Josenilson Feitosa de Lima

**Perfil fenotípico e funcional de células *Natural Killers*
induzido por ligantes de receptores *Toll-like* e células T
CD8⁺ antígeno-específicas em indivíduos expostos e não
infectados por HIV-1**

São Paulo
2013

Josenilson Feitosa de Lima

**Perfil fenotípico e funcional de células *Natural Killers*
induzido por ligantes de receptores *Toll-like* e células T
CD8⁺ antígeno-específicas em indivíduos expostos e não
infectados por HIV-1**

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

Programa de Dermatologia
Orientadora: Profa.: Dra. Maria Notomi Sato

São Paulo
2013

AGRADECIMENTOS

Embora o foco desse trabalho seja dado aos autores, diversas pessoas e entidades contribuíram profundamente para o seu desenvolvimento. Meus sinceros agradecimentos:

- A Profa. Dra. Maria Notomi Sato pela orientação e amizade ao longo do desenvolvimento desse trabalho;
- Aos meus pais João Mendes de Lima (Sr João) e Zelita Feitosa de Lima (Dona Zelita) por serem o alicerce familiar que sustentou minhas convicções pessoais e profissionais;
- Aos meus irmãos Joselito, Nilda, Júnior, Aninha e Nainha, pelo carinho e amizade sempre estimulantes;
- Aos sobrinhos José Rodrigues e Rogério por me ensinarem o significado do afeto natural de tio, e as sobrinhas Lavínia e Camila por suas inocências cativantes;
- As cunhadas Diane e Samita, pelo companheirismo;
- Aos amigos e amigas *in vivo* da “experimental” do LIM-56: Gabriel (Vaquinha), Titz (Incompe), Luanda, Camila (Lolla), Raquel, Jeff (Palmito), Luana, Aninha, Nátalli, Rosana, Aline, Marília, Marina, Vanessa e Kelly; E aos que passaram (*ex-vivo*) pelo laboratório nesse período: Elaine, Mayce, Juliana, Eliana (Eli), Cyro e Bruno (Pipoca). Sou grato a essas pessoas por me proporcionaram conhecimento técnico e científico, e pelo ambiente de companheirismo do laboratório;
- Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, pela infraestrutura do LIM-56;
- Aos funcionários da secretaria do LIM-56: Luís, Edna, Lúcio e Ângelo, pelo suporte que deram a esse trabalho; E aos funcionários técnicos do LIM-56:

Noêmia, Patrícia e Rosângela (setor de citometria), e ao Eduardo (setor de carga viral) por proporcionar parte dos resultados desse estudo;

- Aos amigos e amigas da residência universitária da USP: Márlio, Fernando, Sandro (pai veio), Paulo Henrique (PH), Tiago, Paulo, Elanir e Valquíria, pelo convívio salutar num ambiente as vezes difícil;
- A Faculdade de Medicina da USP, e em especial ao seu Departamento de Dermatologia por ser o elo com o LIM-56;
- Ao Hospital das Clínicas, Instituto de Infectologia Emilio Ribas e Centro de Referência e Tratamento em DTS/AIDS, por permitirem o contato com os pacientes desse estudo;
- Aos pacientes que gentilmente aceitaram participar desse estudo;
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), por fomentar a pesquisa científica no Brasil, e ter financiado o meu primeiro ano de bolsa de doutorado;
- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por fomentar a pesquisa científica no estado de São Paulo, e financiar minha bolsa de doutorado (Processo FAPESP: 2009/53474-4) e pela aprovação do processo de auxílio (Processo FAPESP: 2010/15756-5) indispensáveis a execução desse estudo.

“Nós, homens do conhecimento, não nos conhecemos; de nós mesmos somos desconhecidos — e não sem motivo. Nunca nos procuramos: como poderia acontecer que um dia nos encontrássemos? Com razão alguém disse: ‘onde estiver teu tesouro, estará também teu coração’”.

(F. Nietzsche em Genealogia da Moral)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ANEXOS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Epidemiologia da Infecção pelo HIV-1	20
1.2 O Fenômeno da Exposição ao HIV-1 sem Infecção	21
1.2.1. O Polimorfismo Genético e a Resistência ao HIV-1	23
1.2.3. A imunidade inata mediada pelas células NK	24
1.2.4. Imunidade adaptativa mediada pelas células T CD8	27
2. OBJETIVOS	31
2.1. Geral	32
2.2. Específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Casuística	35
3.2. Coleta do sangue periférico	35

3.3. Quantificação do HIV no plasma e do HIV integrado ao genoma do hospedeiro	36
3.4. Determinação das células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ no sangue periférico	36
3.5. Marcação <i>ex-vivo</i> das células NK e das células T CD8 ⁺	37
3.6. Dosagem de IgG e IgM anti-HCMV séricas	39
3.7. Genotipagem dos KIRs	40
3.8. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	40
3.9. Estimulação das células NK com agonistas TLRs intracelulares	41
3.10. Estimulação das células T CD8 ⁺ com <i>pools</i> da proteína Gag do HIV-1	42
3.11. Marcação das células NK e T CD8 ⁺ estimuladas: avaliação funcional	45
3.12. Análises Estatísticas	46
 4. RESULTADOS	 47
4.1. Dados Demográficos dos Casais Sorodiscordantes e Indivíduos Controles	48
4.2. Análise fenotípica das células NK do sangue periférico: expressão de receptores de ativação/inibitórios e moléculas de memória nas células NK	50
4.3. Correlação entre receptores de ativação/memória de células NK e a produção de IgG anti-HCMV	58
4.4. Frequência dos alelos de KIRs	60
4.5. Ativação das células NK com agonistas de TLRs intracelulares	61
4.6. Análise fenotípica das células T do sangue periférico: expressão de marcadores de ativação/exaustão nas células T CD8 ⁺	66
4.6. Estimulação das células T CD8 ⁺ com o <i>pool</i> de peptídeos	

correspondentes a região p24 da Gag do HIV-1	76
5. DISCUSSÃO	80
5.1. Perfil fenotípico e funcional das células NK nos indivíduos ENI	81
5.2. Perfil fenotípico e funcional das células T CD8⁺ nos indivíduos ENI	85
6. CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS	99

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	<i>Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>
AEED	Ambulatório de Imunodeficiências Secundária Hospital das Clínicas da FMUSP
aids	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CL097	Agonista para TLR-7 e TLR-8
dsRNA	<i>double stranded RNA</i>
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ENI	Expostos não Infectados
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FcγR3 (CD16)	Fc-gamma receptors <i>type 3</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
HCMV	<i>Human Cytomegalovirus</i>
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus type 1</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
IFN-γ	Interferon gamam

IFN- α	Interferon alfa
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IRF-3	<i>Interferon Regulator Factor type 3</i>
IRF-7	<i>Interferon Regulator Factor type 7</i>
KIRs	<i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptors</i>
KLRs	<i>Killer Lectin-like Receptors</i>
LTNP	<i>Long Term non Progressors</i>
mCMV	<i>mouse Cytomegalovirus</i>
MIC A/B	<i>Major histocompatibility complex class I-related Chains A/B</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage Inflammatory Proteins</i>
MHC-I	<i>Major Histocompatibility Complex class I</i>
NCAM (CD56)	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NLRs	<i>Nod-Like Receptors</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
NKB-1	<i>human killer inhibitory receptor</i>
NKG2A	<i>Natural Killer Group 2 member D receptor</i>
NKG2C	<i>Natural Killer Group 2 member C receptor</i>
NKG2D	<i>Natural Killer Group 2 member D receptor</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
PAMPS	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>

PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein</i>
poly I:C-HMW	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid High Molecular Weight</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
RLRs	<i>Retinoic acid induced gene (RIG)-Like Receptors</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i>
SEB	<i>Staphylococcus aureus Enterotoxin B</i>
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>
Th1	<i>T-cells helper type 1</i>
TLRs	<i>Toll-Like Receptors</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 53

Figura 2 54

Figura 3 55

Figura 4 56

Figura 5 57

Figura 6 59

Figura 7 64

Figura 8 65

Figura 9 69

Figura 10 70

Figura 11 71

Figura 12 72

Figura 13 73

Figura 14 74

Figura 15 75

Figura 16 78

Figura 17 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 49

Tabela 2 60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	39
Quadro 2	39
Quadro 3	46
Quadro 4	46

Anexo 1 100

Anexo 2 101

LIMA, JF. “Perfil fenotípico e funcional de células *Natural Killer* induzido por ligantes de receptores *Toll-like* e células T CD8⁺ antígeno-específicas em indivíduos expostos e não infectados por HIV-1” [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 102p.

Introdução: A resistência a infecção pelo HIV-1 depende de fatores virais, genéticos e imunológicos do hospedeiro, incluindo os componentes da resposta imune inata e adaptativa. As células *Natural Killer* (NK) e as células T CD8⁺ são as principais células efetoras que medeiam atividade citotóxica contra células transformadas ou infectadas, que exercem importante papel protetor nos indivíduos expostos e não infectados por HIV-1 (ENI). **Objetivo:** Avaliar a expressão de receptores de ativação e inibição/exaustão nas células NK e T CD8⁺, e a capacidade das células NK em secretar citocinas e componentes citotóxicos após estimulação via receptores *Toll-like* (TLRs), e a resposta de células T CD8⁺ a peptídeos da Gag do HIV-1 em indivíduos ENI e seus parceiros infectados por HIV-1. **Resultados:** No grupo ENI foi observado aumento da frequência de células NK CD56^{bright} que expressam moléculas de ativação NKG2D e CD95 na população CD56^{dim}, enquanto no grupo HIV-1 foi mais prevalente a expressão de MIC A/B em ambas populações de células NK, com redução da expressão de NKG2D na população CD56^{dim}. Além disto, foi observado expansão da população de células NK CD56^{dim} que expressam CD94, NKG2C e principalmente de CD57 foi mais prevalente nos indivíduos ENI, com correlação positiva com títulos de anticorpos IgG anti-citomegalovírus humano. Nos indivíduos ENI foi observado que a ativação via TLR-3, TLR-7 ou TLR-7/8 foi capaz de potencializar a expressão de marcadores de desgranulação e de citotoxicidade, CD107a e granzima B, principalmente na população CD56^{dim}, e de IFN- γ e TNF nas populações CD56^{bright} e CD56^{dim}. Além disto, somente o grupo ENI, foi detectado aumento da frequência de células NK secretoras de CD107a, granzima B, IFN- γ e TNF, após estimulação com acetato de miristato de forbol e ionomicina. A frequência de expressão de alelos de KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) foi similar entre os grupos analisados. Elevada frequência de células T CD8⁺ CD38⁺ e CD8⁺PD-1⁺ (*programmed cell death protein 1*) foi detectado nos grupos ENI e HIV-1, cuja alteração foi observada em todas as fases de maturação celular. Os indivíduos ENI mostraram presença de resposta antígeno-específica de células T CD8⁺ secretoras de CD107a, granzima B, IFN- γ e TNF, semelhante ao grupo HIV-1. **Conclusão:** Os resultados mostraram que no grupo ENI, as células NK expressam um perfil de ativação, com potente resposta aos estímulos de resposta inata e células NK com perfil de memória. Presença de células TCD8⁺ antígeno-específica foi evidenciada no grupo ENI, com perfil semelhante, mas de menor magnitude ao detectado no grupo infectado por HIV. Em conjunto, os achados mostraram que no grupo ENI a resposta inata está potencialmente ativa, e que em associação a resposta T CD8⁺ antígeno-específica podem contribuir para a resistência a infecção pelo HIV-1.

Descritores: HIV-1, células *Natural Killer*, linfócitos T CD8-positivo e receptores *Toll-like*

SUMMARY

LIMA, JF. “Phenotypic and functional profile of *Natural Killer* cells induced by *Toll-like* receptors ligands and antigen-specific CD8⁺ T cells in HIV-1 exposed uninfected individuals” [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 102p.

Introduction: Resistance to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) is dependent on viral, genetic and immunological host factors, including components of innate and adaptive immune response. Natural Killers cells (NK) and CD8⁺ T cells are main effectors cells mediating cytotoxic role against transformed or infected cells, playing a crucial role in HIV-1 exposed uninfected individuals (EU). **Aim:** To evaluate the expression of activation and inhibitory/exhaustion receptors on NK cells and CD8⁺ T-cells, and to determine the NK cells ability to cytokines and cytotoxic molecules secretion upon Toll-like receptors (TLRs) pathway activation as well as CD8⁺ T-cells response to HIV Gag peptides in EU individuals and HIV-1 infected partner. **Results:** Increased frequency of NK CD56^{bright} cells expressing NKG2D and CD95 on CD56^{dim} cells have been observed in EU group, while HIV-1 group was more prevalent MIC A/B expression in both NK cells subsets, with reduced expression of NKG2D in CD56^{dim} cells. Moreover, expansion of NK CD56^{dim} cells expressing CD94, NKG2C, and CD57 was prevalent on ENI group, which positive correlation with anti-human cytomegalovirus IgG serum titers. EU individuals showed that TLR-3, TLR-7 or TLR-7/8 pathway activation was able to enhance CD107a and granzyme B expression in CD56^{dim} cells, and IFN- γ and TNF expressions levels in both CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells. Moreover, only in EU group, high frequency of NK cells expressing CD107a, granzyme B, IFN- γ and TNF were detected upon phorbol myristate acetate and ionomicyn stimulation. Frequency of KIR alleles (killer cell immunoglobulin-like receptors) was similar between groups. High frequency of CD8+CD38⁺ and CD8+PD-1⁺ (programmed cell death protein 1) T-cells were observed in EU and HIV-1 groups, in all stages of cellular differentiation. EU subjects showed presence of antigen-specific response by CD8⁺ T-cells secreting CD107a, granzyme B, IFN- γ and TNF similar to HIV-1 group. **Conclusion:** The results showed that NK cells in EU subjects express activating profile, with potent ability to innate immune stimuli, as well as NK cells with memory profile. Presence of antigen-specific CD8⁺ T-cells was detected in EU group, with similar profile, but in less magnitude than HIV-1 group. Taken together, the findings showed an enhanced innate immune response in EU subjects, in association with antigen-specific CD8⁺ T-cell response can contribute to resistance to HIV-1 infection.

Descriptors: HVI-1, Natural Killer cells, CD8-positive T-lymphocytes, Toll-like receptors

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia da Infecção pelo HIV-1

O vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV – *human immunodeficiency vírus*) atualmente infecta cerca de 35,3 (32,2 – 38,8) milhões de pessoas. Cerca de 2,3 (1,9 – 2,7) milhões de novas infecções foram registradas no mundo, desde o último senso em 2009. O número de mortes relacionadas a aids (*acquired immunodeficiency syndrome*) diminuiu neste período (World Health Organization, UNAIDS, 2013).

A epidemia do HIV-1 encontra-se estável no mundo, no entanto a prevalência continua crescendo no Leste Europeu, e na Ásia Central. O Sub-Saara da África permanece como a região de maior incidência da infecção por HIV-1, e concentrou em 2013 70% das novas infecções pelo HIV-1. Na América Latina a epidemia permaneceu estável, com uma prevalência regional de 0,6% (0,5 – 0,6%). No Brasil, estima-se um número superior a 620.000 infectados pelo HIV (BRASIL – MS, 2008). Desde 1980 até junho de 2008 confirmou-se 506.499 casos de Aids notificados ao Ministério da Saúde.

A cobertura do tratamento antiretroviral na América Latina (em torno de 54%) é maior que a média global (World Health Organization, UNAIDS, 2013). Alguns estudos na América Latina tem correlacionado a cobertura do tratamento com o declínio das mortes relacionadas ao HIV-1 (KILSZTAJN et al., 2007), onde foi observada uma redução de 5% das mortes relacionadas ao HIV em 2008, em relação a estimativa anterior de 2004. Na região, o tratamento inicia-se quando a contagem das células T CD4 está abaixo de 350 células por milímetro cúbico de sangue. O início precoce da terapia antiretroviral oferece a possibilidade de uma maior eficácia terapêutica com redução da carga viral plasmática, e benefícios adicionais na prevenção da infecção pelo HIV-1.

A cinética do HIV-1 e a interação com o sistema imunológico distingue três distintos fenótipos para os indivíduos infectados: 1º – 80 a 90 % das pessoas infectadas

pelo HIV-1 são formados pelos progressores típicos e tem o curso da doença com mediana de tempo de sobrevivência de aproximadamente 8-10 anos (PANTALEO et al., 1993; DEEKS et al., 2007); 2° – 5 a 10 % das pessoas infectadas são de progressores rápidos e tem uma rápida e não usual progressão do curso da doença pelo HIV-1 (3 a 4 anos) (SHEPARD et al., 1993; PHAIR et al., 1994); e 3° em torno de 1-5% das pessoas infectadas não vivenciam a progressão da doença por um período de tempo de pelo menos 8 anos e são determinadas como *Long term non progressors* (LTNP) ou progressores lentos (PL) [1](SHEPARD et al., 1993; EASTERBROOK et al., 1994; SCHARGER et al., 1994; PANTALEO et al., 1995; CAO et al., 1995).

Em todos os três grupos é possível observar resposta imune HIV-1-específica. Contudo, a resposta imune anti-HIV-1 pode ser detectada também em um grupo de indivíduos que são expostos ao HIV-1, mas que se mantêm soro negativo. Esse grupo é denominado de expostos não infectados (ENI), e a existência de indivíduos com habilidade para evitar a infecção sugere que a resposta imune anti-HIV-1 pode ter uma importante participação na resistência ao HIV-1.

1.2. O Fenômeno da Exposição ao HIV-1 sem Infecção

Desde o final da década de 80 é conhecido que alguns indivíduos mantêm-se soronegativos a despeito de repetidas exposições ao HIV-1 (FOWKE et al., 1996). Esse efeito foi inicialmente observado em trabalhadoras do sexo em Nairóbi no Quênia, mas coortes de indivíduos que se expõem ao HIV-1 e não se infectam são encontradas em diversos países do mundo. Um fenômeno que é observado em mulheres e homens (QUINN et al., 2000; CARPENTER et al., 1999).

Em alguns países africanos a frequência de casais heterossexuais onde um(a) dos membros é infectado(a) pelo HIV-1, é de 2/3 (HUGONNET et al., 2002). Porém, esses indivíduos ENI apresentam 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 (QUINN et al., 2000). Os indivíduos ENI representam a principal fonte de novas infecções pelo HIV-1 em países africanos, onde se observa que até 95% das novas infecções pelo vírus ocorrem em indivíduos ENI, e em especial aqueles que vivem relacionamentos estáveis (DUNKLE et al., 2008).

A exposição ao HIV-1 sem infecção é observada em trabalhadoras do sexo (JENNES et al., 2006), casais hetero e homossexuais (BERETTA et al., 1996; CLERICI et al., 1992), em recém-nascidos filhos de mães infectadas pelo HIV-1 (BALLAN et al., 2007), em indivíduos expostos intravenosamente como trabalhadores da saúde (PINTO et al., 1995), hemofílicos transfundidos (KRONER et al., 1994), e usuários de drogas intravenosas (BOULET et al., 2008). Entre as diferentes rotas de exposição ao HIV, a exposição sexual possui um importante papel no contexto da infecção, pois é a principal rota de exposição das novas infecções em adultos (QUINN et al., 2000).

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 (RANKI et al., 1989). Estudos posteriores confirmaram essa resposta das células T CD4⁺ HIV-1-específicas, e a hipótese é era que a soroconversão não ocorre nos indivíduos ENI porque a exposição faz o *priming* das células T, e essa resposta medeia a “proteção” nos indivíduos ENI (CLERECI et al., 1991; CLERECI et al., 1992). 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 tornam infectadas por HIV-1 ao longo de um ano (FOWKE et al., 1996).

O fenômeno da resistência e da susceptibilidade ao HIV-1 resultam de uma interação entre fatores derivados do HIV-1 (fatores virais) e os fatores do hospedeiro (MONTROYA et al., 2006). Os fatores de resistência do hospedeiro envolvem o polimorfismos em receptores de entrada para o HIV, o polimorfismo nos genes do *Human Leukocyte Antigen* (HLA) e nos genes *killer immunoglobulin receptors* (KIRs), e a resposta das células do sistema imune inato e adaptativo.

1.2.1. O Polimorfismo Genético e a Resistência ao HIV-1

O mais conhecido polimorfismo relacionado a resistência ao HIV-1 é a homozigose para a deleção de 32 pares de base no gene que codifica o co-receptor para o HIV-1, o C-C chemokine receptor type 5 – CCR5 (mutação Δ -32 do CCR5). Ela resulta na síntese de uma proteína truncada com apenas quatro dos sete domínios necessários para sua expressão na superfície das células, e em consequência essa mutação oferece resistência contra as cepas R5 do HIV-1 (DEAN et al., 1996). Os indivíduos heterozigotos para mutação Δ -32 do CCR5 são susceptíveis a infecção pelo HIV-1, mas podem ter uma progressão lenta para aids (GALVANE, NOVENBRE, 2005). A homozigose para a mutação Δ -32 do CCR5 ocorre em aproximadamente 1% da população de descendentes europeus, mas é rara na população não-europeia (MARTINSON et al., 1997). Alguns estudos em populações europeias e da América do Norte evidenciaram uma alta frequência da homozigose para a deleção Δ -32 em indivíduos ENI hemofílicos (ZHANG et al., 2003). Essa mutação foi encontrada em 2-4% dos indivíduos ENI na África, e sugere que outros mecanismos mediam essa resistência (CLERECI et al., 2007).

O polimorfismo dos genes do *human leukocyte antigen* (HLA) é correlacionado com resistência ao HIV-1, e até com retardo na progressão para aids (CARRINGTON, O'BRIEN, 2003). Os HLA-B*57 e HLA-B*27 são frequentes entre ENIs e progressores lentos (MARTIN et al., 2002; MARTIN et al., 2007). O HLA de classe I apresenta peptídeos do HIV-1 para as células T CD8⁺ e estimula a resposta das células que reconhecem o complexo HLA + peptídeo (STREECK et al., 2007). Além disso as moléculas do HLA estimulam a resposta das células *natural killers* (NK), porque se ligam aos *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIRs) expressos por essas células, e essa associação é correlacionada com a transmissão do HIV-1 e a progressão para aids (NORMAN et al., 2013, McMICHAEL et al., 2010).

1.2.3. A imunidade inata mediada pelas células NK

Em humanos as células NK compreendem cerca de 15% dos linfócitos do sangue periférico. Elas são fenotipicamente caracterizadas pela expressão de CD56, uma isoforma do neural cell adhesion molecule (NCAM), e CD16 (FcγR3) um receptor para a porção Fc de Imunoglobulinas G (Fc-IgG). Este último participa dos mecanismos *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC). Em humanos as células NK são agrupadas em dois principais subtipos, diferentes fenotípica e funcionalmente. Esses subtipos são identificados de acordo com a densidade de expressão de CD56 e CD16. O subtipo CD56^{bright}CD16⁻ é considerado o mais regulatório devido o seu potencial para secretar citocinas que incluem interferon-gama e alfa (IFN-γ e IFN-α), fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) e interleucina-10 (IL-10). O subtipo CD56^{dim}CD16⁺, por sua vez, possui uma potente atividade citotóxica e é facilmente recrutado para os sítios de inflamação na periferia (MAGHAZACHI, 2003).

As células NK mediam a resposta citotóxica do sistema imune inato a infecções virais (LANIER, 2008). O HIV-1 evade a resposta das células NK do hospedeiro via *down-regulation* das moléculas de MHC-I sob a superfície das células infectadas (KOTTILIL et al., 2003); desregulação da produção de citocinas que ativam as funções efectoras das células NK (KOTTILIL et al., 2006); efeitos inibitórios diretos de algumas proteínas virais na função das células NK (MAVILIO et al., 2003); e mudanças na expressão dos receptores das células NK (MAVILIO et al., 2006). Interações entre os receptores de KIRs expresso por células NK e o HLA-B são relacionadas com o retardo na progressão para aids (MARTIN et al., 2002).

Evidências recentes tem demonstrado que adultos e crianças expostas ao HIV-1 apresentam mudanças fenotípicas e funcionais cruciais para o controle e prevenção da infecção pelo HIV-1 (VIVER et al., 2011; SLYKER et al., 2012). Essas mudanças envolvem aumento da expressão marcadores de ativação e secreção de IFN- γ e CD107a (RAVET et al., 2007; MONTOYA et al., 2006).

As células NK são reguladas pelo equilíbrio entre os receptores de inibição e de ativação expressos em sua superfície. O repertório desses receptores controla funções efectoras nas células NK (SPITS et al., 1998). Os receptores de NK são codificados por genes da linhagem germinal e não sofrem recombinação somática (LANIER, 2005). Eles reconhecem moléculas de HLA clássicas e não-clássicas. Os receptores de células NK incluem os KIR, as moléculas da família dos receptores de lectina C CD94, NKG2A e NKG2C, e o NKG2D um membro dos *killer lectin-like receptors* (KLRs).

Além de reconhecer células infectadas por vírus, as células NK podem reconhecer os vírus diretamente. Células NK murinas podem reconhecer diretamente a partícula m157 do *mouse cytomegalovirus* (mCMV) por meio do receptor Ly49h (ARASE et al., 2002).

Contudo, o reconhecimento direto dos vírus pode ser feito por intermédio dos *Pattern recognition receptor* (PRR). As principais famílias de PRRs incluem os *Nod-like receptors* (NLRs), *retinoic acid induced gene (RIG)-like receptors* (RLRs), e os *Toll-like receptors* (TLRs). Todos esses receptores podem participar da resposta imune inata, além de ligar a imunidade inata a adaptativa (HIRSCH et al., 2010). Os TLRs são os PRRs mais descritos. Em humanos existem 10 diferentes TLRs, com afinidade para diferentes *Pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs). A primeira evidencia que os TLRs podem reconhecer vírus, veio com os resultados de que a proteína de fusão do *respiratory syncytial virus* (RSV) estimula a secreção de IL-6 de macrófagos murinos, de maneira dependente da sinalização do TLR-4 (KURT-JONES et al., 2000). Esse processo adiciona uma nova dimensão as células NK que são reguladas não apenas pelo balanço dos receptores de ativação e inibitórios, mas também por receptores que reconhecem moléculas expressas nos patógenos.

Alguns subtipos de TLRs estão localizados nos endossomos, onde eles reconhecem ácidos nucleicos de origem viral que entram nas células pelos mecanismos de endocitose (KAWAI et al., 2010). Esses TLR incluem o TLR-3, que reconhece moléculas de RNA de fita-dupla, TLR-7 e TLR-8, que reconhece moléculas de RNA de fita-simples (incluindo o HIV-1, *vesicular stomatitis virus*-VSV, e o vírus da influenza A), e o TLR-9 reconhece moléculas de DNA não-metiladas (tais como as presentes no herpes simplex vírus-HSV). Algumas moléculas sintéticas podem ser reconhecidas por TLRs, como os compostos imidazoquinolina (R848 – resiquimode), e o CpG sintético que é reconhecido por TLR-9 (HIRSCH et al., 2010). Uma característica comum desses receptores é a indução dos interferons tipo 1 (IFN-1), citocinas próinflamatórias e diferenciação celular. O engajamento dos TLRs por PAMPs virais causa a dimerização do receptor, seguido da

ativação intracelular de vias que culminam com a ativação dos fatores de transcrição *Nuclear factor kappa B* (NFκB), *Interferon regulador factor 3/7* (IRF-3 e IRF-7) (HIRSCH et al., 2010).

As células NK humanas expressam o TLR-2, -3, -4 e -6, e relativamente pouco o TLR-4, -7, -8 e -9 (GORSKI et al., 2006). O TLR-2 é preferencialmente expresso na população de células NK CD56^{bright}, onde a ativação do heterodímero TLR-2/TLR-6, aumenta a expressão de CD69 (marcador de ativação precoce) na população CD56^{bright}. As células NK CD56^{dim} tem uma maior expressão de TLR-3 em relação ao subtipo CD56^{bright}. Sob estimulação com poly I:C (agonista de TLR-3), elas respondem com aumento da expressão de CD69 (GORSKI et al., 2006).

Os receptores TLR-7, -8 e -9 são relacionados com a resposta antiviral (BARTON, 2007), e em particular ssRNA do HIV é um agonista de TLR-7 e 8 (DIEBOLD et al., 2004). Os TLRs representam a primeira linha de defesa contra os patógenos, e pouco ainda se conhece a respeito do possível papel da imunidade inata na modulação da susceptibilidade/resistência a infecção pelo HIV-1 (SCOTT-ALGARA et al., 2003; MONTOYA et al., 2006). Neste estudo buscou-se avaliar o efeito da estimulação das células NK com agonistas TLRs intracelulares de casais sorodiscordantes, onde um indivíduo é infectado pelo HIV-1 e o outro não.

1.2.4. Imunidade adaptativa mediada pelas células T CD8

A imunidade celular mediada pelas células T é fundamental para o controle e o *clearance* de algumas infecções humanas (KLENERMAN, HILL, 2005). A infecção pelo HIV-1 provoca mudanças significativas nas células T, de maneira a alterá-las

fenotipicamente e funcionalmente. As características mais comuns entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 incluem: ativação crônica das células T, intensa replicação viral, e perda das células T CD4⁺, esses fatores cooperam para a progressão para aids (OWEN et al., 2010). Frequentemente o aumento da ativação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ em indivíduos infectados pelo HIV, está associado à progressão para aids (HUNT et al., 2008). Por outro lado, os indivíduos que mantêm a carga viral reduzida e o número de células CD4⁺ $\geq$ 500/mL, denominados controladores de Elite, possuem uma menor expressão de marcadores de ativação (OWEN et al., 2010). Esses dados sugerem que a diminuição da ativação pode ser um fator importante para retardar a progressão para aids.

Os mecanismos inicialmente elucidados relacionados à proteção nos indivíduos ENI evidenciaram a presença de uma resposta das células T-específicas a epítomos do envelope viral e as proteínas do core (RANKI et al., 1989). Em crianças expostas durante a gestação e que não foram infectadas, foi demonstrado uma intensa proliferação das células T em resposta a antígenos do envelope e do core do HIV-1. Clerici et al. (1992) observaram que homossexuais masculinos soronegativos com alta frequência de exposição ao HIV-1 possuem aumento da resposta proliferativa dos linfócitos T *helper* (Th), associada a uma acentuada produção de interleucina-2 (IL-2) em resposta ao HIV-1 e/ou peptídeos sintéticos do HIV-1. Em usuários de drogas injetáveis, foi observado um aumento da produção de IFN- γ e redução da produção de IL-4 e IL-10 em resposta a fitohemaglutinina. Demonstrou-se também que a resposta das células T HIV-1-específicas ocorre no fluido cérvico-vaginal e no sêmen, sugerindo uma contribuição da mucosa genital na resposta anti-HIV (MAZZOLI et al., 1997; LO CAPUTO et al., 2003). A imunidade anti-HIV, por tanto pode induzir uma resposta do tipo Th1 (BARCELLINI et al., 1995).

Uma consequência da resposta Th1 é a ativação das células T CD8⁺ citotóxicas.

Essas células participam diretamente do controle da infecção pelo HIV-1

(McMICHAEL, ROWLAND-JONES, 2001). Inclusive a infecção pelo HIV-1 promove uma intensa expansão das células T CD8⁺. O mecanismo básico do funcionamento das células T CD8⁺ é o reconhecimento do complexo HLA-I + epítipo. Esse mecanismo promove um processo programado de ativação, proliferação, e diferenciação em células T efetoras (LAWRENCE et al., 2005). O reconhecimento dos alelos de classe I do HLA pelas células T CD8⁺, influencia a cinética de progressão para aids nos indivíduos infectados pelo HIV-1 (KASLOW et al., 2006). As células T CD8⁺ HIV-1-específicas com restrição para os alelos HLA-B*27 e HLA-B*57, correlacionam-se com o retardo da progressão para aids. Essa resposta é intensa o suficiente para evadir até mesmo a resposta das células T supressoras, que encontram-se elevadas em progressores lentos (ELAHI et al., 2011). Os mecanismos efetores da resposta das células T CD8⁺ são: a produção e secreção de mediadores inflamatórios (IFN- γ , TNF, MIP-1 α) (LA GRUTA et al., 2007); lise direta das células infectadas mediada por perforina/granzima; e ativação dos mecanismos pro-apoptóticos mediada pela ativação do receptor de TNF (TOPHAM et al., 1997; BRINCKS et al., 2008).

No processo de reconhecimento do HLA de classe I, as células T respondem elevando a secreção de citocinas. Sob estimulação as células T CD8⁺ podem expressar e secretar várias citocinas concomitantemente, e são denominadas de células T CD8 polifuncionais. Essas células T CD8⁺ polifuncionais foram inicialmente demonstradas na resposta a diferentes porções da Gag (HIV-1) em indivíduos progressores lentos (BETTS et al., 2006; ZIMMERLI et al., 2005). Indivíduos expostos ao HIV-1 não infectados também podem responder a Gag com aumento da frequência de células T CD8⁺ polifuncionais, e ainda com capacidade para lisar células alvo que apresentam epítopos cognatos (ERICKSON et al., 2008). A partir desses dados especula-se que a geração de uma potente resposta das células T CD8⁺ polifuncionais, pode conferir proteção/resistência

contra a infecção pelo HIV-1. A elucidação desse mecanismo de resposta ao HIV-1 em indivíduos que foram expostos, mas que não se infectaram pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de uma vacina baseada em células T CD8⁺.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar em células NK a expressão de receptores inibitórios e de ativação, e seu aspecto funcional através da estimulação dos receptores TLR intracelulares na produção de citocinas e marcadores de desgranulação. Nas células T CD8⁺ analisar a expressão de marcadores de ativação/exaustão, e sua resposta a peptídeos da região da Gag do HIV-1 quanto à produção de citocinas e marcadores de desgranulação. Essas análises foram realizadas em sangue periférico ou células mononucleares de casais sorodiscordantes para o HIV-1 e em indivíduos controles não expostos.

2.2 Específicos

- Avaliar a frequência das células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} do sangue periférico, quanto a expressão de receptores de ativação (CD69, CD95, NKG2D, CD94, NKG2 e CD57), e receptores inibitórios (NKG2A, NKB.1 e MIC A/B), além de CD62L e CD127,
- Avaliar a relação entre o perfil de memória de células NK e soropositividade ao citomegalovírus,
- Genotipar os receptores KIRs,
- Avaliar a frequência de resposta das células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} quando a expressão de CD107a, TNF, IFN- γ , e granzima B, em resposta a estímulos via TLR-3, TLR-7 e TLR-7/8,
- Avaliar a frequência das células T CD8⁺ quanto à expressão dos marcadores de ativação/exaustão (CD38, CD69, CD95, PD-1, CD62L e CD127) nas populações de maturação,

- Avaliar a frequência de células T CD8⁺ a peptídeos da Gag do HIV-1, quanto a expressão de CD107a, TNF, IFN- γ e granzima B.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

O grupo de estudos foi composto por indivíduos expostos ao vírus HIV e que possuem sorologia negativa ao HIV (n=16), indivíduos infectados pelo HIV-1 (n=13), incluindo os parceiros(as) infectados(as), em tratamento ou não com a terapia antirretroviral. Esses indivíduos foram provenientes do Ambulatório de Imunodeficiências Secundária (AEED) do Hospital das Clínicas da FMUSP, do Ambulatório de Vulneráveis do Instituto de Infectologia do Emílio Ribas e do Centro de Referência e Tratamento em DTS/AIDS.

O grupo controle (n= 17) foi constituído por indivíduos não infectados pelo HIV-1, provenientes do Instituto de Medicina Tropical da USP.

Todos os indivíduos foram informados do conteúdo da pesquisa, por meio de um termo de consentimento livre e esclarecido, e responderam um questionário de pesquisa. Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo (nº 0683/09). No Instituto de Infectologia Emílio Ribas esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (nº 018/2011).

Critério de Inclusão: história de sexo sem proteção com o(a) atual parceiro(a) por pelo menos 1 ano, e idade acima de 18 anos.

Critério de Exclusão: foram excluídos indivíduos com múltiplos pares, co-infecções, infecções oportunistas ativas, gravidez e uso de imunomoduladores ou imunossupressores.

3.2. Coleta do sangue periférico

O sangue periférico foi coletado por punção venosa em três tubos diferentes:

- Tubos contendo EDTA para obtenção do plasma, quantificação *ex-vivo* das células T CD4⁺ e T CD8⁺ totais, de acordo com as instruções do Ministério da Saúde do Brasil, e para análise da frequência de células NK e seus receptores de ativação e inibitórios, e das células T CD8⁺ para análise da frequência de marcadores de ativação e exaustão.
- Tubos contendo heparina sódica para obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), fração onde se encontra os linfócitos T e as células NK.
- Tubos sem aditivo (tubo seco) para obtenção do soro e posterior quantificação dos título de IgM e IgG anti-HCMV.

3.3. Quantificação do HIV no plasma e do HIV integrado ao genoma do hospedeiro

O ensaio qualitativo para detecção do DNA do HIV-1 em PBMC do grupo ENI foi realizado com o Amplicor HIV-1 DNA Test (Roche, Branchburg, NJ, USA).

3.4. Determinação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico

Para quantificação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ utilizou-se o *kit* BD Multitest™ CD3 FITC/ CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC Reagent (BD Pharmingen – San Jose-USA). As marcações foram feitas com 50 µL de sangue periférico coletados em tubos contendo EDTA. Esse procedimento é o mesmo que o Ministério da Saúde do Brasil recomenda. Adicionou-se 50 µL de sangue periférico em tubos *Trucount* que contendo *beads* (microesferas) marcadas com os anticorpos anti-CD3 (FITC), anti-CD45 (PerCP), anti-CD4 (APC) e anti-CD8 (PE). Na análise, o número absoluto das células positivas (células/µL) na amostra é determinado comparando-se o número de eventos celulares em

relação ao número de eventos de *beads*. Esse procedimento é realizado com o auxílio do *software* BD MultisetTM, e do *software* BD CellQuestTM.

3.5. Marcação *ex-vivo* das células NK e das células T CD8⁺

O tubo contendo EDTA foi homogeneizado por 5 minutos, em seguida as marcações foram realizadas com 70µL de sangue. **Células NK** – Para marcação das células NK utilizou-se os anticorpos anti-CD3, anti-CD19, anti-CD16, anti-CD56, anti-CD62L, anti-CD69, anti-CD94, anti-CD127, MIC-A/B, NKG2A, NKG2C e NKG2D. Após a adição dos anticorpos as células foram incubadas por 20' protegidas da luz e em temperatura ambiente (t.a.). Em seguida as células foram incubadas por 15' a t.a. em 450 µL de uma solução de lise de hemácias (BD FACSTM Lysing – BD Pharmingen – San Jose-USA) até a lise completa das hemácias, em seguida foram lavadas com 1 mL de isoton (Hemoton SPEC – Bragança Paulista, SP-Brasil). Ao final as células foram resuspendidas em 300 µL de isoton. Os anticorpos anti-CD3 e anti-CD19 foram usados para excluir as poluições de células T e de células B, e os anticorpos anti-CD56 e anti-CD16 foram usados para definir as populações de células NK CD56^{bright} (CD3⁻CD19⁻CD56^{high}CD16⁻) e as células CD56^{dim} (CD3⁻CD19⁻CD56^{low}CD16⁺). Dentro dessas populações analisou-se a frequência de expressão dos receptores de ativação e inibitórios, e dos demais marcadores. **Células T CD8⁺** – Para marcação das células T CD8⁺ utilizou-se os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA, anti-CCR7, anti-CD38, anti-CD69, anti-CD62L, anti-CD95, anti-CD127 e anti-PD-1. Os procedimentos de incubação com os anticorpos e em seguida com a solução de lise de hemácias foram semelhantes aos da marcação das células NK. A análise da expressão dos marcadores de ativação/exaustão das células T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) foi realizada dentro das populações de maturação

definidas pela expressão de CD45RA e CCR7. Dessa forma foram definidas quatro diferentes populações de células T CD8⁺ denominadas: *Naive* (CD45RA⁺CCR7⁺), Memória Central (CD45RA⁺CCR7⁺), Efetora (CD45RA⁺CCR7⁻) e Efetora RA (CD45RA⁺CCR7⁻). Ao final foram adquiridos 200.000 – 300.000 eventos em FACS Fortessa com auxílio do *software Diva* (BD Pharmingen – San Jose, CA-USA). As compensações e análises da frequência das células e dos marcadores de ativação/inibição foram realizadas com auxílio do *software Flow Jo* (Tree Star – Ashland, OR-USA). Abaixo encontram-se os quadros com as especificações dos anticorpos usados nessas marcações.

Quadro 1. Pannel para marcação *ex-vivo* de células NK.

Anticorpo	Fluorescência	Clone	Volume em µL	Fabricante/Local
Anti-CD3	Q-Dote 606	UCHT1	0,170	Invitrogen/Eugene, OR-USA
Anti-CD19	Horizon V500	HIB19	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD16	Alexa 647	3G8	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD56	Alexa 700	B159	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD62L	PE-Cy5.5	Dreg 56	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD127	PE-Cy7	HIL-7R	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD69	FITC	FN50	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-NKG2D	APC	1D11	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-NKG2A	PE	131411	1	R&D Systems/Minneapolis, MN-USA
Anti-NKG2C	FITC	134591	1	R&D Systems/Minneapolis, MN-USA
Anti-MIC A/B	PE	6DH	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-NKB1	FITC	DX9	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD94	APC	HP3D9	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD57	FITC	HP3D9	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA

Quadro 2. Pannel para marcação *ex-vivo* de células T CD8⁺.

Anticorpo	Fluorescência	Clone	Volume em µL	Fabricante/
Anti-CD3	Q-Dote 606	UCHT1	0,170	Invitrogen/Eugene, OR-USA
Anti-CD4	PE-DL594	T5	1	Ex-Bio/Vestec, Praha-Czech Republic
Anti-CD8	Horizon V500	RPA-T8	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD45RA	APC-H7	HI100	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CCR7	Alexa 647	3D12	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD62L	PE-Cy5.5	Dreg 56	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD127	PE-Cy7	HIL-7R	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD69	FITC	FN50	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD38	Alexa 700	HIT2	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD95	Horizon V450	DX2	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-PD-1	PE	MIH4	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA

3.6. Dosagem de IgG e IgM anti-HCMV séricas

A presença de anticorpos anti-HCMV IgG ou IgM específicos foi realizado a partir de amostras do soro dos indivíduos ENI, HIV-1 e controles saudáveis não expostos, de acordo com o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA – Virion/Serion, Wurzburg, Germany). O *cut-off* foi considerado quando os valores eram maiores que 25 U/mL.

3.7. Genotipagem dos KIRs

Para genotipagem dos receptores da família dos KIRs, o sangue foi coletado em tubo contendo EDTA, de onde coletou-se o *pellet* de leucócitos. O DNA genômico foi extraído da a partir dos leucócitos totais com o kit AllPrep DNA/RNA (QUIAGEN, Inc., Mississauga, Ontário-Canadá). Para a genotipagem foi usado o kit KIR Genotyping SSP (Life Technologies, Brown Deer, Wisconsin-USA). O DNA-alvo foi amplificado por PCR usando um *set* de *primer* para os 21 genes KIR específicos do grupo (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1, 2DP1, 3DP1, bem como as variantes comuns de 2DL5, 2DS4, and 3DP1). Em seguida determinou-se a presença e/ou a ausência de cada gene KIR em gel de agarose a 2% (Invitrogen, Carlsbad, CA-USA) com brometo de etídio.

3.8. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Para obtenção das *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs), coletou-se aproximadamente 30 mL de sangue periférico em tubos heparinizados. O sangue coletado em heparina sódica foi diluído em salina 0,9% estéril (v:v). As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas por centrifugação (800g/20minutos) usando gradiente de densidade Ficoll-Paque (GE – Uppsala, SE-Sweden). Posteriormente, as células foram lavadas 2x em salina e ressuspensas em 1 mL de RPMI 1640, quantificadas em contador automático Cell-Dyn[®] (Beckman Coulter, Inc. – Brea, CA-USA). Em seguida essas células foram cultivadas para avaliação da resposta polifuncional das células NK após ativação de receptores *Toll-like* intracelulares (TLR-3, TLR-7 e TLR-7/8), bem como a

resposta polifuncional das células T CD8⁺ por meio da estimulação com *pools* da proteína Gag do HIV-1.

3.9. Estimulação das células NK com agonistas TLRs intracelulares

O ensaio funcional para analisar a capacidade de resposta das células NK CD56^{bright} e CD56^{dim}, foi realizado cultivando-se 5 x10⁵ de PBMCs/0,5 mL de meio de cultura 1640 (Gibco-Life TechnologiesTM – Grand Island, NY-USA), em placas de 48 poços com diferentes agonistas dos TLRs intracelulares. A ativação das populações de células NK com os TLRs foi realizada da seguinte forma:

- Estimulação da via TLR-3, as células foram incubadas durante 6 horas com 20 µg/mL do composto sintético *polyinosinic-polycytidylic acid* (poly I:C-HMW), um análogo de RNA de dupla fita (dsRNA), agonista do TLR-3.
- Estimulação da via TLR-7, as células foram incubadas durante 6 horas com 50 µg/mL do composto *imiquimod* análogo de RNA de simples fita (ssRNA), um agonista do TLR-7.
- Estimulação das vias TLR-7/TLR-8, as células foram incubadas durante 6 horas com 10 µg/mL do composto CL097, um análogo de ssRNA que estimula o TLR-7 e o TLR-8. Todos os agonistas TLRs foram provenientes da Invivogen (San Diego, CA-USA).
- Como controle positivo da resposta das células NK, as células foram estimuladas por 6 horas com 30 ng/mL de *Phorbol myristate acetate* (PMA) e 0,3 µg/mL ionomicina (ambos – Sigma-Aldrich – St. Louis, MO-USA).

O meio 1640 foi tamponado com 10% de soro humano AB (Sigma-Aldrich – St. Louis, MO-USA), adicionou-se 40 mg/mL de gentamicina (Novafarma – Anápolis, GO-Brasil), L-glutamina (Gibco-Life Technologies™ – Grand Island, NY-USA), e 1% aminoácidos não-essenciais (Gibco-Life Technologies™ – Grand Island, NY-USA). Para quantificar a degranulação das células adicionou-se 5 µL de anti-CD107a (PE-Cy5 – clone: H4A3 – BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA) no início da cultura. As células foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C por 6 horas. Após 2 horas de estímulo adicionou-se 10 µg/mL de brefeldida A (Sigma-Aldrich – St. Louis, MO-USA) para bloquear a secreção de citocinas. Ao final as células foram coletadas para marcação e aquisição no FACS Fortessa (BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA), onde foram adquiridos 200.000 eventos.

3.10. Estimulação das células T CD8⁺ com *pools* da proteína Gag do HIV-1

A proteína Gag do HIV-1 utilizada neste estudo foi composta por 123 peptídeos de 15 Mer (15 resíduos de aminoácidos), onde cada peptídeo apresenta 11 resíduos de aminoácidos de sobreposição (NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1 Con B Gag peptides- Complete Set). No processo de maturação do HIV-1 a protease do HIV-1 cliva a Gag (p55), e as partículas geradas irão compor a matriz (MA – p17), o capsídeo (CA – p24), os peptídeos curtos p1, p2 e p6, e a p7 que forma o núcleo capsídeo (NC – p7) (DATTA et al., 2007). Neste estudo utilizaram-se três *pools* (*pool* 1, ou *pool* 2, ou *pool* 3) da proteína Gag do HIV-1 correspondentes a todas as regiões desta proteína (ver a descrição dos *pools* abaixo). O principal objetivo foi realizar um mapeamento primário das regiões da Gag quanto ao perfil de resposta a essas regiões da proteína. Para tanto as PBMCs foram estimuladas com o *pool* 1, ou *pool* 2, ou *pool* 3 durante 6h, no início da cultura as células foram co-estimuladas com 1µg/mL de anti-CD28

e anti-CD49d (BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA); e adicionou-se ainda 5 µL de anti-CD107a. Como controle positivo de estimulação utilizou-se a enterotoxina B do *Staphylococcus aureus* (SEB/10 µg/mL – Sigma-Aldrich – St. Louis, MO-USA). Esses ensaios foram realizados com 5×10^5 PBMCs/0,5 mL de meio de cultura 1640. O meio foi tamponado com 10% de soro humano AB, adicionou-se gentamicina (40 mg/mL), e foi enriquecido com L-glutamina, e aminoácidos não-essenciais. As células foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C por 6h. Após 2 horas de estímulo adicionou-se 10 µg/mL de brefeldida A para bloquear a secreção de citocinas. Ao final as células foram coletadas para marcação e aquisição no FACS Fortessa, onde foram adquiridos 200.000 eventos.

***Pool 1** (correspondente a região da p17)

MGARASVLSGGELDR-ASVLSGGELDRWEKI-SGGELDRWEKIRLRP-DRWEKIRLRPGGKKE-KIRLRPGGKKKYKL-
 LRPGGKKKYKLKHIV-GKKKYKLKHIVWASR-YKLKHIVWASRELER-HIVWASRELERFAVN-ASRELERFAVNPGLL-
 LERFAVNPGLLETSE-AVNPGLEETSEGCRQ-GLLETSEGCRQILGQ-TSEGCRQILGQLQPS-CRQILGQLQPSLQTG-
 LGQLQPSLQTGSEEL-QPSLQTGSEELRSLY-QTGSEELRSLYNTVA-EELRSLYNTVATLYC-SLYNTVATLYCVHQR-
 TVATLYCVHQRIEVK-LYCVHQRIEVKDTKE-HQRIEVKDTKEALEK-EVKDTKEALEKIEEE-TKEALEKIEEEQNKS-
 LEKIEEEQNKSKKKA-EEEQNKSKKKAQQAA-NKSKKKAQQAAADTG-KKAQQAAADTGNSSQ-QAAADTGNSSQVSQN-
 DTGNSSQVSQNYPIV-SQVSQNYPIVQNLO-SQNYPIVQNLOQGMV

***Pool 2** (correspondente a região da p24)

SQNYPIVQNLOQGMV-PIVQNLOQGMVHQAI-NLOQGMVHQAI-SPRT-QMVHQAI-SPRTLNAW-QAISPRTLNAWVKV-
 PRTLNAWVKVVEKA-NAWVKVVEKA-FSPE-KVVEKA-FSPEVIPM-EKAFSPEVIPMFSAL-SPEVIPMFSALSEGA-
 IPMFSALSEGATPQD-SALSEGATPQDLNTM-EGATPQDLNTMLNTV-PQDLNTMLNTVGGHQ-NTMLNTVGGHQAA-
 NTVGGHQAAQMKE-GHQAAQMKE-TINE-AMQMLKETINEEAAE-LKETINEEAAEWDR-INEEAAEWDRHHPVH-
 AAEWDRHHPVHAGPI-DRLHHPVHAGPIAPGQ-PVHAGPIAPGQMREP-GPIAPGQMREPRGSD-PGQMREPRGSDIAGT-
 REPRGSDIAGTTSTL-GSDIAGTTSTLQEQI-AGTTSTLQEQI-GWMT-STLQEQIGWMTNNPP-EQIGWMTNNPP-IPVG-
 WMTNNPP-IPVGEIYK-NPP-IPVGEIYKRWII-PVGEIYKRWIILGLN-IYKRWIILGLNKIVR-WIILGLNKIVRMYS-
 PGLNKIVRMYSPTSIL-IVRMYSPTSILDIRQ-YSPTSILDIRQGPKE-SILDIRQGPKEPFRD-IRQGPKEPFRDYVDR-
 PKEPFRDYVDRFYKT-FRDYVDRFYKTLRAE-VDRFYKTLRAEQASQ-YKTLRAEQASQEVKN-RAEQASQEVKNWMT-
 EQASQEVKNWMTETLLV-VKNWMTETLLVQNAN-MTETLLVQNANPDCK-LLVQNANPDCKTILK-NANPDCKTILKALGP-
 DCKTILKALGPAATL-ILKALGPAATLEEMM-LGPAATLEEMMTACQ-ATLEEMMTACQGVGG-EMMTACQGVGGPGHK-
 ACQGVGGPGHKARVL-VGGPGHKARVLAEM-GHKARVLAEMSQVT-RVLAEMSQVTNSAT

***Pool 3** (correspondente a região da p7, p6, p1 e p2)

RVLAEMSQVTNSAT-EAMSQVTNSATIMMQ-QVTNSATIMMQ-RGNF-SATIMMQ-RGNFRNQR-MMQ-RGNFRNQRKT-
 VKNFRNQRKTVCFCN-NQRKTVCFCNKGEG-TVKCFNKGEGHIAK-FNKGEGHIAKNCR-KEGHIAKNCRAPRKK-
 IAKNCRAPRKKGCWK-CRAPRKKGCWKCGKE-RKKGCWKCGEGHQM-CWKCGEGHQM-KDCT-GKEGHQM-KDCTERQA-
 HQMKDCTERQANFLG-DCTERQANFLGKIWP-RQANFLGKIWPSHKG-FLGKIWPSHKG-RPGN-IWPSHKG-RPGN-FLQS-
 HK-RPGN-FLQSRPEP-PGNFLQSRPEPTAPP-LQSRPEPTAPP-EESF-PEPTAPP-EESFRFGE-APPEESFRFGEETT-
 ESFRFGEETTTPSQK-FGEETTTPSQKQEP-ITTPSQKQEPIDKEL-SQKQEPIDKELYPLA-EPIDKELYPLASLRS-
 KELYPLASLRS-LFGN-PLASLRS-LFGNDPSS-LRS-LFGNDPSSSQ

*Em Cinza (—) – os aminoácidos que se sobrepõem. Em Vermelho e/ou Azul (— ou —) – as sequências de aminoácidos expressas pelas proteínas da Gag do HIV-1, o azul representa aqueles peptídeos que se repetem no set de peptídeos da Gag do NIH. Em negrito – os peptídeos repetidos na formulação dos *pools*.

3.11. Marcação das células NK e T CD8⁺ estimuladas: avaliação funcional

Ao final das 6 horas de estimulação as células foram coletas submetendo-se a placa de 48 poços a uma superfície com gelo para facilitar a remoção das células aderidas. Em seguida as células foram centrifugadas (1.500 rpm x 5 minutos), o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi incubado com 10 µL de uma solução de IgG humanas totais (1 mg/mL – Sigma-Aldrich – St. Louis, MO-USA) por 15 minutos a 4 °C no escuro, afim de se reduzir a ligação inespecíficas dos anticorpos usados nas marcações. Em seguida realizou-se a fixação com 50 µL de BD Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen – San Diego, CA-USA), por 20 minutos a 4 °C no escuro. Posteriormente as células foram lavadas a 1.500 rpm x 5 minutos, com 500 µL da solução BD *Perm/Wash* (BD Pharmingen – San Diego, CA-USA), o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* submetido a marcação das populações de células NK e T CD8⁺. Para marcação das células NK e T CD8⁺ realizou-se um *pool* de anticorpos (intracelulares e extracelulares), que foram diluídos em 50 µL de diluente (BD Perm/Wash), em seguida essas células foram incubadas por 20 minutos a 4 °C no escuro, e ao final elas foram ressuspensas em 300 µL de tampão de lavagem produzido *in house* (PBS 1x + BSA 0,1% + Azida Sódica 0,1%). Os painéis de anticorpos utilizados nas marcações estão descritos abaixo.

Quadro 3. Painel de marcação células NK estimuladas.

Anticorpo	Fluorescência	Clone	Volume em μL	Fabricante/Local
Anti-CD3	Q-Dote 606	UCHT1	0,170	Invitrogen/Eugene, OR-USA
Anti-CD19	Horizon V500	HIB19	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD16	Alexa 647	3G8	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD56	Alexa 700	B159	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD62L	FITC	Dreg 56	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD107a	PE-Cy5	H4A4	5	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-IFN- γ	PE	B27	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-TNF	PE-Cy7	MAB11	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-Granz. B	Horizon V450	GB11	1,5	R&D Systems/Minneapolis, MN-USA
Anti-IL-10	APC	JES319	1	R&D Systems/Minneapolis, MN-USA

Quadro 4. Painel de marcação células T CD8⁺ estimuladas.

Anticorpo	Fluorescência	Clone	Volume em μL	Fabricante/Local
Anti-CD3	Q-Dote 606	UCHT1	0,170	Invitrogen/Eugene, OR-USA
Anti-CD4	PE-DL594	T5	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD8	Horizon V500	RPA-T8	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD45RA	APC-CY7	HI100	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CCR7	Al. 647	3D12	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-CD107a	PE-Cy5	H4A4	5	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-IFN- γ	PE	B27	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-TNF	PE-Cy7	MAB11	1	BD Pharmingen™/San Jose, CA-USA
Anti-Granz.B	Horizon V450	GB11	1,5	R&D Systems/Minneapolis, MN-USA

3.12. Análises Estatísticas

O test de Kruskal–Wallis seguido do pós-teste de Dunn's foram utilizados para comparar as variáveis entre os grupos ENI, HIV-1 e controle. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $P \leq 0.05$. A presença dos genes KIR foi analisada pelo teste de Pearson chi-square. Para analisar igualdade entre os grupos, utilizou-se o teste Likelihood.

4. RESULTADOS

4.1. Dados Demográficos dos Casais Sorodiscordantes e Indivíduos Controles

A Tabela demográfica mostra que a coorte foi composta por 15 casais heterossexuais e 5 casais homossexuais masculinos (**Tabela 1**). O tempo médio de relação entre os casais discordantes foi de $12,21 \pm 1,81$ anos (**Anexo 1**). Entre os indivíduos infectados pelo HIV-1, o tempo de médio de infecção foi de $9,53 \pm 1,46$ (**Anexo 1**). No momento da coleta apenas 3 indivíduos do grupo HIV-1 apresentaram carga viral (CV) acima de 50 cópias/ μ L de sangue (179, 50.930 e 51) (**Tabela 1**). Não foi observada diferença no número de células T CD8⁺ entre os grupos, contudo o número de células T CD4⁺ mostrou-se significativamente reduzido no grupo HIV-1, em relação aos grupos ENI e controle (**Tabela 1**). Cerca de 70% dos indivíduos do grupo HIV-1 estavam em tratamento antirretroviral no momento da coleta, onde o tempo médio de tratamento foi de $7,63 \pm 1,89$ anos (**Anexo 1**).

No grupo ENI (n=20) três indivíduos não foram pareados com seus respectivos parceiros infectados pelo HIV-1. Quanto a distribuição de gênero, o grupo controle foi composto por 3 homens e 14 mulheres, para se assemelhar essencialmente ao grupo ENI, que possui 9 homens e 14 mulheres (**Tabela 1**).

Tabela 1. Dados demográficos

Grupo	Gênero	Idade	Relação	pVL (Cópias/mL)	pVL (Log)	CD4/ μ L	CD8/ μ L
ENI 001	M	52	Hom.	< 50	< 1,69	1425	451
ENI 002	M	57	Het.	< 50	< 1,69	2419	1028
ENI 003	M	38	Het.	< 50	< 1,69	1085	462
ENI 004	F	41	Het.	< 50	< 1,69	1297	545
ENI 005	F	40	Het.	< 50	< 1,69	1137	490
ENI 006	F	43	Het.	< 50	< 1,69	1514	1691
ENI 007	F	46	Het.	< 50	< 1,69	1396	611
+ENI 008	M	25	Hom.	< 50	< 1,69	1105	1194
+ENI 009	F	38	Het.	< 50	< 1,69	1152	691
ENI 010	F	66	Het.	< 50	< 1,69	858	370
ENI 011	F	45	Het.	< 50	< 1,69	940	844
ENI 012	F	39	Het.	< 50	< 1,69	981	606
ENI 013	F	49	Het.	< 50	< 1,69	1735	880
+ENI 014	M	57	Hom.	< 50	< 1,69	1010	515
ENI 015	F	55	Het.	< 40	< 1,60	1594	1805
ENI 016	M	47	Hom.	< 40	< 1,60	1570	1298
ENI 017	F	46	Het.	< 40	< 1,60	1441	489
ENI 018	M	35	Hom.	< 40	< 1,60	1312	868
ENI 019	M	33	Het.	< 40	< 1,60	990	322
ENI 020	M	35	Het.	< 40	< 1,60	1263	588
(n=20)	(9M/11F)	(44,35 $\pm$ 2,18)	(15Het./5Hom.)	-	-	(1311 $\pm$ 79)	(787 $\pm$ 94)
HIV 001	M	48	Hom.	< 50	< 1,69	248	1367
HIV 002	F	46	Het.	< 50	< 1,69	413	683
HIV 003	F	38	Het.	< 50	< 1,69	1131	857
HIV 004	M	41	Het.	< 50	< 1,69	169	941
HIV 005	M	43	Het.	< 50	< 1,69	623	471
HIV 006	M	53	Het.	< 50	< 1,69	1561	633
HIV 007	M	46	Het.	179	2,25	451	1061
HIV 010	M	59	Het.	< 50	< 1,69	402	381
HIV 011	M	44	Het.	< 50	< 1,69	626	526
HIV 012	M	39	Het.	50.930	4,7	174	2120
HIV 013	M	53	Het.	< 50	< 1,69	415	559
HIV 015	M	51	Het.	< 50	< 1,69	1032	1270
HIV 016	M	47	Hom.	< 50	< 1,69	1205	862
HIV 017	M	40	Het.	< 50	< 1,69	971	1743
HIV 018	M	36	Hom.	< 40	< 1,60	640	748
HIV 019	F	36	Het.	51	1,70	273	366
HIV 020	M	40	Het.	-	-	212	673
(n=17)	(14M/3F)	(44,71 $\pm$ 1,59)	(14Het./3Hom.)	-	-	(620 $\pm$ 100)***/#	(897 $\pm$ 117)
CTL 001	M	47	-	-	-	1118	549
CTL 002	M	32	-	-	-	695	330
CTL 003	F	41	-	-	-	485	311
CTL 004	F	38	-	-	-	1164	640
CTL 005	F	58	-	-	-	612	414
CTL 006	F	56	-	-	-	870	363
CTL 007	F	40	-	-	-	1408	1408
CTL 008	F	36	-	-	-	1560	858
CTL 009	F	43	-	-	-	1679	368
CTL 010	F	33	-	-	-	803	410
CTL 011	F	37	-	-	-	1224	428
CTL 012	F	46	-	-	-	1535	1102
CTL 013	F	22	-	-	-	545	378
CTL 014	F	38	-	-	-	1092	469
CTL 015	F	32	-	-	-	1008	337
CTL 016	F	41	-	-	-	890	1272
CTL 017	M	53	-	-	-	711	1634
(n=17)	(3M/14F)	(40,7 $\pm$ 2,24)				(957 $\pm$ 107)	(663 $\pm$ 103)

(+) Indivíduos ENI cujo parceiro infectado não compareceu à coleta. *** $P \leq 0,001$ /diferença entre o grupo ENI e o HIV-1. # $P \leq 0,05$ /diferença entre o grupo controle e o HIV-1. Hom. (homossexual) e Het. (Heterossexual). Os valores entre parênteses foram expressos como média $\pm$ e erro padrão.

4.2. Análise fenotípica das células NK do sangue periférico: expressão de receptores de ativação/inibitórios e moléculas de memória nas células NK

A resposta citotóxica é mediada principalmente por células NK e células T CD8⁺. O aumento da expressão de receptores de ativação estimula a citotoxicidade em células NK, e relaciona-se com a resistência à infecção por HIV-1 em indivíduos ENI (ERICKSON et al., 2008). Neste estudo foi avaliado o perfil fenotípico (sem estimulação) e o funcional (com estimulação) das células NK dos indivíduos infectados com HIV-1, e de seu companheiro exposto ao HIV-1 sem infecção, e em indivíduos não expostos e saudáveis.

Inicialmente, foi observada uma redução na frequência das células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} do sangue periférico do grupo HIV-1 em relação aos grupos ENI e controle, respectivamente (**Figuras 1b e 1c**). Este achado evidencia que indivíduos em fase crônica da infecção pelo HIV-1, possuem uma reduzida frequência dos subtipos de células NK circulantes.

As células NK expressam moléculas indicadoras de estado funcional (ativação ou inibição) e maturacional (*naïves* e maduras). Neste sentido, foi realizada a análise da frequência de expressão de receptores de ativação (CD94, NKG2C, NKG2D, CD69 e CD95), receptores inibitórios (NKG2A e NKB1), CD62L como molécula de *homing* para órgãos linfóides, CD127 expresso por células NK imaturas de origem tímica, MIC A/B\ como ligante do NKG2D, e o CD57 que é relacionado com as células NK de memória (aquelas que sofrem expansão clonal em presença de antígeno).

A frequência de células NK CD69⁺ foi significativamente reduzida nas populações de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} no grupo ENI comparadas ao grupo controle (**Figura 2b**). A segunda molécula de ativação avaliada foi o CD95 (Fas), que representa um

importante mecanismo para indução da apoptose e de ativação das células NK. A frequência de expressão de CD95 no grupo HIV-1 foi elevada nas duas populações de células NK, em relação ao grupo controle. Já no grupo ENI, a frequência de expressão de CD95 foi maior apenas na população CD56^{dim} em relação aos grupos HIV-1 e controle (**Figura 2c**). O terceiro receptor de ativação avaliado foi o NKG2D, que interage com MIC A/B, é capaz de ativar a resposta citolítica das células NK. O aumento percentual de células NK CD56^{bright} NKG2D⁺ foi detectado no grupo ENI, em relação aos grupos HIV-1 e controle, em contraste com a redução significativa da frequência de NKG2D na população CD56^{dim} do grupo HIV-1, em relação aos demais grupos (**Figura 2d**). Esses evidenciam um perfil ativado das células NK mediada pela expressão de NKG2D apesar do decréscimo do marcador de ativação CD69 no grupo ENI.

Outra via de regulação da atividade das células NK são as moléculas inibitórias, dentre as quais destacamos a molécula NKG2A, NKB.1 e MIC A/B (ligante de NKG2D) (**Figura 3**). A frequência de expressão de NKG2A em células NK, não alterou entre os grupos (**Figura 3b**). Entretanto, elevada frequência de células CD56^{dim} NKB.1⁺ foi detectado no grupo ENI em relação ao grupo HIV-1 e o controle (**Figura 3c**). As moléculas MIC A e B caracterizadas como moléculas não-clássicas de MHC. As células NK CD56^{bright} de CD56^{dim} do grupo HIV-1 apresentaram elevada frequência de expressão de MIC A/B, em relação ao grupo controle (**Figura 3d**). Coletivamente a elevação na frequência de células NK CD56^{dim} NKB.1⁺ do grupo ENI pode estar relacionado com o controle do perfil ativatório. Contudo são necessários ensaios funcionais que relacionem essa molécula com a capacidade de inibição das células NK, bem como analisar os seus ligantes naturais, os alelos de HLA-B. A expressão de CD62L, uma molécula de *homing* para órgãos linfoides secundários, foi encontrada em similar frequência nos subtipos de células NK entre os grupos (**Figura 4b**). O CD127 (cadeia alfa do receptor das IL-7) é um

marcador de células NK que se originam no timo e/ou em órgãos linfoides. Observou-se nos grupos ENI e HIV-1 um aumento na frequência de células $CD56^{\text{bright}} CD127^+$ e $CD56^{\text{dim}} CD127^+$, evidenciando elicitação de células NK imaturas à periferia (**Figura 4c**).

Para avaliar o fenótipo relacionado com as células NK de memória, caracterizou-se a expressão de CD94, NKG2C e CD57 (**Figura 5**). O grupo HIV-1 mostrou uma redução significativa na frequência de células $CD56^{\text{bright}} CD94^+$ em relação ao grupo ENI e ao controle (**Figura 5b**). A população $CD56^{\text{dim}} CD94^+$ mostrou elevada frequência somente no grupo ENI, quando comparada ao grupo HIV-1 e ao grupo controle (**Figura 5b**). A frequência de células NK $CD56^{\text{bright}}$ que expressam NKG2C mostrou-se reduzida no grupos ENI em relação aos grupos HIV-1 e controle, e elevadas na população $CD56^{\text{dim}}$ nos grupos ENI e HIV-1 em relação ao grupo controle (**Figura 5c**). Além disso, o CD57 foi significativamente mais expresso nas populações $CD56^{\text{bright}}$ e $CD56^{\text{dim}}$ do grupo ENI em relação ao grupo controle (**Figura 5d**). Juntos esses dados mostraram que no grupo ENI há expansão da população de células NK $CD56^{\text{dim}} CD57^+$, com perfil de memória.

Os resultados mostraram importantes alterações fenotípicas na população de células NK $CD56^{\text{dim}}$ do grupo ENI em relação grupo controle, e semelhanças na frequência de expressão dos marcadores: CD69, NKG2A, MIC A/B, CD62L, CD127 e CD94 com o grupo HIV-1.

Figura 1. Análise da frequência de células NK no sangue periférico. a) Estratégia de *gate* em PBMC e caracterização das populações de células NK $CD56^{bright}$ e $CD56^{dim}$. b) Frequência das populações $CD56^{bright}$ e c) $CD56^{dim}$ no grupo ENI (n=19), HIV-1 (n=16) e controle (n=17). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, ** $P \leq 0,01$.

Figura 2. Frequência da expressão de marcadores de ativação nas populações de células NK. a) Estratégia de *gate* para avaliação das frequências dos marcadores inibitórios expressos nas populações CD56^{bright} e CD56^{dim}; b) frequência de CD69 (marcador de ativação precoce); c) frequência de CD95 (receptor Fas); d) frequência do receptor de ativação NKG2D. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média ± erro padrão, *P≤0,05, **P≤0,01 e ***P≤0,001.

Figura 3. Frequência da expressão de marcadores de inibitórios nas populações de células NK. a) Estratégia de *gate* para avaliação das frequências dos marcadores inibitórios expressos nas populações CD56^{bright} e CD56^{dim}; b) frequência de NKG2A; c) frequência de NKB.1; d) frequência de MIC A/B (ligante de NKG2D). ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, **P $\leq$ 0,01 e ***P $\leq$ 0,001.

Figura 4. Frequência da expressão de CD62L e CD127 nas populações de células NK. a) Estratégia de *gate* para avaliação das frequências de CD62L e CD127 expressos nas populações CD56^{bright} e CD56^{dim}; b) frequência de CD62L; c) frequência de CD127 (cadeia α do IL-7R). ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, **P $\leq$ 0,01 e ***P $\leq$ 0,001.

Figura 5. Frequência da expressão de marcadores de ativação/memória nas populações de células NK. a) Estratégia de *gate* para avaliação das frequências dos receptores CD94 e NKG2C, e do marcador de memória CD57 expressos nas populações CD56^{bright} e CD56^{dim}; b) frequência de CD94; c) frequência de NKG2C; d) frequência de CD57. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média ± erro padrão, *P≤0,05, **P≤0,01 e ***P≤0,001.

4.3. Correlação entre receptores de ativação/memória de células NK e a produção de IgG anti-HCMV

O citomegalovírus (HCMV) induz expansão das células NK de memória. A frequência de infecção pelo HCMV no mundo é entre 50% a 80% da população adulta (MICHAELIS et al., 2009). A associação entre a positividade dos anticorpos IgM e IgG anti-HCMV com a frequência de células NK que expressam CD94, NKG2C e CD57, foi analisada entre os grupos (**Figura 6**). Não foram detectados anticorpos IgM anti-HCMV nos soros dos grupos estudados. Contudo, níveis elevados de anticorpos IgG anti-CMV séricos foram identificados em 100% dos indivíduos dos grupos ENI e HIV-1, sendo que no grupo controle foi de 71,43% (**Figura 6a**). A expressão de CD94, NKG2C ou CD57 nas células NK CD56^{dim}, mostrou forte correlação com os títulos de IgG anti-HCMV em todos os grupos analisados (**Figura 6b, c e d**). Esses dados mostram a expansão das células CD56^{dim} nos grupos analisados, e que as células NK de memória estão numericamente preservadas nos indivíduos infectados pelo HIV-1.

Figura 6. Correlação entre a frequência de CD94, NKG2C e CD57 na população de células NK CD56^{dim} e a concentração de IgG anti-HCMV. a) A concentração sérica dos anticorpos IgG anti-HCMV foi determinada por ELISA, onde o valor considerado do *cut-off* foi de 25 U/mL (ilustrado com letra tracejada b) Correlação entre IgG anti-HCMV e CD94. c) Correlação entre IgG anti-HCMV e NKG2C. d) Correlação entre IgG anti-HCMV e CD57. ENI (n=14), HIV-1 (n= 9) e controle (n= 20).

4.4. Frequência dos alelos de KIRs

Neste estudo foi realizada a genotipagem dos alelos de KIRs a partir de DNA de células do sangue periférico. Similar frequência quanto à presença ou ausência dos alelos de KIR foi observada entre os grupos (**Tabela 2**).

Tabela 2. Frequência dos alelos de KIR.

KIR gene	ENI (n=20)		HIV-1 (n=17)		Controle (n=17)		P
	n	%	n	%	n	%	
2DL1	18	90	17	100	16	94	ns
2DL2	15	75	13	76	9	53	ns
2DL3	16	80	16	94	17	100	ns
2DL4	19	95	16	94	17	100	ns
2DL5A	9	45	8	47	4	24	ns
2DL5B	6	30	8	47	6	35	ns
3DL1	17	85	17	100	17	100	ns
3DL2	20	100	17	100	17	100	ns
3DL3	20	100	17	100	17	100	ns
2DS1	9	45	8	47	5	29	ns
2DS2	10	50	12	71	8	50	ns
2DS3	6	30	5	29	5	29	ns
2DS5	8	40	9	53	5	29	ns
3DS1	9	45	8	47	5	29	ns
2DP1*	18	90	16	94	17	100	ns

*2DP1 é um pseudogene com estrutura similar aos genes KIRs. Acredita-se que ele represente um ancestral dos genes KIRs (Fonte: CARRINGTON e NORMAN, 2003).

4.5. Ativação das células NK com agonistas de TLRs intracelulares

Para potencializar a resposta mediada pelas células NK foram utilizados agonistas sintéticos de TLR-3 (poly I:C), TLR-7 (imiquimode) e TLR-7 associado do TLR-8 (CL097). As PBMCs dos grupos estudados foram estimuladas com os agonistas dos TLRs intracelulares ou com o acetato miristato de forbol (PMA) + Ionomicina como controle de ativação, em seguida avaliadas quanto a expressão de IFN- γ , TNF, CD107a e Granzima B, moléculas envolvidas na resposta anti-viral das células NK.

A frequência de células que expressam CD107a nas células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} do grupo ENI foi significativamente modulada via TLR-3, -7 e -7/8, comparadas ao grupo HIV-1 e ao controle (**Figura 7a**). Curiosamente, houve aumento da frequência de expressão de CD107a nas duas populações de células NK do grupo HIV-1, apenas com o agonista TLR-7, em relação ao grupo controle (**Figura 7a**). O estímulo com PMA + Ionomicina também induziu um significativo aumento da frequência de expressão de CD107a nos dois subtipos de células NK do grupo ENI (**Figura 7a**).

Outro componente da citotoxicidade a granzima B, foi avaliada nas populações CD56^{bright} e CD56^{dim}, após a estimulação com agonistas de TLRs. A subpopulação de células NK CD56^{bright}, após estímulo com o agonista TLR-7/8 mostrou redução da frequência de células que expressam granzima B no grupo HIV-1, comparado aos demais grupos (**Figura 7b**). Já na população CD56^{dim}, foram evidenciadas alterações para todos os estímulos, onde a via TLR-3 induziu uma significativa redução da frequência de expressão de granzima B no grupo HIV-1, em relação aos demais grupos (**Figura 7b**). A via TLR-7 aumentou a frequência de expressão de granzima B na população CD56^{dim} do grupo ENI, comparada aos grupos HIV-1 e controle (**Figura 7b**). Curiosamente, a via TLR-7/8 no grupo controle induziu o aumento da frequência de expressão de granzima B, em relação

aos grupos ENI e HIV-1 (**Figura 7b**). O estímulo policlonal com PMA + Ionomicina aumentou o percentual de células granzima B⁺ no grupo ENI em relação ao controle.

Esses dados mostraram que o grupo ENI é mais susceptível a estimulação via TLRs intracelulares em induzir a expressão de CD107a e granzima B. Os dados também mostram que a população reguladora CD56^{bright} é capaz de expressar moléculas efetoras da citotoxicidade como CD107a e granzima B.

A frequência de células NK CD56^{bright} ou CD56^{dim} que expressam IFN- γ e TNF também foi avaliada após a estimulação via TLR-3, -7 ou -7/8. A via TLR-3 aumentou significativamente a expressão de IFN- γ na população CD56^{bright} nos grupos ENI e HIV-1, em relação ao grupo controle (**Figura 8a**). Já na população CD56^{dim} somente o grupo ENI mostrou elevada frequência de células que expressam IFN- γ (**Figura 8a**). A produção de IFN- γ pelas células CD56^{bright} mediada por TLR-7 foi suprimida no grupo ENI, em relação aos grupos HIV-1 e controle, contudo na população CD56^{dim} a estimulação de TLR-7 elevou significativamente a frequência de células que expressam IFN- γ no grupo ENI, seja em relação ao grupo HIV-1 ou ao grupo controle (**Figura 8a**). A estimulação via TLR-7/8 aumentou a frequência de células CD56^{bright} que expressam IFN- γ no grupo ENI, em relação aos grupos HIV-1 e controle, sendo que a população CD56^{dim} do grupo HIV-1 mostrou reduzida resposta, em relação aos demais grupos (**Figura 8a**). A indução de IFN- γ mediada por PMA + Ionomicina foi significativamente superior no grupo ENI tanto na população CD56^{bright} quanto em CD56^{dim} (**Figura 8a**).

A expressão do TNF mediada por TLRs foi significativamente maior no grupo ENI, em relação ao grupo HIV-1 e/ou ao grupo controle, exceto na via TLR-3 da população CD56^{dim}, onde a resposta foi similar entre os grupos (**Figura 8b**). Além disso, a estimulação via PMA + Ionomicina também promoveu um expressivo aumento da frequência de expressão de TNF nas populações CD56^{bright} e CD56^{dim}. Em conjunto os

achados mostram que a estimulação via TLRs intracelulares podem potencializar a expressão de moléculas citotóxicas bem como de citocinas próinflamatórias em ambos os subtipos de células NK dos indivíduos ENI. A ativação via TLR-7 na indução de CD107a está exacerbada nos indivíduos infectados por HIV-1.

Figura 7. Produção de CD107a e Granzima B nas populações de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim}, após estimulação via TLR-3, TLR-7 e TLR-7/8. As PBMCs foram cultivadas por 6 horas na presença de PMA + ionomicina, poly I:C (TLR-3), imiquimode (TLR-7) ou CL097 (TLR-7/8). a) Frequência de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} que expressam CD107a. b) Frequência de células NK que expressam Granzima B. Os valores basais de CD107a e/ou Granzima B foram subtraídos dos valores obtidos após estimulação. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média ± erro padrão, *P≤0,05, **P≤0,01 e ***P≤0,001.

Figura 8. Produção de IFN- γ e TNF nas populações de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim}, após estimulação via TLR-3, TLR-7 e TLR-7/8. As PBMCs foram cultivadas por 6 horas na presença de PMA + Ionomicina, poly I:C (TLR-3), imiquimode (TLR-7) ou CL097 (TLR-7/8). a) Frequência de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} que expressam IFN- γ . b) Frequência de células NK que expressam TNF. Os valores basais de IFN- γ e/ou TNF foram subtraídos dos valores obtidos após estimulação. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01 e ***P $\leq$ 0,001.

4.6. Análise fenotípica das células T do sangue periférico: expressão de marcadores de ativação/exaustão nas células T CD8⁺

As células T CD8⁺ representam as principais células efetoras da imunidade adaptativa com atividade citotóxica. Inicialmente, observou-se uma diminuição da frequência das células T CD4⁺ e aumento das células T CD8⁺ no grupo HIV-1 em relação ao grupo ENI e ao grupo controle (**Figuras 9b e 9c**). Para avaliar nos indivíduos ENI o perfil de maturação de células T CD8⁺ foi analisado a frequência das populações de células T CD8⁺ *naive* (CD45RA⁺CCR7⁺), memória central (CD45RA⁻CCR7⁺), efetora (CD45RA⁻CCR7⁻) e efetora RA (CD45RA⁺CCR7⁻) (**Figura 9a**). Quanto aos estágios de maturação, foi observado um aumento da frequência de células T CD8⁺ de memória central (M. Central) nos grupos ENI e HIV-1, e redução da frequência de células T CD8⁺ efetoras, quando comparadas ao grupo controle (**Figura 9d**).

Em seguida as células T CD8⁺ foram avaliadas quanto à expressão de marcadores de ativação (CD38, CD69, CD95), de exaustão celular (PD-1), de *homing* para órgãos linfoides secundários (CD62L) e o marcador de regeneração das células T (CD127).

A frequência de células T CD8⁺ CD38⁺ foi significativamente mais elevada nos grupos ENI e HIV-1, em relação ao grupo controle (**Figuras 10a e 10b**). A expressão de CD38 foi elevada em todas as populações de maturação no grupo HIV-1, sendo que no grupo ENI foi significativamente maior nas populações *naive* e de memória central em relação ao grupo controle (**Figura 10c**).

A frequência de células T CD8⁺ que expressam CD69 foi similar entre os grupos (**Figuras 11a e 11b**). Entretanto, a frequência de 69 nas populações de maturação, mostrou-se elevadas nas populações *naive* e de memória central do grupo HIV-1 em relação ao grupo controle (**Figura 11c**).

Outro marcador de ativação e de apoptose o CD95, não teve sua frequência alterada nas células T CD8⁺ dos grupos estudados (**Figuras 12a e 12b**). Contudo, entre as populações de maturação foi observada uma redução da frequência das células T CD8⁺ CD95⁺ de memória central no grupo ENI em relação ao grupo controle (**Figura 12c**).

Em conjunto, os dados das populações de células T CD8⁺ evidenciaram que há similaridades na expressão de CD38 entre o grupo ENI e o HIV-1, como também na dispersão dos valores, achado não observado no grupo controle.

Em seguida avaliou-se a frequência de células T CD8⁺ que expressam o PD-1, entre os grupos desse estudo. Os indivíduos ENI e HIV-1 mostraram um expressivo aumento na frequência de células T CD8⁺ PD-1⁺ em relação ao grupo controle (**Figuras 13a e 143**). Nas populações de maturação das células T CD8⁺ esse aumento foi observado em todas as populações de maturação dos grupos ENI e HIV-1, em relação ao grupo controle (**Figura 13c**). Chama atenção a semelhança no perfil de frequência do PD-1 das células T CD8⁺ nos grupos ENI e HIV-1, mas que pode devido à exposição ao HIV-1, e não necessariamente à infecção crônica.

Células T *naïves* e efetoras são conhecidas por expressar diferentes moléculas de adesão e por exibirem diferentes padrões de migração. O CD62L é diferencialmente expresso pelas populações de células T em amadurecimento. Neste estudo não foi observada alteração na frequência de células T CD8⁺ que expressam CD62L (**Figuras 14a e 15b**). No entanto, o grupo HIV-1 mostrou uma redução na frequência de células T CD8⁺ CD62L⁺ *naïves* em relação ao grupo controle (**Figura 14c**). No grupo ENI foi observada uma redução significativa da frequência de células T CD8⁺ CD62L⁺ de memória central quando comparada ao grupo controle (**Figura 14c**). A redução de células T CD8⁺ que expressam CD62L foi observada especialmente nas populações mais imaturas, *naïve* (HIV-

1) e de memória central (ENI), que pode influenciar na migração para órgãos linfoides secundários.

A frequência de células T CD8⁺ CD127⁺ foi similar entre os grupos (**Figuras 15a e 15b**). Já nas populações de maturação houve uma redução da frequência de células T CD8⁺ CD127⁺ *naive* em relação ao grupo controle (**Figura 15c**).

No conjunto, os achados mostraram similaridades na expressão de CD38 e PD-1 nas células T CD8⁺ entre os grupos ENI e HIV-1, sejam nas célula imaturas, as mais diferenciadas. Estas alterações evidenciaram que a exposição viral pode acarretar na expressão de ativação e exaustão.

Figura 9. Frequência das células T CD8⁺ e suas populações em diferentes estágios de maturação. a) Estratégia de *gate* para determinação das populações de células T CD8⁺ Naive, Memória Central (M. Central), Efetora e Efetora RA. b) Frequência de células T CD4⁺. c) Frequência de células T CD8⁺. d) Frequência de células T CD8⁺ em diferentes estágios de maturação. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01 e ***P $\leq$ 0,001.

Figura 10. Frequência de expressão de CD38 em células T CD8⁺. a) Estratégia de *gate* em células T CD8⁺ para determinar a frequência de expressão de CD38. b) Frequência de células T CD8⁺ que expressam CD38. c) Perfil da expressão de CD38 nas populações de maturação de células CD8⁺. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média ± erro padrão, *P≤0,05, **P≤0,01 e ***P≤0,001.

Figura 11. Frequência de expressão de CD69 em células T CD8⁺. a) Estratégia de *gate* em células T CD8⁺ para determinar a frequência de expressão de CD69. b) Frequência de células T CD8⁺ que expressam CD69. c) Perfil da expressão de CD69 nas populações de maturação de células CD8⁺. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média ± erro padrão, *P≤0,05 e **P≤0,01.

Figura 12. Frequência de expressão de CD95 em células T CD8⁺. a) Estratégia de *gate* em células T CD8⁺ para determinar a frequência de expressão de CD95. b) Frequência de células T CD8⁺ que expressam CD95. c) Perfil da expressão de CD95 nas populações de maturação de células CD8⁺. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, *P $\leq$ 0,05.

Figura 13. Frequência de expressão de PD-1 em células T CD8⁺. a) Estratégia de *gate* em células T CD8⁺ para determinar a frequência de expressão de PD-1. b) Frequência de células T CD8⁺ que expressam PD-1. c) Perfil da expressão de PD-1 nas populações de maturação de células CD8⁺. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01 e ***P $\leq$ 0,001.

Figura 14. Frequência de expressão de CD62L em células T CD8⁺. a) Estratégia de *gate* em células T CD8⁺ para determinar a frequência de expressão de CD62L. b) Frequência de células T CD8⁺ que expressam CD62L. c) Perfil da expressão de CD62L nas populações de maturação de células CD8⁺. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, *P $\leq$ 0,05.

Figura 15. Frequência de expressão de CD127 em células T CD8⁺. a) Estratégia de *gate* em células T CD8⁺ para determinar a frequência de expressão de CD127. b) Frequência de células T CD8⁺ que expressam CD127. c) Perfil da expressão de CD127 nas populações de maturação de células CD8⁺. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média ± erro padrão, *P≤0,05.

4.6. Estimulação das células T CD8⁺ com o *pool* de peptídeos correspondentes a região p24 da Gag do HIV-1

Para avaliar se os indivíduos ENI desenvolvem resposta de células T CD8⁺ HIV-específica, as células T CD8⁺ foram estimuladas com *pools* de peptídeos da proteína Gag do HIV-1. A resposta antígeno-específica mediada pelas células T CD8⁺, foi detectada essencialmente ao *pool* correspondente a p24 da Gag do HIV-1 (*pool* 2). Um aumento significativo da frequência das células T CD8⁺ que expressam granzima B e IFN- γ foi identificada para os grupos ENI e HIV-1, já as células T CD8⁺ CD107a⁺ foram mais elevadas no grupo HIV-1 e as células T CD8⁺ TNF⁺ no grupo ENI em relação ao controle (**Figura 16a**).

Na sequência verificou-se a expressão de CD107a e granzima B nas populações *naive*, memória central, efetora e efetora RA das células T CD8⁺ após estimulação com peptídeos da Gag. A frequência de células T CD8⁺ CD107a⁺ foi significativamente maior nos grupos ENI e HIV, em todas as populações, em relação ao grupo controle (**Figura 16b**). Na população efetora RA do grupo HIV-1, a frequência de CD107a foi mais elevada do que o grupo ENI (**Figura 16b**). Similarmente, a expressão de granzima B nas células T CD8⁺ mostrou-se maior nos grupos ENI e HIV-1, quando comparadas ao grupo controle, além disto, foi observado na população *naive* do grupo HIV-1, uma maior frequência na expressão de granzima B que no grupo ENI (**Figura 16c**).

Entre as populações de células T CD8⁺, foi observado aumento da frequência de expressão de IFN- γ de todas as populações dos grupos ENI e HIV-1 em relação ao grupo controle (**Figura 16d**). A população *naive* do grupo ENI, mostrou maior frequência de expressão de IFN- γ do que o grupo HIV-1 (**Figura 16d**). Similarmente, as células T CD8⁺ secretoras de TNF foram observadas em todos os estágios de maturação, nos grupos ENI e

HIV-1 (**Figura 16e**). Os dados evidenciam que o grupo ENI é capaz de desenvolver resposta ao HIV-1 de maneira semelhante, mas não na mesma magnitude ao grupo HIV-1.

A estimulação com PMA + Ionomicina aumentou significativamente a frequência de células T CD8⁺ que expressam CD107a, IFN- γ ou TNF em relação ao grupo HIV ou ao grupo controle (**Figura 17a**). A expressão de CD107a nas populações de maturação foi mais pronunciada nas células T CD8⁺ CD107a⁺ *naive* e de memória central no grupo ENI do que os grupos HIV-1 e controle (**Figura 17b**). A frequência de expressão de granzima B no grupo HIV-1 mostrou-se mais elevada nas populações *naive* e efetora RA, em relação ao grupo controle (**Figura 17c**). A frequência de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF no grupo ENI foram maiores nas populações *naive*, memória central e efetora, quando comparadas ao grupo HIV-1 e ao grupo controle (**Figuras 17d e 17e**).

O grupo ENI mostrou a resposta das células T CD8⁺ aos peptídeos da p24 do HIV-1, especialmente mediada pela população de memória central, sendo um perfil semelhante ao HIV-1. Já com o estímulo não específico PMA + Ionomicina, o grupo ENI mostrou maior frequência na produção de CD107a e IFN- γ . Essa habilidade das células T CD8⁺ dos indivíduos ENI em produzir moléculas citotóxicas e citocinas pró-inflamatórias, pode representar uma importante mecanismo de resistência a infecção pelo HIV-1.

Figura 16. Resposta das células T CD8⁺ aos peptídeos correspondentes a região e p24 (Gag/HIV-1). As PBMCs foram cultivadas por 6 horas na presença de peptídeos da p24 do HIV-1, e co-estimuladas com anti-CD28 e anti-CD49d. a) Frequência de células T CD8⁺ que expressam CD107a, granzima B, IFN-γ ou TNF. b) Frequência da expressão de CD107a nas populações de maturação das células T CD8⁺. c) Frequência da expressão de granzima B nas populações de maturação das células T CD8⁺. d) Frequência da expressão de IFN-γ nas populações de maturação das células T CD8⁺-p24 específicas. e) Frequência da expressão de TNF nas populações de maturação das células T CD8⁺. Os dados dos valores basais expressos foram subtraídos dos valores estimulados para cada molécula. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média ± erro padrão, *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

Figura 17. Resposta das células T CD8⁺ ao PMA e Ionomicina. As PBMCs foram cultivadas por 6 horas na presença de PMA e ionomicina. a) Frequência de células T CD8⁺ que expressam CD107a, granzima B, IFN- γ ou TNF após estimulação. b) Frequência da expressão de CD107a nas populações de maturação das células T CD8⁺. c) Frequência da expressão de granzima B nas populações de maturação das células T CD8⁺. d) Frequência da expressão de IFN- γ nas populações de maturação das células T CD8⁺. e) Frequência da expressão de TNF nas populações de maturação das células T CD8⁺. Os dados dos valores basais expressos foram subtraídos dos valores estimulados para cada molécula. ENI (n= 19), HIV-1 (n= 16) e controle (n= 17). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01 e ***P $\leq$ 0,001.

5. DISCUSSÃO

O fenômeno da resistência ao HIV-1 evidenciado em 1989 é um indício da heterogeneidade na interação entre o HIV-1 e o hospedeiro humano (MIYAZAWA et al., 2009). Alguns indivíduos submetidos a repetidas exposições ao HIV-1, por via sexual ou sistêmica, permanecem sem sinais de infecção. Esses indivíduos com resistência natural ao HIV-1 são denominados expostos não infectados (ENI). As observações iniciais sugeriram que os indivíduos ENI eram capazes de montar uma resposta do tipo Th1 específica para o HIV-1 (RANKI et al., 1989). Atualmente sabe-se que o fenômeno da resistência ao HIV-1 é mediado por múltiplos fatores, envolvendo tanto a resposta inata quanto a adaptativa (BIASIN, CLERECI e PIACENTINI, 2010).

As células NK e as células T CD8⁺ são as principais células efetoras citotóxicas do sistema imune, e são hábeis em reconhecer células infectadas. Neste estudo foram avaliadas a expressão de receptores de ativação e de inibição nas células NK, e o perfil de resposta das células NK a ligantes (agonistas) sintéticos de TLR-3, TLR-7 e TLR-7/8. Por outro lado, nas células T CD8⁺ além da caracterização da expressão de marcadores de ativação e exaustão, avaliou-se a resposta a peptídeos da Gag do HIV-1, nos indivíduos ENI, HIV-1 e nos indivíduos controles saudáveis.

5.1. Perfil fenotípico e funcional das células NK nos indivíduos ENI

A ativação das células NK é modulada por moléculas de superfície (GUERINI et al., 2010). Nós caracterizamos a frequência de expressão de receptores de ativação e de inibição nas células NK dos grupos estudados.

A infecção crônica pelo HIV-1, frequentemente é acompanhada da redução das células NK na periferia (FAUCI, MAVILIO e KOTTILIL, 2005). Neste estudo foi

observada uma significativa redução das populações de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} no grupo HIV-1. Por outro lado a exposição não alterou a frequência das populações de células NK no grupo ENI.

O CD69 controla a ativação das células NK, e o aumento de sua expressão é associado com resistência ao HIV-1 (RAVET et al., 2007). Curiosamente, os indivíduos ENI mostraram redução da frequência de expressão de CD69, em ambas as populações de células NK. A expressão do CD69 em células NK é inibida por NKG2A, ambas as moléculas pertencem a família da lectina C (BORREGO et al, 1999). A análise da frequência de células que expressam NKG2A, não diferiu entre as populações de células NK, nos grupos estudados. Por outro lado, a análise da intensidade média de fluorescência (MFI) poderá esclarecer se existem diferenças na expressão dessas moléculas entre os grupos.

A morte celular mediada por Fas é uma importante via apoptótica das células NK nos indivíduos infectados pelo HIV-1 (KOTTILIL et al., 2007). O aumento da frequência de CD95 na população CD56^{dim} do grupo ENI sugere que a exposição ao HIV-1 também induz a expressão de CD95, o que representa uma propensão da população CD56^{dim} para apoptose mediada pela via Fas. Curiosamente, o aumento da frequência do CD127, nas populações CD56^{bright} e CD56^{dim} nos grupos ENI e HIV-1, mostra que os órgãos linfóides podem ser acionados para desenvolver células NK nesses indivíduos, uma vez que as células NK que expressam CD127 são originadas nesses compartimentos (LUTHER, WARNER e TAKEI, 2011).

A interação do receptor de ativação NKG2D com seus ligantes MIC ou ULBP (expresso nas células alvo), resulta em reconhecimento e lise de células transformadas e/ou

infectadas (MATUSALI et al., 2013). Recentemente foi demonstrado que a infecção pelo HIV-1 pode inibir esse mecanismo diminuindo a expressão de NKG2D nas células efetoras e pelo aumento do NKG2D na forma solúvel (MATUSALI et al., 2013). O aumento da frequência de NKG2D nas células NK CD56^{bright} do grupo ENI, reflete o estado de ativação dessas células na imunovigilância diante da exposição ao HIV-1. A diminuição de NKG2D na população CD56^{dim} do HIV-1, aparentemente pode reduzir a lise das células alvo mediada por NKG2D. No entanto, foi observado um significativo aumento da expressão de MIC A/B sob as células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} no grupo HIV-1, tornando-as mais susceptíveis a lise mediada por NKG2D.

As células CD56^{dim} do grupo ENI apresentaram uma significativa expressão do receptor inibitório NKB1. Ainda pouco estudado, o NKB1 é um receptor ligado à inibição da lise de células alvo que expressam HLA-Bw4 (LANIER et al., 1995).

Os dados que mais chamaram atenção na análise fenotípica desse estudo, referem-se à expressão de CD94, NKG2C e CD57 na população CD56^{dim} do grupo ENI. Essas moléculas coordenam a maturação das células NK, a resposta citotóxica e geração de células NK de “memória” (LOPEZ-VERGÈS et al., 2010). Os receptores CD94, NKG2C e a molécula CD57 foram intensamente mais expressos na população CD56^{dim} do grupo ENI e diretamente correlacionados com o título de IgG anti-HCMV sérico nesses indivíduos. Esses dados mostraram que as vias envolvidas na expansão das células NK de memória estão preservadas nos indivíduos ENI. No mecanismo de resistência ao HIV-1, a manutenção das vias que regulam a maturação, bem como a geração de células de memória, pode ser um reflexo da eficácia da resposta das células NK nos indivíduos ENI. Esse mecanismo, no entanto não foi exclusivo do grupo ENI, os grupos HIV-1 e controle também mostram correlação entre esses receptores e o título de IgG anti-HCMV.

Coletivamente os dados das análises fenotípicas mostraram que as populações de células NK expressam diferencialmente os receptores de ativação e inibição, e, além disso, a exposição ao HIV-1 modulou o grau de ativação das células NK, com aumento da frequência de células ativadas e de memória principalmente na população CD56^{dim} do grupo ENI.

Neste estudo não foram observadas diferenças significativas na frequência de expressão dos genes KIR entre os grupos. A associação entre o KIR3DS1 e seu ligante HLA-Bw4 é relacionada a resistência a ao HIV-1 em indivíduos ENI, pois elas é uma via de ativação das células NK, que permite a eliminação mais eficiente de células infectadas por HIV-1 (ALTER et al, 2007). Por tanto, no contexto da resistência ao HIV-1 é importante também caracterizar o repertório das moléculas do HLA de classe I, ligantes naturais de KIR.

Os receptores *Toll-like* (TLRs) reconhecem padrões moleculares conservados de bactérias e vírus, e induzem ativação celular e liberação de proteínas (BIASIN, CLERECI e PIACENTINI, 2010). O TLR-3, TLR-7, TLR-8 e o TLR-9 são implicados na resposta antiviral, em particular a fita simples de RNA do HIV ativa os receptores TLR-7 e TLR-8 (BARTON, 2007). A estimulação de TLR-3, TLR-7 e TLR8 nas PBMCs do grupo ENI resultou em aumento da frequência de células NK que expressam granzima B, CD107a, IFN- γ e TNF, em relação ao grupo controle, e algumas vezes até em relação ao grupo HIV-1. Apenas recentemente, a influencia da ativação dos TLRs foi investigada em monócitos de indivíduos ENI (BIASIN, CLERECI e PIACENTINI, 2010). A estimulação de TLR-3, TLR-7 e TLR-7/8 elevou a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , CCL2, CCL3, e da ciclooxygenase 2 (COX2), em indivíduos ENI, e esse efeito não foi decorrente do aumento da expressão dos receptores TLRs envolvidos (BIASIN, CLERECI e PIACENTINI, 2010).

De maneira geral, a estimulação da via TLRs nos indivíduos ENI resultou em uma maior ativação das células NK dos indivíduos ENI, e a nossa hipótese é que a ativação da resposta inata mediada pelas células NK pode interferir na integração do HIV-1, bem como na replicação do vírus. Consistente com essa hipótese, a ativação de PBMCs TLR-7/8 resultou em inibição da replicação do HIV-1 em células T CD4⁺ antes da integração viral, a qual foi acompanhada por mudanças na produção de citocinas (SCHLAEPFER et al., 2006). Por outro lado, em indivíduos infectados por HIV-1, a ativação de células dendríticas plasmocitóides (pDCs) e monócitos com ligantes de TLR-7/8 codificados pelo HIV-1 (sRNA rico em uridina), aumenta o estado de ativação imune, e correlaciona-se com a progressão da doença (MEIER et al., 2007).

No grupo ENI a estimulação com PMA + Ionomicina conferiu forte aumento da frequência das populações de células NK que expressam CD107a, granzima B, IFN- γ e TNF. As células NK dos indivíduos ENI são mais sensíveis a estimulação mediada por PMA + Ionomicina, inicialmente demonstrada em uma coorte de usuários de drogas injetáveis (SCOTT-ALGARA et al., 2003).

Coletivamente o perfil de ativação, a expansão das células NK de memória, aliadas a potente resposta das células NK via TLRs nos indivíduos ENI, podem representar um correlato de proteção ao HIV-1 nesses indivíduos.

5.2. Perfil fenotípico e funcional das células T CD8⁺ nos indivíduos ENI

A infecção por HIV-1 é caracterizada por depleção das células T CD4⁺, e expansão das células T CD8⁺ (CATALFAMO et al., 2011). O grupo HIV-1 desse estudo mostrou redução do número e da frequência de células T CD4⁺ periféricas. Por outro lado, as células T CD8⁺ do grupo HIV-1 mostraram aumento apenas em sua frequência no sangue

periférico. Observou-se em seguida aumento da frequência das células T CD8⁺ de memória central no grupo HIV-1 e curiosamente no grupo ENI. Tanto a infecção por HIV-1, como a exposição ao vírus podem alterar a dinâmica da maturação das células T CD8⁺ (CLERICI et al., 2000).

Nossas análises mostraram que as células T CD8⁺ CD38⁺ periféricas estão aumentadas nos indivíduos ENI, semelhante ao grupo HIV-1. Esse aumento foi observado a partir das células T CD8⁺ *naives* e de memória central. O aumento da ativação imune nos indivíduos ENI pode cooperar para a resistência ao HIV-1, onde elevada frequência de células T CD8⁺ CD38⁺ foi demonstrada em coortes de trabalhadoras do sexo e em casais sorodiscordantes heterossexuais e homossexuais (MIYAZAWA et al., 2009; BIASIN et al., 2000; TRAN et al., 2006; SUY et al., 2007).

Por outro lado, os indivíduos ENI desses estudos também exibiram aumento da frequência de expressão de PD-1 nas células T CD8⁺, semelhante ao grupo HIV-1. O PD-1 é um importante regulador da resposta das células T CD8⁺ antígeno-específica durante infecções crônicas, envolvido na exaustão celular (DURAI SWAMY et al., 2011). Esse aumento foi mais pronunciado nas populações de memória central, efetora e efetora RA do grupo ENI. Esses dados mostraram que as células T CD8⁺ do grupo ENI foram submetidas à regulação da ativação e da exaustão de maneira similar ao grupo HIV-1.

A resposta de células T CD8⁺ HIV-específicas foi caracterizada em trabalhadoras do sexo, em usuários de drogas injetáveis e em casais discordantes (ROWLAND-JONES et al., 1998; MAKEDONAS et al., 2002; LO CAPUTO et al., 2003). As células T CD8⁺ dos indivíduos ENI foram responsivas ao *pool* de peptídeos da Gag correspondente a região da p24, com aumento da frequência de células que expressam CD107a, granzima B, IFN- γ e TNF. Essa resposta foi demonstrada em todas as populações de células T CD8⁺. As células T CD8⁺ HIV-específicas de memória central e efetoras RA exercem um papel

importante na resposta a Gag do HIV-1 em indivíduos ENI, marcada pela produção de IL-2 e IFN- γ (SCHENAL et al., 2005).

Esses resultados mostraram a presença de células T CD8⁺ HIV-específicas nos indivíduos ENI, semelhante ao grupo HIV-1, uma indicação de que houve exposição e montagem da resposta imune HIV-específica nos indivíduos ENI.

A análise futura da frequência de células T CD8⁺ HIV-específicas polifuncionais, será um indicativo da qualidade da resposta antígeno-específica nessa coorte de indivíduos ENI.

6. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que:

- As células NK do grupo ENI mostraram um perfil ativador de expressão de moléculas, em especial de NKG2D, que pode favorecer seu potencial de resposta. Já o grupo HIV-1 mostrou expressão mais proeminente de marcadores inibitórios, como MIC A/B e redução do NKG2D;

Houve expansão do perfil de células NK de memória, particularmente das células NK CD57⁺ nos indivíduos ENI e relação com a soropositividade ao CMV. O grupo HIV-1 mostra que as células NK de memória estão preservadas;

- A estimulação via TLR-3, -7 e 7/8 bem como de PMA e ionomicina, foram capazes de potencializar a resposta citotóxica de ambos subtipos de células NK dos indivíduos ENI, evidenciado a predisposição ativatória da resposta das células NK;
- As células T CD8⁺ mostraram um aumento da frequência de expressão de CD38 e PD-1 nos indivíduos ENI, semelhante aos indivíduos infectados por HIV-1. A exposição contínua ao HIV, e não necessariamente a infecção, é capaz de promover a expressão de marcadores indicadores de ativação/exaustão celular;
- Os indivíduos ENI desenvolveram resposta T CD8⁺ antígeno-específica, de perfil semelhante, mas de provável maior eficácia que nos indivíduos infectados por HIV-1.

- Em conjunto, a resposta citotóxica mediada por células NK e células TCD8⁺, nos indivíduos ENI, devem ser correlatos de proteção à infecção ao HIV-1.

7. REFERÊNCIAS

ALTER, G.; MARTIN, M. P.; TEIGEN, N.; CARR, W. H.; SUSCOVICH, T. J.; SCHNEIDEWIND, A.; STREECK, H.; WARING, M.; MEIER, A.; BRANDER, C.; LIFSON, J. D.; ALLEN, T. M.; CARRINGTON, M.; ALTFELD, M. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. **J Exp Med**, v. 204, n. 12, p. 3027-3036, 2007.

ARASE, H.; MOCARSKI, E. S.; CAMPBELL, A. E.; HILL, A. B.; LANIER, L. L. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. **Science**, v. 296, n. 5571, p. 1323-1326, 2002.

BALLAN, W. M.; VU, B. A.; LONG, B. R.; LOO, C. P.; MICHAËLSSON, J.; BARBOUR, J. D.; LANIER, L. L.; WIZNIA, A. A.; ABADI, J.; FENNELLY, G. J.; ROSENBERG, M. G.; NIXON, D. F. 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**, v. 179, n. 5, p. 3362-3370, 2007.

BARCELLINI, W.; RIZZARDI, G. P.; VELATI, C.; BORGHI, M. O.; FAIN, C.; LAZZARIN, A.; MERONI, P. L. In vitro production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from high-risk HIV-negative intravenous drug users. **AIDS**, v. 9, n. 7, p. 691-694, 1995.

BARTON, G. M. Viral recognition by Toll-like receptors. **Semin Immunol**, v. 19, n. 1, p. 33-40, 2007.

BETTS, M. R.; NASON, M. C.; WEST, S. M.; DE ROSA, S. C.; MIGUELES, S. A.; ABRAHAM, J.; LEDERMAN, M. M.; BENITO, J. M.; GOEPFERT, P. A.; CONNORS, M.; ROEDERER, M.; KOUP, R. A. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4781-4789, 2006.

BIASIN, M.; CAPUTO, S. L.; SPECIALE, L.; COLOMBO, F.; RACIOPPI, L.; ZAGLIANI, A.; BLÉ, C.; VICHI, F.; CIANFERONI, L.; MASCI, A. M.; VILLA, M. L.; FERRANTE, P.; MAZZOTTA, F.; CLERICI, M. Mucosal and systemic immune activation is present in human immunodeficiency virus-exposed seronegative women. **J Infect Dis**, v. 182, n. 5, p. 1365-1374, 2000.

BIASIN, M.; CLERICI, M.; PIACENTINI, L. Innate immunity in resistance to HIV infection. **J Infect Dis**, v. 202, 2010.

BORREGO, F.; ROBERTSON, M. J.; RITZ, J.; PEÑA, J.; SOLANA, R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. **Immunology**, v. 97, n. 1, p. 159-165, 1999.

BOULET S, KLEYMAN M, KIM JY, KAMYA P, SHARAFI S, SIMIC N, BRUNEAU J, ROUTY JP, TSOUKAS CM, BERNARD NF. A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. **AIDS**, v. 22, n. 12, p. 1487-1491, 2008.

BRSAIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV), da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Brasília, DF, 2013. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2012/boletim-epidemiologico-aids-e-dst-2012>. Acesso em: 01 de Dezembro de 2013.

BRINCKS, E. L.; KATEWA, A.; KUCABA, T. A.; GRIFFITH, T. S.; LEGGE, K. L. CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection. **J Immunol**, v. 181, n. 7, p. 4918-4925, 2008.

CARPENTER, L. M.; KAMALI, A.; RUBERANTWARI, A.; MALAMBA, S. S.; WHITWORTH, J. A. Rates of HIV-1 transmission within marriage in rural Uganda in relation to the HIV sero-status of the partners. **AIDS**, v. 13, n. 9, p.1083-1089, 1999.

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

CARRINGTON, M.; NORMAN, P. The KIR Gene Cluster. About Bookshelf [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/about/TOC>. Acesso em: 02 de Novembro de 2013.

CATALFAMO, M.; WILHELM, C.; TCHEUNG, L.; PROSCHAN, M.; FRIESEN, T.; PARK, J. H.; ADELSBERGER, J.; BASELER, M.; MALDARELLI, F.; DAVEY, R.; ROBY, G.; REHM, C.; LANE, C. CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7. **J Immunol**, v. 186, n. 4, p. 2106-2116, 2011

CLERICI, M.; GIORGI, J. V.; CHOU, C. C.; GUDEMAN, V. K.; ZACK, J. A.; GUPTA, P.; HO, H. N.; NISHANIAN, P. G.; BERZOFSKY, J. A.; SHEARER, G. M. Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1. **J Infect Dis**, v. 165, n. 6, p. 1012-1019, 1992.

CLERICI, M.; SARESELLA, M.; COLOMBO, F.; FOSSATI, S.; SALA, N.; BRICALLI, D.; VILLA, M. L.; FERRANTE, P.; DALLY, L.; VIGANO, A. T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. **Blood**, v. 96, n. 12, p. 3866-3871, 2000.

DEAN, M.; CARRINGTON, M.; WINKLER, C.; HUTTLEY, G. A.; SMITH, M. W.; ALLIKMETS, R.; GOEDERT, J. J.; BUCHBINDER, S. P.; VITTINGHOFF, E.; GOMPERTS, E.; DONFIELD, S.; VLAHOV, D.; KASLOW, R.; SAAH, A.; RINALDO, C.; DETELS, R.; O'BRIEN, S. J. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. **Science**, v. 273, n. 5283, p. 1856-1862, 1996.

DIEBOLD, S. S. Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, n. 7, p. 813-823, 2008.

DUNKLE, K. L.; STEPHENSON, R.; KARITA, E.; CHOMBA, E.; KAYITENKORE, K.; VWALIKA, C.; GREENBERG, L.; ALLEN, S. New heterosexually transmitted HIV infections in married or cohabiting couples in urban Zambia and Rwanda: an analysis of survey and clinical data. **Lancet**, v. 371, n. 9631, p. 2183-2191, 2008.

DURAIWAMY, J.; IBEGBU, C. C.; MASOPUST, D.; MILLER, J. D.; ARAKI, K.; DOHO, G. H.; TATA, P.; GUPTA, S.; ZILLIOX, M. J.; NAKAYA, H. I.; PULENDRAN, B.; HAINING, W. N.; FREEMAN, G. J.; AHMED, R. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. **J Immunol**, v. 186, n. 7, p. 4200-4212, 2011.

ELAHI, S.; DINGES, W. L.; LEJARCEGUI, N.; LAING, K. J.; COLLIER, A. C.; KOELLE, D. M.; MCEL RATH, M. J.; HORTON, H. Protective HIV-specific CD8+ T cells evade Treg cell suppression. **Nat Med**, v. 17, n. 8, p. 989-995, 2011.

ERICKSON, A. L.; WILLBERG, C. B.; MCMAHAN, V.; LIU, A.; BUCHBINDER, S. P.; GROHSCOPF, L. A.; GRANT, R. M.; NIXON, D. F. 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**, v. 15, n. 11, p. 1745-1748, 2008.

FAUCI AS, MAVILIO D, KOTTILIL S. NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 11, p. 835-843.

FOWKE, K. R.; NAGELKERKE, N. J.; KIMANI, J.; SIMONSEN, J. N.; ANZALA, A. O.; BWAYO, J. J.; MACDONALD, K. S.; NGUGI, E. N.; PLUMMER, F. A. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. **Lancet**, v. 348, p. 1347-1351, 1996.

GALVANI, A. P.; NOVEMBRE, J. The evolutionary history of the CCR5-Delta32 HIV-resistance mutation. **Microbes Infect**, v. 7, n. 2, p. 302-309, 2005.

GORSKI, K. S.; WALLER, E. L.; BJORNTON-SEVERSON, J.; HANTEN, J. A.; RITER, C. L.; KIEPER, W. C.; GORDEN, K. B.; MILLER, J. S.; VASILAKOS, J. P.; TOMAI, M. A.; ALKAN, S. S. Distinct indirect pathways govern human NK-cell activation by TLR-7 and TLR-8 agonists. **Int Immunol**, v. 18, n. 7, p. 1115-1126, 2006.

GUERINI, F. R.; LO CAPUTO, S.; GORI, A.; BANDERA, A.; MAZZOTTA, F.; UGLIETTI, A.; ZANZOTTERA, M.; MASERATI, R.; CLERICI, M. Under representation of the inhibitory KIR3DL1 molecule and the KIR3DL1+/BW4+ complex in HIV exposed seronegative individuals. **J Infect Dis**, v. 203, n. 9, p. 1235-1239, 2011.

HIRSCH, I.; CAUX, C.; HASAN, U.; BENDRISS-VERMARE, N.; OLIVE, D. Impaired Toll-like receptor 7 and 9 signaling: from chronic viral infections to cancer. **Trends Immunol**, v. 31, n. 10, p. 391-397, 2010.

HUGONNET, S.; MOSHA, F.; TODD, J.; MUGEYE, K.; KLOKKE, A.; NDEKI, L.; ROSS, D.; GROSSKURTH, H.; HAYES, R. Incidence of HIV infection in stable sexual partnerships: a retrospective cohort study of 1802 couples in Mwanza Region, Tanzania. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 30, n. 1, p. 73-80, 2002.

HUNT, P. W.; CARRINGTON, M. Host genetic determinants of HIV pathogenesis: an immunologic perspective. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 3, n. 3, p. 342-348, 2008.

JENNES, W.; EVERTSE, D.; BORGET, M. Y.; VUYLSTEKE, B.; MAURICE, C.; NKENGASONG, J. N.; KESTENS, L. Suppressed cellular alloimmune responses in HIV-exposed seronegative female sex workers. **Clin Exp Immunol**, v. 143, n. 3, p. 435-444, 2006.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 373-384, 2010.

KEDZIERSKA, K.; LA GRUTA, N. L.; STAMBAS, J.; TURNER, S. J.; DOHERTY, P. C. Tracking phenotypically and functionally distinct T cell subsets via T cell repertoire diversity. **Mol Immunol**, v. 45, n. 3, p. 607-618, 2008.

KILSZTAJN, S.; LOPES, E.S.; DO CARMO, M. S.; ROCHA, P. A. Improvement in survival among symptomatic AIDS patients by exposure category in Sao Paulo. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 45, n. 1, p. 342-347, 2007.

KLENERMAN, P.; HILL, A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. **Nat Immunol**, v. 6, n. 9, p. 873-879, 2005.

KOTTILIL, S.; CHUN, T. W.; MOIR, S.; LIU, S.; MCLAUGHLIN, M.; HALLAHAN, C. W.; MALDARELLI, F.; COREY, L.; FAUCI, A. S. Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function. **J Infect Dis**, v. 187, n. 7, p. 1038-1045, 2003.

KOTTILIL, S.; SHIN, K.; JACKSON, J. O.; REITANO, K. N.; O'SHEA, M. A.; YANG, J.; HALLAHAN, C. W.; LEMPICKI, R.; ARTHOS, J.; FAUCI, A. S. Innate immune dysfunction in HIV infection: effect of HIV envelope-NK cell interactions. **J Immunol**, v. 176, n. 2, p. 1107-1114, 2006.

KOTTILIL, S.; JACKSON, J. O.; REITANO, K. N.; O'SHEA, M. A.; ROBY, G.; LLOYD, M.; YANG, J.; HALLAHAN, C. W.; REHM, C. A.; ARTHOS, J.; LEMPICKI, R.; FAUCI, A. S. Innate immunity in HIV infection: enhanced susceptibility to CD95-mediated natural killer cell death and turnover induced by HIV viremia. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 46, n. 2, p. 151-159, 2007.

KRONER, B. L.; ROSENBERG, P. S.; ALEDORT, L. M.; ALVORD, W. G.; GOEDERT, J. J. 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**, v. 7, n. 3, p. 279-286, 1994.

KURT-JONES, E. A.; POPOVA, L.; KWINN, L.; HAYNES, L. M.; JONES, L. P.; TRIPP, R. A.; WALSH, E. E.; FREEMAN, M. W.; GOLENBOCK, D. T.; ANDERSON, L. J.; FINBERG, R. W. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. **Nat Immunol**, v. 1, n. 5, p. 398-401, 2000.

LANIER, L. L.; GUMPERZ, J. E.; PARHAM, P.; MELERO, I.; LÓPEZ-BOTET, M.; PHILLIPS, J. H. The NKB1 and HP-3E4 NK cells receptors are structurally distinct glycoproteins and independently recognize polymorphic HLA-B and HLA-C molecules. **J Immunol**, v. 154, n. 7, p. 3320-3327, 1995.

LANIER, L. L. NK cell recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 225-274, 2005.

LANIER, L. L. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 4, p. 259-268, 2008.

LAWRENCE, C. W.; REAM, R. M.; BRACIALE, T. J. Frequency, specificity, and sites of expansion of CD8⁺ T cells during primary pulmonary influenza virus infection. **J Immunol**, v. 174, n. 9, p. 5332-5240, 2005.

LO CAPUTO, S.; TRABATTONI, D.; VICHI, F.; PICONI, S.; LOPALCO, L.; VILLA, M. L.; MAZZOTTA, F.; CLERICI, M. Mucosal and systemic HIV-1-specific immunity in HIV-1-exposed but uninfected heterosexual men. **AIDS**, v. 17, n. 4, p. 531-539, 2003.

LOPEZ-VERGÈS, S.; MILUSH, J. M.; PANDEY, S.; YORK, V. A.; ARAKAWA-HOYT, J.; PIRCHER, H.; NORRIS, P. J.; NIXON, D. F.; LANIER, L. L. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16⁺ NK-cell subset. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3865-3874, 2010

LUTHER, C.; WARNER, K.; TAKEI, F. Unique progenitors in mouse lymph node develop into CD127⁺ NK cells: thymus-dependent and thymus-independent pathways. **Blood**, v. 117, n. 15, p. 4012-4021, 2011

MAGHAZACHI, A. A. G protein-coupled receptors in natural killer cells. **J Leukoc Biol**, v. 74, n. 1, p. 16-24, 2003.

MARTIN, M. P.; GAO, X.; LEE, J. H.; NELSON, G. W.; DETELS, R.; GOEDERT, J. J.; BUCHBINDER, S.; HOOTS, K.; VLAHOV, D.; TROWSDALE, J.; WILSON, M.; O'BRIEN, S. J.; CARRINGTON, M. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. **Nat Genet**, v. 31, n. 4, p. 429-434, 2002.

MARTINSON, J. J.; CHAPMAN, N. H.; REES, D. C.; LIU, Y. T.; CLEGG, J. B. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. **Nat Genet**, v. 16, n. 1, p. 100-103, 1997.

MATUSALI, G.; TCHIDJOU, H. K.; PONTRELLI, G.; BERNARDI, S.; D'ETTORRE, G.; VULLO, V.; BUONOMINI, A. R.; ANDREONI, M.; SANTONI, A.; CERBONI, C.; DORIA, M. Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during HIV-1 infection and impair NKG2D expression and cytotoxicity of NK cells. **FASEB J**, v. 27, n. 6, p. 2440-2450, 2013.

MAVILIO, D.; BENJAMIN, J.; DAUCHER, M.; LOMBARDO, G.; KOTILIL, S.; PLANTA, M. A.; MARCENARO, E.; BOTTINO, C.; MORETTA, L.; MORETTA, A.; FAUCI, A. S. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on

inhibitory and activating receptors and their functional correlates. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 25, p. 15011-15016, 2003.

MCMICHAEL, A. J.; ROWLAND-JONES, S. L. Cellular immune responses to HIV. **Nature**, v. 410, n. 6831, p. 980-987, 2001.

MAKEDONAS, G.; BRUNEAU, J.; LIN, H.; SÉKALY, R. P.; LAMOTHE, F.; BERNARD, N. F. HIV-specific CD8 T-cell activity in uninfected injection drug users is associated with maintenance of seronegativity. **AIDS**, v. 16, n. 12, p. 1595-1602, 2002.

MEIER, A.; ALTER, G.; FRAHM, N.; SIDHU, H.; LI, B.; BAGCHI, A.; TEIGEN, N.; STREECK, H.; STELLBRINK, H. J.; HELLMAN, J.; VAN LUNZEN, J.; ALTFELD, M. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. **J Virol**, v. 81, n. 15, p. 8180-8191, 2007.

MICHAELIS, M.; DOERR, H. W.; CINATL, J. JR. Oncomodulation by human cytomegalovirus: evidence becomes stronger. **Med Microbiol Immunol**, v. 198, n. 2, p. 79-81, 2009.

MIYAZAWA, M.; LOPALCO, L.; MAZZOTTA, F.; LO CAPUTO, S.; VEAS, F.; CLERICI, M.; for the ESN Study Group. The 'immunologic advantage' of HIV-exposed seronegative individuals. **AIDS**, v. 23, n. 2, p. 161-175, 2009.

MONTOYA, C. J.; VELILLA, P. A.; CHOUGNET, C.; LANDAY, A. L.; RUGELES, M. T. Increased IFN-gamma production by NK and CD3+/CD56+ cells in sexually HIV-1-exposed but uninfected individuals. **Clin Immunol**, v. 120, n. 2, p. 138-146, 2006.

NORMAN, P. J.; HOLLENBACH, J. A.; NEMAT-GORGANI, N.; GUETHLEIN, L. A.; HILTON, H. G.; PANDO, M. J.; KORAM, K. A.; RILEY, E. M.; ABI-RACHED, L.; PARHAM, P. Co-evolution of Human Leukocyte Antigen (HLA) Class I Ligands with Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptors (KIR) in a Genetically Diverse Population of Sub-Saharan Africans. **PLoS Genet**, v. 9, n. 10, 2013.

OWEN, R. E.; HEITMAN, J. W.; HIRSCHKORN, D. F.; LANTERI, M. C.; BISWAS, H. H.; MARTIN, J. N.; KRONE, M. R.; DEEKS, S. G.; NORRIS, P. J.; NIAID Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology. HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. **AIDS**, v. 24, n. 8, p. 1095-1105, 2010.

PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C.; FAUCI, A. S. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **N Engl J Med**, v. 328, n. 5, p. 327-335, 1993.

PHAIR, J. P. Keynote address: variations in the natural history of HIV infection. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.10, n. 8, p. 883-885, 1994.

QUINN TC, WAWER MJ, SEWANKAMBO N, SERWADDA D, LI C, WABWIRE-MANGEN F, MEEHAN MO, LUTALO T, GRAY RH. Viral load and heterosexual

transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. **N Engl J Med**, v. 342, n. 13, p. 921-929, 2000.

RANKI, A.; MATTINEN, S.; YARCHOAN, R.; BRODER, S.; GHAYEB, J.; LÄHDEVIRTA, J.; KROHN, K. T-cell response towards HIV in infected individuals with and without zidovudine therapy, and in HIV-exposed sexual partners. **AIDS**, v. 3, n. 2, p. 63-69, 1989.

RAVET, S.; SCOTT-ALGARA, D.; BONNET, E.; TRAN, H. K.; TRAN, T.; NGUYEN, N.; TRUONG, L. X.; THEODOROU, I.; BARRÉ-SINOUSSE, F.; PANCINO, G.; PAUL, P. Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. **Blood**, v. 109, n. 10, p. 4296-4305, 2007.

ROWLAND-JONES, S. L.; DONG, T.; FOWKE, K. R.; KIMANI, J.; KRAUSA, P.; NEWELL, H.; BLANCHARD, T.; ARIYOSHI, K.; OYUGI, J.; NGUGI, E.; BWAYO, J.; MACDONALD, K. S.; MCMICHAEL, A. J.; PLUMMER, F. A. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. **J Clin Invest**, v. 102, n. 9, p. 1758-1765.

SCHLAEPFER, E.; AUDIGÉ, A.; JOLLER, H.; SPECK, R. F. TLR7/8 triggering exerts opposing effects in acute versus latent HIV infection. **J Immunol**, v. 176, n. 5, p. 2888-2895, 2006.

SCHENAL, M.; LO CAPUTO, S.; FASANO, F.; VICHI, F.; SARESELLA, M.; PIEROTTI, P.; VILLA, M. L.; MAZZOTTA, F.; TRABATTONI, D.; CLERICI, M. Distinct patterns of HIV-specific memory T lymphocytes in HIV-exposed uninfected individuals and in HIV-infected patients. **AIDS**, v. 19, n. 7, p. 653-661.

SCOTT-ALGARA, D.; TRUONG, L. X.; VERSMISSE, P.; DAVID, A.; LUONG, T. T.; NGUYEN, N. V.; THEODOROU, I.; BARRÉ-SINOUSSE, F.; PANCINO, G. Cutting edge: increased NK cell activity in HIV-1-exposed but uninfected Vietnamese intravascular drug users. **J Immunol**, v. 171, n. 11, p. 5663-5667, 2003.

SLYKER, J. A.; LOHMAN-PAYNE, B.; JOHN-STEWART, G. C.; DONG, T.; MBORINGACHA, D.; TAPIA, K.; ATZBERGER, A.; TAYLOR, S.; ROWLAND-JONES, S. L.; BLISH, C. A. The impact of HIV-1 infection and exposure on natural killer (NK) cell phenotype in Kenyan infants during the first year of life. **Front Immunol**, v. 3, n. 399, 2012.

SONG, W.; HE, D.; BRILL, I.; MALHOTRA, R.; MULENGA, J.; ALLEN, S.; HUNTER, E.; TANG, J.; KASLOW, R. A. Disparate associations of HLA class I markers with HIV-1 acquisition and control of viremia in an African population. **PLoS One**, v. 6, n. 8, 2011.

SPITS, H.; BLOM, B.; JALECO, A. C.; WEIJER, K.; VERSCHUREN, M. C.; VAN DONGEN, J. J.; HEEMSKERK, M. H.; RES, P. C. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. **Immunol Rev**, v. 165, p. 75-86, 1998.

STREECK, H.; LICHTERFELD, M.; ALTER, G.; MEIER, A.; TEIGEN, N.; YASSINE-DIAB, B.; SIDHU, H. K.; LITTLE, S.; KELLEHER, A.; ROUTY, J. P.; ROSENBERG, E. S.; SEKALY, R. P.; WALKER, B. D.; ALTFELD, M. Recognition of a defined region within p24 gag by CD8⁺ T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection in individuals expressing protective HLA class I alleles. **J Virol**, v. 81, n. 14, p. 7725-7731, 2007.

SUY, A.; CASTRO, P.; NOMDEDEU, M.; GARCÍA, F.; LÓPEZ, A.; FUMERO, E.; GALLART, T.; LOPALCO, L.; COLL, O.; GATELL, J. M.; PLANA, M. Immunological profile of heterosexual highly HIV-exposed uninfected individuals: predominant role of CD4 and CD8 T-cell activation. **J Infect Dis**, v. 196, n. 8, p. 1191-1201, 2007.

TRAN, H. K.; CHARTIER, L.; TROUNG, L. X.; NGUYEN, N. N.; FONTANET, A.; BARRÉ-SINOUSSE, F. E.; PANCINO, G.; SCOTT-ALGARA, D. Systemic immune activation in HIV-1-exposed uninfected Vietnamese intravascular drug users. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 22, n. 3, p. 255-261, 2006.

UNAIDS, 2013. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/203/gr2013>. Acesso em: 01 de Dezembro de 2013.

ZHANG, G.; CHEN, Y. H. ELDKWA-epitope-specific monoclonal antibodies inhibit HIV env-mediated syncytium formation. **Immunobiology**, v. 207, n. 4, p. 259-264, 2003.

8. ANEXOS

ANEXO 1

Anexo 1. Dados demográficos do grupo HIV-1

Grupo	Tempo de Relacionamento (anos)*	Tempo de diagnóstico da Infecção (anos)	Tratamento	Tempo de Tratamento (anos)
HIV 001	6	0,68	TDF/3TC/EFZ	1
HIV 002	8	3	RTV/AZT/3TC/ATV	3
HIV 003	4	7	sd	sd
HIV 004	18	12	TDF/3TC/EFZ	0,83
HIV 005	0,5	10	TDF/LPV/LPVr	10
HIV 006	20	3	Naive de tratamento	-
HIV 007	18	15	TDF/RTV/DRV/RAL/3TC	15
HIV 010	7	5	sd	sd
HIV 011	15	14	sd	sd
HIV 012	18	9	sd	Sd
HIV 013	20	19	TDF/NVP/3TC	10
HIV 015	22	12	sd	12
HIV 016	15	16	BIOVIL/EFZ	16
HIV 017	21	18	sd	Sd
HIV 018	2	3	TDF/EFZ/3TC	0,83
HIV 019	10	14	BIOVIR/KALETRA	14
HIV 020	3	1,41	TDF/EFZ/3TC	1,33
(n=17)	(12,21±1,81)	(9,53±1,46)		(7,63±1,89)

TDF (Tenofovir), 3TC (Lamivudina), EFZ (Efavirenz), RTV (Ritonavir), AZT (Zidovudina), ATV (Atazanavir), LPVr (Liponavir + Ritonavir), DRV (Darunavir), RAL (Raltegravir), NVP (Nevirapina), BIOVIR (Zidovudina + Lamivudina) e KALETRA (Popinavir + Ritonavir) sd (sem dados). (*) tempo de relacionamento com o atual parceiro.

ANEXO 2. Carta de aprovação do projeto de pesquisa pela CAPPesq. **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 15/07/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0683/09**, intitulado: **"PERFIL DE RESPOSTA INATA INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO COM AGONISTAS DE RECEPTORES TOLL-LIKE EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS E NÃO-INFECTADOS PELO VÍRUS HIV-1"** apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Maria Notomi Sato**

Pesquisador (a) Executante: **Josenilson Feitosa de Lima**

CAPPesq, 16 de Julho de 2009

PROF. DR. CLAUDIO LEONE

Vice - Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br