BRUNA TERESO SANTILLO

**Análise fenotípica e funcional de células dendríticas
polarizadas para o tipo alfa-1 (α -DC1) derivadas de
monócitos de indivíduos infectados pelo 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: Prof(a). Dr(a). Telma Miyuki
Oshiro Sumida

São Paulo

2020

BRUNA TERESO SANTILLO

**Análise fenotípica e funcional de células dendríticas
polarizadas para o tipo alfa-1 (α -DC1) derivadas de
monócitos de indivíduos infectados pelo 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: Prof(a). Dr(a). Telma Miyuki
Oshiro Sumida

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santillo, Bruna Tereso

Análise fenotípica e funcional de células dendríticas polarizadas para o tipo alfa-1 (α -DC1) derivadas de monócitos de indivíduos infectados pelo HIV-1 / Bruna Tereso Santillo -- São Paulo, 2020.

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

Programa de Dermatologia.

Orientadora: Telma Miyuki Oshiro Sumida

Descritores: 1.HIV 2.Células dendríticas 3.Imunoterapia 4.Interferon tipo I 5.Interferon Gama

USP/FM/DBD-028/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho a todas as pessoas portadoras do HIV, especialmente àquelas que fizeram parte desta pesquisa. Dedico de forma especial a estas, não por terem aceitado doar auxílio, mas pela disponibilidade, alegria e esperança que demonstravam naturalmente e que funcionavam como combustível à minha alma impulsionando o meu “querer fazer mais”.

Agradecimentos

Se meu coração ditasse o que existe aqui dentro, não haveria páginas suficientes para expressar o tamanho da gratidão que tenho pelos anjos que passaram por esta trajetória.

Obrigada Deus Pai, por ser fonte de bondade e luz, sempre me auxiliando com muita força e proteção.

Obrigada, Pai (Roberto Santillo) e Mãe (Guida M. G. Tereso Santillo) por terem me proporcionado estrutura familiar, estudo, amor e carinho. Agradeço pelas palavras de tranquilidade e pelos abraços reconfortantes.

Agradeço ao meu marido Thiago Bonatti pela parceria, companheirismo e amor esbanjados durante este ciclo. Obrigada pelas palavras carinhosas, pelos relatos de admiração e por muitas vezes enxergar em mim um algo a mais que eu mesma não conseguia visualizar.

Agradeço a todas as minhas amigas-irmãs (Denise Reis, Laís Teodoro, Alana Dias, Edione Reis, Marcela Vassão, Nathalia Romani e Ana Paula Vieira) por esta amizade tão maravilhosa. Com vocês aprendi o que é ciência, pesquisa, ética, parceria, harmonia e amizade que se originou em meio à pesquisa, mas que se estendeu para além das paredes do LIM56. Tenho um agradecimento especial à Laís Teodoro, pelo auxílio imensurável, pela paciência em me ensinar, pelos conselhos e pelas risadas. Obrigada pela oportunidade e pela bondade. Você é um exemplo de pessoa e profissional!

Agradeço à minha orientadora Dra. Telma Oshiro por ter acreditado em mim desde a iniciação científica e ter fornecido tanta oportunidade de desenvolvimento no LIM56. Obrigada pela paciência, compreensão, cuidado, amizade, ensinamentos e por todo o carinho. No Grupo Telma me senti fazer parte de uma família e isso não seria possível se não tivéssemos uma orientadora como você.

Agradeço à Marina Mazzilli por me permitir desenvolver como orientadora e pelo auxílio nos experimentos.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências LIM56 da FMUSP pelo acolhimento, aprendizado e auxílio.

Agradeço ao Prof. Dr. Alberto da Silva Duarte, pela oportunidade e crescimento no LIM56.

Agradeço à colaboração da Prof^a Bruna Alencar do ICB/USP e das suas alunas Letícia e Taís pela paciência e discussões científicas.

Agradeço ao Departamento de Dermatologia do HC/FMUSP pela oportunidade de ingresso na pós-graduação.

Agradeço aos pacientes pela doação de amostras e colaboração, pois sem eles nada seria possível.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência.

Muito obrigada a todos!

*“Lembremo-nos de que o homem interior se
renova sempre. A luta enriquece-o de
experiência, a dor aprimora-lhe as emoções
e o sacrifício tempera-lhe o caráter. O
Espírito encarnado sofre constantes
transformações por fora, a fim de acrisolar-
se e engrandecer-se por dentro.”
(Chico Xavier)*

Santillo BT. *Análise fenotípica e funcional de células dendríticas polarizadas para o tipo alfa-1 (α -DC1) derivadas de monócitos de indivíduos infectados pelo HIV-1* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Resumo: A imunoterapia baseada em células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) constitui uma estratégia promissora para o manejo de indivíduos infectados pelo HIV podendo atuar como um tratamento complementar para pacientes que fazem uso de terapia antirretroviral. Protocolos para obtenção de MoDCs convencionais, aqui denominadas IL4-DCs, utilizam como mediadores da diferenciação celular as citocinas IL-4 e GM-CSF que originam DCs imaturas com características mielóides. O estímulo das DCs imaturas com citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 ativa as MoDCs tornando-as aptas a apresentar antígenos e iniciar uma resposta imune específica. As IL4-DCs tem demonstrado capacidade de induzir resposta específica de linfócitos T, mas ainda demonstram baixo potencial de migrar para os linfonodos e produzir IL-12p70, essencial para estimular linfócitos Th1. Um protocolo alternativo tem proposto a utilização de interferons dos tipos I e II, além de agonistas de TLR para suplementar o estímulo para ativação de MoDCs. As MoDCs assim estimuladas são denominadas células dendríticas polarizantes para o tipo alfa-1 (α -DC1) e apresentam capacidade de produzir níveis elevados de IL-12p70 levando a uma potente resposta Th1. O potencial terapêutico de α -DC1 foi demonstrado inicialmente em protocolos de imunoterapia para pacientes de tumores e mais recentemente foi desenvolvido protocolo para indivíduos infectados pelo HIV. Há alguns anos nosso grupo de pesquisa está envolvido com protocolo clínico de imunoterapia baseada em IL4-DCs pulsadas com vírus quimicamente inativado. Neste contexto, com o objetivo de buscar alternativas para aperfeiçoar a imunoterapia, a nossa proposta foi avaliar *in vitro* aspectos fenotípicos e funcionais das α -DC1 pulsadas com HIV quimicamente inativado com potencial de aplicação na imunoterapia. Para tanto, foram avaliadas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controle quanto à morfologia, expressão de moléculas de superfície, produção de IL-12p70, capacidade de estimular a produção de IFN- γ e expressão de CD107a em linfócitos T autólogos e capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T alogênicos. Os resultados revelaram que as α -DC1 apresentam maior expressão de CD40, CCR7 e CCR5, quando comparadas às IL4-DCs. Os resultados dos ensaios funcionais demonstraram que as α -DC1 tendem a produzir maiores níveis de IL-12p70 e que ambas α -DC1 e IL4-DCs foram capazes de estimular linfócitos T autólogos de pacientes a produzirem IFN- γ . Ainda, ambas MoDCs foram capazes de induzir a proliferação de linfócitos T alogênicos de pacientes e HIV-. Embora as α -DC1 e IL4-DCs constituam populações distintas de MoDCs, demonstrando potencial de produção de IL-12p70 distintos, observamos que a capacidade de reconhecer e apresentar antígenos virais e estimular resposta de linfócitos T foi semelhante entre estas duas populações.

Descritores: HIV; Células dendríticas; Imunoterapia; Interferon tipo I; Interferon Gama.

Santillo BT. *Phenotypic and functional analysis of alpha-type1 polarized dendritic cells (α -DC1) derived from monocytes of HIV-1 infected subjects* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Abstract: Immunotherapy based on monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) has been shown to be a promising tool for treating HIV-infected individuals, and can act as a complementary treatment for HIV-infected individuals in use of antiretroviral therapy. Protocols for obtaining conventional MoDCs, here called IL4-DCs, use as mediators of cell differentiation the IL-4 and GM-CSF cytokines that originate immature DCs with myeloid characteristics. Stimulation with TNF- α , IL-1 β and IL-6 pro-inflammatory cytokines activates MoDCs making them able to present antigens and initiate a specific immune response. IL4-DCs have shown able to induce specific-T cell response, but still unable to migrate to lymph nodes and increase IL-12p70 production, essential to stimulate Th1 cells. An alternative protocol has proposed the use of type I and II interferons, in addition to TLR agonists to supplement the activation stimulus of MoDCs. These MoDCs are called alpha-type-1 polarized DCs (α -DC1), which have an exuberant capacity to produce high levels of IL-12p70 cytokine and to induce a potent Th1 response, consequently. The therapeutic potential of α -DC1 was first demonstrated in immunotherapy protocols for tumor patients and more recently a protocol has been developed for HIV-infected individuals. For some years, our research group has been involved in a clinical immunotherapy protocol based on IL4-DCs stimulated with chemically-inactivated virus. In this context, the aim of this study was to investigate alternatives to improve immunotherapy with proposing to evaluate in vitro phenotypic and functional aspects of α -DC1 pulsed with chemically inactivated HIV prospecting as a potential application in HIV immunotherapy. For that, α -DC1 and IL4-DCs of HIV+ and HIV- subjects were evaluated for morphology, surface molecule expression, IL-12p70 production, ability to stimulate IFN- γ production and CD107a expression in autologous T lymphocytes and ability to stimulate the proliferation of allogeneic T lymphocytes. The results revealed that α -DC1. The results of functional assays demonstrate that α -DC1 tends to produce higher levels of IL-12p70 and that both α -DC1 and IL4-DCs were able to stimulate IFN- γ -producing autologous T lymphocytes of HIV+ subjects. Also, both of MoDCs were able to induce allogeneic T lymphocytes proliferation of HIV+ and HIV- subjects. Although α -DC1 and IL4-DCs are distinct MoDCs populations that demonstrated different potential to release IL-12p70, we observed that the ability to recognize and present viral antigens and stimulate T lymphocyte response was similar between these two populations.

Descriptors: HIV; Dendritic cells; Immunotherapy; Interferon type I; Interferon-Gamma.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estratégia de análise utilizada na caracterização fenotípica de MoDCs	35
Figura 2 – Estratégia de análise utilizada na caracterização da expressão dos marcadores extracelulares e da proliferação de linfócitos T	38
Figura 3 - Estratégia de análise para a seleção das populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ produtores de IFN- γ e que expressam CD107a (citotóxicos).	42
Figura 4 - Aspecto morfológico de α -DC1 e IL4-DCs de pacientes.	46
Figura 5 – Aspecto morfológico de α -DC1 e IL4-DCs de controles.	47
Figura 6 – Rendimento das α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.	48
Figura 7 - Viabilidade das α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.	49
Figura 8 – Expressão da molécula HLA-DR pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	50
Figura 9 – Expressão da molécula CD86 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	51
Figura 10 – Expressão da molécula CD80 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	52
Figura 11 – Expressão da molécula CD83 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	53
Figura 12 – Expressão da molécula CD40 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	54
Figura 13 – Expressão da molécula CCR7 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	55
Figura 14 – Expressão da molécula CCR6 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	56
Figura 15 – Expressão da molécula CCR5 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	57

Figura 16 – Expressão da molécula CXCR4 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	58
Figura 17 – Expressão da molécula DC-SIGN pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	59
Figura 18 – Expressão da molécula PD-L1 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	60
Figura 19 – Expressão da molécula CD123 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	62
Figura 20 – Expressão da molécula CD56 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	63
Figura 21 – Expressão da molécula CD16 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	64
Figura 22 – Produção de IL-12p70 quantificada em sobrenadantes de cultura de MoDCs.....	66
Figura 23 – Viabilidade de linfócitos alogênicos TCD4+ e CD8+ após 144 horas de cocultivo alogênico (MLR)	67
Figura 24 – Proliferação dos linfócitos T CD4+ e CD8+ estimulados pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles	68
Figura 25 – Viabilidade de linfócitos alogênicos TCD4+ e CD8+ após 144 horas de cocultivo alogênico (MLR).	69
Figura 26 – Produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4+ e CD8+ estimulados pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes.....	70

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características dos pacientes participantes do estudo	30
Tabela 2 - Relação de anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização fenotípica das MoDCs.....	36
Tabela 3 - Relação de anticorpos monoclonais utilizados para avaliar as populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ no ensaio de proliferação	38
Tabela 4 – Relação de anticorpos monoclonais utilizados para avaliação da produção de IFN- γ e expressão de CD107a por linfócitos T	41

Lista de Siglas e Abreviaturas

α -DC1	Células dendríticas polarizadas para o tipo α 1
α -DC1-HIV	α -DC1 pulsada com HIV inativado por AT-2
ADEE	Ambulatório do Departamento de Dermatologia
AF	Alexa fluor
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AIM-V	Meio para imunoterapia adotiva versão 5
APCs	Células apresentadoras de antígenos
APC	Aloficocianina
AT-2	Aldrithiol-2
BDCA	Antígeno de células dendríticas do sangue (do inglês: <i>blood dendritic cells antigen</i>)
BV	Violeta brilhante (do inglês: <i>Brilliant Violet</i>)
CAPPesq	Comissão de ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCR	Receptor para quimiocina CC
CD	Conjunto de diferenciação (do inglês: <i>Cluster of Differentiation</i>)
CD40L	CD40 ligante
CTL	Linfócito T citotóxico (do inglês: <i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CXCR	Receptor para quimiocina CXC
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC1	Células dendríticas polarizadas para o tipo 1
DCs	Células dendríticas (do inglês: <i>dendritic cells</i>)
DC-AD8	Célula dendrítica incubada com HIV infectivo AD8
DC-HIV-AT-2	Célula dendrítica incubada com HIV inativado por AT-2
DC-NI	Célula dendrítica não infectada
DC-SIGN	Molécula não integrina, que capta a molécula de adesão intercelular 3 e específica das células dendríticas (do inglês: <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido

DNAM	Molécula acessória do DNAX (do inglês: <i>DNAX accessory molecule</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEA-1	Antígeno 1 de endossomos iniciais (do inglês: <i>Early Endossomes Antigen 1</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
Env	Envelope
FcγR	Receptor da porção Fc da imunoglobulina G (do inglês: <i>Fc gamma receptors</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos (do inglês: <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
gp	Glicoproteína
HAART	Terapia antirretroviral altamente potente (do inglês: <i>highly active antiretroviral therapy</i>)
HC	Hospital das Clínicas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HIV-AT-2	HIV inativado por AT-2
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano – MHC classe II
ICAM	Molécula de adesão intercelular (do inglês: <i>Intercellular Adhesion Molecule</i>)
iDC	Célula dendrítica imatura
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL4-DC	Células dendríticas diferenciadas de monócitos geradas na presença de GM-CSF e IL-4 e ativadas com TNF-α, IL-1β e IL-6
IL4-DC-HIV	IL4-DC pulsada com HIV inativado por AT-2
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium

LAMP	Proteína associada à membrana do lisossomo (do inglês: <i>Lysosome-associated membrane protein</i>)
LOX	Receptor de lipoproteína de baixa densidade oxidada semelhante à lectina
LPS	Lipopolissacarídeo
mAB	anticorpo monoclonal (do inglês: <i>monoclonal antibody</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1	Proteína-1 inflamatória de macrófagos (do inglês: <i>Macrophage Inflammatory Protein 1</i>)
MFI	Intensidade média de fluorescência (do inglês: <i>mean fluorescence intensity</i>)
MoDCs	Células dendríticas derivadas de monócitos
MOI	Multiplicidade de infecção (do inglês: <i>multiplicity of infection</i>)
NIH	Institutos Nacionais da Saúde (do inglês: National Institutes of Health)
NK	Natural killer
NKG2D	(do inglês: <i>Natural Killer Group 2D</i>)
PAMP	padrões moleculares associados a patógenos (do inglês: <i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PE-Cy	Ficocianina-eritrina
PD-1	Proteína de morte celular programada 1 (do inglês: <i>programmed cell death protein 1</i>)
PD-L1	Ligante de morte celular programada 1 (do inglês: <i>Programmed Death-Ligand 1</i>)
PGE2	Prostaglandina E2
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate

Poly I:C	Ácido polinosínico-policitidínico (do inglês: <i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>)
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão (do inglês: <i>pattern recognition receptor</i>)
PVL	Carga viral plasmática (do inglês: <i>plasma viral load</i>)
Qdot	(do inglês: <i>quantum dot technology</i>)
RANTES	(do inglês: <i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>)
RNA	Ácido ribonucléico (do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAB	Soro tipo AB humano
SFB	Soro fetal bovino
T CD4+	Linfócito T CD4+
T CD8+	Linfócito T CD8*
TCR	Receptor de linfócito T
Th	T auxiliar (do inglês: <i>T helper</i>)
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i> (do inglês: <i>Toll Like Receptor</i>)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNE	TampãoTris/HCl, NaCl e EDTA
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS	26
2.1. <i>Objetivos Gerais</i>	27
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Casuística.....	29
3.2. Cultura viral	31
3.3. Inativação do HIV com aldrithiol-2 (HIV-AT2).....	32
3.4. Purificação dos vírus inativados	32
3.5. Obtenção das amostras	32
3.6. Obtenção de células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs)	33
3.6.1. <i>Obtenção de células dendríticas polarizadas para o tipo $\alpha 1$ (α-DC1)</i>	33
3.6.2. <i>Obtenção de células dendríticas convencionais/ padrão (IL4-DCs)</i>	33
3.7. Determinação do perfil fenotípico das MoDCs	34
3.8. Ensaio para avaliação da produção de IL-12 p70	36
3.9. Reação leucocitária mista (MLR).....	37
3.9.1. <i>Marcação extracelular e análise por citometria de fluxo</i>	37
3.10. Ensaio de cocultivo	39
3.10.1. <i>Marcação extracelular</i>	39
3.10.2. <i>Marcação intracelular</i>	40
3.11. Congelamento e descongelamento de células.....	43
3.12. Análise de resultados	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Avaliação do aspecto morfológico das α -DC1	45

4.3. Avaliação do rendimento e da viabilidade das α -DC1	49
4.4. Avaliação do perfil fenotípico das α -DC1	49
4.4. Produção de IL-12p70	65
4.5. Avaliação do potencial das α -DC1 em estimular a proliferação de linfócitos alogênicos	66
4.6. Avaliação do potencial das α -DC1 em estimular linfócitos TCD4+ e CD8+ autólogos a produzirem IFN- γ	68
4.7. Avaliação do potencial das α -DC1 em estimular linfócitos T CD4+ e CD8+ citotóxicos	71
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
APÊNDICE A – Imagens referentes às culturas de α -DC1 cultivada em placa de cultura sem tratamento e de IL4-DCs cultivadas em placa de baixa adesão.	95
ANEXO I - Publicação de artigos científicos	97
ANEXO II - Ficha do aluno	101
ANEXO III – Aprovação do Comitê de Ética.....	104
ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	106

Introdução

A epidemia da síndrome da imunodeficiência humana adquirida (do inglês, *acquired immunodeficiency syndrome* - aids), causada pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), teve seu início em 1980 e continua sendo um grande causador de mortes, mesmo após o surgimento dos medicamentos antirretrovirais, como a Azidovudina, criada em 1987. Atualmente, existem 37,9 milhões de pessoas vivendo com HIV/aids no mundo (WHO, <https://www.who.int/hiv/data/en/>). As principais vias de transmissão são sexual, compartilhamento de seringas para uso de drogas injetáveis, seguida da transmissão vertical. Nos últimos 12 anos, foram notificados cerca de 300 mil casos de infecção pelo HIV no Brasil. No ano de 2018 foram notificados quase 44 mil casos de infecção pelo HIV e registrados cerca de 40 mil casos de aids. Apesar disso, as taxas de detecção de novos casos de aids foram reduzidas em 17,6% nos últimos 10 anos. Nos últimos 10 anos, verificou-se redução de 24,1% na mortalidade (boletim epidemiológico, 2019)

O HIV é um lentivírus pertencente à família *Retroviridae*, composto basicamente por um invólucro formado por uma bicamada lipídica e um capsídeo com forma cônica, que está associado ao genoma viral, cuja composição compreende duas simples fitas de RNA (1-3). Para que haja a infecção, o HIV liga a glicoproteína presente em seu envelope, a gp120, à molécula CD4 presente na superfície de linfócitos T (também presente, em menor quantidade, em macrófagos e células dendríticas (DCs)). Além da molécula CD4, a infecção pelo HIV requer sua interação com os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 (por este motivo, também são considerados coreceptores da infecção pelo HIV), que se apresentam adjacentes ao receptor CD4. Após o estabelecimento destas interações ocorre a fusão do envelope viral com a membrana da célula, seguida da liberação do capsídeo viral no meio intracelular. Deste, são liberados o genoma e as enzimas virais (transcriptase reversa, integrase e protease), que participam das etapas de integração ao genoma do hospedeiro e posteriormente, replicação viral, utilizando os processos celulares como maquinaria para a produção de novos vírus (revisto por (4)).

A infecção pelo HIV promove a ativação crônica do sistema imune e a depleção maciça de linfócitos T CD4+ provocando um profundo comprometimento da resposta

Introdução

imune do hospedeiro, que culmina em um quadro de imunossupressão profunda, característico da aids (5).

A resposta imune celular desempenha um papel fundamental na patogênese do HIV. Com o auxílio de linfócitos T CD4+, as células T CD8+ específicas ao HIV, que constituem a parte efetora da resposta celular são capazes de eliminar células infectadas pelo HIV, atuando diretamente na citólise de células infectadas e também na secreção de fatores que controlam a replicação viral (6, 7). Além disso, foi demonstrada uma correlação inversa entre a frequência da atividade de linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos ao HIV e a carga viral plasmática em todos os estágios da infecção (8). Soma-se a isto a observação que pacientes não progressores apresentam uma resposta CTL maior do que pacientes progressores (9).

Atualmente a terapia antirretroviral constitui a principal estratégia para o controle da infecção pelo HIV, tanto em nível individual quanto social. De fato, seu uso tornou possível a redução dramática da carga viral dos indivíduos infectados, levando à queda nos índices de mortalidade relacionada à AIDS, além da redução nos níveis de transmissão do vírus (revisto por (10)).

A despeito deste grande avanço, alguns problemas persistem como alterações clínicas e laboratoriais importantes relacionadas ao uso desta terapia, a parcela de pacientes que a despeito do tratamento apresenta um quadro de falência terapêutica, o alto custo da medicação, o risco de desenvolvimento de resistência viral e a necessidade de uso de terapia por toda a vida (revisto por (11)). Além disso, sabe-se que somente o tratamento não é capaz de proporcionar a erradicação definitiva dos vírus (cura esterilizante) devido à persistência dos reservatórios celulares de infecção.

Além dos problemas mencionados, uma limitação chave das drogas antirretrovirais é a incapacidade de restaurar a resposta imune específica anti-HIV (12-14). Neste contexto, a imunoterapia pode representar uma oportunidade para expandir e melhorar a imunidade adaptativa anti-HIV de forma a controlar a infecção viral, o que poderia ser empregada como um complemento ao tratamento. Além disso, o incremento da imunidade adaptativa poderia potencialmente reduzir os reservatórios virais, que combinado a uma terapia altamente potente poderia

Introdução

promover a cura funcional da infecção pelo HIV (15). Ainda, tem sido proposta a combinação entre estratégia de "*shock and kill*" que consiste em ativar reservatórios virais e eliminar os vírus com o uso de drogas altamente potentes, que associada à imunoterapia poderia levar à erradicação destes reservatórios, finalmente promovendo a cura esterilizante da infecção pelo HIV.

Em particular, a imunoterapia com DCs tem sido explorada nos últimos anos pelo seu potencial em induzir imunidade protetora, inicialmente constatada em doenças crônicas, como no câncer. As DCs constituem as principais células apresentadoras de antígenos (APC) do sistema imune e são consideradas sentinelas naturais, por apresentarem alto potencial de acesso aos patógenos invasores uma vez que estão posicionadas em regiões estratégicas do organismo tais como pele, superfícies mucosas e sangue. Nestes locais as DCs, em geral, encontram-se no seu estágio imaturo, durante o qual possuem grande capacidade de reconhecimento, captura e processamento antigênico. O encontro com o patógeno leva à ativação das DCs tornando-as maduras e capazes de aumentar a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe I e II associadas com a apresentação de antígenos (MHC – do inglês: *major histocompatibility complex*), além de elevar os níveis de moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, moléculas de ativação CD83 e CD40 e de receptores de quimiocinas, como o CCR7, que permite a sua migração para órgãos linfóides secundários. Assim, durante o processo de maturação as DCs migram para os órgãos linfóides drenantes e ao atingirem a zona de linfócitos T, encontram-se aptas a apresentarem os antígenos via moléculas de MHC classe I e classe II aos linfócitos T CD8+ e CD4+, respectivamente, sendo capazes de iniciar as respostas imunes mediadas por linfócitos T contra patógenos invasores (16-18).

A população de DCs circulantes é relativamente rara, constituindo menos que 1% do número total de células do sangue (19), por este motivo o emprego de DCs em protocolos terapêuticos só se tornou possível com o desenvolvimento de técnicas capazes de produzir estas células em escalas maiores, através da diferenciação a partir de populações precursoras mais abundantes, como os monócitos (20).

Introdução

No contexto da infecção pelo HIV as DCs são as principais iniciadoras da resposta imune adaptativa, uma vez que a resposta de linfócitos T é dependente da apresentação de antígenos. Deste modo, DCs infectadas apresentando produção de proteínas virais no citosol podem induzir a ativação de linfócitos T CD8+, enquanto proteínas virais, debris de células apoptóticas e antígenos de HIV processados resultam na ativação de células T CD4+ (21). Além disso, as células dendríticas podem processar antígenos extracelulares de HIV por meio do processo de apresentação cruzada. Tal processo requer uma interação adequada do receptor de superfície para HIV e fusão do vírus com a membrana celular. Esta apresentação tem papel crucial na ativação de células T CD8+ (22).

Tais evidências levaram ao desenvolvimento de protocolos de diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos, carreando antígenos de HIV, para o tratamento de indivíduos cronicamente infectados. Até o presente mais de 10 ensaios clínicos de imunoterapia com DCs já foram publicados, totalizando mais de 150 pacientes estudados (revisto por (15, 23)). Em todos os ensaios foi constatado tratar-se de um procedimento seguro, uma vez que efeitos colaterais mínimos foram observados durante a vacinação e seguimento vacinal. Além disso, os resultados clínicos em geral mostram que a imunoterapia é capaz de promover algum grau de imunogenicidade, mas que nem sempre se traduz em impacto sobre a carga viral plasmática durante o seguimento vacinal.

Um ponto importante a ser considerado é que não existe um consenso sobre o protocolo ótimo para a diferenciação de células dendríticas, o melhor método para o carregamento das DCs com antígenos e nem sobre qual imunógeno seria capaz de induzir a melhor resposta imune, de modo que o estabelecimento de um protocolo padrão-ouro ainda constitui um desafio para o sucesso da vacina terapêutica baseada em DCs para indivíduos infectados pelo HIV. Neste sentido, o protocolo mais utilizado para a obtenção de DCs envolve a cultura de monócitos na presença de IL-4 e GM-CSF e posterior ativação das DCs imaturas com estímulo pró-inflamatório, originando as IL4-DCs.

Em um protocolo clínico recentemente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, em fase de publicação, utilizamos IL4-DCs para o tratamento de indivíduos cronicamente infectados. Neste estudo confirmamos a segurança e

Introdução

tolerância do produto vacinal, entretanto, embora num pequeno grupo de pacientes tenhamos observado uma melhora nos níveis de células T CD4+ e carga viral plasmática, estatisticamente não observamos diferenças relevantes entre amostras pré e pós-vacina analisadas quanto à carga viral e níveis de células T CD4+.

Este perfil de resposta não foi observado apenas nos ensaios realizados pelo nosso grupo, mas também por grupos empregando a PGE2 como um componente do coquetel pró-inflamatório (DC padrão). Uma das razões que pode explicar parcialmente os dados obtidos é a inabilidade das IL4-DCs (ou DCs padrão) em produzir IL-12, um fator crítico na indução de respostas do tipo Th1.

Considerando que a alta plasticidade apresentada pelas DCs é dependente da origem precursora e das citocinas presentes no microambiente (24) e que existe a possibilidade da obtenção de DCs derivadas de monócitos (MoDCs), estudos têm mostrado que o cultivo de MoDCs em meio condicionante composto por fatores indutores de respostas do tipo Th1 ou do tipo Th2 pode gerar MoDCs polarizadas direcionadas para gerar estes tipos de respostas. A presença de IFN- γ durante o processo de maturação das MoDCs leva ao desenvolvimento de DC polarizadas para o tipo 1, que é capaz de produzir altos níveis de IL-12 após contato com linfócitos T naive, os quais, por sua vez, são ativados e diferenciados em linfócitos Th1 (25-28).

Neste sentido, trabalhos têm proposto cultivar DCs na presença de interferons dos tipos I e II e agonistas de TLR, originando DCs polarizadas para o tipo $\alpha 1$ (α -DC1), com o objetivo de empregar estas células clinicamente e polarizá-las para a indução de uma resposta específica do tipo Th1 acompanhada de resposta CTL, desejável particularmente no caso de uma infecção viral. Neste contexto, algumas características críticas para a indução de uma resposta Th1 devem ser consideradas: (i) status de maturação plena, (ii) responsividade a quimiocinas de órgãos linfóides secundários e (iii) habilidade em produzir altos níveis da citocina IL-12p70 (29).

O potencial polarizante da α -DC1 foi demonstrado em ensaios *in vitro* utilizando amostras derivadas de indivíduos saudáveis e pacientes de melanoma (29). Posteriormente, resultados promissores foram observados em aplicações clínicas que utilizaram α -DC1 para o tratamento de tumor do tipo glioma (30, 31). Mais

Introdução

recentemente α -DC1 foi avaliada em ensaio clínico para tratamento de indivíduos infectados pelo HIV, utilizando como antígeno células apoptóticas autólogas infectadas pelo HIV-1, mostrando proteção parcial, mas que não é sustentada após interrupção de HAART (32).

A literatura ainda é escassa no estudo das α -DC1 derivadas de monócitos de indivíduos infectados pelo HIV com potencial de aplicação terapêutica. Neste contexto, resultados advindos do presente trabalho podem permitir a compreensão dos aspectos funcionais destas células e fornecer elementos para aperfeiçoar tanto aspectos relacionados à pesquisa básica em projetos *in vitro* para avaliação de DCs de pacientes infectados pelo HIV, quanto projetos de pesquisa clínica de vacinação terapêutica para tratamento de indivíduos infectados pelo HIV.

Neste contexto, considerando que as α -DC1 potencializam uma resposta do tipo Th1, exibindo aumentada produção de IL-12 e intensificando a resposta CTL, nosso objetivo foi avaliar *in vitro* aspectos fenotípicos e funcionais das α -DC1 geradas a partir de monócitos de pacientes infectados pelo HIV e comparar com as células dendríticas convencionalmente utilizadas, as IL4-DCs.

Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar *in vitro* aspectos fenotípicos e funcionais das α -DC1 geradas a partir de monócitos de pacientes infectados pelo HIV e comparar com as células dendríticas convencionalmente utilizadas, obtidas por meio do protocolo IL4-DC.

2.2. Objetivos específicos

Comparar α -DC1 e IL4-DCs com relação à:

- expressão das moléculas de superfície,
- produção das citocinas IL-12p70,
- capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T alogênicos,
- capacidade de estimular resposta específica ao HIV avaliando as populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ quanto à produção de IFN- γ e à expressão de CD107a.

3.1. Casuística

Foram incluídos no estudo 20 indivíduos cronicamente infectados pelo HIV, cujos dados clínicos e laboratoriais estão descritos na Tabela 1. Todos os pacientes apresentavam-se sob o uso de terapia antirretroviral (esquema de tratamento está incluído na Tabela 1) e com contagem mínima de células T CD4+ de 500 células/mm³.

Como fatores de exclusão foram considerados contagem de células T CD4+ inferior a 500 células/mm³, idade inferior a 18 anos, gravidez, condições que pudessem promover alterações da resposta imune, como coinfeções, câncer, tratamento com antiinflamatórios e imunossupressores.

Além do grupo de pacientes foi incluído um grupo controle, constituído por 10 indivíduos não infectados pelo HIV.

Os pacientes foram selecionados no Ambulatório ADEE - 3002 do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. Os indivíduos controle, por sua vez, foram selecionados no Banco de Sangue do Hospital Osvaldo Cruz (doadores de repetição) e do LIM56.

Todos os participantes deste projeto participaram voluntariamente após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com a resolução nº. 466/12 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

O projeto tem a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) sob nº de parecer 1.177.544 aprovado em 05 de agosto de 2015.

Materiais e métodos

Tabela 3 - Características dos pacientes participantes do estudo.

Paciente	Gênero	Idade	Terapia	Contagem de células TCD4+ (célis/ μ L)*	PVL	
					(cópias/mL)*	(log10 cópias/mL)*
P1	M	49	Tenofovir/Emtricitabina + Efavirenz	1126	ND	ND
P2	M	34	Tenofovir/Emtricitabina + Atazanavir/Ritonavir	783	ND	ND
P3	M	41	Tenofovir/Emtricitabina + Efavirenz	732	480	2,681
P4	M	63	Tenofovir/Emtricitabina + Atazanavir/Ritonavir	576	ND	ND
P5	M	52	Tenofovir/Emtricitabina + Efavirenz	751	<40	-
P6	M	54	Tenofovir/Emtricitabina + Efavirenz	649	<40	-
P7	M	44	Tenofovir/Emtricitabina + Efavirenz	1460	ND	ND
P8	F	45	Tenofovir + Efavirenz + Lamivudina	908	ND	ND
P9	M	63	Tenofovir/Emtricitabina + Efavirenz	500	ND	ND
P10	M	49	Tenofovir + Lamivudina + Efavirenz	728	<40	-
P11	M	34	Tenofovir + Lamivudina + Dolutegravir	426	ND	ND
P12	F	43	Tenofovir + Lamivudina + Efavirenz	981	ND	ND
P13	F	50	Tenofovir + Lamivudina + Efavirenz	1201	ND	ND
P15	F	50	Tenofovir + Lamivudina + Dolutegravir	1626	ND	ND
P16	F	27	Tenofovir + Lamivudina + Efavirenz	1736	ND	ND
P17	M	57	Tenofovir + Lamivudina + Efavirenz	981	ND	ND
P19	M	63	Tenofovir + Lamivudina + Efavirenz	719	<40	<1,60
P20	M	59	Tenofovir + Lamivudina + Dolutegravir	833	ND	ND
P21	M	41	Tenofovir + Lamivudina + Efavirenz	771	<40	<1,60
P22	M	55	Tenofovir + Lamivudina + Dolutegravir	1680	ND	ND

* Valores de testes realizados no período mais próximo da coleta da amostra para o estudo.
 Abreviações: ND = Não detectável.

3.2. Cultura de expansão viral

O estímulo utilizado para o pulso das MoDCs foi constituído por um *pool* de isolados de HIV provenientes de 3 pacientes. Os vírus foram quimicamente inativados por meio do uso do aldrithiol-2 (AT-2; ou 2,2'-dipiridildissulfeto), um reagente oxidante capaz de manter a integridade conformacional das proteínas virais e, concomitantemente, neutralizar a infectividade do HIV, por meio de uma modificação covalente das estruturas de zinco do nucleocapsídeo viral (33).

Inicialmente, pacientes HIV+ participantes de um projeto de pesquisa desenvolvido anteriormente por nosso grupo foram submetidos ao procedimento de leucoaférese. Deste material, foram obtidas as PBMCs, as quais foram mantidas em cultura na presença de PBMCs autólogas, juntamente com 1% de fitohemaglutinina (PHA; Gibco, Life Technologies) e 20 UI/mL de IL-2 (PeproTech) para o estímulo da proliferação celular e, conseqüentemente, da replicação viral. Destas culturas foram armazenados os sobrenadantes a -80 °C, cujas alíquotas remanescentes foram utilizadas para iniciar a cultura viral dos isolados que compuseram o pool de vírus utilizado para pulsar as MoDCs do presente projeto. É válido ressaltar que os pacientes foram comunicados e autorizaram o uso do material para o desenvolvimento deste trabalho, através de assinatura do TCLE.

Sendo assim, os isolados virais de 3 indivíduos sabidamente infectados pelo HIV foram adicionados separadamente às culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de doador sadio (cultura alogênica) previamente ativadas por 48 a 72 horas com 1% de fitohemaglutinina (PHA) (Gibco, Life Technologies) e mantidos em meio RPMI1640 (Gibco, Life Technologies) contendo 10% de SFB (Gibco, Life Technologies) e 20 IU/mL de IL-2 (PeproTech) em estufa de CO₂ a 37 °C. O meio foi trocado a cada 3 dias e, semanalmente, as culturas foram realimentadas com PBMCs de doador sadio previamente ativadas com PHA. Sobrenadantes sabidamente positivos para partículas virais de cada cultura foram armazenados a cada repique. As culturas foram monitoradas com relação ao aumento da carga viral, quantificada com relação ao número de partículas virais através da reação de cadeia de polimerase (PCR), utilizando kit Cobas Amplicor (Roche Diagnostics).

3.3. Inativação do HIV com aldrithiol-2 (HIV-AT2)

A inativação dos vírus foi realizada de acordo com protocolo descrito por Rossio *et al* (1998). Em resumo, o volume armazenado de sobrenadante proveniente de cada indivíduo foi incubado com 250 μ M de AT-2 (Sigma-Aldrich) sob agitação constante por 1 hora a 37 °C para inativação. Em seguida, o material foi centrifugado a 3000 g por 20 minutos para remoção de *debris* celulares e concentrado em dispositivo de ultrafiltração Amicon (Millipore) com membrana de 100 kDa, por meio de centrifugação a 3200 g por 20 minutos em cada ciclo.

3.4. Purificação dos vírus inativados

O concentrado dos sobrenadantes contendo as partículas virais foi ultracentrifugado para o isolamento dos vírus em centrífuga L80 Beckman, utilizando rotor de ângulo móvel (SW41 Ti). Para tanto, o material foi acondicionado sobre solução de sacarose a 20% em TNE (20 mM de Tris/HCl, 20 mM de NaCl e 2,5 mM de EDTA), na proporção de 1 parte de sacarose para 2 partes de sobrenadante concentrado e, em seguida, centrifugado a 4 °C por 1 hora a 100.000 g. Após este período, todo o material acima da sacarose foi removido e o *pellet* ressuspensionado em TNE. Foi realizada uma nova centrifugação por mais 1 hora a 100.000 g e em seguida o *pellet* foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640 e quantificado com relação ao número de partículas virais através da reação de cadeia de polimerase (PCR), utilizando kit Cobas Amplicor (Roche Diagnostics).

3.5. Obtenção das amostras

Foram coletados em tubos contendo heparina cerca de 70 mL de sangue periférico de indivíduos infectados pelo HIV. As amostras de controles foram provenientes de câmara de leucorredução cedidas pelo banco de sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz.

PBMCs de pacientes e controles foram separadas por meio de gradiente de densidade Ficoll/Hypaque (GE healthcare). Em seguida, realizamos a purificação de células CD14+ (monócitos) por meio de seleção positiva utilizando *beads*

magnéticas (Miltenyi Biotec). Após purificação, os monócitos foram quantificados e diferenciados em células dendríticas. As células CD14- (predominantemente linfócitos) foram ressuspensas em soro fetal bovino (SFB; Gibco, Life Technologies) contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e congeladas em nitrogênio líquido.

3.6. Obtenção de células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs)

3.6.1. Obtenção de células dendríticas polarizadas para o tipo $\alpha 1$ (α -DC1)

Para o cultivo de α -DC1 utilizamos placa de baixa adesão (Corning), conforme preconizado pelo grupo de pesquisa que desenvolveu este protocolo. A placa de baixa adesão é caracterizada por possuir uma camada de hidrogel ligada covalentemente à superfície dos poços que impede a adesão celular, além de minimizar a absorção de proteínas, ativação de enzimas e ativação celular.

Monócitos foram cultivados a uma concentração de 5×10^5 céls/mL em meio de cultura IMDM (Gibco, Life Technologies) contendo 10% de SFB, 1000 IU/mL de GM-CSF e 1000 IU/mL de IL-4 (PeproTech) durante 5 dias para a obtenção de α -DC1 imaturas. Parte dessas células foi estimulada com um coquetel pró-inflamatório contendo 50 ng/mL de TNF- α , 25 ng/mL de IL-1 β (PeproTech), 20 μ g/mL de Poly-I:C (Sigma), 1000 IU/mL de IFN- α e 1000 IU/mL de IFN- γ (Miltenyi Biotec) por mais 48 horas para a obtenção de α -DC1 maduras. As α -DC1 pulsadas foram obtidas pela incubação de α -DC1 imaturas com HIV inativado por AT-2 (HIV-AT2) durante 2 horas, a um MOI de 30 partículas virais, seguido do estímulo pró-inflamatório (descrito acima) por mais 48 horas.

3.6.2. Obtenção de células dendríticas convencionais/ padrão (IL4-DCs)

Monócitos foram cultivados em placa de cultura sem tratamento para adesão, a uma concentração de 5×10^5 céls/mL e em meio de cultura AIM-V (Gibco, Life Technologies) contendo 500 IU/mL de GM-CSF e 250 IU/mL de IL-4 (PeproTech) durante 5 dias para a obtenção de IL4-DCs imaturas. No 5º dia de cultivo, as IL4-DCs receberam reforço de IL-4 e GM-CSF (mesma concentração adicionada no 1º dia de cultivo). Parte dessas células foi

estimulada com um coquetel pró-inflamatório contendo 50 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL de IL-1 β e 100 ng/mL de IL-6 (PeproTech) por mais 48 horas para a obtenção de IL4-DCs maduras. As IL4-DCs pulsadas foram obtidas pela incubação de IL4-DCs imaturas com HIV-AT2 durante 2 horas, a um MOI de 30 partículas virais, seguido do estímulo pró-inflamatório (descrito acima) por mais 48 horas.

3.7. Determinação do perfil fenotípico das MoDCs

Para a avaliação do perfil fenotípico por citometria de fluxo, a população de células dendríticas foi determinada pelo fenótipo CD14⁻ (marcador de linhagem monocítica, ausente em células dendríticas) e CD11c⁺ (marcador de células dendríticas mielóides). A expressão de moléculas de superfície foi avaliada por meio de anticorpos monoclonais anti-HLA-DR, CD86, CD80, CD83, CD40, CCR7, CCR6, CCR5, CXCR4, DC-SIGN, PD-L1, CD123, CD56 e CD16 (Tabela 2). A viabilidade celular foi monitorada utilizando o *Live&Dead Cell Viability Assay Kit* (Invitrogen). Foram adquiridos no mínimo 30.000 eventos, utilizando o citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Bioscience). A análise do perfil fenotípico das MoDCs foi realizada por meio do software FlowJo V10, seguindo as estratégias de *gate* ilustradas na figura 1.

Materiais e métodos

Figura 1 - Estratégia de análise utilizada na caracterização fenotípica de MoDCs.

Representação gráfica da estratégia de análise utilizada na caracterização dos marcadores extracelulares das MoDCs. Primeiramente avaliamos se houve a presença de interferência no funcionamento dos lasers analisando Time x PE (A). Em seguida, a análise foi realizada de acordo com a seleção de populações celulares na seguinte ordem: população de MoDCs segundo tamanho e granulosidade característicos desse tipo celular (B), população de células vivas (C), população de células CD14- (D), população de células CD11c+ (E) e, por fim, populações celulares expressando simultaneamente as moléculas CD11c e as demais moléculas estudadas (F). O posicionamento dos *gates* utilizados para delimitar as populações de interesse (azul) foi baseado nos *gates* delimitados com base nas células não marcadas (vermelho). As células foram adquiridas por meio do citômetro de fluxo BD LRS Fortessa e a análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo.

Tabela 4 – Relação de anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização fenotípica das MoDCs.

Marcador/ Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Clone	Fabricante
Live/Dead® Fixable Green Cell Stain Kit	FITC	-	Life Technologies
Anti-CD14	Qdot	TüK4	Life Technologies
Anti-CD11c	PE-Cy5	B-ly6	BD Bioscience
Anti-HLA-DR	V500	G46-6	BD Bioscience
Anti-CD86	PE-Cy7	2331 (FUN-1)	BD Bioscience
Anti-CD80	PE	L307.4	BD Bioscience
Anti-CD83	APC	HB15e	BD Bioscience
Anti-CD40	APC-H7	5C3	BD Bioscience
Anti-CCR7	V450	1500503	BD Bioscience
Anti-CCR6	APC	11A9	BD Bioscience
Anti-CCR5	BV421	2D7/CCR5	BD Bioscience
Anti-CXCR4	PE-CF594	12G5	BD Bioscience
Anti-DC-SIGN	PE-Cy7	eB-h209	BD Bioscience
Anti-PD-L1	APC	MIH-1	BD Bioscience
Anti-CD123	BV421	7G3	BD Bioscience
Anti-CD56	PE-Cy7	B159	BD Bioscience
Anti-CD16	PE-CF594	3G8	BD Bioscience

3.8. Ensaio para avaliação da produção de IL-12 p70

MoDCs imaturas, maduras e pulsadas foram plaqueadas em duplicata a uma concentração de $1,25 \times 10^5$ céls/mL ($2,5 \times 10^4$ céls/poço) em placa de 96 poços fundo chato e em seguida estimuladas com $0,25 \mu\text{g/mL}$ de CD40L recombinante (Enzo Life Sciences) durante 24 horas. Após incubação, a placa foi centrifugada por 5 min a 2000 rpm e, em seguida, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C .

A dosagem das citocinas IL-12p70 foi realizada seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante do kit Human IL-12p70 Uncoated ELISA (Invitrogen, Viena, Áustria).

3.9. Reação leucocitária mista (MLR)

A capacidade das MoDCs em estimular a proliferação *in vitro* de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ alogênicos foi avaliada através de ensaio de reação leucocitária mista. Para tanto foi realizada cocultivo de MoDCs de pacientes ou controles com linfócitos de indivíduo não infectado pelo HIV (diferente do indivíduo controle que faz parte do grupo controle), previamente marcados com 2,5 μ M/mL de CFSE.

O cocultivo foi realizado na proporção de 1 MoDC (4×10^5 céls/poço) para 5 linfócitos alogênicos (20×10^5 céls/poço) em placa de 96 poços fundo chato por 144 horas em meio de cultura IMDM contendo 10% SFB (cocultivos contendo α -DC1) ou AIM-V suplementado com 10% de soro AB humano (cocultivos contendo IL4-DCs).

O controle positivo foi composto por linfócitos estimulados por 72 horas com 1% de PHA (Sigma-Aldrich). O controle basal foi composto por linfócitos mantidos em IMDM contendo 10% SFB e/ou AIM-V suplementado com 10% de soro AB humano por 144 horas.

3.9.1. Marcação extracelular e análise por citometria de fluxo

Ao final do cocultivo as células foram coletadas e incubadas por 30 minutos com *Live/Dead Cell Viability* (Life Technologies) em conjunto com os anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD3, CD4 e CD8 (tabela 3) sob refrigeração (4-8 °C) e protegido de luz. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 min e fixadas com a solução de Cytifix (BD Biosciences) por 20 minutos. Por fim, as células foram centrifugadas e ressuspensas em solução isotônica BD FACS Flow (BD Bioscience) e armazenadas a 4 °C até a aquisição no citômetro de fluxo.

Foram adquiridos um mínimo de 60.000 eventos em citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Bioscience). A análise da proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi realizada por meio do software FlowJo V10, seguindo a estratégia de *gate* ilustrada na figura 2.

Materiais e métodos

Tabela 3 - Relação de anticorpos monoclonais utilizados para avaliar as populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ no ensaio de proliferação.

Marcador/ Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante
Live/Dead® Fixable AquaDead Cell Stain Kit	V500	-	Life Technologies
Anti-CD3	PE-Cy 5.5	UCHT1	BD Bioscience
Anti-CD4	PE	RPA-T4	BD Bioscience
Anti-CD8	APC-H7	SK1	BD Bioscience

Figura 2 - Estratégia de análise utilizada na caracterização da expressão dos marcadores extracelulares e da proliferação de linfócitos T.

Representação gráfica da estratégia de análise utilizada na caracterização da expressão dos marcadores extracelulares e da proliferação de linfócitos T. MoDCs imaturas (verde claro) e maduras (verde escuro) foram cocultivadas com linfócitos alogênicos (previamente marcados com CFSE) por 144 horas. O controle basal foi composto apenas de linfócitos (vermelho) e o controle positivo foi composto de linfócitos estimulados com PHA (azul). Primeiramente avaliamos se houve a presença de alguma interferência no funcionamento dos lasers analisando Time x PE (A). Em seguida, a análise foi realizada de acordo com a seleção de populações celulares na seguinte ordem: população de linfócitos segundo tamanho e granulosidade característicos desse tipo celular (B), população de células vivas (C), população de células CD3+ (D), populações expressando simultaneamente os marcadores CD3 e CD4 (E) ou CD8 (H). Por fim, a população de linfócitos T que proliferou foi considerada de acordo com a marcação simultânea de CD3, CD4 ou CD8 e baixa expressão de CFSE (CFSE^{low}) (F, G, I e J). O posicionamento dos *gates* utilizados para delimitar as populações de células proliferativas (verde claro, verde escuro e azul) foi baseado nos *gates* delimitados na condição basal (vermelho) (G e J). As células foram adquiridas por meio do citômetro de fluxo BD LRS Fortaleza e a análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo.

3.10. Ensaio de cocultivo

Com o objetivo de avaliar a capacidade das MoDCs em estimular uma resposta específica através da produção de IFN- γ e em induzir atividade citotóxica, mensurada por meio da expressão do marcador de desgranulação CD107a, realizamos um cocultivo autólogo de MoDCs com linfócitos. Por se tratar de avaliação de resposta imune específica, este ensaio foi realizado somente com amostras de pacientes.

Para tanto, células CD14- (predominantemente linfócitos) conservadas por congelamento foram descongeladas 24 horas antes do início do ensaio de cocultivo e mantidas em meio RPMI contendo 10% SFB. A viabilidade e a contagem das células foram avaliadas utilizando Trypan Blue (Gibco, Lite Technologies).

Para a cocultivo, as células autólogas foram cultivadas na proporção de 1 MoDC (4×10^5 céls/poço) para 5 linfócitos (20×10^5 céls/poço) em placas de fundo U por 96 e 120 horas (conforme cinética previamente estabelecida) em meio de cultura IMDM contendo 10% SFB (cocultivos contendo α -DC1) ou AIM-V suplementado com 10% de soro AB humano (cocultivos contendo IL4-DCs).

Com o intuito de avaliar a capacidade das MoDCs em induzir linfócitos com atividade citotóxica foi adicionado o anticorpo monoclonal anti-CD107a nas últimas 6 horas da cocultivo.

O controle positivo foi composto por linfócitos estimulados com 10 ng/mL de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) e 20 ng/mL de ionomicina (Sigma-Aldrich) durante 25 horas. Como controle positivo de resposta específica, utilizamos linfócitos cocultivados com MoDCs maduras expostos aos peptídeos da proteína gag do HIV por 24 horas. Foram utilizados 8 pools de peptídeos, cujo conjunto compreende a proteína gag completa do HIV. Foi utilizada a concentração de 2 μ g/mL de cada pool. O bloqueador do complexo de Golgi utilizado foi a Brefeldina A (Sigma-Aldrich) adicionada 24 horas antes do término da cocultivo na concentração de 2 μ g/mL.

3.10.1. Marcação extracelular

Ao término do cocultivo, os linfócitos foram coletados para a marcação extracelular utilizando anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD3, CD4 e CD8 (Tabela 4). Como marcador de viabilidade celular utilizamos o

Materiais e métodos

Live&Dead Cell Viability Assay Kit (Invitrogen). As células em processo de marcação foram mantidas sob refrigeração (4-8 °C) e protegidas de luz por 20 minutos. Após centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos com tampão de marcação (PBS 1X contendo 5% de BSA) foi adicionada a solução de fixação Cytofix/Cytoperm (BD Cytofix/Cytoperm® Fixation/Permeabilization Kit), seguida de incubação por 20 minutos sob refrigeração (4-8 °C) e protegida de luz. Após a centrifugação (1500 rpm/ 5 minutos) em tampão de marcação, as células foram ressuspensas, novamente, em tampão de marcação e armazenadas à 4-8 °C e protegidas de luz até a realização da marcação intracelular.

3.10.2. Marcação intracelular

Linfócitos previamente submetidos à marcação extracelular foram submetidos a duas centrifugações (1500 rpm/ 5 minutos) com a solução BD Perm/Wash 1X (BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit) e, em seguida, foram incubados com o mesmo reagente juntamente com o anticorpo monoclonal anti-IFN- γ (Tabela 4) e incubados a 4-8°C e protegidos de luz durante 30 minutos. Posteriormente, as células centrifugadas duas vezes com a solução BD Perm/Wash 1X (BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit). Por fim, as células foram ressuspensas em solução isotônica BD FACS Flow (BD Bioscience) e adquiridas em citômetro de fluxo em até 24 horas.

Materiais e métodos

Tabela 4 – Relação de anticorpos monoclonais utilizados para avaliação da produção de IFN- γ e expressão de CD107a por linfócitos T.

Marcador/ Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante
Live/Dead® Fixable AquaDead Cell Stain Kit	V500	-	Life Technologies
Anti-CD3	V450	UCHT1	BD Bioscience
Anti-CD4	Qdot	S3.5	Life Technologies
Anti-CD8	APC-H7	SK1	BD Bioscience
Anti-IFN-γ	PerCP Cy 5.5	B27	BD Bioscience
Anti-CD107a	APC	H4A3	BD Bioscience

Figura 3 – Estratégia de análise para a seleção das populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ produtores de IFN- γ e que expressam CD107a (citotóxicos).

Representação gráfica da estratégia de análise utilizada na avaliação da produção de IFN- γ ou da expressão de CD107a pelas populações de linfócitos T CD4+ e CD8+. MoDCs maduras e/ou pulsadas (verde claro) foram cocultivadas com linfócitos autólogos por 96 e 120 horas. O controle basal foi composto apenas por linfócitos (vermelho) e o controle positivo foi composto por linfócitos estimulados com PMA/ionomicina (azul). Primeiramente avaliamos se houve a presença de interferência no funcionamento do laser analisando Time x PE (A). Em seguida, a análise foi realizada de acordo com a seleção de populações celulares na seguinte ordem: população de linfócitos segundo tamanho e granulosidade característicos desse tipo celular (B), população de células vivas (C), população de células CD3+ (D), populações expressando simultaneamente os marcadores CD3 e CD4 (E) ou CD8 (G). Por fim, foram selecionadas as populações CD3+CD4+IFN γ + ou CD3+CD4+CD107a+ (F) e CD3+CD8+IFN γ + ou CD3+CD8+CD107a+ (H). O posicionamento dos *gates* utilizados para delimitar as populações de células positivas para IFN- γ ou CD107a (verde) foi baseado nos *gates* delimitados na condição basal (vermelho). As células foram adquiridas por meio do citômetro de fluxo BD LRS Fortessa e a análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo.

3.11. Congelamento e descongelamento de células

Para o congelamento, as células CD14- foram centrifugadas e o pellet ressuspendido em SFB e em seguida igual volume de solução de congelamento (SFB contendo 20% de dimetilsulfóxido – DMSO) foi lentamente gotejado à suspensão celular. Em seguida o material foi transferido para tubos de criopreservação e acondicionados em container para criopreservação com redução gradual de temperatura à taxa de $-1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Em seguida o container foi transferido para freezer -80°C . Após 24 horas, as células foram transferidas para o container de nitrogênio líquido (-196°C).

Para o descongelamento, o tubo criogênico contendo as células foi parcialmente descongelado em banho-maria a 37°C e em seguida seu conteúdo foi transferido para um tubo contendo meio de cultura. As células foram centrifugadas 2 vezes a 1500 rpm por 10 min para remoção completa do DMSO.

3.12. Análise de resultados

A geração dos gráficos e a análise estatística foram realizadas por meio do software Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc). Foi utilizado o teste One-way ANOVA para comparar os diferentes grupos com pós-teste Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos.

Resultados

Resultados

4.1. Avaliação do aspecto morfológico das α -DC1

Monócitos de 20 indivíduos infectados pelo HIV-1 e de 10 doadores sadios foram diferenciados em α -DC1 ou IL4-DCs. Conforme preconizado por protocolos já estabelecidos, e com o objetivo de comparar rigorosamente o protocolo convencional utilizado até o presente com o protocolo desenvolvido pelo grupo do Dr. Robbie Mailliard (Universidade de Pittsburg), pesquisador responsável por descrever as α -DC1 e colaborador no presente trabalho, as α -DC1 foram cultivadas em placas de baixa adesão, enquanto IL4-DCs foram cultivadas em placas sem tratamento.

No 7º dia de cultura, capturamos imagens de ambas α -DC1 e IL4-DCs, nos diferentes estágios de maturação, de pacientes e controles, respectivamente ilustradas nas figuras 4 e 5.

Em ambos os grupos de indivíduos estudados, as α -DC1 formaram agregados celulares, os quais apresentaram aumento tanto em tamanho, quanto em quantidade conforme adição de estímulo pró-inflamatório e, para o grupo de pacientes, pulso viral. Tal característica pode ser claramente visualizada na Figura 4B. Isso provavelmente se deve ao cultivo dessas células em placa de baixa adesão. Por esse motivo, o aspecto morfológico das α -DC1 demonstrou-se, de modo geral, predominantemente arredondado e com prolongamentos citoplasmáticos curtos e/ou retraídos. Tais características apresentaram-se homogêneas entre as α -DC1 imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)].

As IL4-DCs, por sua vez, apresentaram-se ligeiramente mais arredondadas quando imaturas, tornando-se mais delgadas e fusiformes após adição do estímulo para maturação e, no grupo de pacientes, na presença do pulso viral (figura 5), sendo características típicas e esperadas para ambos os grupos de indivíduos estudados, conforme nossa experiência prévia.

É válido comentar que durante os ensaios de padronização, também realizamos o cultivo de α -DC1 de controles (n=5) em placa de cultura sem

Resultados

tratamento e o cultivo de IL4-DCs de indivíduo controle em placa de baixa adesão para buscar compreender se as α -DC1 e IL4-DCs apresentariam diferenças nas características morfológicas devido ao cultivo em placas de cultura distintas. As imagens obtidas podem ser visualizadas no Apêndice. Observamos que as α -DC1 apresentaram-se menos aderentes e ligeiramente mais arredondadas, mas ainda exibiram morfologia muito próxima àquela mostrada pelas IL4-DCs cultivadas na placa sem tratamento. As IL4-DCs, por sua vez, também demonstraram morfologia semelhante às α -DC1 quando cultivadas na placa de baixa adesão, apresentando formação de agregados celulares após adição do estímulo pró-inflamatório e/ou viral. Deste modo, podemos observar que os aspectos morfológicos distintos, observados para IL4-DC e α -DC1 se devem, de modo geral, à natureza da placa em que cada DC foi cultivada.

Em conjunto, os resultados de morfologia apresentada pelas α -DC1 e IL4-DCs maduras e pulsadas de ambos os grupos de indivíduos estudados mostraram-se semelhantes, sugerindo que a presença do vírus inativado não promoveu alterações proeminentes, passíveis de serem detectadas por meio da metodologia utilizada (microscopia óptica, aumento máximo de 400x).

Figura 4 – Aspecto morfológico de α -DC1 e IL4-DCs de pacientes.

Resultados

No 7º dia de cultivo imagens de α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] derivadas de monócitos de pacientes foram capturadas e analisadas por meio de microscopia óptica, com aumento de 400x (A). Em (B) é possível visualizar a formação de agregados celulares na cultura das α -DC1 (aumento de 40x).

Figura 5 - Aspecto morfológico de α -DC1 e IL4-DCs de controles.

α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC) e maduras [mDC(-HIV)] derivadas de monócitos de controles foram obtidas no 7º dia de cultivo e imagens foram capturadas. A análise foi realizada por meio de microscopia óptica, com aumento de 400x.

4.2. Avaliação do rendimento e da viabilidade das α -DC1

Monócitos de ambos os grupos de indivíduos estudados (paciente e controle) foram isolados por meio de seleção positiva de células CD14+ e quantificados após isolamento. Após o processo de diferenciação dos monócitos em α -DC1 e IL4-DCs, as DCs foram coletadas e quantificadas, permitindo avaliar o rendimento das células com base na quantidade inicial de monócitos (figura 6).

Figura 6 – Rendimento das α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A) e controles (B) foram obtidas e quantificadas, permitindo-nos avaliar o percentual do rendimento das MoDCs com base no número inicial de monócitos. Os resultados estão expressos na forma de média do percentual $\pm$ erro padrão.

Resultados

A viabilidade das α -DC1 e IL4-DCs, por sua vez, foi avaliada por meio de citometria de fluxo com base na expressão negativa do marcador de viabilidade Live&Dead (Life Technologies), cujos resultados obtidos estão representados na figura 7. Observamos que, embora na ausência de diferença estatisticamente significativa, as α -DC1 do grupo de pacientes apresentaram-se ligeiramente mais viáveis, quando comparadas às IL4-DCs. No grupo controle, por sua vez, esta tendência não foi observada, mostrando semelhança entre as α -DC1 e IL4-DCs.

Figura 7 – Viabilidade das α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes e controles foram obtidas e marcadas com marcador de viabilidade *Live&Dead*, permitindo-nos avaliar o percentual de células viáveis. Os resultados estão expressos na forma de média do percentual $\pm$ erro padrão.

4.3. Avaliação do perfil fenotípico das α -DC1

α -DC1 e IL4-DCs imaturas, maduras e pulsadas de pacientes e controles foram caracterizadas quanto ao padrão de expressão de algumas moléculas de superfície por meio da técnica de citometria de fluxo. Para tanto, foram utilizados anticorpos para a identificação das moléculas HLA-DR, CD86, CD80, CD83, CD40, CCR7, CXCR4, CCR5, CCR6, PD-L1, DC-SIGN, CD16, CD56 e CD123, avaliadas nas populações de células viáveis, que apresentavam expressão negativa da molécula CD14 e expressão positiva da molécula CD11c (CD14-CD11c+).

Resultados

Os resultados obtidos, representados pelo percentual de células positivas e mediana da intensidade de fluorescência (MFI), estão ilustrados nas figuras 8-21.

A expressão de HLA-DR (molécula do complexo principal de histocompatibilidade humana classe II) (figura 8) observada em amostras de pacientes não mostrou diferenças significativas entre as α -DC1 e IL4-DCs, assim como entre os estágios de maturação. Apesar disso, notamos que após a adição do estímulo pró-inflamatório e/ou viral ambas as MoDCs apresentaram um ligeiro aumento na expressão de HLA-DR. Quando observamos os gráficos da mediana de intensidade fluorescência (MFI), nota-se uma tendência das α -DC1 a apresentar maior capacidade de elevar esta expressão, quando comparadas às IL4-DCs. As α -DC1 e IL4-DCs de controles demonstraram um padrão semelhante na expressão de HLA-DR (figura 8C e 8D).

Figura 8 - Expressão da molécula HLA-DR pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

Resultados

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície HLA-DR. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Com relação à expressão de CD86 (molécula de coestimulação), representada na figura 9, observamos um perfil similar ao observado para expressão de HLA-DR, mostrando α -DC1 e IL4-DCs de pacientes com frequência semelhante na expressão desta molécula (figura 9A). Enquanto que para os níveis de MFI (figura 9B), as α -DC1 maduras apresentaram aumento significativo na expressão de CD86 em relação às α -DC1 imaturas, indicando aumento na densidade da molécula CD86 expressa na superfície das α -DC1 após serem expostas ao estímulo pró-inflamatório. Tal significância não foi observada nas IL4-DCs. α -DC1 e IL4-DCs de controles demonstraram um padrão semelhante na expressão da molécula CD86 (figura 9C e 9D).

Figura 9 - Expressão da molécula CD86 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

Resultados

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície CD86. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Com relação à expressão de CD80 (molécula de coestimulação), ilustrada na figura 10, observamos que tanto as α -DC1, quanto as IL4-DCs de pacientes foram capazes de elevar a expressão desse marcador após estímulo pró-inflamatório e/ou viral. Ainda, as IL4-DCs pulsadas apresentaram aumento significativo no percentual de expressão da molécula CD80 em relação às IL4-DCs imaturas (figura 10A). Tal significância não foi observada nas α -DC1, pois as α -DC1 imaturas parecem expressar níveis mais elevados de CD80 (comparadas às IL4-DCs imaturas), gerando uma mediana de expressão mais próxima das α -DC1 estimuladas [mDC(-HIV) e mDC(+HIV)]. α -DC1 e IL4-DCs de controles demonstraram um padrão semelhante na expressão da molécula CD80 (figura 10C e 10D).

Figura 10 - Expressão da molécula CD80 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

Resultados

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície CD80. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

A molécula CD83 (expressão característica de DCs ativadas) também foi avaliada (figura 13) e, assim como observado na expressão de CD80, tanto as α -DC1, quanto as IL4-DCs de ambos os grupos de indivíduos estudados foram capazes de elevar a expressão desse marcador após estímulo pró-inflamatório e/ou viral. Ainda, este aumento apresentou-se estatisticamente significativo quando observamos a diferença entre as IL4-DCs imaturas e maduras do grupo controle.

Figura 11 - Expressão da molécula CD83 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície CD83. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Resultados

Outro marcador avaliado foi a molécula CD40, cuja expressão é característica de DCs ativadas (figura 12). Observamos que, assim como verificado na expressão das moléculas CD80 e CD83, as α -DC1 e as IL4-DCs de pacientes foram capazes de elevar a expressão desse marcador após estímulo pró-inflamatório e/ou pulso viral, porém as α -DC1 maduras apresentaram um percentual de expressão significativamente maior que as IL4-DCs maduras. Ainda, IL4-DCs maduras foram capazes de elevar significativamente a frequência de CD40 após estímulo de ativação (figura 12A).

Figura 12 - Expressão da molécula CD40 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície CD40. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Resultados

Com o objetivo de avaliar o potencial migratório das células dendríticas, incluímos a análise dos receptores de quimiocinas CCR7, CCR6, CCR5 e CXCR4.

Com relação à expressão de CCR7 (marcador associado à migração para os linfonodos drenantes) (figura 13), observamos que no grupo de pacientes (figura 13 A e 13B) as α -DC1 imaturas, maduras e pulsadas expressaram níveis significativamente maiores da molécula CCR7 em relação às IL4-DCs nos seus respectivos estágios de maturação. Os níveis de MFI, por sua vez, demonstraram-se semelhantes entre as α -DC1 e as IL4-DCs. Os dados gerados de amostras de controles (figura 13C e 13D), embora sem diferenças significativas, demonstraram um percentual similar aos apresentados pelas α -DC1 e as IL4-DC do grupo de pacientes, que indicam maior tendência das α -DC1 expressarem maiores níveis de CCR7.

Figura 13 - Expressão da molécula CCR7 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície CCR7. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Resultados

Em seguida, avaliamos a expressão de CCR6 (marcador associado à migração celular para regiões de mucosa), cujos resultados estão representados na figura 14. No grupo de pacientes (figura 14A e 14B), observamos que ambas MoDCs elevaram os níveis de CCR6 após estímulo de ativação, porém seguido de ligeira redução após pulso viral. No grupo controle (figura 14C e 14D), ambas MoDCs apresentaram expressão semelhante de CCR6.

Figura 14 - Expressão da molécula CCR6 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície CCR6. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Resultados

A análise da expressão de CCR5 e CXCR4 também se mostra de grande importância para este trabalho, uma vez que, além de serem receptores de quimiocinas e fornecerem dados relacionados à migração aos sítios inflamatórios, também apresentam papel de coreceptores na infecção pelo HIV. Os resultados obtidos estão representados nas figuras 15 e 16. Inicialmente, com relação à expressão de CCR5 (figura 15), α -DC1 e IL4-DCs de pacientes (figura 15A e 15B) foram capazes de expressar CCR5, ainda que em níveis reduzidos. Além disso, observamos que as α -DC1 pulsadas foram capazes de expressar níveis percentuais significativamente maiores de CCR5, quando comparadas às IL4-DCs pulsadas (figura 15A). Os níveis de MFI tendem a ser maiores nas α -DC1. No grupo controle (figura 15C e 15D) as α -DC1 maduras expressaram elevado percentual de CCR5, quando comparadas às demais condições, embora sem diferenças significativas.

Figura 15 - Expressão da molécula CCR5 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

Resultados

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície CCR5. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Com relação à expressão de CXCR4 (figura 16), no grupo de pacientes notamos um padrão inverso entre as α -DC1 e as IL4-DCs, ou seja, enquanto as α -DC1 tendem a reduzir os níveis de CXCR4 após estímulo pró-inflamatório e/ou viral, as IL4-DCs aumentam a expressão dessa molécula após serem estimuladas. Este aumento demonstrou-se estatisticamente significativo quando comparamos o percentual de expressão de CXCR4 obtido pelas IL4-DC imaturas em relação às IL4-DCs maduras e pulsadas no grupo de pacientes (figura 16A). No grupo de controles (figura 16C e 16D), observamos elevados percentual e MFI de CXCR4 apresentados, principalmente, pelas α -DC1.

Figura 16 - Expressão da molécula CXCR4 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles

Resultados

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície CXCR4. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Além das moléculas CCR5 e CXCR4, o HIV também é capaz de utilizar outras moléculas presentes na superfície das DCs de modo a favorecer sua persistência. Uma dessas moléculas é o DC-SIGN, uma lectina do tipo-C capaz de reconhecer o HIV. Os resultados, que estão representados na figura 17, mostram que as α -DC1 e IL4-DCs imaturas, de ambos os grupos de indivíduos estudados, tendem a expressar níveis elevados de DC-SIGN e que são reduzidos conforme as MoDCs são expostas o estímulo pró-inflamatório e/ou viral. Esta redução na expressão de DC-SIGN demonstrou-se significativa entre as IL4-DCs imaturas e maduras de pacientes (figura 17A e 17B), o que não foi observado nas α -DC1.

Figura 17 - Expressão da molécula DC-SIGN pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

Resultados

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície DC-SIGN. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Seguindo para a análise da expressão de PD-L1 (molécula associada à regulação da resposta imune), que está representada na figura 18, verificamos que no grupo de pacientes (figura 18A e 18B) ambas MoDCs foram capazes de expressar PD-L1, apresentando aumento na frequência desse marcador quando maduras e pulsadas. Os níveis de MFI (figura 18B) das α -DC1 demonstram-se semelhantes aos exibidos no gráfico de percentual (figura 18A), enquanto que as IL4-DCs maduras e pulsadas mantiveram seus níveis reduzidos (figura 18C). No grupo de controles (figura 18B e 18D), ambas MoDCs também foram capazes de expressar PD-L1, apresentando padrão semelhante ao exibido pelas MoDCs de pacientes.

Figura 18 - Expressão da molécula PD-L1 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

Resultados

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície PD-L1. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Por fim, avaliamos a expressão de algumas moléculas características de DCs plasmocitóides ou células NK, que incluem CD123, CD16 e CD56.

Os dados de expressão de CD123 estão representados na figura 19, na qual podemos observar que nas amostras de pacientes as α -DC1 maduras e pulsadas tendem a aumentar a frequência na expressão dessa molécula em relação às α -DC1 imaturas e tendem a expressar níveis superiores de CD123, quando comparadas às IL4-DCs (figura 19A). Com relação aos níveis de MFI (figura 19B), verificamos que as α -DC1 imaturas apresentaram níveis significativamente superiores às IL4-DCs imaturas. Além disso, diferente ao observado no gráfico de percentual, no gráfico de MFI as α -DC1 imaturas apresentam níveis semelhantes às α -DC1 maduras e pulsadas. No grupo de controles (figura 19C e 19D), as MoDCs exibiram percentual semelhante aos apresentados pelo grupo de pacientes. Contudo, no gráfico de MFI, observamos expressão inversa, na qual as IL4-DCs maduras tendem a expressar maiores níveis de CD123, comparas às demais condições testadas (figura 19D).

Resultados

Figura 19 - Expressão da molécula CD123 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície CD123. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Com relação à expressão de CD56 (figura 20), observamos que tanto as α -DC1 quanto as IL4-DCs de ambos os grupos de indivíduos estudados foram capazes de expressar esse marcador. O percentual e o MFI apresentaram padrão heterogêneo, não sendo identificadas diferenças significativas.

Resultados

Figura 20 - Expressão da molécula CD56 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície CD56. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Por fim, com relação à expressão da molécula CD16 (figura 21), verificamos que nas amostras de pacientes (figuras 21A e 21B) ambas MoDCs foram capazes de expressar esta molécula, ainda que em algumas variáveis essa expressão tenha sido muito reduzida. Os dados de MFI revelaram grande variabilidade na expressão desse marcador exibido por ambas MoDCs. No grupo de controles (figura 21C e 21D), observamos um percentual reduzido em ambas MoDCs, além de não serem observadas diferenças significativas.

Resultados

Figura 21 - Expressão da molécula CD16 pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

No 7º dia de cultivo, α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC(-HIV)] e pulsadas [mDC(+HIV)] de pacientes (A, B) e controles (C, D) foram marcadas com anticorpos específicos para a molécula de superfície CD16. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de mediana da frequência e do MFI com valores mínimo e máximo de detecção.

Resultados

4.4. Produção de IL-12p70

Umas das principais características da α -DC1 é sua exuberante capacidade de produzir IL12p70, polarizando a resposta para o tipo Th1 (Mailliard et al, 2004). Assim, com a finalidade de avaliar a capacidade das α -DC1 em produzir IL-12p70, em comparação com as IL4-DCs realizamos a quantificação desta citocina por ELISA.

Devido a dificuldades técnicas com a estabilidade do CD40L recombinante, a análise das amostras dos indivíduos controle e de parte dos pacientes foi prejudicada, tendo sido possível realizar os ensaios com amostras de apenas um indivíduo sadio e 5 pacientes.

Primeiramente avaliamos a produção da IL-12 p70 no sobrenadante do 7º dia de cultura de α -DC1 e IL4-DCs de pacientes (n=5). Os resultados obtidos (figura 22A) mostraram que, embora não tenhamos observado diferença estatisticamente significativa, as α -DC1 tendem a elevar a produção de IL-12p70 após estímulo pró-inflamatório e/ou viral. As IL4-DCs, por sua vez, apresentaram níveis reduzidos de IL-12p70. Amostras do sobrenadante do 7º dia de cultivo de pacientes foram testadas, mas devido a falhas técnicas não foi possível obter os respectivos dados.

Em seguida, buscamos avaliar o potencial de produção de IL-12p70 após interação com CD40L recombinante, mimetizando a interação DC:linfócito. Para tanto, dosamos a secreção desta citocina no sobrenadante de cultura de α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC (HIV-)] e pulsadas [mDC (HIV+)] de pacientes (n=5) e controle (n=1), após estímulo de CD40L recombinante durante 24 horas (Figura 22B). No grupo de pacientes, observamos que as α -DC1 elevaram significativamente a produção de IL-12p70 quando maduras [mDC (HIV-)] e pulsadas [mDC (HIV+)], diferente do observado nas IL4-DCs (Figura 22A). Estas, por sua vez, apresentaram quantidade reduzida na secreção de IL-12p70, cujos níveis foram semelhantes aos apresentados pelas α -DC1 imaturas.

Embora tenhamos um número amostral de indivíduo controle meramente ilustrativo, observamos um perfil de resposta semelhante ao obtido para os

Resultados

pacientes, no qual as α -DC1 tendem a apresentar potencial superior às IL4-DCs, sugerindo que esta não seja uma característica exclusiva das amostras provenientes dos pacientes.

Figura 22 – Produção de IL-12p70 quantificada em sobrenadantes de cultura de MoDCs.

Após 7 dias de cultivo (A) e após estímulo de 24h com CD40L (B,C), os sobrenadantes de cultura de α -DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC (HIV-)] e pulsadas [mDC (HIV+)] de pacientes (n=5) (A,B) e controle (n=1) (C) foram coletados para dosagem de IL-12p70 por meio de ELISA. Os resultados estão expressos na forma de média da concentração (pg/mL) $\pm$ erro padrão. ** $p < 0,01$.

4.5. Avaliação do potencial das α -DC1 em estimular a proliferação de linfócitos T alogênicos

A capacidade das α -DC1 em estimular a proliferação de linfócitos T alogênicos foi avaliada por meio do cocultivo de MoDCs com linfócitos provenientes de doador sadio (1 MoDC:5 linfócitos) durante 144 horas (6 dias) e monitoramento da divisão celular utilizando CFSE.

Primeiramente avaliamos a viabilidade apresentada pelos linfócitos T após o cocultivo com α -DC1. Para fins comparativos, foram realizados ensaios em paralelo utilizando IL4-DCs. Os resultados (Figura 23) revelam que na maioria das amostras, tanto de pacientes (Figura 23A), quanto de controles (Figura 23B), cerca de 80 a 95% dos linfócitos apresentaram-se viáveis.

Resultados

Figura 23 - Viabilidade de linfócitos alogênicos TCD4+ e CD8+ após 144 horas de cocultivo alogênico (MLR).

Após 144 horas de cocultivo de linfócitos T com α-DC1 e IL4-DCs imaturas (iDC), maduras [mDC (HIV-)] de pacientes (n=9) e controles (n=10), as células foram coletadas e marcadas com o marcador de viabilidade Live&Dead para avaliação da frequência de linfócitos viáveis. Os resultados estão expressos na forma de média da concentração (pg/mL)±erro padrão. ** $p<0,01$.

Em seguida, os percentuais de proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+ foram comparados após estímulo promovido pelas DCs imaturas e maduras. Os resultados apresentados referem-se à diferença entre o percentual da proliferação basal e o percentual da proliferação de linfócitos induzida pelas DCs após 144 horas de cocultivo.

Os resultados obtidos das amostras do grupo de pacientes estão representados na figura 24. Observamos que ambas α-DC1 e IL4-DCs foram capazes de estimular linfócitos T CD4+ e CD8+ alogênicos e em níveis similares, inclusive quando comparamos MoDCs imaturas com suas respectivas MoDCs maduras. Um padrão de resposta semelhante foi demonstrado nos resultados

Resultados

provenientes das amostras de controle, porém com níveis ligeiramente mais elevados e com maior variabilidade entre os indivíduos. Embora não tenhamos encontrado diferenças estatisticamente significativas, as IL4-DCs maduras de controles tendem a promover maior proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+.

Figura 24 – Proliferação dos linfócitos T CD4+ e CD8+ estimulados pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles.

Linfócitos isolados de PBMCs de indivíduo não infectado pelo HIV foram marcados com CFSE e cocultivados durante 144 horas com α -DC1 (branco) e IL4-DCs (preto) imaturas (iDC), maduras [mDC (HIV-)] derivadas de pacientes (n=9; A,C) e controles (n=10; B,D). Ao término do cocultivo, as células foram coletadas e marcadas com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD3, CD4 e CD8 e analisadas por citometria de fluxo. Os dados demonstrados referem-se à diferença (Δ) entre o percentual da proliferação estimulada pelas MoDCs e o percentual de proliferação basal (sem estímulo). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão.

4.6. Avaliação do potencial das α -DC1 em estimular linfócitos TCD4+ e CD8+ autólogos a produzirem IFN- γ

A capacidade funcional das α -DC1 de pacientes em processar e apresentar antígenos de HIV aos linfócitos T e estimular uma resposta específica foi avaliada

Resultados

por meio do cocultivo de α -DC1 maduras e pulsadas com linfócitos autólogos durante 96 e 120 horas (4 e 5 dias). A resposta específica foi mensurada com base na produção da citocina IFN- γ pelas populações de linfócitos T CD4+ e CD8+.

Primeiramente avaliamos a viabilidade apresentada pelos os linfócitos T após serem estimulados por α -DC1 ou IL4-DCs. Os resultados (figura 25) revelam que, na maioria das amostras avaliadas foram obtidos cerca de 60 a 95% de linfócitos viáveis.

Figura 25 - Viabilidade de linfócitos alogênicos TCD4+ e CD8+ após 144 horas de cocultivo alogênico (MLR).

Após 96 e 120 horas de cocultivo de linfócitos T autólogos com α -DC1 e IL4-DCs maduras [mDC (HIV-)], pulsadas [mDC (HIV+)] e na presença de MoDCs maduras juntamente com peptídeos virais ([mDC (HIV-)]) de pacientes (n=13), as células foram coletadas e marcadas com o marcador de viabilidade Live&Dead para avaliação da frequência de linfócitos viáveis. Os resultados estão expressos na forma de média da concentração (pg/mL) $\pm$ erro padrão. ** $p < 0,01$.

Resultados

Em seguida, foi avaliado o potencial das α -DC1 de induzir a ativação de linfócitos Th1. Para fins comparativos, foram realizados ensaios em paralelo utilizando IL4-DCs. Os resultados apresentados na figura 25 se referem à diferença entre o percentual de linfócitos T produtores de IFN- γ na ausência das MoDCs (cultura contendo apenas linfócitos) e o percentual de linfócitos T produtores de IFN- γ na presença das α -DC1 e IL4-DCs após 96 ou 120 horas de cocultivo.

Diferente do esperado, os resultados, representados na Figura 26, mostraram que tanto as α -DC1 quanto as IL4-DCs pulsadas exibiram potencial semelhante em relação às α -DC1 e IL4-DCs maduras (não pulsadas pelo HIV-AT2). Além disso, o percentual médio da produção de IFN- γ apresentou-se semelhante entre as culturas estimuladas com α -DC1 ou IL4-DCs, não tendo sido observadas diferenças significativas.

Utilizamos como controle positivo da resposta específica ao HIV peptídeos que compõem a proteína gag do vírus. Nesta condição, notamos tendência no aumento na produção de IFN- γ por linfócitos TCD4+ cocultivados em conjunto às α -DC1 e IL4-DCs maduras após 96 e 120 h, respectivamente. Novamente, diferente do esperado, não observamos aumento na resposta de linfócitos TCD8+ induzida pelas α -DC1, conforme descrito na literatura.

Figura 26 – Produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4+ e CD8+ estimulados pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes.

Resultados

Linfócitos TCD4+ (A,B) e CD8+ (C,D) de foram cocultivados durante 96 (A,C) e 120 horas (B,D) com α -DC1 (branco) e IL4-DCs (preto) maduras [mDC (HIV-)], pulsadas [mDC (HIV+)] e na presença de MoDCs maduras juntamente com peptídeos virais ([mDC (HIV-)]) de pacientes (n=13). Ao término do cocultivo as células foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos para as moléculas CD3, CD4 e CD8 e para a citocina IFN- γ e analisadas por citometria de fluxo. Os dados demonstrados referem-se à diferença (Δ) entre a porcentagem de células produtoras de citocina estimuladas pelas MoDCs e a porcentagem basal de células produtoras de citocina (sem estímulo). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$.

4.7. Avaliação do potencial das α -DC1 em estimular linfócitos T CD4+ e CD8+ citotóxicos

A capacidade funcional das α -DC1 de pacientes em processar e apresentar antígenos de HIV aos linfócitos T e estimular linfócitos T citotóxicos foi avaliada por meio do cocultivo de α -DC1 maduras e pulsadas com linfócitos autólogos durante 96 e 120 horas.

A identificação de linfócitos T CD4+ e CD8+ citotóxicos foi avaliada por meio da expressão de CD107a, uma vez que este marcador está associado à presença de vesículas responsáveis pela liberação de perforina (proteína liberada pelo linfócito citotóxico, que induz a formação de poros na célula alvo).

Os resultados obtidos (figura 26) revelam que as ambas α -DC1 e IL4-DCs foram capazes de estimular linfócitos T CD4+ e CD8+ citotóxicos. O padrão de expressão apresentou-se, de modo geral, variável entre os indivíduos quando analisamos a população de linfócitos T CD4+ em ambos os tempos de cocultivo (96 e 120 horas). Apesar desta variabilidade, a média na frequência da expressão de CD107a parece ser elevada quando os linfócitos T CD4+ estão na presença das α -DC1 e IL4-DCs maduras e, principalmente, pulsadas.

A população de linfócitos T CD8+, por sua vez, demonstrou níveis de expressão mais homogêneos que a população de linfócitos T CD4+, mas com tendência semelhante no aumento de células citotóxicas quando na presença das MoDCs pulsadas, especialmente as α -DC1 pulsadas após 4 dias de cocultivo.

Isso pôde ser verificado em ambas as populações de linfócitos T estudadas e em ambos os tempos de cocultivo.

Resultados

Figura 26 - Linfócitos T CD4+ e CD8+ citotóxicos estimulados pelas α -DC1 e IL4-DCs de pacientes.

Linfócitos TCD4+ (A,B) e CD8+ (C,D) de foram cocultivados durante 96 (A,C) e 120 horas (B,D) com α -DC1 (branco) e IL4-DCs (preto) maduras [mDC (HIV-)], pulsadas [mDC (HIV+)] e na presença de MoDCs maduras juntamente com peptídeos virais ([mDC (HIV-)]) de pacientes (n=9). Nas últimas 6 horas de cocultivo o anticorpo monoclonal anti-CD107a foi adicionado à cultura. Ao término das 96 e 120 horas, as células foram coletadas e marcadas com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD3, CD4 e CD8. O percentual de linfócitos expressando CD107a foi analisado por citometria de fluxo. Os dados demonstrados referem-se à diferença (Δ) entre a porcentagem de células citotóxicas estimuladas pelas MoDCs e a porcentagem basal de células citotóxicas (sem estímulo). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão.

Discussão

A habilidade das DCs em induzir e coordenar uma resposta imune antígeno-específica faz dessas células ferramentas potenciais em estratégias de imunoterapia. Considerando que nossa linha de pesquisa consiste no desenvolvimento de imunoterapia baseada em MoDCs para o tratamento de indivíduos infectados pelo HIV e o interesse e a necessidade de aperfeiçoar o produto vacinal, o objetivo deste estudo foi analisar as α -DC1 derivadas de monócitos de pacientes e indivíduos controles com relação ao perfil fenotípico e funcional e comparar com MoDCs convencionais, denominadas IL4-DCs.

Por se tratar de uma comparação entre o produto vacinal obtido através de protocolo convencional atualmente em uso e que inclusive já foi testado pelo nosso grupo em um ensaio clínico, e um produto desenvolvido através de protocolo distinto, desenvolvido por nossos colaboradores da Universidade de Pittsburgh, a comparação entre os dois produtos foi realizada pareadamente, sendo cada produto rigorosamente preparado conforme preconizado em cada protocolo, o que inclui concentrações e composições diferentes de citocinas de diferenciação e ativação, placas especialmente tratadas para adesão celular e meio de cultura distinto. Deste modo, algumas diferenças encontradas entre α -DC1 e IL4 DCs podem não estar relacionadas com a natureza de cada tipo celular, mas a detalhes inerentes a cada protocolo, por exemplo o uso de placa de baixa adesão para o protocolo α -DC1. Vale ressaltar que teria sido importante comparar as MoDCs estudadas em cada condição, entretanto, devido à limitação no volume de amostras, estes ensaios-controle não puderam ser realizados.

Com o propósito de estudar a morfologia apresentada pelas MoDCs, avaliamos as células nos diferentes estágios de maturação. As IL4-DCs exibiram características típicas, que incluem aspecto irregular com longos e delgados prolongamentos citoplasmáticos, quando estimuladas, e aspecto mais regular e arredondado com poucos e pequenos prolongamentos, quando não estimuladas (16, 17). As α -DC1, por sua vez, pelo fato do seu cultivo ter sido realizado em meio IMDM contendo soro fetal bovino e, ainda, em placa de baixa adesão, apresentaram-se em suspensão no meio de cultura e com formação de agregados celulares, especialmente após serem estimuladas. Após a maturação, normalmente as DCs elevam a expressão de moléculas de adesão conhecidas por auxiliar na

Discussão

interação DC-linfócito T (16), porém essas moléculas também podem estar associadas à formação de agregados de DCs, uma vez que estas células deixam de se agregar quando ICAM-1 (CD54), por exemplo, é bloqueada (45). Ainda, parece que a quantidade e/ou o tamanho dos agregados de DCs está estritamente relacionada com o seu grau de ativação (quanto mais ativada, maior o número e/ou a quantidade de agregados) (45). Portanto, a formação de *clusters* não parece depender do protocolo de obtenção de DCs, uma vez que investigamos o cultivo das α -DC1 em placa sem tratamento e o cultivo das IL4-DCs em placa de baixa adesão. Deste modo, a formação dos agregados pode estar associada ao nível de ativação da célula.

Por sua vez, os valores de rendimento e viabilidade das MoDCs, podem ter sido influenciados pelo uso da placa de baixa adesão no protocolo de obtenção das α -DC1, pois a principal função do tratamento em sua superfície é reduzir a aderência das células, o que facilita a coleta após a diferenciação ou ativação. Tal fato diminui o tempo de manipulação para recuperação das células e elimina a etapa de descolamento mecânico (procedimento necessário para a coleta das IL4-DCs), o que, ao final do processo, diminui a perda celular em número ou em viabilidade, aumentando o rendimento final.

As MoDCs são células potencialmente plásticas, que apresentam características fenotípicas e funcionais distintas dependendo do microambiente a que são expostas. Basicamente, as MoDCs podem apresentar-se nos estados imaturo (ou não estimulado) e maduro (ou estimulado), cuja transição de um estado ao outro, respectivamente, caracteriza o processo de maturação. Neste processo, as MoDCs sofrem alterações na expressão de moléculas de superfície, que auxiliam na caracterização dos estados de diferenciação e ativação, perfil migratório, entre outras características. Neste contexto, quando expostas a agentes infecciosos e/ou estímulos pró-inflamatórios, as DCs passam pelos processos de maturação para se tornarem capazes de migrar aos órgãos linfóides secundários e desencadear uma resposta imune, passando a elevar a expressão de moléculas necessárias para esse processo, tais como: HLA-DR (MHC de classe II) e CD80 e CD86, que são moléculas envolvidas na apresentação antigênica e na coestimulação de linfócitos, respectivamente (17). Sabendo disso, avaliamos a expressão dessas moléculas nas

Discussão

MoDCs estudadas, as quais demonstraram um perfil condizente com o processo de maturação, tendo sido observado um aumento na expressão das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 após estímulo de ativação, resultando em α -DC1 e IL4-DCs maduras, capazes de gerar os 2 primeiros sinais de ativação necessários para estimular linfócitos T CD4+, quando em contato com os mesmos (46).

A expressão de CD80, em especial, mostrou-se significativamente maior nas IL4-DCs pulsadas com HIV-AT2 em relação às IL4-DCs imaturas, o que não foi observado nas α -DC1. Nota-se que as α -DC1 imaturas tenderam a apresentar expressão basal um pouco mais elevada quando comparadas às IL4-DCs imaturas. Essa tendência também pode ser vista na expressão dos marcadores CD86, CD83 e CD40. As citocinas utilizadas para a diferenciação de monócitos em DCs, em ambos os protocolos foi GM-CSF e IL-4, porém em concentrações diferentes, de acordo com cada protocolo. Para a diferenciação de monócitos em α -DC1 imaturas foram utilizadas cerca de 2 e 4 vezes mais GM-CSF e IL-4, respectivamente, com relação às concentrações utilizadas para a diferenciação em IL4-DCs imaturas. O fato das α -DC1 terem seus níveis basais, aparentemente, mais elevados pode ser explicado pela maior concentração de GM-CSF utilizada, pois esta citocina que foi inicialmente identificada como um fator de crescimento hematopoiético tem demonstrado funções importantes associadas à ativação da população celular mieloide, inclusive de MoDCs (revisado por (47)). Considerando que o GM-CSF pode ser produzido durante a inflamação ou infecção por uma variedade de células, como as células T, desse modo promovendo a ativação das DCs (revisado por (47)), ensaios avaliando GM-CSF produzido por células T CD8+ estimuladas com anti-CD3/CD28 e cocultivadas com DCs, exibiu capacidade de estimular as DCs, induzindo o aumento de moléculas coestimuladoras (48).

As MoDCs ativadas geralmente apresentam alta expressão de CD83, uma molécula membro da superfamília das imunoglobulinas que pode apresentar-se na forma solúvel e na forma ligada à membrana celular. Quando solúvel apresenta função imunossupressora e quando ligada à superfície celular, exibe função oposta, pois tem sua expressão associada às células ativadas, incluindo as DCs. A partir daí, as DCs ativadas passaram a ser definidas pela alta expressão de CD83 (49-51). Essa molécula também está positivamente relacionada com a expressão de MHC de

Discussão

classe II e CD86, com a proliferação e produção de IFN- γ pelos linfócitos T alogênicos e autólogos, respectivamente (52, 53). α -DC1 e IL4-DCs de pacientes e controles foram capazes de elevar a expressão de CD83 após estímulo de ativação e/ou pulso viral, indicando que os estímulos de ativação utilizados (coquetel pró-inflamatório e HIV-AT2) promoveram a ativação das MoDCs e em níveis similares quando comparadas tanto com relação ao percentual de expressão, quanto o MFI.

As α -DC1 tem como principal característica a produção estável de IL-12 após estímulo pró-inflamatório, sendo a interação entre as moléculas CD40-CD40 ligante (CD40L) o estímulo primordial para a produção desta citocina (55). Diversos estudos avaliaram a produção de IL-12p70 após reestímulo das α -DC1 maduras com CD40L recombinante ou com células expressando CD40L (linfócitos T ou células de linhagem) por meio de cocultivo, obtendo-se elevada produção de IL-12 como resultado unânime (29, 56-58). Ainda, quando comparadas com outras MoDCs obtidas através de protocolos diversos, demonstraram maior potencial de secreção (59).

Além disso, as α -DC1 são capazes de formar uma rede reticulada de nanotúbulos entre elas, que constitui basicamente na formação de projeções citoplasmáticas longas e ultrafinas capazes de comunicar uma célula à outra. Essa rede de comunicação entre as α -DC1 permite o transporte de organelas, íons, citocinas, entre outros componentes celulares, como moléculas de MHC acopladas aos antígenos, podendo transferir informações para DCs foliculares, por exemplo, favorecendo a amplificação da resposta imune (60).

Com base nisso, tornou-se fundamental a investigação da expressão de CD40 pelas α -DC1, assim como o seu potencial de produção de IL-12p70. Os resultados obtidos mostraram que α -DC1 apresentaram elevado percentual na expressão de CD40 já no seu estado não estimulado, com aumento dos níveis após estímulo pró-inflamatório e/ou viral e significativamente maiores em relação às IL4-DCs (α -DC1 madura VS IL4-DC madura). Em concordância com esses dados, ensaios avaliando a produção de IL-12p70 mostraram claramente o potencial superior das α -DC1 em produzir essa citocina, principalmente após interação com CD40L recombinante.

Para que ocorra a interação DC-linfócito T e consequente produção de IL-12 é necessária a migração das DCs para os órgãos linfóides secundários. O receptor de quimiocinas CCR7 e seus ligantes CCL19 e CCL21 são cruciais para que ocorra esta migração, uma vez que estão envolvidos no *homing* de células T e de DCs para as áreas dos linfonodos onde ocorre a interação DC-linfócito T e o início da resposta imune adaptativa (revisto por (61)). Comparadas às IL4-DCs, as α -DC1 exibiram maior expressão da molécula CCR7, sugerindo maior potencial destas células para migração aos órgãos linfóides secundários.

Além da molécula CCR7, também avaliamos a expressão de outros receptores de quimiocinas envolvidos na migração das DCs, são eles: CXCR4, CCR5 e CCR6.

Primeiramente, com relação à molécula CXCR4, as α -DC1 de pacientes apresentaram leve redução na expressão desse marcador após serem estimuladas, enquanto que as IL4-DCs exibiram perfil inverso, apresentando diferença significativa entre as IL4-DCs não estimuladas e estimuladas. Sabe-se que durante a resposta imune *in vivo* ocorre uma regulação positiva na expressão de CXCR4 durante a maturação das DCs, que migram para sítios inflamatórios (p. ex. linfonodos drenantes) em resposta à quimiocina CXCL12 (62). Além disso, foi demonstrado que a CXCL12 controla simultaneamente a quimiotaxia e a sobrevivência das DCs (62). Deste modo, a expressão da molécula CXCR4 poderia fornecer sinais importantes para a proteção contra apoptose das DCs quando maduras (63).

Um padrão inverso exibido pelas α -DC1 pode ser explicado pelo fato das DCs maduras responderem mais fortemente aos ligantes de CCR7 do que aos ligantes de CXCR4 (62, 64), o que provavelmente está relacionado a níveis mais elevados de expressão do receptor de CCR7. Ensaio utilizando camundongos *knockout* para CCR7 mostrou que quando esta molécula não está presente, a resposta através do CXCR4 é aumentada. Como ambos os receptores sinalizam através de proteínas G, a falta de CCR7 pode aumentar o suprimento de proteínas G disponíveis para CXCR4 para gerar sinal. Da mesma forma, embora a expressão de CXCR4 seja regulada positivamente durante a maturação, esta molécula ainda pode apresentar maior redução nos níveis de expressão em relação aos outros receptores como

Discussão

resultado da alta expressão de CCR7, levando à diminuição da resposta quimiotática aos ligantes de CXCR4 (64).

A molécula CCR5, por sua vez, é normalmente expressa em células de Langerhans e DCs do sangue periférico (65) e direciona a migração das DCs para sítios inflamatórios (66). Foi mostrado que em resposta aos sinais inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β e LPS, as DCs maduras perdem a expressão de CCR5 e, consequentemente, a capacidade de responder aos seus ligantes MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES (revisto por (67)). Observamos que ambas MoDCs de controles expressaram níveis reduzidos de CCR5, especialmente as IL4-DCs. As α -DC1 mostraram níveis ligeiramente mais elevados, principalmente as α -DC1 pulsadas, gerando uma diferença significativa em relação às IL4-DCs pulsadas. Sendo assim, podemos especular que embora as α -DC1 tenham menor expressão de CXCR4 que poderia levar a uma menor capacidade de migrar para sítios inflamatórios, a expressão de CCR5 poderia compensar essa falta.

No contexto da infecção pelo HIV, os receptores de quimiocinas CXCR4 e/ou CCR5 são utilizados pelo HIV como coreceptores nas etapas iniciais da infecção favorecendo a ligação do envelope viral à membrana da célula hospedeira. Dependendo da variante viral, o HIV pode ter tropismo apenas para o coreceptor CXCR4 (vírus X4) ou CCR5 (vírus R5) ou ambos (vírus R5X4) (revisto por (68)). Estudos demonstraram que vírus R5 infectam DCs mielóides de forma mais eficiente devido a sua maior expressão de CCR5 (revisto por (69)). Considerando a possibilidade de aplicar as α -DC1 como imunoterapia para pacientes infectados pelo HIV e que a principal variante viral encontrada em indivíduos cronicamente infectados pelo HIV são vírus R5, a maior expressão de CCR5 apresentada pelas α -DC1 poderia, ao mesmo tempo, funcionar como sítios de ligação ao HIV, o que poderia favorecer a endocitose pelas α -DC1. Ainda, mesmo que haja a entrada do HIV, as α -DC1 maduras (utilizadas como produto vacinal) apresentam fatores de restrição que impediriam a replicação viral.

Seguindo para o receptor de quimiocina CCR6, as α -DC1 tendem a expressar maiores níveis desta molécula, quando comparadas às IL4-DCs. O CCR6 é um importante receptor que está envolvido na regulação da imunidade de mucosa, incluindo a capacidade de mediar o recrutamento de células apresentadoras de

Discussão

antígenos (APCs) aos locais de inflamação epitelial em resposta ao seu ligante CCL20. Além disso, o CCR6 medeia o *homing* de células T CD4⁺ e DCs para o tecido linfóide da mucosa intestinal (revisto por (70)). Neste contexto, as α -DC1 poderiam contribuir com a imunidade de mucosa de indivíduos infectados pelo HIV, podendo atingir uma das principais regiões de entrada do HIV, a mucosa intestinal.

Com relação à molécula DC-SIGN, que tem como função reconhecer e internalizar glicanos presentes na superfície de patógenos (p. ex. envelopes virais) (71), observamos redução na expressão desta molécula após adição do estímulo pró-inflamatório e/ou viral em ambas MoDCs, sendo observada diferença significativa entre IL4-DCs imaturas e maduras. Os resultados obtidos corroboram os dados da literatura, uma vez que após processo de maturação a capacidade de internalização via DC-SIGN apresenta-se reduzida para dar lugar ao processo de apresentação antigênica via MHC-I ou MHC-II (72). No contexto da infecção pelo HIV pode ocorrer interação de alta afinidade de DC-SIGN com a gp120 (componente do envelope do HIV) com subsequente internalização do HIV em compartimentos não-lisossomais, onde permanecem até que as DCs iniciem o processo de interação com os linfócitos T. Durante a sinapse imunológica pode ocorrer a transferência dos vírus para linfócitos T, um processo denominado transinfecção (revisto por (18)).

Considerando que utilizamos IFN- α como fator de ativação para a obtenção das α -DC1 e que as IFN-DCs constituem MoDCs diferenciadas na presença de GM-CSF e IFN- α , exibindo fenótipo misto de DCs mielóides, DCs plasmocitóides e células NK, sendo capazes de reconhecer PAMPs, expressar DC-SIGN, TLR 1-8, LOX-1, além de CD56, granzimas e TRAIL (76-78), investigamos a expressão de marcadores associados às DCs plasmocitóides e células NK, sendo eles CD123, CD16 e CD56.

As α -DC1 de pacientes demonstraram percentual e MFI de CD123 superiores em relação às IL4-DCs, cuja diferença foi significativa entre as MoDCs imaturas. Considerando que as DCs plasmocitóides são caracterizadas pela expressão de CD123 (IL-3R), CD303 (BDCA-2), e CD304 (BDCA-4 or Neuropilin-1) (79, 80), os dados obtidos sugerem que as α -DC1 exibem característica de DCs plasmocitóides, cujas atividades são essenciais durante infecções virais.

Discussão

O CD56 é considerado um marcador de células natural killer (NK), mas apesar dessa estrita relação CD56-NK, a expressão desse marcador também está presente em outras células da linhagem linfocítica, incluindo células NKT e linfócitos T ativados. Estas populações celulares possuem em comum a função citotóxica, sugerindo a íntima relação entre a expressão de CD56 e células efectoras citotóxicas (81-83). Além disso, monócitos cultivados na presença de IFN- α geraram MoDCs com capacidade citotóxica, capazes de expressar TRAIL (78). Os dados obtidos sugerem que α -DC1 e IL4-DCs exibem características citotóxicas, mas que não foi possível identificar uma causa em comum, devido à alta variabilidade encontrada. Podemos dizer que tanto as α -DC1, quanto as IL4-DCs foram capazes de expressar CD56.

Por fim, avaliamos a expressão de CD16 com o objetivo de agregar informações referentes à presença de características de células NK nas MoDCs estudadas. As células NK do sangue periférico consistem em duas populações distintas, CD56^{Dim} CD16+ (> 90% das células) e CD56^{Bright} CD16-, cujos receptores de ativação incluem NKG2D, NKp46, NKp44, NKp80, DNAM1, 2B4 e CD16 e que são capazes de reconhecer ligantes derivados de patógenos, moléculas induzidas pelo estresse, antígenos tumorais, entre outros. Para desencadear a atividade de células NK é necessária a ligação de dois ou mais receptores de ativação, exceto o CD16 (FCIIlyRA), em que a ligação apenas desse receptor é suficiente para causar a degranulação das células NK (revisto por (84)). Os resultados obtidos sugerem que as MoDCs são capazes de expressar CD16, embora em níveis reduzidos, sugerindo a presença de característica de célula NK, mas baixo potencial citotóxico relacionado à molécula CD16.

Com relação à expressão de PD-L1 (*programmed death-1 ligand*), ambas as MoDCs exibiram aumento semelhante no percentual desta molécula após adição do estímulo pró-inflamatório e/ou viral, porém com relação aos níveis de MFI, as α -DC1 mostraram-se superiores. PD-L1 é expresso por APCs e constitui o ligante da molécula PD-1, expresso dentre outras células em linfócitos T. PD-L1 apresenta-se altamente expresso em DCs não estimuladas, seguido de aumento após adição de estímulo pró-inflamatório. A adição de IFN- γ ao coquetel pró-inflamatório (MoDC padrão: TNF- α , IL-1 β , IL-6 e PGE2) auxilia na formação de MoDCs com elevada

Discussão

expressão de PD-L1 (74). Embora promova inibição da resposta de linfócitos T, a interação PD-1/PD-L1 é importante na formação de linfócitos T de memória efetora. O bloqueio desta interação constitui uma estratégia de tratamento para pacientes que possuem câncer, pois favorecem a geração de CTL específicos aos antígenos tumorais. Contudo, o bloqueio desta interação durante a infecção pelo HIV pode gerar efeitos distintos nas populações de linfócitos T, isto é, quando bloqueada durante cocultivos de α -DC1 e linfócitos T CD8+ de memória é capaz de promover a ativação destas células. Em contrapartida, prejudica a indução de resposta específica ao HIV durante cocultivos de α -DC1 e linfócitos T naive.

Neste contexto, α -DC1 expostas ao CD40L elevam a produção de IL-12p70, cuja citocina tem papel importante na formação de CTLs. Logo, podemos especular que estas α -DC1 ativadas têm a expressão de PD-L1 elevado. Logo, a interação CD40/CD40L entre α -DC1 e linfócitos T CD4+ contribui para o priming de linfócitos T naive, embora também possa prejudicar na ativação da memória efetora.

A aloreatividade é definida como uma forte resposta primária de células T frente a variantes de moléculas de MHC não próprias (revisto por (85)), estando relacionada à capacidade da célula estimuladora de exibir moléculas de MHC, o que leva a uma grande ativação acompanhada pela proliferação dessas células. Neste sentido, avaliamos a capacidade das α -DC1 e IL4-DCs de promover a proliferação de linfócitos T alogênicos. Os resultados obtidos sugerem que ambas MoDCs apresentam-se aptas ao reconhecimento de antígenos, uma vez que exibiram capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+.

A estratégia de instruir e/ou polarizar as DCs rumo a um perfil com habilidade de estimular resposta imune do tipo Th1 tem se tornado um método interessante nos últimos anos sendo aplicado em imunoterapia para pacientes com câncer (30). Mais recentemente, α -DC1 foi avaliada em ensaio clínico para tratamento de indivíduos infectados pelo HIV-1, utilizando como antígeno células apoptóticas autólogas infectadas, demonstrando uma proteção parcial, mas que não é sustentada após interrupção de HAART (32).

Considerando que um dos principais objetivos da estratégia de instruir e/ou polarizar as DCs no contexto da infecção pelo HIV é de gerar uma resposta imune do tipo Th1 acompanhada de potente atividade CTL, cocultivamos as α -DC1 e IL4-

Discussão

DCs carregadas com antígenos de HIV com linfócitos autólogos para a avaliação da capacidade das MoDCs de estimular a produção de IFN- γ e a indução de células T citotóxicas. Observamos que ambas foram capazes de estimular linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ao induzirem, de forma semelhante, a produção de IFN- γ e a expressão de CD107a. Repostas semelhantes também foram observadas quando comparamos as MoDCs maduras e pulsadas com HIV-AT2. Também utilizamos como controle de resposta específica peptídeos da proteína Gag do HIV, que se mostrou capaz de promover ligeiro aumento na produção de IFN- γ e na expressão de CD107a de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Considerando a semelhança nas respostas de linfócitos T induzidas pelas diferentes condições de cocultivo e que a interação PD-1/PD-L1 pode gerar linfócitos T de memória, pode ser que a cinética do cocultivo adotada nos ensaios de resposta específica ainda não seja a mais adequada. Trabalhos como de Hansen et al (ref) e Nuria Climente et al (ref) reportam uso de ensaios de cocultivo que requerem maior tempo de cultivo (por exemplo: 21 dias) e adição de estímulos inespecíficos (como IL-2 e IL-7) para induzirem a proliferação de linfócitos T naive e de memória após contato com MoDCs autólogas. Ainda, são aplicados reestímulos de MoDCs para reforçar o estímulo de linfócitos T naive e induzir a linfócitos T de memória. Protocolos mais longos permitiriam expandir clusters de linfócitos T específicos (principalmente CTLs específicos ao HIV), identificar a presença de linfócitos T memória, além de gerar maior quantidade de células e favorecer a identificação de eventos raros, como células produtoras de IFN- γ (e outras citocinas).

O conjunto dos dados obtidos sugere que as α -DC1 apresentam os requisitos básicos para estimular uma resposta imune do tipo Th1: (i) status de maturação plena e (ii) responsividade a quimiocinas que as direcionem aos órgãos linfóides secundários, corroborando os dados de Mailliard *et al* (2004) (29). Além disso, apresentam características de DCs plasmocitóides e células NK, podendo exibir importante atividade antiviral e função citotóxica. Estes requisitos foram acompanhados pelo potencial de estimular linfócitos T alogênicos e autólogos. Apesar de exibirem características positivas como potenciais ferramentas para compor uma imunoterapia anti-HIV, ensaios funcionais adicionais devem ser considerados para fornecer dados complementares aos obtidos.

Conclusões

Considerando os dados obtidos, concluímos que as α -DC1 apresentam características fenotípicas e funcionais positivas, que favorecem sua aplicação na imunoterapia anti-HIV. Ainda, embora as α -DC1 e as IL4-DCs constituam populações distintas de MoDCs, ambas promoveram respostas semelhantes de linfócitos T CD4+ e CD8+.

Referências

1. BarreSinoussi F. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 1996; **348**: 31-35.
2. Cullen BR. REGULATION OF HIV-1 GENE-EXPRESSION. *Faseb Journal* 1991; **5**: 2361-2368.
3. Levy JA. PATHOGENESIS OF HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS INFECTION. *Microbiological Reviews* 1993; **57**: 183-289.
4. Engelman A and Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology* 2012; **10**: 279-290.
5. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine* 2006; **12**: 1365-1371.
6. Walker CM, Moody DJ, Stites DP and Levy JA. LYMPHOCYTES-CD8+ CAN CONTROL HIV-INFECTION INVITRO BY SUPPRESSING VIRUS-REPLICATION. *Science* 1986; **234**: 1563-1566.
7. Musey L, Hughes J, Schacker T, Shea T, Corey L and McElrath MJ. Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *New England Journal of Medicine* 1997; **337**: 1267-1274.
8. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S *et al.* Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 1998; **279**: 2103-2106.
9. Hogan CM and Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease part 1: Cellular and humoral immune responses. *Annals of Internal Medicine* 2001; **134**: 761-776.
10. Gunthard HF, Saag MS, Benson CA *et al.* Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults 2016 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2016; **316**: 191-210.
11. Troya J and Bascunana J. Safety and Tolerability: Current Challenges to Antiretroviral Therapy for the Long-Term Management of HIV Infection. *Aids Reviews* 2016; **18**: 127-137.
12. Autran B, Carcelain G, Li TS *et al.* Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4(+) T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997; **277**: 112-116.
13. Dalod M, Harzic M, Pellegrin I *et al.* Evolution of cytotoxic T lymphocyte responses to human immunodeficiency virus type 1 in patients with symptomatic primary infection receiving antiretroviral triple therapy. *Journal of Infectious Diseases* 1998; **178**: 61-69.

Referências

14. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S *et al.* Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *Journal of Virology* 1999; **73**: 797-800.
15. Vanham G and Van Gulck E. Can immunotherapy be useful as a "functional cure" for infection with Human Immunodeficiency Virus-1? *Retrovirology* 2012; **9**.
16. Banchereau J, Briere F, Caux C *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 2000; **18**: 767-+.
17. Banchereau J and Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**: 245-252.
18. Lambotin M, Raghuraman S, Stoll-Keller F, Baumert TF and Barth H. A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nature Reviews Microbiology* 2010; **8**: 350-360.
19. Steinman RM. THE DENDRITIC CELL SYSTEM AND ITS ROLE IN IMMUNOGENICITY. *Annual Review of Immunology* 1991; **9**: 271-296.
20. Sallusto F and Lanzavecchia A. EFFICIENT PRESENTATION OF SOLUBLE-ANTIGEN BY CULTURED HUMAN DENDRITIC CELLS IS MAINTAINED BY GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR PLUS INTERLEUKIN-4 AND DOWN-REGULATED BY TUMOR-NECROSIS-FACTOR-ALPHA. *Journal of Experimental Medicine* 1994; **179**: 1109-1118.
21. Rinaldo CR and Piazza P. Virus infection of dendritic cells: portal for host invasion and host defense. *Trends in Microbiology* 2004; **12**: 337-345.
22. Buseyne F, Le Gall S, Boccaccio C *et al.* MHC-I-restricted presentation of HIV-1 virion antigens without viral replication. *Nature Medicine* 2001; **7**: 344-349.
23. Levy Y, Thiebaut R, Montes M *et al.* Dendritic cell-based therapeutic vaccine elicits polyfunctional HIV-specific T-cell immunity associated with control of viral load. *European Journal of Immunology* 2014; **44**: 2802-2810.
24. Steinman RM and Hemmi H. Dendritic cells: Translating innate to adaptive immunity. *From Innate Immunity to Immunological Memory* 2006; **311**: 17-58.
25. Kalinski P, Hilkens CMU, Snijders A, Snijdewint FGM and Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E-2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *Journal of Immunology* 1997; **159**: 28-35.
26. Kalinski P, Schuitemaker JHN, Hilkens CMU and Kapsenberg ML. Prostaglandin E-2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a(+)CD83(+) dendritic cells: The levels of IL-12 are determined during the

Referências

- final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *Journal of Immunology* 1998; **161**: 2804-2809.
27. Kalinski P, Hilkens CMU, Wierenga EA and Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunology Today* 1999; **20**: 561-567.
28. Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML and Kalinski P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *Journal of Immunology* 2000; **164**: 4507-4512.
29. Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q *et al.* alpha-type-1 polarized dendritic cells: A novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Research* 2004; **64**: 5934-5937.
30. Okada H, Kalinski P, Ueda R *et al.* Induction of CD8(+) T-Cell Responses Against Novel Glioma-Associated Antigen Peptides and Clinical Activity by Vaccinations With alpha-Type 1 Polarized Dendritic Cells and Polyinosinic-Polycytidylic Acid Stabilized by Lysine and Carboxymethylcellulose in Patients With Recurrent Malignant Glioma. *Journal of Clinical Oncology* 2011; **29**: 330-336.
31. Akiyama Y, Oshita C, Kume A *et al.* alpha-type-1 polarized dendritic cell-based vaccination in recurrent high-grade glioma: a phase I clinical trial. *Bmc Cancer* 2012; **12**.
32. Macatangay BJC, Riddler SA, Wheeler ND *et al.* Therapeutic Vaccination With Dendritic Cells Loaded With Autologous HIV Type 1-Infected Apoptotic Cells. *Journal of Infectious Diseases* 2016; **213**: 1400-1409.
33. Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K *et al.* Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *Journal of Virology* 1998; **72**: 7992-8001.
34. Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L and Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 2000; **96**: 3102-3108.
35. Connolly NC, Whiteside TL, Wilson C, Kondragunta V, Rinaldo CR and Riddler SA. Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-Infected individuals. *Clinical and Vaccine Immunology* 2008; **15**: 284-292.
36. Garcia F, Lejeune M, Climent N *et al.* Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. *Journal of Infectious Diseases* 2005; **191**: 1680-1685.

Referências

37. Garcia F, Climent N, Assoumou L *et al.* A Therapeutic Dendritic Cell-Based Vaccine for HIV-1 Infection. *Journal of Infectious Diseases* 2011; **203**: 473-478.
38. Garcia F, Plana M, Climent N, Leon A, Gatell JM and Gallart T. Dendritic cell based vaccines for HIV infection The way ahead. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2013; **9**: 2445-2452.
39. Kundu SK, Engleman E, Benike C *et al.* A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. *Aids Research and Human Retroviruses* 1998; **14**: 551-560.
40. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT and Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nature Medicine* 2004; **10**: 1359-1365.
41. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M *et al.* Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine* 1998; **4**: 328-332.
42. Nestle FO. Dendritic cell vaccination for cancer therapy. *Oncogene* 2000; **19**: 6673-6679.
43. Schuler-Thurner B, Dieckmann D, Keikavoussi P *et al.* Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1(+) melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Immunology* 2000; **165**: 3492-3496.
44. Thurner B, Haendle I, Roder C *et al.* Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *Journal of Experimental Medicine* 1999; **190**: 1669-1678.
45. Delemarre FGA, Hoogeveen PG, de Haan-Meulman M, Simons PJ and Drexhage HA. Homotypic *cluster* formation of dendritic cells, a close correlate of their state of maturation. Defects in the biobreeding diabetes-prone rat. *Journal of Leukocyte Biology* 2001; **69**: 373-380.
46. Bugeon L and Dallman MJ. Costimulation of T cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; **162**: S164-S168.
47. Ushach I and Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *Journal of Leukocyte Biology* 2016; **100**: 481-489.
48. Min L, Isa S, Wang SA *et al.* Cutting Edge: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Is the Major CD8(+) T Cell-Derived Licensing Factor for Dendritic Cell Activation. *Journal of Immunology* 2010; **184**: 4625-4629.

Referências

49. Zhou LJ and Tedder TF. HUMAN BLOOD DENDRITIC CELLS SELECTIVELY EXPRESS CD83, A MEMBER OF THE IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY. *Journal of Immunology* 1995; **154**: 3821-3835.
50. Hock BD, Kato M, McKenzie JL and Hart DNJ. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *International Immunology* 2001; **13**: 959-967.
51. Prechtel AT and Steinkasserer A. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Archives of Dermatological Research* 2007; **299**: 59-69.
52. Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaerts S *et al.* CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. *European Journal of Immunology* 2007; **37**: 686-695.
53. Tze LE, Horikawa K, Domaschewitz H *et al.* CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *Journal of Experimental Medicine* 2011; **208**: 149-165.
54. Ju XS, Silveira PA, Hsu WH *et al.* The Analysis of CD83 Expression on Human Immune Cells Identifies a Unique CD83(+)-Activated T Cell Population. *Journal of Immunology* 2016; **197**: 4613-4625.
55. van Kooten C and Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *Journal of Leukocyte Biology* 2000; **67**: 2-17.
56. Mailliard RB, Smith KN, Fecek RJ *et al.* Selective Induction of CTL Helper Rather Than Killer Activity by Natural Epitope Variants Promotes Dendritic Cell-Mediated HIV-1 Dissemination. *Journal of Immunology* 2013; **191**: 2570-2580.
57. Smith KN, Mailliard RB, Piazza PA *et al.* Effective Cytotoxic T Lymphocyte Targeting of Persistent HIV-1 during Antiretroviral Therapy Requires Priming of Naive CD8(+) T Cells (vol 7, e00473, 2016). *Mbio* 2016; **7**.
58. Watchmaker PB, Urban JA, Berk E *et al.* Memory CD8(+) T cells protect dendritic cells from CTL killing. *Journal of Immunology* 2008; **180**: 3857-3865.
59. Hansen M, Hjortø GM, Donia M *et al.* Comparison of clinical grade type I polarized and standard matured dendritic cells for cancer immunotherapy. *Vaccine* 2013; **31**: 639-646.
60. Zaccard CR, Watkins SC, Kalinski P *et al.* CD40L Induces Functional Tunneling Nanotube Networks Exclusively in Dendritic Cells Programmed by Mediators of Type 1 Immunity. *Journal of Immunology* 2015; **194**: 1047-1056.

Referências

61. Hauser MA and Legler DF. Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 2016; **99**: 869-882.
62. Humrich JY, Humrich JH, Auerbeck M *et al.* Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration. *Immunology* 2006; **117**: 238-247.
63. Delgado-Martin C, Escribano C, Pablos JL, Riol-Blanco L and Rodriguez-Fernandez JL. Chemokine CXCL12 Uses CXCR4 and a Signaling Core Formed by Bifunctional Akt, Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 1/2, and Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Proteins to Control Chemotaxis and Survival Simultaneously in Mature Dendritic Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2011; **286**: 37222-37236.
64. Ricart BG, John B, Lee D, Hunter CA and Hammer DA. Dendritic Cells Distinguish Individual Chemokine Signals through CCR7 and CXCR4. *Journal of Immunology* 2011; **186**: 53-61.
65. Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D and Doms RW. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; **96**: 5215-5220.
66. Rossi R, Lichtner M, De Rosa A *et al.* In vitro effect of anti-human immunodeficiency virus CCR5 antagonist maraviroc on chemotactic activity of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology* 2011; **166**: 184-190.
67. McColl SR. Chemokines and dendritic cells: A crucial alliance. *Immunology and Cell Biology* 2002; **80**: 489-496.
68. Regoes RR and Bonhoeffer S. The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends in Microbiology* 2005; **13**: 269-277.
69. Wu L and KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature Reviews Immunology* 2006; **6**: 859-868.
70. Ito T, Carson WF, Cavassani KA, Connett JM and Kunkel SL. CCR6 as a mediator of immunity in the lung and gut. *Experimental Cell Research* 2011; **317**: 613-619.
71. Menon S, Rosenberg K, Graham SA *et al.* Binding-site geometry and flexibility in DC-SIGN demonstrated with surface force measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; **106**: 11524-11529.

Referências

72. Engering A, Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ *et al.* The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *Journal of Immunology* 2002; **168**: 2118-2126.
73. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine* 2000; **192**: 1027-1034.
74. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR *et al.* Blockade of programmed death-1 Ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *Journal of Immunology* 2003; **170**: 1257-1266.
75. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N and Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; **11**: 141-151.
76. Farkas A and Kemeny L. Interferon-alpha in the generation of monocyte-derived dendritic cells: recent advances and implications for dermatology. *British Journal of Dermatology* 2011; **165**: 247-254.
77. Korthals M, Safaian N, Kronenwett R *et al.* Monocyte derived dendritic cells generated by IFN-alpha acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *Journal of Translational Medicine* 2007; **5**.
78. Papewalis C, Jacobs B, Wuttke M *et al.* IFN-alpha skews monocytes into CD56(+)-expressing dendritic cells with potent functional activities in vitro and in vivo. *Journal of Immunology* 2008; **180**: 1462-1470.
79. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P *et al.* BDCA-2, BDCA-3 and BDCA-4: Three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Journal of Immunology* 2000; **165**: 6037-6046.
80. Collin M, McGovern N and Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology* 2013; **140**: 22-30.
81. Pittet MJ, Speiser DE, Valmori D, Cerottini JC and Romero P. Cutting edge: Cytolytic effector function in human circulating CD8(+) T cells closely correlates with CD56 surface expression. *Journal of Immunology* 2000; **164**: 1148-1152.
82. Ou DW, Metzger DL, Wang XJ, Pozzilli P and Tingle AJ. beta-cell antigen-specific CD56(+) NKT cells from type 1 diabetic patients: Autoaggressive effector T cells damage human CD56(+) beta cells by HLA-restricted and non-HLA-restricted pathways. *Human Immunology* 2002; **63**: 256-270.
83. Farag SS and Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Reviews* 2006; **20**: 123-137.

Referências

84. Tsukerman P, Stern-Ginossar N, Yamin R *et al.* Expansion of CD16 positive and negative human NK cells in response to tumor stimulation. *European Journal of Immunology* 2014; **44**: 1517-1525.
85. Nagy ZA. Alloreactivity: An Old Puzzle Revisited. *Scandinavian Journal of Immunology* 2012; **75**: 463-470.
86. Kalinski P, Nakamura Y, Watchmaker P, Giermasz A, Muthuswamy R and Mailliard RB. Helper roles of NK and CD8(+) T cells in the induction of tumor immunity - Polarized dendritic cells as cancer vaccines. *Immunologic Research* 2006; **36**: 137-146.
87. Turville SG, Santos JJ, Frank I *et al.* Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 2004; **103**: 2170-2179.

Apêndice

APÊNDICE A – Imagens referentes às culturas de α -DC1 cultivada em placa de cultura sem tratamento e de IL4-DCs cultivadas em placa de baixa adesão.

Aspecto morfológico das α -DC1 cultivada em placa de cultura sem tratamento.

α -DC1(-HIV)

α -DC1(+HIV)

Monócitos de indivíduo sadio foram cultivados e diferenciados em α -DC1 maduras (α -DC1) e pulsadas (α -DC1-HIV) em placa de cultura sem tratamento. No 7º dia de cultivo, capturamos imagens no aumento de 200x por meio de câmera acoplada ao microscópio óptico.

Apêndice

Aspecto morfológico das IL4-DCs cultivadas em placa de baixa adesão.

Monócitos de indivíduo sadio foram cultivados e diferenciados em IL4-DCs imaturas (iDC), maduras (IL4-DC) e pulsadas (IL4-DC-HIV) em placa de baixa adesão. No 7º dia de cultivo, capturamos imagens em três diferentes aumentos, sendo 40x, 100x e 400x, por meio de câmera acoplada ao microscópio óptico.

ANEXO I – Publicação de artigos científicos

HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS
2019, VOL. 15, NO. 9, 2140–2149
<https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1547603>

RESEARCH PAPER

Phenotypic and functional profile of IFN- α -differentiated dendritic cells (IFN-DCs) from HIV-infected individuals

Bruna Tereso Santillo^{a,b}, Denise da Silva Reis^{a,b}, Laís Teodoro da Silva^a, Nathalia Teixeira Romani^a, Alberto José da Silva Duarte^a, and Telma Miyuki Oshiro^a

^aLaboratório de Dermatologia e Imunodeficiências LIM56, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; ^bDepartamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

Dendritic cell (DC)-based immunotherapy is a promising strategy for the treatment of HIV-infected individuals. Different from the conventional protocol for DC differentiation based on the cytokine IL-4 (IL4-DCs), several studies have suggested obtaining DCs by culturing monocytes with type I IFN (IFN- α) to yield IFN-DCs, as performed in cancer therapy. To evaluate the phenotypic and functional characteristics, monocytes from HIV-infected subjects were differentiated into IFN-DCs or IL4-DCs, pulsed with chemically inactivated HIV and stimulated with pro-inflammatory cytokines. A comparative analysis between both types of monocyte-derived DCs (MoDCs) showed that immature IFN-DCs were phenotypically distinct from immature IL4-DCs at the baseline of differentiation, presenting a pre-activated profile. From the functional profile, we determined that IFN-DCs were capable of producing the cytokine IL-12 p70 and of inducing the production of IFN- γ by CD4 + T lymphocytes but not by TCD8+ lymphocytes. Our results suggest that IFN-DCs derived from HIV-infected individuals are able to recognize and present viral antigens to induce TCD4+ cellular immunity to HIV.

ARTICLE HISTORY

Received 6 June 2018
Revised 10 October 2018
Accepted 24 October 2018

KEYWORDS

dendritic cells; type I interferon; HIV; immunotherapy

Introduction

Highly active antiretroviral therapy (HAART) has made human immunodeficiency virus (HIV) infection a chronic disease and, if treated and managed properly, could decrease morbidity and death. However, HAART is unable to eradicate HIV reservoirs and cannot completely restore the immune response.¹ In addition, patient adherence to HAART can be impaired by the side effects.² Accordingly, efforts have been made to reduce viral replication and improve patients' quality of life, such as immunotherapy protocols based on autologous monocyte-derived dendritic cells (MoDCs).^{3,4}

MoDCs have been used as a therapeutic vaccine because of their unique capacity to induce the primary immune response to establish immunological memory and their potent antigen-presenting ability, as well as their ability to induce, sustain and regulate the immune response.⁵ Two major subtypes of DCs include myeloid DCs (mDCs), a professional antigen-presenting cell (APC) capable of initiating a cellular immune response, and plasmacytoid DCs (pDCs), which are related to the antiviral response by producing high levels of type I interferon (IFN), such as IFN- α .⁶ In the context of HIV infection, there is a reduction in the absolute number of DCs, particularly in patients with active HIV-1 replication.⁷ In addition, HIV infection promotes suboptimal maturation of DCs, resulting in poor generation of an antiviral immune response. Together, these facts suggest a key role for DC in controlling

viral load. In this context, DC-based immunotherapy aims to restore DC function through the adoptive transfer of cells. In fact, in recent years, an increasing number of DC-based clinical trials have enhanced the general interest in DC biology and the interaction between this innate immune cell type and HIV-1.⁸

MoDCs obtained through the cultivation of peripheral blood monocytes with interleukin (IL)-4 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), referred to as IL4-DCs, have been implicated in immunotherapy for cancer^{9,10} and HIV infection³ and have been used as the gold standard in DC-based immunotherapy. Although MoDCs could provide many positive functions to immunotherapy applications, a portion of vaccinated individuals do not respond to treatment.^{8,11}

Alternative protocols to obtain MoDCs include the use of IFN- α instead of IL-4 (referred to as IFN-DCs).^{12,13} Type I IFNs markedly promote the differentiation of peripheral blood monocytes into DCs. Using a murine model, studies have demonstrated that MoDCs differentiated with type I IFN are able to induce a strong cytotoxic response and cross priming of CD8 + T lymphocytes against viral or tumour antigens in both *in vitro* and *in vivo* assays.^{14–16} Additionally, IFN-DCs exhibit a combined phenotype of mDCs and pDCs associated with characteristics of natural killer (NK) cells.^{17,18}

Considering the ongoing research in DC manipulation and therapeutic strategies for acquired immunodeficiency

CONTACT Telma Miyuki Oshiro telma.oshiro@hcfm.usp.br Laboratory of Dermatology and Immunodeficiency Research (LIM56), Faculdade de Medicina, 470 Doutor Eneas Carvalho de Aguiar St, building II, 3th floor, Jardim America District, São Paulo, Brazil.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/khvi.

Supplemental data for this article can be accessed here.

© 2018 Taylor & Francis Group, LLC

Using Dendritic Cell-Based Immunotherapy to Treat HIV: How Can This Strategy be Improved?

Lais Teodoro da Silva, Bruna Tereso Santillo, Alexandre de Almeida, Alberto Jose da Silva Duarte and Telma Miyuki Oshiro*

Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Harnessing dendritic cells (DC) to treat HIV infection is considered a key strategy to improve anti-HIV treatment and promote the discovery of functional or sterilizing cures. Although this strategy represents a promising approach, the results of currently published trials suggest that opportunities to optimize its performance still exist. In addition to the genetic and clinical characteristics of patients, the efficacy of DC-based immunotherapy depends on the quality of the vaccine product, which is composed of precursor-derived DC and an antigen for pulsing. Here, we focus on some factors that can interfere with vaccine production and should thus be considered to improve DC-based immunotherapy for HIV infection.

OPEN ACCESS

Keywords: dendritic cells, HIV, immunotherapy, therapeutic vaccine, clinical trial

Edited by:

Daniela Santoro Rosa,
Federal University of São Paulo, Brazil

Reviewed by:

Juliana Maricato,
Federal University of São Paulo, Brazil
Irina Caminschi,
Monash University, Australia

*Correspondence:

Telma Miyuki Oshiro
telma.oshiro@hc.fm.usp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Vaccines and Molecular Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 27 July 2018

Accepted: 04 December 2018

Published: 18 December 2018

Citation:

da Silva LT, Santillo BT, de Almeida A,
Duarte AJdS and Oshiro TM (2018)
Using Dendritic Cell-Based
Immunotherapy to Treat HIV: How
Can This Strategy be Improved?
Front. Immunol. 9:2993.
doi: 10.3389/fimmu.2018.02993

INTRODUCTION

Although antiretroviral therapy has deeply improved the quality of life of HIV-infected individuals, some problems must be overcome, such as viral resistance, drug toxicities, therapeutic failure, and lack of drug access to viral reservoirs (1–4), which impair treatment effectiveness and patient adherence and hinder the discovery of functional or sterilizing cures.

In this context, harnessing dendritic cells (DC) to treat HIV infection is a promising strategy that has been extensively studied in recent years (5–21). The rationale for using DC is based on their essential role in the immune system, priming a specific immune response (22, 23). This strategy was initially tested for cancer treatment (24) and then for infectious diseases (5, 25), and more recently, tolerogenic DC have been evaluated for treating autoimmune diseases (26, 27).

Particularly in HIV infection, DC are qualitatively and quantitatively impaired in the host. In fact, HIV is able to evade innate immune sensing by DC, leading to suboptimal maturation that results in a poor antiviral adaptive immune response (28). Thus, the administration of properly sensitized DC can drive the immune response to a specific target, improving the anti-HIV-specific response.

More recent approaches have proposed a strategy using DC to reactivate HIV reservoirs (29, 30) together with a potent antiretroviral drug, which could finally promote the discovery of a long-awaited sterilizing cure. This timely and paramount approach encourages further studies on this type of intervention.

While many studies have demonstrated the high potential of DC-based strategies to stimulate an anti-HIV immune response *in vitro* (31–33), a systematic review of currently published trials concluded that in general, clinical outcomes have been modest, and the expected success rates have not been achieved (34). This outcome suggests that the full potential of this technique has not yet been realized, and opportunities to improve the efficacy of this strategy remain.

Characterization of monocyte-derived dendritic cells used in immunotherapy for HIV-1-infected individuals

Laís Teodoro da Silva, Wanessa Cardoso da Silva, Alexandre de Almeida, Denise da Silva Reis, Bruna Tereso Santillo, Paula Ordonhez Rigato, Alberto José da Silva Duarte & Telma Miyuki Oshiro

Published Online: 3 Aug 2018 | <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0165>

View Article

Tools Share

Aims: A therapeutic vaccine based on monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) has been shown to represent a promising strategy for the treatment of cancer and viral infections. Here, we characterized the MDDCs used as an immunogen in a clinical trial for an anti-HIV-1 therapeutic vaccine. **Patients & Methods:** Monocytes obtained from 17 HIV-infected individuals were differentiated into MDDCs and, after loading with autologous HIV, the cells were characterized concerning surface molecule expression, migratory and phagocytosis capacity, cytokine production and the induction of an effective cell-mediated immune response. **Results:** The MDDCs were able to induce antigen-specific responses in autologous CD4+ and CD8+ T lymphocytes. **Conclusions:** Despite a large interindividual variability, the results suggested that MDDCs present the potential to promote immune responses in vaccinated patients.

Keywords: dendritic cells • HIV/AIDS • immunotherapy

Dendritic cells primed with a chimeric plasmid containing HIV-1-*gag* associated with lysosomal-associated protein-1 (LAMP/*gag*) is a potential therapeutic vaccine against HIV

Carolina G. D. O. Lucas,^{*} Flavio L. Matassoli,^{*} Ligia M. T. Peçanha,[†] Bruna Tereso Santillo,^{‡,§} Luanda Mara da Silva Oliveira,[‡] Telma Miyuki Oshiro,[‡] Ernesto T. D. A. Marques, Jr.,^{¶||} Annette Oxenius,[§] and Luciana B. de Arruda^{*,†}

^{*}Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia and [†]Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; [‡]Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56), Departamento de Dermatologia, Escola de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; [§]Institute of Microbiology, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland; [¶]Department of Infectious Diseases and Microbiology, Center for Vaccine Research, Pittsburgh, Pennsylvania, USA; and ^{||}Department of Virology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)—Pernambuco, Recife, Brazil

ABSTRACT: The decline in number and function of T cells is a hallmark of HIV infection, and preservation or restoration of HIV-specific cellular immune response is a major goal of AIDS treatment. Dendritic cells (DCs) play a key role in the initiation and maintenance of the immune response, and their use as a vaccine vehicle is a promising strategy for enhancing vaccine efficacy. We evaluated the potential of DC-mediated immunization with a DNA vaccine consisting of HIV-1-p55gag (*gag*, group-specific antigen) associated to lysosomal associated protein (LAMP) sequence (LAMP/*gag* vaccine). Immunization of mice with mouse DCs transfected with LAMP/*gag* (Lg-mDCs) stimulated more potent B- and T-cell responses than naked DNA or DCs pulsed with inactivated HIV. Anti-Gag antibody levels were sustained for at least 3 mo after immunization, and recall T-cell responses were also strongly detected at this time point. Human DCs transfected with LAMP/*gag* (Lg-hDCs) were also activated and able to stimulate greater T-cell response than native *gag*-transfected DCs. Coculture between Lg-hDCs and T lymphocytes obtained from patients with HIV resulted in upregulation of CD38, CD69, HLA-DR, and granzyme B by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and increased IFN- γ and TNF- α production. These results indicate that the use of LAMP/*gag*-DC may be an efficient strategy for enhancing immune function in patients with HIV.—Lucas, C. G. D. O., Matassoli, F. L., Peçanha, L. M. T., Santillo, B. T., Oliveira, L. M. D. S., Oshiro, T. M., Marques, E. T. D. A., Jr., Oxenius, A., de Arruda, L. B. Dendritic cells primed with a chimeric plasmid containing HIV-1-*gag* associated with lysosomal-associated protein-1 (LAMP/*gag*) is a potential therapeutic vaccine against HIV. FASEB J. 30, 2970–2984 (2016). www.fasebj.org

KEY WORDS: HIV immunotherapy • T-cell activation • dendritic cell vaccine

ABBREVIATIONS: APC, antigen-presenting cell; ART, antiretroviral therapy; AT-2, aldrithiol-2; BFU, blue focus unit; BMDC, bone marrow-derived dendritic cell; DC, dendritic cell; EBV, Epstein-Barr virus; Flu, influenza; *gag*, group-specific antigen; *gag*_N, native *gag*; *gag*_N-DC, dendritic cell transfected with native *gag*; GB, granzyme B; HAART, highly active antiretroviral therapy; iHIV, inactivated HIV; iHIV-DC, dendritic cell pulsed with AT-2-inactivated HIV; LAMP, lysosomal membrane-associated protein; Lg-DC, dendritic cell transfected with LAMP/*gag*; Lg-DNA, LAMP/*gag* DNA; Lg-mDC, mouse dendritic cell transfected with LAMP/*gag*; Lg-hDC, human dendritic cell transfected with LAMP/*gag*; MDDC, monocyte-derived dendritic cell; MHC, major histocompatibility complex; NR, neutral red; ntDC, nontransfected dendritic cell; PE, phycoerythrin; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; T_H, T helper

¹ Correspondence: Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco I, Laboratory I-SS-048, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21941-902. E-mail: arruda@micro.ufrj.br

doi: 10.1096/fj.201500059

AIDS progression is characterized by depletion and functional alterations of CD4⁺ T cells, associated with exhaustion of B and T cells and severe immunodeficiency (1–5). Diminished levels and dysfunctional dendritic cells (DCs) are also frequently observed and may contribute to an overall impairment of adaptive immunity (6–8).

Despite the remarkable advances in HIV treatment achieved in past decades, the currently available drugs do not completely eliminate the virus, and patients must receive life-long antiretroviral therapy (ART) that may be associated with severe side effects (9–13). In addition, restoration of HIV-specific cellular immune responses usually fails in patients receiving ART, even when a virologic response is achieved (14, 15). Therefore, new immunotherapeutic strategies that improve anti-HIV immune response

Anexo

ANEXO II – Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

5133 - 7117952/1 - Bruna Tereso Santillo

Email: brunasantillo@usp.br
Data de Nascimento: 06/09/1991
Cédula de Identidade: RG - 36.304.975-7 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharela em Biomedicina - Centro Universitário São Camilo - São Paulo - Brasil - 2012
Mestrado: Mestra em Ciências - Área: Imunologia - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2015

Curso: Doutorado
Programa: Medicina (Dermatologia)
Área: Dermatologia
Data de Matrícula: 06/10/2015
Início da Contagem de Prazo: 06/10/2015
Data Limite para o Depósito: 03/02/2020
Orientador: Prof(a). Dr(a). Jose Antonio Sanches Junior - 06/10/2015 até 09/12/2015. Email: jasanches@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Telma Miyuki Oshiro Sumida - 10/12/2015 até o presente. Email: tmoshiro@yahoo.com
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 06/10/2015
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 06/10/2019 até 03/02/2020
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 30/11/2017
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 06/10/2015
 Prorrogação em 01/08/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Prorrogação em 01/08/2019

Impresso em: 30/01/2020 01:24:13

Anexo

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
 Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

5133 - 7117952/1 - Bruna Tereso Santillo

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MCG5825-4/5	Pedagogia Médica e Didática Especial	01/03/2016	02/05/2016	90	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
MIP5737-2/4	Fundamentos da Citometria de Fluxo - Aplicações na Investigação da Relação Hospedeiro-Parasita	13/06/2016	19/06/2016	30	2	80	A	N	Concluída
MPT5760-5/1	Metodologia de Ensino I: Preparação Pedagógica	02/08/2016	03/10/2016	90	6	93	A	N	Concluída
MCM5896-2/2	HIV: Sexo, Sociedade e Ciência	01/09/2016	14/12/2016	120	8	100	B	N	Concluída
ICB5752-1/1	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	14/09/2016	27/09/2016	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
PSP5515-1/1	Aspectos Pedagógicos do Ensino Superior em Saúde (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	16/09/2016	17/11/2016	45	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
MPT5794-1/5	Ultra-Estrutura e Função Celular	19/09/2016	23/10/2016	75	0	-	-	N	Matrícula cancelada
Atividade do Programa	Participou do XLI Congress of the Brazilian Society of Immunology - IMMUNO 2016, com o trabalho "Monocyte-derived dendritic cells differentiated with IFN- γ are able to induce cellular immune response to HIV", apresentado em forma de Pôster, Campos do Jordão, 2016. (1)	29/10/2016	02/11/2016	-	1	-	-	-	-
MIP5742-1/4	Citometria de Fluxo Avançada - Aplicações na Investigação da Relação Hospedeiro-Parasita	11/11/2016	22/12/2016	90	6	100	A	N	Concluída
BIO5739-5/4	Organização do Citoplasma da Célula Animal (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	15/03/2017	27/06/2017	120	8	80	A	N	Concluída
BIO5791-2/1	Tráfego Intracelular e Degeneração (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	03/04/2017	14/05/2017	90	6	75	A	N	Concluída
FBA5728-4/6	Aprimoramento Pedagógico (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo)	03/04/2018	30/04/2018	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
BTC5840-1/1	Aplicabilidade da Técnica de ELISpot Presente, Passado e Futuro (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	09/04/2018	15/04/2018	30	0	-	-	N	Turma cancelada
ICB5750-3/1	Métodos Avançados em Biologia Celular (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	08/05/2018	26/06/2018	60	4	87	A	N	Concluída
MCM5920-2/2	Desenvolvimento de Vacinas em Doenças Infecciosas	18/06/2018	24/06/2018	30	2	100	A	N	Concluída
ICB5752-1/4	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	25/06/2018	08/07/2018	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	4	8	43
Estágios:			

Anexo

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Total:	4	8	43

Créditos Atribuídos à Tese: 176

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o Artigo 64 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 06/12/2016.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 01/08/2019

Impresso em: 30/01/2020 01:24:13

Anexo

ANEXO III – Aprovação do Comitê de Ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
<p>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</p> <p>Título da Pesquisa: Análise fenotípica e funcional de alfa-DC1 derivada de indivíduos infectados pelo HIV-1</p> <p>Pesquisador: Telma Miyuki Oshiro Sumida</p> <p>Área Temática:</p> <p>Versão: 2</p> <p>CAAE: 46499715.2.0000.0068</p> <p>Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P</p> <p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p> <p>DADOS DO PARECER</p> <p>Número do Parecer: 1.177.544</p> <p>Data da Relatoria: 05/08/2015</p> <p>Apresentação do Projeto:</p> <p>Avaliar a DC1 derivadas de monocitos de indivíduos infectados pelo HIV com relação a características fenotípicas, interação com HIV e capacidade de apresentação antigenica.</p> <p>Objetivo da Pesquisa:</p> <p>Avaliar a DC1 derivadas de monocitos de indivíduos infectados pelo HIV com relação a características fenotípicas, interação com HIV e capacidade de apresentação antigenica.</p> <p>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</p> <p>Não há riscos envolvidos, a não ser a coleta de sangue periférico</p> <p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</p> <p>não apresenta questionamentos de natureza etica</p> <p>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</p> <p>O TCLE foi adequado conforme solicitação anterior</p>														
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="3">Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Cerqueira Cesar</td> <td style="text-align: right;">CEP: 05.403-010</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: SAO PAULO</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (11)2661-7585</td> <td>Fax: (11)2661-7585</td> <td style="text-align: right;">E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br</td> </tr> </table>			Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar			Bairro: Cerqueira Cesar	CEP: 05.403-010		UF: SP	Município: SAO PAULO		Telefone: (11)2661-7585	Fax: (11)2661-7585	E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br
Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar														
Bairro: Cerqueira Cesar	CEP: 05.403-010													
UF: SP	Município: SAO PAULO													
Telefone: (11)2661-7585	Fax: (11)2661-7585	E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.177.544

Recomendações:

APROVADO

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SEM PENDENCIAS-APROVADO

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 10 de Agosto de 2015

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo

ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

SUJEITO DA PESQUISA

NOME: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: _____ SEXO : M () F ()

DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____ Nº _____ APTO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TELEFONE: DDD () _____

RESPONSÁVEL LEGAL

NOME: _____

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: _____ SEXO: M () F ()

DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____ Nº _____ APTO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TELEFONE: DDD () _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** Análise fenotípica e funcional de alfa-DC1 derivada de indivíduos infectados pelo HIV-1
2. **PESQUISADOR:** Telma Miyuki Oshiro
3. **CARGO/FUNÇÃO:** Pesquisadora Científica
4. **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRBio** 39439/01-D
5. **UNIDADE DO HCFMUSP:** Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências – LIM 56
6. **AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**
 1. RISCO MÍNIMO (X)
 2. RISCO BAIXO ()

3. RISCO MÉDIO ()
4. RISCO MAIOR ()
7. **Duração da pesquisa:** 36 meses
8. **Desenho do estudo e objetivo(s):** Atualmente está sendo testada uma forma de tratamento da infecção pelo HIV, conhecida como vacina terapêutica. Para fazer essa vacina são necessárias células de defesa presentes no sangue do paciente. Depois, essas células são tratadas em laboratório e então injetadas novamente no próprio paciente. Esperamos que essa vacina aumente a defesa do organismo contra o HIV.

Apesar da produção da vacina ser um procedimento conhecido, existe um novo modo para o preparo desta vacina, que usa um medicamento já utilizado para o tratamento de outras infecções causadas por vírus chamado interferon-alfa (IFN-alfa). O IFN-alfa é conhecido por ajudar na defesa do nosso organismo contra os vírus. Considerando que esta nova maneira de preparar a vacina pode trazer alguns benefícios com relação ao processo utilizado até o presente (*protocolo convencional*), o objetivo deste estudo é analisar, em laboratório, as características da célula tratada com IFN-alfa (*protocolo alfa-DC1*) e comparar com a célula utilizada no *protocolo convencional*. É importante deixar claro que nenhum paciente será vacinado neste projeto. Os resultados obtidos poderão contribuir imensamente para o desenvolvimento de novos protocolos de vacina para o tratamento anti-HIV.
9. **Descrição dos procedimentos que serão realizados, o porquê e a determinação dos procedimentos experimentais e dos não rotineiros:** Neste trabalho, após avaliação clínica feita pelo médico, será coletado um volume de 70 mL de sangue (corresponde a cerca de 7 colheres de sopa). Este sangue será levado a um laboratório, onde as células serão separadas e a vacina será preparada utilizando o *protocolo convencional* e o novo protocolo com IFN-alfa (*protocolo alfa-DC1*). Estas vacinas serão então testadas em laboratório para comparar a capacidade dessas células de aumentar a defesa do organismo contra o vírus.
10. **Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:** coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço (coleta de sangue comum realizada na veia presente na dobra do braço. Para a coleta utilizamos agulha e seringa para “tirar” o sangue);

11. **Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 9 e 10:** o maior desconforto será dor local no momento da coleta do sangue (“picada” da agulha), porém este procedimento não deverá trazer nenhum risco à saúde do paciente. Todos os materiais utilizados serão descartáveis.
12. **Benefícios para o participante:** o voluntário não terá nenhum benefício adicional por participar deste trabalho, mas estará contribuindo enormemente para o desenvolvimento de uma nova estratégia de tratamento que poderá trazer muitos benefícios futuramente.
13. **Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:** não se aplica.
14. **Garantia de acesso:** em qualquer etapa do estudo, o participante terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Telma Miyuki Oshiro que pode ser encontrada:
Endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 - prédio IMT 2 - 3º andar – Cerqueira César – São Paulo/ SP. Telefone(s): 3061-7499 ou 3061-7457
Se o participante tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):
Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – Cerqueira César – São Paulo/ SP. Telefone: (11) 2661-6442 (ramais 16, 17, 18) ou (11) 2661-7585.
E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br
15. É garantida a **liberdade da retirada de consentimento** a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
16. **Direito de confidencialidade:** os resultados obtidos neste trabalho serão analisados em conjunto com outros pacientes. Não será divulgada a identificação de nenhum paciente;
17. **Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores:** os indivíduos participantes terão pleno acesso aos seus dados na pesquisa, bem como esclarecimento por parte dos investigadores, em qualquer momento que acharem necessário;
18. **Despesas e compensações:** não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há

Anexo

compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

19. **Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa:** os dados coletados serão utilizados exclusivamente para este estudo e não serão utilizados para nenhuma outra finalidade.

DECLARAÇÃO:Sujeito da pesquisa

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise fenotípica e funcional de α -DC1 derivada de indivíduos infectados pelo HIV-1”.

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

Assinatura do paciente/ representante legal

Data: ____/____/____

Assinatura da testemunha*

Data: ____/____/____

**Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.*

Responsável do projeto

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: ____/____/____