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet*. 2001;357(9263):1149-53.
23. Ferreira VH, Kafka JK, Kaushic C. Influence of common mucosal co-factors on HIV infection in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol*. 2014;71(6):543-54.
24. Iwasaki A. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:381-418.
25. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol*. 2008;9(3):301-9.
26. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006;12(12):1365-71.
27. Sandler NG, Douek DC. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(9):655-66.

28. Landmann R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schumann R, Zimmerli W. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1996;64(5):1762-9.
29. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, et al. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis.* 2009;199(8):1177-85.
30. Costiniuk CT, Angel JB. Human immunodeficiency virus and the gastrointestinal immune system: does highly active antiretroviral therapy restore gut immunity? *Mucosal Immunol.* 2012;5(6):596-604.
31. Neil S, Bieniasz P. Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(9):569-80.
32. Vázquez-Pérez JA, Ormsby CE, Hernández-Juan R, Torres KJ, Reyes-Terán G. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. *Retrovirology.* 2009;6:23.
33. Sewram S, Singh R, Kormuth E, Werner L, Mlisana K, Karim SS, et al. Human TRIM5alpha expression levels and reduced susceptibility to HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2009;199(11):1657-63.
34. Trabattoni D, Caputo SL, Maffei G, Vichi F, Biasin M, Pierotti P, et al. Human alpha defensin in HIV-exposed but uninfected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004;35(5):455-63.
35. Pereira NZ, Cardoso EC, Oliveira LM, de Lima JF, Branco AC, Ruocco RM, et al. Upregulation of innate antiviral restricting factor expression in the cord blood and decidual tissue of HIV-infected mothers. *PLoS One.* 2013;8(12):e84917.
36. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 1996;382(6593):722-5.
37. Paxton WA, Liu R, Kang S, Wu L, Gingeras TR, Landau NR, et al. Reduced HIV-1 infectability of CD4+ lymphocytes from exposed-uninfected individuals: association with low expression of CCR5 and high production of beta-chemokines. *Virology.* 1998;244(1):66-73.
38. Trecarichi EM, Tumbarello M, de Gaetano Donati K, Tamburrini E, Cauda R, Brahe C, et al. Partial protective effect of CCR5-Delta 32 heterozygosity in a cohort of heterosexual Italian HIV-1 exposed uninfected individuals. *AIDS Res Ther.* 2006;3:22.
39. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet.* 2002;31(4):429-34.

40. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet.* 2007;39(6):733-40.
41. Gao X, Nelson GW, Karacki P, Martin MP, Phair J, Kaslow R, 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.* 2001;344(22):1668-75.
42. Martin MP, Carrington M. Immunogenetics of HIV disease. *Immunol Rev.* 2013;254(1):245-64.
43. Lopalco L, Pastori C, Cosma A, Burastero SE, Capiluppi B, Boeri E, et al. Anti-cell antibodies in exposed seronegative individuals with HIV type 1-neutralizing activity. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000;16(2):109-15.
44. Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, Katinger H, Carpenter CB, Hanson CE, et al. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med.* 2000;6(2):207-10.
45. Carrillo J, Restrepo C, Rallón NI, Massanella M, del Romero J, Rodríguez C, et al. HIV exposed seronegative individuals show antibodies specifically recognizing native HIV envelope glycoprotein. *AIDS.* 2013;27(9):1375-85.
46. Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol.* 2005;6(9):873-9.
47. Soghoian DZ, Jessen H, Flanders M, Sierra-Davidson K, Cutler S, Pertel T, et al. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci Transl Med.* 2012;4(123):123ra25.
48. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol.* 2007;19(6):377-82.
49. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008;28(4):454-67.
50. Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol.* 2007;51(12):1139-47.
51. Salgado M, Rallón NI, Rodés B, López M, Soriano V, Benito JM. Long-term non-progressors display a greater number of Th17 cells than HIV-infected typical progressors. *Clin Immunol.* 2011;139(2):110-4.
52. Ciccone EJ, Greenwald JH, Lee PI, Biancotto A, Read SW, Yao MA, et al. CD4+ T cells, including Th17 and cycling subsets, are intact in the gut mucosa of HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J Virol.* 2011;85(12):5880-8.
53. Chege D, Sheth PM, Kain T, Kim CJ, Kovacs C, Loutfy M, et al. Sigmoid Th17 populations, the HIV latent reservoir, and microbial translocation in men on long-term antiretroviral therapy. *AIDS.* 2011;25(6):741-9.

54. Kim CJ, McKinnon LR, Kovacs C, Kandel G, Huibner S, Chege D, et al. Mucosal Th17 cell function is altered during HIV infection and is an independent predictor of systemic immune activation. *J Immunol.* 2013;191(5):2164-73.
55. McKinnon LR, Nyanga B, Chege D, Izulla P, Kimani M, Huibner S, et al. Characterization of a human cervical CD4+ T cell subset coexpressing multiple markers of HIV susceptibility. *J Immunol.* 2011;187(11):6032-42.
56. Chege D, Chai Y, Huibner S, Kain T, Wachihi C, Kimani M, et al. Blunted IL17/IL22 and pro-inflammatory cytokine responses in the genital tract and blood of HIV-exposed, seronegative female sex workers in Kenya. *PLoS One.* 2012;7(8):e43670.
57. Prodger JL, Hirbod T, Kigozi G, Nalugoda F, Reynolds SJ, Galiwango R, et al. Immune correlates of HIV exposure without infection in foreskins of men from Rakai, Uganda. *Mucosal Immunol.* 2014;7(3):634-44.
58. Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R, Wolk K. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(5):365-79.
59. Honda K. IL-22 from T cells: better late than never. *Immunity.* 2012;37(6):952-4.
60. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol.* 2009;10(8):857-63.
61. Luan L, Ding Y, Han S, Zhang Z, Liu X. An increased proportion of circulating Th22 and Tc22 cells in psoriasis. *Cell Immunol.* 2014;290(2):196-200.
62. Czarnowicki T, Gonzalez J, Shemer A, Malajian D, Xu H, Zheng X, et al. Severe atopic dermatitis is characterized by selective expansion of circulating TH2/TC2 and TH22/TC22, but not TH17/TC17, cells within the skin-homing T-cell population. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(1):104-15.e7.
63. Kim CJ, Nazli A, Rojas OL, Chege D, Alidina Z, Huibner S, et al. A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis. *Mucosal Immunol.* 2012;5(6):670-80.
64. Fernandes SM, Pires AR, Ferreira C, Foxall RB, Rino J, Santos C, et al. Enteric Mucosa Integrity in the Presence of a Preserved Innate Interleukin 22 Compartment in HIV Type 1-Treated Individuals. *J Infect Dis.* 2014;210(4):630-40.
65. Kim CJ, Kovacs C, Chun TW, Kandel G, Osborne BJ, Huibner S, et al. Antiretroviral therapy in HIV-infected elite controllers: impact on gut immunology, microbial translocation, and biomarkers of serious non-AIDS conditions. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2014;67(5):514-8.
66. Missé D, Yssel H, Trabattoni D, Oblet C, Lo Caputo S, Mazzotta F, et al. IL-22 participates in an innate anti-HIV-1 host-resistance network through acute-phase protein induction. *J Immunol.* 2007;178(1):407-15.

67. Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(12):917-24.
68. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):735-47.
69. Omiya R, Buteau C, Kobayashi H, Paya CV, Celis E. Inhibition of EBV-induced lymphoproliferation by CD4(+) T cells specific for an MHC class II promiscuous epitope. *J Immunol.* 2002;169(4):2172-9.
70. Aslan N, Yurdaydin C, Wiegand J, Greten T, Ciner A, Meyer MF, et al. Cytotoxic CD4 T cells in viral hepatitis. *J Viral Hepat.* 2006;13(8):505-14.
71. Nemes E, Lugli E, Bertoncelli L, Nasi M, Pinti M, Manzini S, et al. CD4+ T-cell differentiation, regulatory T cells and gag-specific T lymphocytes are unaffected by CD4-guided treatment interruption and therapy resumption. *AIDS.* 2011;25(12):1443-53.
72. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity.* 2008;29(6):1009-21.
73. Bernard NF, Yannakis CM, Lee JS, Tsoukas CM. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T lymphocyte activity in HIV-exposed seronegative persons. *J Infect Dis.* 1999;179(3):538-47.
74. De Maria A, Colombini S, Schnittman SM, Moretta L. CD8+ cytolytic T lymphocytes become infected in vitro in the process of killing HIV-1-infected target cells. *Eur J Immunol.* 1994;24(3):531-6.
75. Taborda NA, González SM, Alvarez CM, Correa LA, Montoya CJ, Rugeles MT. Higher Frequency of NK and CD4+ T-Cells in Mucosa and Potent Cytotoxic Response in HIV Controllers. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136292.
76. Potter SJ, Lacabaratz C, Lambotte O, Perez-Patrigion S, Vingert B, Sinet M, et al. Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol.* 2007;81(24):13904-15.
77. Van Braeckel E, Desombere I, Clement F, Vandekerckhove L, Verhofstede C, Vogelaers D, et al. Polyfunctional CD4(+) T cell responses in HIV-1-infected viral controllers compared with those in healthy recipients of an adjuvanted polyprotein HIV-1 vaccine. *Vaccine.* 2013;31(36):3739-46.
78. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood.* 2006;107(12):4781-9.
79. Riou C, Burgers WA, Mlisana K, Koup RA, Roederer M, Abdool Karim SS, et al. Differential impact of magnitude, polyfunctional capacity, and specificity of HIV-specific CD8+ T cell responses on HIV set point. *J Virol.* 2014;88(3):1819-24.

80. Erickson AL, Willberg CB, McMahan V, Liu A, Buchbinder SP, Grohskopf LA, et al. Potentially exposed but uninfected individuals produce cytotoxic and polyfunctional human immunodeficiency virus type 1-specific CD8(+) T-cell responses which can be defined to the epitope level. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(11):1745-8.
81. Pera A, Campos C, Corona A, Sanchez-Correa B, Tarazona R, Larbi A, et al. CMV latent infection improves CD8+ T response to SEB due to expansion of polyfunctional CD57+ cells in young individuals. *PLoS One*. 2014;9(2):e88538.
82. Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(3):346-51.
83. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
84. Jenabian MA, Ancuta P, Gilmore N, Routy JP. Regulatory T cells in HIV infection: can immunotherapy regulate the regulator? *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:908314.
85. Kinter AL, Horak R, Sion M, Riggan L, McNally J, Lin Y, et al. CD25+ regulatory T cells isolated from HIV-infected individuals suppress the cytolytic and nonlytic antiviral activity of HIV-specific CD8+ T cells in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23(3):438-50.
86. Rueda CM, Velilla PA, Chougnet CA, Montoya CJ, Rugeles MT. HIV-induced T-cell activation/exhaustion in rectal mucosa is controlled only partially by antiretroviral treatment. *PLoS One*. 2012;7(1):e30307.
87. Horta A, Nobrega C, Amorim-Machado P, Coutinho-Teixeira V, Barreira-Silva P, Boavida S, et al. Poor immune reconstitution in HIV-infected patients associates with high percentage of regulatory CD4+ T cells. *PLoS One*. 2013;8(2):e57336.
88. Card CM, McLaren PJ, Wachihi C, Kimani J, Plummer FA, Fowke KR. Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells. *J Infect Dis*. 2009;199(9):1318-22.
89. Li L, Liu Y, Bao Z, Chen L, Wang Z, Li T, et al. Analysis of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in HIV-exposed seronegative persons and HIV-infected persons with different disease progressions. *Viral Immunol*. 2011;24(1):57-60.
90. Legrand FA, Nixon DF, Loo CP, Ono E, Chapman JM, Miyamoto M, et al. Strong HIV-1-specific T cell responses in HIV-1-exposed uninfected infants and neonates revealed after regulatory T cell removal. *PLoS One*. 2006;1:e102.
91. Taylor JJ, Jenkins MK. CD4+ memory T cell survival. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(3):319-23.
92. Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):144-54.

93. Dunham RM, Cervasi B, Brechley JM, Albrecht H, Weintrob A, Sumpter B, et al. CD127 and CD25 expression defines CD4⁺ T cell subsets that are differentially depleted during HIV infection. *J Immunol.* 2008;180(8):5582-92.
94. Shive CL, Clagett B, McCausland MR, Mudd JC, Funderburg NT, Freeman ML, et al. Inflammation perturbs the IL-7 axis, promoting senescence and exhaustion that broadly characterize immune failure in treated HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2015.
95. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-9.
96. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006;439(7077):682-7.
97. Peligero C, Argilaguet J, Güerri-Fernandez R, Torres B, Ligeró C, Colomer P, et al. PD-L1 Blockade Differentially Impacts Regulatory T Cells from HIV-Infected Individuals Depending on Plasma Viremia. *PLoS Pathog.* 2015;11(12):e1005270.
98. Paris RM, Petrovas C, Ferrando-Martinez S, Moysi E, Boswell KL, Archer E, et al. Selective Loss of Early Differentiated, Highly Functional PD1^{high} CD4 T Cells with HIV Progression. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144767.
99. Strauss G, Lindquist JA, Arhel N, Felder E, Karl S, Haas TL, et al. CD95 co-stimulation blocks activation of naive T cells by inhibiting T cell receptor signaling. *J Exp Med.* 2009;206(6):1379-93.
100. Heigele A, Joas S, Regensburger K, Kirchhoff F. Increased susceptibility of CD4⁺ T cells from elderly individuals to HIV-1 infection and apoptosis is associated with reduced CD4 and enhanced CXCR4 and FAS surface expression levels. *Retrovirology.* 2015;12:86.
101. Mueller YM, De Rosa SC, Hutton JA, Witek J, Roederer M, Altman JD, et al. Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8(+) T cells. *Immunity.* 2001;15(6):871-82.
102. Weekes MP, Carmichael AJ, Wills MR, Mynard K, Sissons JG. Human CD28-CD8⁺ T cells contain greatly expanded functional virus-specific memory CTL clones. *J Immunol.* 1999;162(12):7569-77.
103. Echeverría A, Moro-García MA, Asensi V, Cartón JA, López-Larrea C, Alonso-Arias R. CD4⁺CD28^{null} T lymphocytes resemble CD8⁺CD28^{null} T lymphocytes in their responses to IL-15 and IL-21 in HIV-infected patients. *J Leukoc Biol.* 2015;98(3):373-84.
104. Vivar N, Ruffin N, Sammiceli S, Hejdeman B, Rethi B, Chiodi F. Survival and proliferation of CD28- T cells during HIV-1 infection relate to the amplitude of viral replication. *J Infect Dis.* 2011;203(11):1658-67.
105. Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. Elevated levels of CD38⁺ CD8⁺ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low

CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1993;6(8):904-12.

106. Mocroft A, Bofill M, Lipman M, Medina E, Borthwick N, Timms A, et al. CD8+,CD38+ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1997;14(2):158-62.

107. Koning FA, Otto SA, Hazenberg MD, Dekker L, Prins M, Miedema F, et al. Low-level CD4+ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection. *J Immunol*. 2005;175(9):6117-22.

108. McLaren PJ, Ball TB, Wachihi C, Jaoko W, Kelvin DJ, Danesh A, et al. HIV-exposed seronegative commercial sex workers show a quiescent phenotype in the CD4+ T cell compartment and reduced expression of HIV-dependent host factors. *J Infect Dis*. 2010;202 Suppl 3:S339-44.

109. Dembek CJ, Kutscher S, Heltai S, Allgayer S, Biswas P, Ghezzi S, et al. Nef-specific CD45RA+ CD8+ T cells secreting MIP-1beta but not IFN-gamma are associated with nonprogressive HIV-1 infection. *AIDS Res Ther*. 2010;7:20.

110. Cicala C, Martinelli E, McNally JP, Goode DJ, Gopaul R, Hiatt J, et al. The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(49):20877-82.

111. Oliveira LM, Lima JF, Cervantes CA, Casseb JS, Mendonça M, Duarte AJ, et al. Increased frequency of circulating Tc22/Th22 cells and polyfunctional CD38(-) T cells in HIV-exposed uninfected subjects. *Sci Rep*. 2015;5:13883.

112. McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature*. 2001;410(6831):974-9.

113. Lima JF, Oliveira LM, Pereira NZ, Mitsunari GE, Duarte AJ, Sato MN. Distinct natural killer cells in HIV-exposed seronegative subjects with effector cytotoxic CD56(dim) and CD56(bright) cells and memory-like CD57+NKG2C+CD56(dim) cells. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014;67(5):463-71.

114. Oliveira LM, Lima JF, Cervantes CA, S Casseb J, Mendonça M, Duarte AJ, et al. Increased frequency of circulating Tc22/Th22 cells and polyfunctional CD38(-) T cells in HIV-exposed uninfected subjects. *Sci Rep*. 2015;5:13883.

115. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol*. 2013;21(1):6-13.

116. Restrepo C, Rallón NI, del Romero J, Rodríguez C, Hernando V, López M, et al. Low-level exposure to HIV induces virus-specific T cell responses and immune activation in exposed HIV-seronegative individuals. *J Immunol*. 2010;185(2):982-9.

117. Kader M, Wang X, Piatak M, Lifson J, Roederer M, Veazey R, et al. Alpha4(+)beta7(hi)CD4(+) memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection. *Mucosal Immunol*. 2009;2(5):439-49.

118. Matrajt L, Younan PM, Kiem HP, Schiffer JT. The majority of CD4⁺ T-cell depletion during acute simian-human immunodeficiency virus SHIV89.6P infection occurs in uninfected cells. *J Virol.* 2014;88(6):3202-12.
119. Ding J, Tasker C, Lespinasse P, Dai J, Fitzgerald-Bocarsly P, Lu W, et al. Integrin $\alpha 4\beta 7$ Expression Increases HIV Susceptibility in Activated Cervical CD4⁺ T Cells by an HIV Attachment-Independent Mechanism. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2015;69(5):509-18.
120. Baker CA, Clark R, Ventura F, Jones NG, Guzman D, Bangsberg DR, et al. Peripheral CD4 loss of regulatory T cells is associated with persistent viraemia in chronic HIV infection. *Clin Exp Immunol.* 2007;147(3):533-9.
121. Fritzscheing B, Oberle N, Pauly E, Geffers R, Buer J, Poschl J, et al. Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood.* 2006;108(10):3371-8.
122. Fritzscheing B, Oberle N, Eberhardt N, Quick S, Haas J, Wildemann B, et al. In contrast to effector T cells, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol.* 2005;175(1):32-6.
123. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol.* 2006;176(8):4622-31.