CLAUDIA FINAZZO

**Geração *in vitro* de células T efetoras e células T
reguladoras mediada por células dendríticas
pulsadas com vírus autólogo de pacientes 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 Patologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte

São Paulo

2012

CLAUDIA FINAZZO

**Geração *in vitro* de células T efectoras e células T
reguladoras mediada por células dendríticas
pulsadas com vírus autólogo de pacientes 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 Patologia
Orientador: Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Finazzo, Claudia

Geração *in vitro* de células T efetoras e células T reguladoras mediada por células dendríticas pulsadas com vírus autólogo de pacientes infectados pelo HIV-1 / Claudia Finazzo. -- São Paulo, 2012.

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

Orientador: Alberto José da Silva Duarte.

Descritores: 1.HIV-1 2.Células dendríticas 3.Imunoterapia 4.Células T efetoras
5.Linfócitos T reguladores

USP/FM/DBD-054/12

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese:

A Deus por tudo que me proporciona na vida;

*À minha mãe e meu pai, os quais amo muito, pelo
exemplo de vida e família;*

*A meus irmãos por tudo que me ajudaram até hoje e
por toda amizade e carinho;*

A meu marido Ricardo, pelo amor e apoio nas horas em que mais precisei;

*E a meus amados, Enzo e Catarina,
que vieram iluminar e trazer muitas alegrias à minha vida;*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte que me recebeu em seu laboratório e me deu a oportunidade e as ferramentas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho, por ser mais do que meu chefe e orientador, por acreditar na minha capacidade e no meu crescimento profissional e pessoal, por todas as horas dedicadas e, principalmente, pelo incentivo durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Maria Notomi Sato pela amizade, pela transmissão de conhecimentos e convivência acadêmica.

Ao Dr. João Bosco de Oliveira pelos conhecimentos repassados e por me ensinar a fazer ciência.

À Dra. Telma Oshiro, por ser minha parceira de trabalho, minha amiga, por ser um grande exemplo de mulher, de mãe e de profissional a ser seguido, por todos os ensinamentos e principalmente pelo incentivo durante toda esta etapa de minha vida.

Ao Dr. Alexandre Almeida pela amizade, pela ajuda com os resultados e por todas as discussões proveitosas.

Ao Dr. Jorge Casseb pela colaboração e dicas científicas durante o desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Claudio Sérgio Pannuti pelo acesso gentilmente cedido ao laboratório de nível de biossegurança 2+ do laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP) e ao Wilson Santos Freire pela colaboração na realização deste trabalho.

À Noemia Mie Orie e Rosângela Araújo por sua amizade e pelos ensinamentos e auxílio na citometria de fluxo.

Aos professores da Banca do Exame de Qualificação: Prof. Dra. Maria Irma Seixas Duarte, Prof. Dra. Hiro Goto e Prof. Dr. Gil Bernard pelas valiosas críticas e sugestões que muito contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A todos os amigos do LIM-56 e em especial: Laís Teodoro, Wanessa Cardoso da Silva, Bruna Santillo, Ana Paula Vieira, Mariana Palma, Camila Cárcere, Paula Rigatto, Jefferson Russo Victor, Cyro Alves de Brito, Soraya Ogusuku, Luanda Mara da Silva Oliveira e Elaine Cardoso. Obrigada pela ajuda, pela amizade e pelas boas risadas que demos nos últimos anos.

Aos funcionários da secretaria e suporte técnico que nos ajudam e apoiam em *todos* os momentos: Edna Reis, Juliana, Luiz Abraão, Lucio Martins, Celeste Romano, Angelo, Adriana, André Goto e a equipe de informática.

A todos os colegas do Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências – Lim-56 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que de uma forma ou de outra auxiliaram na execução deste trabalho e demonstraram seu carinho nos últimos anos.

A Deus pelos momentos de felicidade, que iluminam e me dão força para seguir a minha caminhada, e pelos momentos de dificuldade que me moldam a cada instante para ser um ser humano mais digno.

À minha família, o alicerce de minha vida: meus pais, Salvatore e Annunziata, pelo eterno cuidado, dedicação e amor; pelo apoio nos momentos difíceis e de inquietantes decisões; por estarem ao meu lado a cada passo, a cada pequena conquista e grandes realizações, pois estes não teriam valor se vocês não estivessem comigo.

Ao meu amor, Ricardo, pelo companheirismo em todos os momentos, pelo cuidado carinhoso e por mostrar que sonhos podem ser reais e que o ser humano pode se tornar cada vez melhor.

Aos meus irmãos Matteo e Toni, pelos momentos de orgulho, pelo companheirismo e amizade de sempre.

Às minhas irmãs de coração, Fabiana Lettieri, Cristiane Leite Finazzo e Luciana Bento de Souza que sempre estiveram nos momentos mais alegres e nos mais difíceis me apoiando e me dando muito carinho.

À Vanessa Batista e Alessandra Pontillo, amigadas nascidas no laboratório que hoje fazem parte da minha vida e da minha história.

Aos amigos do Coração: Meire Mari Siozak, Eliana Taniguchi, Fernanda Moielli, Vânia Conforto, Vânia Andréia Gomes, Egley Gomes, Catarina Bueno, Marinez Farana e Lucilene Rodrigues, pelas palavras de incentivo e pelo companheirismo.

A todos os pacientes infectados pelo HIV-1 do Ambulatório Clínico de Dermatologia Especializada - ADEE - 3002 do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) que foram os maiores responsáveis pela realização deste trabalho.

Ao programa DST/Aids do Ministério da Saúde, a FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese, meus sinceros agradecimentos.

NORMALIZAÇÃO

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1)	4
1.2 Apoptose celular no curso da infecção pelo HIV-1	5
1.3 Células T reguladoras e a infecção pelo HIV-1	8
1.4 O papel das células dendríticas na infecção pelo HIV-1	12
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	18
2.1 Objetivos específicos	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Casuística	20
3.2 Ativação de <i>PBMCs</i> de doador sadio para expansão viral	20
3.3 Isolamento e expansão de vírus	21
3.4 Inativação do vírus HIV	22
3.5 Geração e estímulo de células dendríticas	23
3.6 Caracterização fenotípica de células dendríticas	23
3.7 Interação de células dendríticas com linfócitos	24
3.8 Análise da apoptose	24
3.9 Análise da produção de IFN- γ por citometria de fluxo	25
3.10 Análise da população de células T reguladoras	26
3.11 Determinação da concentração de citocinas por citometria de fluxo	27
3.12 Congelamento e descongelamento de células	27
3.13 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Características demográficas e dados laboratoriais dos pacientes	30

4.2 Monitoramento da viabilidade celular em cocultivos de linfócitos estimulados com MoDCs pulsadas com AT-2-HIV.....	32
4.3 Perfil imunofenotípico das MoDCs pulsadas com AT-2-HIV.....	34
4.4 Indução de células T CD8+ e T CD4+ secretoras de IFN- γ após estímulo com MoDCs pulsadas com o vírus inativado.....	38
4.5 Análise da produção de IFN- γ por linfócitos T de acordo com o número de células T CD4+ e a Carga Viral	43
4.6 Indução de células T reguladoras após estímulo com MoDCs pulsadas com vírus inativado.....	52
4.7 Correlação entre percentual de células T reguladoras e carga viral ou número de células T CD4+.....	55
4.8 Produção de citocinas após estímulo com MoDCs pulsadas com AT-2-HIV.....	58
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÕES	68
7 ANEXOS.....	70
Anexo A- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	71
Anexo B- Aprovação da Comissão de ética.....	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APCs	Células apresentadoras de antígeno
ARVs	Drogas antirretrovirais
AT-2	Aldrithiol-2
AT-2-HIV	HIV inativado pelo Aldrithiol-2
CCR5	<i>C-C chemokine receptor type 5</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type</i>
D.P.	Desvio padrão
DCMs	Célula Dendrítica Mielóide
DCPs	Célula Dendrítica Plasmocitóide
DCs	Células Dendríticas
DCSIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing</i>
	<i>Non-integrin</i>
DiOC6	<i>3, 3'-dihexyloxacarbocyanine iodide</i>
ELISA	Ensaio imuno enzimático
et al.	e outros
Foxp3	<i>Forkhead transcription factor 3</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNFR-family related receptor</i>
GM-CFS	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1
ICAM-1	<i>Intracellular cell adhesion molecule 1</i>
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenase
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleucina
IONO	Ionicina

LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene-3</i>
LFA-3	<i>Lymphocyte function-associated antigen-3</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MoDCs	Células dendríticas derivadas de monócitos
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Forbol miristato acetato
SFB	Soro fetal bovino
T regs	Células T reguladoras
TCR	Receptores de células T
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Th	Células T auxiliares
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
Tr1	Células T reguladoras do tipo 1

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μM	Micromolar
mM	Milimolar
μL	Microlitro
mL	Mililitro
ng	Nanograma
pg	Picograma
g	Gramma
h	Hora
$\%$	Porcentagem
n°	Número
rpm	Rotações por minuto
UI	Unidade Internacional
$\pm$	Mais ou menos
$<$	Menor
$\leq$	Menor ou igual
$>$	Maior
$=$	Igual
$^\circ\text{C}$	Graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Viabilidade de MoDCs pulsadas com vírus inativado e de linfócitos estimulados após cocultivo.....	33
Figura 2: Análise morfológica das células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes infectados pelo HIV-1.....	35
Figura 3. Estratégia de <i>gate</i> para definir população de MoDCs CD11c+ e suas respectivas moléculas coestimuladoras.....	36
Figura 4. Perfil fenotípico de MoDCs de pacientes infectados pelo HIV-1 após pulso com o vírus inativado.....	37
Figura 5. Estratégia de <i>gate</i> para definir população de linfócitos produtores de IFN- γ	40
Figura 6. Cinética da expressão de IFN- γ por linfócitos T CD8 + após estímulo com MoDCs pulsadas com HIV autólogo	41
Figura 7. Cinética da expressão de IFN- γ por linfócitos T CD4 + cocultivados com MoDCs pulsadas com HIV autólogo.....	42
Figura 8. Indução de células T CD8+ e T CD4+ secretoras de IFN- γ após estímulo com MoDCs pulsadas com HIV de pacientes infectados pelo HIV-1 agrupados de acordo com o número de células T CD4+.....	45
Figura 9. Indução de células T CD8 + e CD4 + secretoras de IFN- γ após estímulo com MoDCs pulsadas com HIV-1 de pacientes agrupados de acordo com a carga viral.....	48
Figura 10. Perfil fenotípico de MoDCs de pacientes infectados pelo HIV-1 divididos de acordo com o número de células T CD4+ após pulso com o vírus inativado	50

Figura 11. Perfil fenotípico de MoDCs de pacientes infectados pelo HIV-1 divididos de acordo com a carga viral após pulso com o vírus inativado	51
Figura 12. Estratégia de <i>gate</i> para a subpopulação de células T reguladoras	53
Figura 13. Indução de células T reguladoras, após cocultivo com MoDCs pulsadas com vírus inativado	54
Figura 14. Correlação entre a carga viral e a porcentagem basal de T regs em pacientes infectados pelo HIV.....	56
Figura 15. Porcentagem basal de células T reguladoras em pacientes infectados pelo HIV.....	57
Figura 16. Correlação entre porcentagem basal de T regs e número de células T CD4+ em pacientes infectados pelo HIV	57
Figura 17. Dosagem de IL-2 em sobrenadante de cocultivo de linfócitos e MoDCs pulsadas com vírus inativado.....	59
Figura 18. Dosagem de IL-6 em sobrenadante de cocultivo de linfócitos e MoDCs pulsadas com vírus inativado.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas e dados laboratoriais dos pacientes.....	31
Tabela 2: Dados laboratoriais de pacientes infectados pelo HIV analisados de acordo com o número de células T CD4+.....	44
Tabela 3. Dados laboratoriais de pacientes infectados pelo HIV analisados de acordo com a carga viral	47

Resumo

Finazzo C. Geração *in vitro* de células T efetoras e células T reguladoras mediada por células dendríticas pulsadas com vírus autólogo de pacientes infectados pelo HIV-1. [tese]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

Imunização terapêutica utilizando células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) pulsadas com antígenos de HIV constitui um meio promissor de potencializar a resposta imune específica anti-HIV em pacientes infectados. Neste contexto, é importante ressaltar que células dendríticas além de estimular a resposta imune específica, podem ser capazes de promover a tolerância periférica em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ao induzir deleção, anergia ou através da expansão de células T reguladoras (T regs). Experimentos *in vitro* foram conduzidos para avaliar a capacidade de MoDCs pulsadas com HIV autólogo inativado em induzir apoptose celular, respostas celulares específicas e a geração de T regs. Os pacientes avaliados neste estudo foram indivíduos infectados pelo HIV, sem uso de tratamento antirretroviral (n = 14) com número de células T CD4⁺ acima de 350 células/ μ L. MoDCs foram geradas a partir de células mononucleares de sangue periférico e em seguida foram pulsadas com vírus autólogo inativado por Aldrithiol-2, tratadas com estímulo para maturação e então cultivadas com linfócitos autólogos. A apoptose de linfócitos T e MoDCs e a frequência de células efetoras e reguladoras foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença nos níveis de apoptose de células T CD4⁺, T CD8⁺ ou MoDCs entre os grupos pulsadas e não pulsadas com HIV inativado. Foi observado que tanto MoDCs pulsadas quanto aquelas não pulsadas com o vírus autólogo inativado foram capazes de induzir células T CD4⁺ secretoras de IFN- γ , enquanto que apenas MoDCs pulsadas levou a um aumento no percentual de células T CD8⁺ efetoras. Pacientes com contagem de células T CD4⁺ acima de 500 células/ μ L apresentaram um percentual maior de células T CD4⁺ secretoras de IFN γ após estímulo de MoDCs pulsadas. Esta diferença não foi observada em células T CD8⁺. T regs também foram induzidas *in vitro* após cocultivo com MoDCs. Níveis basais mais elevados de T regs foram encontrados em pacientes com carga viral plasmática baixa. Em conjunto, os resultados indicam que MoDCs pulsadas com HIV-1 são capazes de induzir linfócitos T efetores, mas também aumentam a frequência de T regs *in vitro*. Além disto, pacientes com maior contagem de células T CD4⁺ foram capazes de responder de forma mais eficiente ao estímulo com MoDCs pulsadas. Viremia persistente na infecção crônica pelo HIV pode estar associada significativamente à perda de T reg.

Palavras chaves: HIV-1; células dendríticas; Imunoterapia; células T efetoras; linfócitos T reguladores.

Summary

Finazzo C. ***In vitro* generation of effector T cells and regulatory T cells by monocyte-derived dendritic cells from HIV-1-infected patients pulsed with autologous virus.** [thesis]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

Therapeutic immunization using inactivated autologous HIV-pulsed dendritic cells (DCs) is a promising strategy to enhance specific anti-HIV immune responses in infected patients. In this context, it is important to note that DC besides stimulate a specific immune response, may be able to promote tolerance in peripheral CD4 + and CD8 + T cells inducing deletion, anergy or through expansion of regulatory T cells (T reg). *In vitro* experiments were conducted to evaluate the capacity of autologous HIV-stimulated DC to induce apoptosis, effector cellular T cell responses and T reg generation. For these purposes, we used peripheral blood from HAART-naïve HIV-infected patients (n=14) with CD4+ T cell counts above 350 cell/ μ L for generation of monocyte-derived DC (MoDC). MoDC were pulsed with aldrithiol-2 (AT-2)-inactivated autologous virus and matured. MoDC were then cocultured with autologous lymphocytes and the apoptosis, production of IFN- γ and T reg cell frequency were evaluated by flow cytometry. There was no difference in the rate of apoptosis of CD4, CD8 T cells or MoDC between the groups pulsed and not pulsed with inactivated HIV. MoDC pulsed or not with inactivated autologous virus induced IFN- γ +CD4+ T cells, whereas only pulsed MoDC were able to increase effector CD8+ T cells percentage along the time culture. Patients with CD4+ T cell counts above 500 had an increased percentage of CD4 + T cells secreting IFN- γ upon DC pulsed with HIV. This difference was not observed in CD8 + T cells. Interestingly, T reg were also induced *in vitro* after MoDC cocultivation. Higher baseline T reg counts were found in patients with lower plasma viral loads. These results show that MoDC pulsed with HIV-1 are able to induce effector lymphocyte but also elevate the frequency of T reg *in vitro*. Patients with higher CD4+ T cell counts are able to respond more efficiently to the stimulation with pulsed MoDC, and persistent viremia in chronic HIV infection is associated with significant loss of T reg.

Keywords: HIV-1; Dendritic cells; Immunotherapy; Effector T cell; Regulatory T lymphocytes.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), causadora da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids), reconhecida desde os anos 80, constitui um desafio sem precedentes na história moderna da Saúde Pública. Esta pandemia vem exigindo importantes medidas que mobilizam não só as autoridades sanitárias dos países envolvidos, mas também seus profissionais de saúde e instituições de pesquisa, na tentativa de minimizar seu impacto.

Desde o início da epidemia, em 1980, até junho de 2011, o Brasil apresentou 608.230 casos registrados de Aids de acordo com o último Boletim Epidemiológico (Ministério da Saúde, 2011). Em 2010, foram notificados 34.212 casos da doença e a taxa de incidência de Aids no Brasil foi de 17,9 casos por 100 mil habitantes. Estima-se que 630.000 indivíduos estejam infectados, o que corresponde a aproximadamente 1,9 % dos casos mundiais, segundo a Organização Mundial de Saúde (Ministério da Saúde, 2011; World Health Organization - WHO, 2010). Entretanto nos países em desenvolvimento, a infecção por HIV / Aids é um problema com grandes dimensões. Dados da WHO revelam que no ano de 2010, 1,8 milhões de pessoas morreram em decorrência desta doença (World Health Organization, UNAIDS, 2010). Vale lembrar que, o continente africano tem forte impacto neste índice de mortalidade em decorrência do grande número de indivíduos infectados e com Aids.

Apesar dos progressos obtidos, a infecção pelo HIV / Aids ainda constitui um sério problema de saúde pública. O tratamento com drogas antirretrovirais (ARVs) desempenha uma ação positiva sobre a mortalidade relacionada com a Aids, porém induz alterações clínicas e laboratoriais importantes (Egger et al, 1997; Eron et al, 1995; Eron et al, 1996; Fischl et al, 1987; Fischl et al, 1989; Fischl et al, 1990). O uso prolongado de ARVs, especialmente quando incluem os inibidores da protease, tem sido associado a várias anormalidades no metabolismo de lipídios, com aumento do risco de doenças cardiovasculares, redistribuição inadequada da gordura corporal e resistência à insulina, que também contribuem para a não adesão ao tratamento (Carr, 2000; Hengel et al, 1997; Henry et al, 1997; Lo et al, 1998; Madge et al, 1999).

Além das alterações decorrentes da terapia antirretroviral, o aumento de pacientes com falência terapêutica e o reconhecimento de vírus altamente patogênicos exigem imediatamente o desenvolvimento de novas terapias contra o HIV /Aids.

Entre as terapias propostas encontra-se a utilização de vacinas terapêuticas e/ou o uso de imunomoduladores, que tem como principais objetivos estimular a resposta imune específica contra o HIV e/ou possibilitar uma melhor reconstituição imunológica em pacientes com infecção pelo HIV em estágio avançado, além de retardar a terapêutica antirretroviral altamente potente. Essas ações resultariam em uma melhor condição de vida, uma menor transmissão do vírus e uma diminuição efetiva do uso de ARVs (Autran et al., 2003; Oshiro et al., 2009).

Lu e colaboradores (2004) propuseram uma vacina terapêutica com células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) pulsadas com HIV autólogo inativado para serem administradas em pacientes infectados cronicamente por esse vírus. Neste trabalho, as MoDCs foram utilizadas para tratar 18 pacientes, os quais não recebiam terapêutica antirretroviral altamente potente e apresentavam carga viral estável durante os seis meses precedentes ao uso dessa vacina. Os autores relataram uma diminuição média da carga viral em 80% dos pacientes, que se manteve estável nos primeiros 112 dias após a vacinação. Além disso, em oito pacientes foi observada uma prolongada supressão da carga viral, de mais de 90% com relação aos níveis iniciais, por pelo menos um ano. Essa vacina demonstrou ser capaz de induzir uma resposta imune celular efetiva contra o vírus, restabelecendo o número de células T CD4+, aumentando a resposta de linfócitos T citotóxicos (CTLs) e suprimindo a carga viral (Lu et al., 2004).

Embora grande parte dos indivíduos tenha evoluído positivamente com o tratamento, observou-se, neste mesmo trabalho, que nem todos os indivíduos são capazes de responder adequadamente à vacina. Não são conhecidas as causas dessa variação da resposta à vacina, mas fatores como a indução da apoptose nas MoDCs e nos linfócitos antígeno-específicos, ou a estimulação e ativação de células T reguladoras (T regs) poderiam contribuir negativamente na resposta imunológica contra o HIV.

Neste contexto, com o objetivo de compreender melhor os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta à vacina terapêutica nosso estudo visa avaliar *in vitro* fatores imunoreguladores como a indução da apoptose celular e a expansão de células T reguladoras mediante o estímulo de MoDCs pulsadas com HIV autólogo inativado de pacientes infectados com HIV. Resultados derivados deste estudo podem abrir caminho para o aperfeiçoamento deste método terapêutico.

1.1 Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1)

A infecção pelo HIV-1 está associada à destruição progressiva de linfócitos T CD4⁺ e o desenvolvimento de imunodeficiências que acabam levando à Aids (Douek et al., 2003). O HIV-1 tem a capacidade de infectar os linfócitos T CD4⁺ através da interação da proteína de seu envelope viral, gp120, com o receptor CD4 (Alkhatib et al., 1996) e os coreceptores CCR5 (Bass et al., 1992) e CXCR4 (Hogan et al., 2001) presentes na superfície da célula hospedeira.

O curso da infecção pelo HIV-1 é caracterizado por uma viremia bifásica, marcada por uma disseminação e propagação do vírus nos tecidos linfáticos durante a infecção primária, seguida do início da resposta imune antiviral do hospedeiro. Essa resposta coincide com a diminuição da carga viral plasmática (Pantaleo et al., 1993).

A infecção aguda dura poucas semanas e cursa com um rápido aumento da carga viral, um acentuado declínio na contagem de linfócitos T CD4⁺ (Asquith et al., 2000; Leonardo et al., 2002; Lyles et al., 2000; Cohen et al., 2001), disseminação do vírus para reservatórios de linfócitos T CD4⁺ em latência (Chun et al., 1998; Finzi et al., 1997; Chun et al., 1997) e o desenvolvimento de uma resposta imunológica específica contra o vírus (Pitcher et al., 1999; Rosenberg et al., 1997; Koup et al., 1994), principalmente através de uma expansão maciça de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) (Kahn e Walker, 1998). A importância das células T CD8⁺ citotóxicas é amplamente documentada e o surgimento desta resposta imunológica específica está diretamente correlacionado com uma diminuição da carga viral (Borrow et al., 1994; Koup et al., 1994).

A fase crônica é caracterizada pelo esforço do sistema imunológico em recuperar os danos causados durante a fase aguda da infecção. Assim, indivíduos infectados com HIV-1 iniciam a fase crônica da doença através de uma resposta humoral e celular eficaz contra o HIV, mantendo o controle parcial da replicação viral. Entretanto, ao longo do tempo esta resposta sofre um declínio lento e progressivo concomitante à diminuição da fração de células T CD4+ infectadas e a um aumento na ativação imunológica crônica de linfócitos T CD4+ e T CD8+ de memória e *naive* associada à depleção sistêmica destas células, por apoptose (Douek et al., 2003; Derdeyn & Silvestri, 2005).

1.2 Apoptose celular no curso da infecção pelo HIV-1

A disfunção e a depleção de linfócitos T CD4+ são marcadores importantes da infecção pelo HIV e estão dentre as principais causas da imunodeficiência que se instala no decorrer da infecção (Westby et al., 1996; Hogan & Hamer, 2001). Inúmeras explicações para a redução de células T CD4+ têm sido propostas incluindo uma produção diminuída das células T pelo timo, a diminuição da capacidade proliferativa das células T CD4+, o armazenamento do vírus em células T específicas presentes no tecido linfóide e o aumento da morte celular através da indução da apoptose pelo HIV (Lawn et al., 2001; Ribeiro et al., 2002; Gougeon, 2003). Estes mecanismos, responsáveis pelo declínio de células T CD4+ não atuam da mesma forma nos linfócitos T CD8+, cujo número aumenta até os últimos estágios da infecção pelo vírus (Ribeiro et al., 2002).

As células dendríticas (DCs), que também expressam o receptor CD4 e os coreceptores de quimiocinas, representam um alvo celular importante para o HIV-1, o que contribui para o desenvolvimento da imunodeficiência observada durante a infecção (Grassi et al., 1999; Donaghy et al., 2001; Jones et al., 2001). Essas células podem apresentar-se defeituosas especialmente pela ação das glicoproteínas do envelope viral que prejudicam sua maturação e secreção de citocinas (Meyaard et al., 1993; Meltzer et al., 1990). Laforge et al. (2011) demonstraram em ensaios *in vitro* que MoDCs cultivadas com HIV durante o processo de diferenciação, aumentou a suscetibilidade destas células em sofrer apoptose em resposta aos receptores de morte

celular. Além disso, propuseram que a infecção com HIV/SIV estaria associada com um aumento das formas ativas das moléculas pró-apoptóticas Bax e Bak e com uma diminuição das proteínas antiapoptóticas Mcl-1 e FLIP. Estes resultados sugerem que ambas as vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose estão envolvidas na morte de células apresentadoras de antígenos (APCs) durante a infecção pelo HIV/SIV. Porém, o impacto do HIV na indução de apoptose em monócitos e DCs ainda devem ser melhor elucidados.

A apoptose representa um dos mais importantes mecanismos responsáveis pela depleção de linfócitos T CD4⁺ (Leaderman et al., 2000; Gougeon, 2003) e CD8⁺ durante a infecção por HIV-1 (Ameisen et al., 1991; Groux et al., 1992; Meyaard et al., 1994). Por sua vez, o HIV desenvolveu estratégias para desencadear os mecanismos apoptóticos tanto em células infectadas como em não infectadas, induzindo assim a destruição das células efectoras do sistema imunológico (Gougeon, 2003; Saellens et al., 2004; Février et al., 2011).

Os principais mecanismos de indução de apoptose nos linfócitos T durante a infecção pelo HIV são: morte direta de células alvo infectadas devido à citotoxicidade do vírus, morte de células circulantes causada por proteínas virais pró-apoptóticas que são liberadas pelas células infectadas, morte dos linfócitos efetores através do recrutamento para os tecidos linfóides infectados, expressão alterada das moléculas reguladoras da apoptose celular pelos linfócitos e pelas APCs em consequência da ativação imunológica persistente e desregulação da produção de citocinas e quimiocinas (Gougeon & Montagnier, 1999; Selliah & Finkel, 2001; Saellens et al., 2004; Février et al., 2011).

As glicoproteínas do envelope viral apresentam um papel crucial na apoptose associada ao HIV através da via mediada por receptores de morte celular ou pela via mitocôndria-dependente. A gp-120 solúvel ou ancorada à membrana celular induz ambas as vias apoptóticas Fas-dependente (aumento de Fas/FasL, diminuição de FLIP) e Fas-independente (aumento de Bax, diminuição de Bcl-2), através de receptores celulares tais como CD4, CXCR4 e CCR5. A gp-120/gp-41 do HIV-1 é expressa na superfície da membrana plasmática de células infectadas levando à fusão célula-célula com células T CD4⁺ adjacentes não infectadas. Tais células fusionadas

entram em apoptose através da via intrínseca mitocôndria-dependente (Wan & Chen, 2010).

Está bem definido que a ativação imunológica crônica tem um importante papel na imunodeficiência modulada por células T e consequentemente na apoptose destas células (Hazenbergh et al., 2000; Mohri et al., 1998; Rosenzweig et al., 1998; Leng et al., 2001). Durante a fase crônica da doença, a ativação imune generalizada está associada com o aumento da sinalização do HIV-1 através de vias pró-apoptóticas dos linfócitos T e com uma diminuição da população de linfócitos T *naive* que ocorre com a progressão da doença, alcançando valores mínimos em indivíduos com Aids (Ginaldi et al., 1997; Ogg et al., 1999). Adicionalmente, a ativação imunológica crônica induz à expressão contínua de fatores de morte celular, podendo transformar linfócitos T e APCs em células efetoras da apoptose celular, levando à destruição também de células não infectadas ativadas (Gougeon & Montagnier, 1999). Sendo assim, através de seu recrutamento nos tecidos linfóides infectados, as células T CD4⁺ *naive* também podem ser mortas através das células dendríticas infectadas (Patterson et al., 2001).

Os níveis de apoptose de células T têm uma correlação com a progressão da doença, tendo sido demonstrado que indivíduos infectados pelo HIV não-progressores apresentam baixos níveis de apoptose celular (Gougeon, 2003; Gougeon et al., 1996). Além disso, um estudo desenvolvido na África mostrou que a infecção pelo HIV-2, que é menos patogênico que o HIV-1, está associado com um baixo nível de ativação celular e redução de apoptose em células T (Michel et al., 2000). Tal fato foi confirmado a partir da observação de uma forte correlação entre ativação imunológica e a depleção de células T CD4⁺, que foi evidenciada quando foram comparados pacientes infectados pelo HIV-1 e pacientes infectados pelo HIV-2 com grau similar de depleção de células T CD4⁺ (Sousa et al., 2002).

Entretanto, apesar de muitos trabalhos mostrarem correlação entre a frequência de apoptose e a progressão da doença (Gougeon et al., 1996; Meyaard et al., 1992), existem resultados contraditórios (Muro-Cacho et al., 1995) refletindo o fato de que a apoptose pode não representar o único fator responsável pela depleção de células T (Lawn et al., 2001) e que outros mecanismos, por exemplo, mediados por T regs, podem estar envolvidos.

1.3 Células T reguladoras e a infecção pelo HIV-1

As células T reguladoras (T regs) possuem mecanismos imunossupressores essenciais para a indução e manutenção da autotolerância imunológica, que controlam células T auto-reativas (Sakaguchi et al., 1995; Suri-Payer et al., 1998). As T regs também regulam linfócitos T aloreativos que reconhecem antígenos tumorais e aloenxertos, reduzindo assim a imunidade antitumoral e a rejeição a enxertos. Controlam ainda o balanço entre a resposta imune de linfócitos T auxiliares 1 (Th1) e T auxiliares 2 (Th2) (Terabe et al., 2004; Taylor et al., 2001; Taylor et al., 2002; Xu et al., 2003). Além de todas estas funções supressoras de células T auto e aloreativas, as T regs também podem suprimir a resposta imune a bactérias (Hori et al., 2002), fungos (Montagnoli et al., 2002), parasitas (Belkaid et al., 2002; Hisaeda et al., 2004) e vírus (Iwashiro et al., 2001; Suvas et al., 2003; Dittmer et al., 2004).

A maioria das T regs é CD4⁺ e expressa constitutivamente a molécula CD25 (cadeia α do receptor de IL-2, IL-2R α) (Sakaguchi et al., 1995). Embora amplamente veiculado, o uso da expressão de CD25 como um marcador fenotípico de T regs durante a resposta imune é muito limitado, pois células T recém-ativadas e não reguladoras também expressam transitoriamente a molécula CD25. Outros marcadores de superfície celular vêm sendo correlacionados com o fenótipo e função de T regs como a alta expressão de CD45RO (Baecher-Allan et al., 2001; Dieckmann et al., 2001) e CD62L (Kuniyasu et al., 2000; Eggena et al., 2005) ou a baixa expressão de CD127 (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006), porém o marcador considerado mais específico de T regs é o fator de transcrição Foxp3 expresso nessa população (Hori et al., 2003; Fontenot et al., 2003; Khattri et al., 2003).

De fato, foi demonstrado que as T regs expressam especificamente o gene regulador *Foxp3*, que codifica um fator de transcrição chamado de *forkhead transcription factor 3*, que controla seu desenvolvimento e função (Hori et al., 2003; Fontenot et al., 2003; Khattri et al., 2003). A expressão retroviral do gene *Foxp3* em células T periféricas CD4⁺CD25⁺ murinas ou humanas resulta na aquisição da função supressora por essas células. Portanto, a expressão de Foxp3 pode ser usada como um marcador molecular específico para as T regs CD4⁺CD25⁺ (Kronenberg e Rudensky, 2005).

As T regs CD4+CD25+ naturais, geradas no timo, apresentam-se como uma subpopulação de células T funcionalmente distinta e madura e constituem aproximadamente 5-10% da população de células T CD4+ (Suri-Payerbet al., 1998; Sakaguchi, 2004). Essas células expressam preferencialmente as moléculas CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*), GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-family related receptor*) e PD-1 (*programmed death-1*) em sua membrana celular (Sakaguchi, 2004) e necessitam da ativação via receptor TCR para se tornarem ativas e exercerem sua função (Thornton & Shevach, 1998; Shevach, 2002). Uma vez ativadas, pressupõe-se que sua função reguladora seja dependente do contato célula-célula (Shevach, 2002), de maneira antígeno específica (Tanchot et al., 2004; Nishimura et al., 2004; Belkaid & Rouse, 2005; Suffia et al., 2006).

Além da geração tímica natural de T regs CD4+CD25+, células T convencionais podem converter-se em T regs *in vivo* após estimulação antigênica crônica ou em condições de linfopenia (Apostolou e Boehmer, 2004; Curotto de Lafaille et al., 2004; Walker et al., 2003) e *in vitro* através da estimulação via TCR (Chen et al., 2003; Fantini et al., 2004). Essas células são conhecidas como T regs adaptativas ou induzidas e podem expressar ou não o Foxp3. As T regs induzidas Foxp3⁻ podem ser de 2 grupos distintos: T regs tipo 1 (Tr1) e células T auxiliares 3 (Th3). As Tr1 são provenientes de células T *naive* convencionais e dependem, exclusivamente, de IL-10 para sua diferenciação e função. As células Th3 estão envolvidas nas respostas relacionadas à tolerância oral e exercem seu papel supressor através da secreção de TGF- β (Mills, 2004). Em relação as T regs induzidas Foxp3⁺ (T reg_i), para essas células adquirirem a expressão de Foxp3 e conseqüentemente, sua função reguladora, é necessário uma estimulação antigênica via TCR e a presença de TGF- β e IL-2 (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009).

Como mencionado anteriormente, a ação das T regs não se limita apenas a antígenos próprios, podendo se estender também a agentes infecciosos. Desta forma, estas células contribuem para a persistência desses agentes infecciosos e o estabelecimento da infecção crônica (Mills et al., 2004; Belkaid & Rouse, 2005).

As T regs possuem uma profunda ação inibitória sobre a ativação, proliferação e função efetora de células T CD4+ e CD8+. É sabido que essas células suprimem a produção de citocinas (especialmente a IL-2) nos linfócitos T respondedores e

inibem a atividade efetora das células T CD8+. Além disso, também exercem sua função supressora através do contato célula-célula. As T regs podem levar células efetoras à morte celular através de mecanismos perforina e/ou granzima dependentes, de maneira semelhante às células T CD8+ citotóxicas (Grossman et al., 2004; Gondek et al., 2005; Cao et al., 2007), ou podem enviar sinais inibitórios para as células efetoras através de três mecanismos: regulação do AMP cíclico intracelular, que leva à inibição da proliferação celular e formação de IL-2 (Boop et al., 2007); expressão do CD39 e CD73 responsáveis pela catalisação da adenosina gerada (Deaglio et al., 2007); e através da interação com B7 (CD80 e CD86) expresso nas células T respondedoras (Paust et al., 2004).

Outra forma das T regs interferirem na atividade de células T é através da produção de citocinas supressoras como IL-10 (Asseman et al., 1999), TGF β (Read et al., 2000; Nakamura et al., 2001) e IL-35 (Collison et al., 2007), que atuam interrompendo o ciclo celular das células alvos. Outras moléculas incluindo o monóxido de carbono e as galectinas produzidas pelas T regs também foram reportadas por apresentarem papéis funcionais na supressão celular (Garin et al., 2007; Lee et al., 2007).

T regs ativadas exercem uma modulação negativa na expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, presentes nas APCs. As T regs expressam CTLA-4 que ao se ligar ao CD80 e CD86, fazem com que as APCs apresentem sua capacidade coestimuladora diminuída. Dessa mesma forma, essas células também estimulam DCs a expressarem a enzima indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO). Essa enzima cataboliza a conversão do triptofano em kinurenina, substância que atua de uma forma tóxica nos linfócitos próximos às DCs (Oderup et al., 2006; Puccetti e Grohmann et al., 2007). As T regs expressam a molécula LAG-3 que similarmente à ação do CTLA-4, interage com o MHC classe II presente nas DCs imaturas mantendo sua imaturidade e consequentemente, diminuindo sua capacidade de apresentação antigênica (Huang et al., 2004).

Em suma, múltiplos mecanismos podem atuar na supressão mediada pelas T regs tanto em células efetoras como em APCs e várias moléculas podem ser secretadas ou expressas na superfície dessas células e contribuir diretamente em suas funções supressoras. Sendo assim, as T regs apresentam um papel importante

limitando a imunopatologia proveniente de altos níveis de estimulação imunológica presentes nas infecções crônicas virais (Sakaguchi, 2003).

As T regs, assim como as células T convencionais, são progressivamente perdidas durante a infecção pelo HIV. Além disso, durante a fase crônica, a frequência das T regs circulantes em indivíduos infectados é mais alta quando comparada com controles normais e a ativação imunológica aumenta com o declínio dessas células (Prendergast et al., 2010). As T regs expressam os coreceptores do HIV CCR5 e CXCR4 e uma vez estimuladas, essas células tornam-se mais suscetíveis à infecção pelo HIV (Ji & Cloyd, 2009).

A queda no número das T regs circulantes pode ser explicada por diversos mecanismos: infecção preferencial pelo HIV e/ou propriedades apoptóticas das T regs e/ou realocação para outros tecidos linfóides (Février et al., 2011).

A infecção crônica pelo HIV interfere na distribuição das T regs CD4+CD25+ (Chase et al., 2008) que apresentam-se com número aumentado nos linfonodos periféricos e nos tecidos linfóides das mucosas onde a maioria das replicações do HIV acontece. Quando é comparada a frequência das T regs no sangue periférico e na mucosa do duodeno, a frequência e o número absoluto das T regs das mucosas apresentam-se altamente elevadas em pacientes sem tratamento (Epple et al., 2006; Nilsson et al., 2006; Fazekas de St Groth & Landay, 2008). A ligação do HIV nas T regs aumenta a expressão de receptores de migração como o CD62L, aumenta sua migração para os linfonodos periféricos e para o tecido linfóide das mucosas, e eleva sua sobrevivência celular (Ji & Cloyd, 2009).

Por outro lado, apesar de outros trabalhos relatarem que durante a infecção crônica, a frequência das T regs apresenta-se significativamente aumentada no timo, a entrada destas células na periferia não garante sua preservação, e assim seu número absoluto se mostra substancialmente diminuído (Jiao, 2009). Dessa forma, a habilidade dessa subpopulação desenvolver um efeito benéfico, ou seja, controlar a ativação imunológica e consequentemente retardar a progressão da doença, apresenta-se prejudicada.

Em modelos murinos de Aids, a progressão da doença está associada com o aumento de células T regs naturais no sangue periférico (Beilharz et al., 2004). Além disso, muitos estudos também indicam que a resposta imunológica contra a infecção

pelo HIV pode ser diminuída pelas T regs naturais (Aandahl et al., 2004; Kinter et al., 2004; Weiss et al., 2004) e que a persistência viral leva à expansão de T regs, resultando em uma tolerância imunológica aos antígenos do HIV (Weiss et al., 2004).

Neste contexto, as T regs apresentam uma importante função na imunoregulação e podem exercer um papel crítico na patogênese do HIV. Apesar da maioria das T regs de indivíduos infectados pelo HIV suprimirem a resposta de células T contra o vírus *in vitro*, e ainda induzirem a tolerância ao HIV *in vivo*, essas mesmas células também podem prevenir a ativação de células T CD4+ e assim, reduzir a viabilidade de células alvo para a replicação do HIV (Kinter et al., 2004). Desta forma, as células T regs apresentam dois papéis importantes na infecção viral, podendo controlar a imunopatologia e ao mesmo tempo facilitar a progressão para infecções crônicas (Nixon et al., 2005; Damoiseaux, 2006; Février et al., 2011).

1.4 O papel das células dendríticas na infecção pelo HIV-1

As células dendríticas (DCs) são as mais potentes células apresentadoras de antígenos (APCs) envolvidas no balanço entre a autotolerância e a resposta inata e adaptativa (Banchereu & Steinman, 1998; Usharauli, 2005).

Existem dois subtipos principais de DCs: as células dendríticas mielóides CD11c+ (DCMs), originárias de precursores mielóides CD34+, e as células dendríticas plasmocitóides CD123+ (DCPs) originárias de precursores linfóides. Ambas DCs são capazes de apresentar antígenos a linfócitos T específicos, porém diferem em outros aspectos funcionais. As DCMs são as mais abundantes e secretam altos níveis de IL-12 durante a apresentação antigênica, enquanto as DCPs produzem IFN- α quando ativadas, desempenhando um importante papel na imunidade antiviral (Siegal et al., 1999; Cella et al., 1999).

As DCs, em particular as DCMs, encontram-se distribuídas por todo o corpo, porém em maiores quantidades na pele e mucosas, onde são encontradas no estágio imaturo. Essas células imaturas expressam os receptores CCR5 e CCR6, responsáveis pela migração das DCs para os locais de inflamação onde são

produzidas quimiocinas inflamatórias tais como, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α e RANTES (Vanbervliet et al., 2002). Quando entram em contato com o antígeno as DCs imaturas respondem rapidamente internalizando o antígeno através da fagocitose, endocitose ou macropinocitose em vesículas lisossomais. Em seguida, essas células iniciam o processo de maturação, caracterizado pelo aumento na expressão das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade I e II (MHC I e II), moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40) e receptores de quimiocinas. Após o processo de maturação, as DCs expressam moléculas de adesão (CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3, ALCAM), adquirindo a capacidade de migrar através dos vasos linfáticos aferentes até as áreas ricas em células T nos linfonodos. Nestes locais, as DCs maduras apresentam os antígenos, via MHC classe I e II, aos linfócitos T CD8 $^{+}$ e T CD4 $^{+}$ específicos, estimulando a expansão clonal dos linfócitos T virgens (Banchereau *et al*, 2000; Liu *et al*, 2001; Steinman, 2001; Gluckman, *et al*, 2002; Adams *et al*, 2005).

As DCs são os primeiros tipos celulares encontrados e infectados pelo HIV após a exposição da mucosa ao vírus, sendo assim, além de iniciarem a resposta imune primária através da apresentação do antígeno, essas células também são utilizadas como um meio de estabelecer a infecção e propagar o vírus no hospedeiro (Hewson et al., 1999). Assim, embora a frequência de DCs infectadas *in vivo* seja até 100 vezes menor do que as células T CD4 $^{+}$ (McIlroy et al., 1995; Collman et al., 2003) estas células apresentam um papel fundamental na iniciação e manutenção da resposta imune contra o HIV (Knight & Stagg, 1993).

O HIV pode infectar diretamente as DCs e estas células infectadas podem subsequenteiramente infectar e induzir a apoptose nos linfócitos T CD4 $^{+}$ *naive*, contribuindo assim para a perda das células T CD4 $^{+}$ no início da infecção.

A infecção da célula dendrítica (DC) pelo HIV ocorre no estágio imaturo da célula, através da ligação da proteína do envelope viral, gp120, ao receptor CD4 e aos coreceptores CCR5 ou CXCR4 expressos na membrana celular (Zaitseva et al., 1997; MacDougall et al., 2002). Além disso, a DC pode capturar o HIV através de receptores de lectina tipo-C, em especial o CD209, também denominado DC-SIGN (Turville *et al*, 2002; Geijtenbeek et al., 2000). Porém, independentemente do modo

de entrada do vírus na DC, ambos os processos tornam-na infectada e capaz de infectar uma célula T CD4+.

Diversos trabalhos apontam para o declínio, ao longo da infecção pelo HIV, do número e da atividade funcional das APCs, incapacitando o organismo de elaborar uma resposta antiviral adequada favorecendo assim a progressão do quadro infeccioso até a doença propriamente dita (Aids) (Barron *et al.*, 2003). Acredita-se que essas alterações, juntamente com a diminuição do número de linfócitos T CD4+, sejam responsáveis pelo progresso da infecção (Grassi *et al.*, 1999; Donaghy *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001).

As DCs também apresentam um papel importante no controle da função e expansão das populações de células T reguladoras, visto que DCs podem expandir ativamente as células T supressoras CD4+CD25+ proporcionando um mecanismo que evita a indução da autoimunidade (Steinman *et al.*, 2003; Steinman & Nussenzweig, 2002; Yamazaki *et al.*, 2003). Fehervari & Sakaguchi (2004) demonstraram que as DCs são as únicas APCs capazes de resgatar as T regs do estado anérgico, estimular a sua proliferação e produção de IL-2, e ainda ativar sua função imunossupressora mantendo estável a expressão do *Foxp3*.

Estudo *in vitro* realizado em pacientes infectados pelo HIV revelou que DCs imaturas infectadas pelo HIV não foram ativadas mediante os estímulos de maturação, e deste modo foram incapazes de apresentar um perfil imunogênico. Essas células não conseguiram processar e apresentar o antígeno viral, desta forma estabelecendo uma tolerância ao vírus. Além disso, observou-se um aumento da função imunossupressora evidenciada através do aumento na produção de IL-10 em cocultivo dessas células com linfócitos autólogos. Os autores sugeriram que a infecção viral pode participar com um aumento da expressão de receptores de ICOS-L, presente na superfície das DCs, responsáveis pela indução das T regs (Granelli-Piperno *et al.*, 2004).

Considerando o papel central que as DCs desempenham no direcionamento da resposta imune, tem sido proposta a manipulação do sistema imunológico para o controle de doenças infecciosas através de vacinas terapêuticas, incluindo imunoterapia para pacientes infectados pelo HIV-1. Apesar de apresentarem uma condição imunológica adequada no início da infecção, os indivíduos infectados não

são capazes de eliminar o vírus. Dessa forma, constitui-se um grande desafio estimular o organismo através das DCs de maneira a conter efetivamente a infecção. Essas células vêm sendo amplamente utilizadas como adjuvantes e carreadores de antígeno para induzir respostas antígeno-específicas de células T com pouca ou nenhuma toxicidade em estratégias de vacinação para uma variedade de doenças, incluindo câncer (Sinkovics & Horvath, 2000; Wierdecky et al., 2006).

No contexto de imunoterapia, é importante notar que DCs, além de seu papel em estimular uma resposta imune específica, também podem promover tolerância periférica em células T CD4⁺ e CD8⁺ via deleção, anergia ou expansão de T regs (Reis e Sousa, 2006; Yamazaki & Steinman, 2009).

Assim, células Th1-vírus específicas podem ajudar diretamente a promover a diferenciação das células T CD8⁺ - vírus específicas através da secreção de citocinas *in situ* e/ou através de um mecanismo indireto, desencadeando a ativação da DC mediada por CD40 que favorece a diferenciação de células T CD8⁺ (O'Sullivan & Thomas, 2003). Assim, estratégias de vacinação que aumentam células Th1-vírus específicas poderiam potencialmente ser utilizadas no tratamento de pessoas com infecção progressiva pelo HIV-1 e outras doenças virais crônicas.

Estratégias de imunização utilizando DCs pulsadas com antígeno têm se mostrado uma forma racional e promissora de potencializar a resposta imune específica anti-HIV em pacientes infectados. A proposta da vacina é retardar o início da terapêutica antirretroviral altamente potente resultando em uma melhor condição de vida e, sobretudo reduzindo a resistência precoce aos antirretrovirais.

Trabalho anteriormente publicado mostrou que uma vacina composta de MoDCs autólogas pulsadas com HIV-1 autólogo inativado pelo calor, diminuiu progressivamente a magnitude e a amplitude da resposta das células T CD8⁺ HIV-1-específicas e aumentou a resposta proliferativa das células T CD4⁺ HIV-1-específicas (Garcia et al., 2005). Connolly e colaboradores (2008) também aplicaram uma vacina de MoDCs autólogas carregadas com um peptídeo sintético do HIV em pacientes tratados com HAART e observaram um aumento significativo na frequência de células produtoras de IFN- γ HIV-específicas. Curiosamente, resultados preliminares deste mesmo trabalho sugeriram um aumento na frequência de T regs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ após 2-4 semanas da vacinação. Esse aumento de

T regs poderia ter impedido uma resposta mais robusta de células T HIV-1-específicas para essa terapia (Rinaldo, 2009).

Resultados expressivos foram demonstrados por Lu e colaboradores (2004) que utilizaram MoDCs autólogas pulsadas com vírus autólogo inativado quimicamente. Esta vacina mostrou ser uma estratégia promissora para controlar a infecção, uma vez que induziu uma resposta imune celular efetiva contra o vírus e suprimiu a carga viral.

Neste contexto, se considerarmos o interesse nesta vacina terapêutica e avaliarmos seu custo operacional, a expectativa gerada em torno do tratamento e o fato de que nem todos os pacientes respondem eficientemente à vacina, torna-se crucial entender os possíveis mecanismos envolvidos durante esta estimulação que possam estar envolvidos na boa ou na má resposta dos pacientes vacinados. Essa informação ajudaria a avaliar possíveis mudanças deste protocolo com o fim de potencializar seu sucesso.

Este estudo propõe realizar uma avaliação *in vitro* da frequência de células T efectoras e T regs de pacientes cronicamente infectados antes e após estimulação com MoDCs autólogas pulsadas com HIV autólogo inativado. Além disso, este estudo avalia os níveis de apoptose de células T e DCs durante o cocultivo. A indução de T regs e morte celular dos linfócitos após a vacinação com DCs pulsadas pode explicar as variações observadas nos resultados após a vacinação terapêutica de Lu e colaboradores (2004). Estes dados fornecem informações importantes a fim de maximizar o sucesso dessa estratégia de vacinação terapêutica e beneficiar um número maior de pacientes infectados pelo HIV.

OBJETIVOS

2. Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a capacidade de MoDCs pulsadas com HIV autólogo inativado em induzir respostas celulares específicas e mecanismos imunorreguladores em pacientes infectados pelo HIV-1

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a apoptose de MoDCs, induzida por HIV autólogo inativado e apoptose de linfócitos ativados após estímulo com MoDCs pulsadas com HIV autólogo inativado.
2. Avaliar a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ após estímulo com MoDCs pulsadas com HIV autólogo inativado
3. Analisar a frequência de T regs após interação de linfócitos com MoDCs pulsadas com vírus autólogo inativado.

MATERIAS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1 Casuística

Foram incluídos no estudo 14 pacientes cronicamente infectados pelo HIV, sem uso de terapia antirretroviral, com contagem de células T CD4+ acima de 350 células/ μ L, sem alteração significativa no número de células T CD4+ e carga viral plasmática nos últimos 6 meses (até 25% no número absoluto de células TCD4+ e variação de até 0,5 log na carga viral).

Foram fatores de exclusão mulheres grávidas, menores de 18 anos, indivíduos com neoplasias, infecções oportunistas (até 6 meses do período que antecede o estudo), doenças autoimunes, imunodeficiências primárias e/ou que apresentem contagem de células T CD4+ inferior a 350 células/ μ L.

Os pacientes foram selecionados no Ambulatório Clínico de Dermatologia Especializada - ADEE - 3002 do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e participaram voluntariamente após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP - CAPPesq (nº: 730/06), de acordo com a resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

3.2 Ativação de *PBMCs* de doador sadio para expansão viral

Para a obtenção de células mononucleares de sangue periférico (*PBMCs*) de doador sadio foram utilizadas bolsas de sangue obtidas do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, com sorologia negativa para HIV, sífilis, hepatite, doença de chagas, malária e HTLV.

O material foi separado por gradiente de Ficoll/Hypaque e as *PBMCs* obtidas foram congeladas e armazenadas a -70° C ou em nitrogênio líquido.

Entre 24 a 48 horas antes do uso, cerca de 10^7 células foram descongeladas e cultivadas em 5 mL de meio de cultura RPMI (Gibco Life Technologies) contendo

10% de soro fetal bovino (SFB), 5 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA) e 20 UI/mL de IL-2 para promover a ativação das células.

3.3 Isolamento e expansão de vírus

O isolamento e expansão de vírus obtidos através de amostra de sangue periférico de pacientes infectados foram realizados segundo protocolo obtido da ACTG *Laboratory Technologist Committe*, com algumas modificações (disponível em http://www.niaid.nih.gov/d aids/vir_manual/full_vir_manual.pdf). Todas as etapas, incluindo isolamento, expansão e inativação, foram realizadas em laboratório de nível de biossegurança 2+ do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP), cujo acesso foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Cláudio Sergio Pannuti.

Para este ensaio foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue periférico de paciente infectado pelo HIV. Após diluição do sangue à proporção de 1:2 em solução salina, as *PBMCs* foram separadas por gradiente Ficoll/Hypaque densidade 1077, através de centrifugação por 20 minutos a 867g.

Cerca de 10^7 *PBMCs* de paciente infectado foram juntados às *PBMCs* de doador sadio, (previamente ativadas com PHA por 24 a 48 h) e a mistura de células foi cultivada em meio de cultura RPMI contendo 10% de SFB e IL-2 (20 UI/mL) e mantida a 37° C em estufa de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias e semanalmente as culturas foram realimentadas com 10^7 *PBMCs* de doador sadio previamente ativadas com PHA.

As culturas foram monitoradas semanalmente pelo método de ELISA, de acordo com as informações do fabricante (ELISA kit Vironostika HIV-1 Antigen, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France), para detecção da proteína p24 no sobrenadante. Culturas positivas foram expandidas em garrafas maiores e culturas que se mantiveram por mais de 4 semanas negativas foram desprezadas.

A cada repique o sobrenadante da cultura contendo as partículas virais foi armazenado a -20° C para posterior inativação. Após acúmulo de cerca de 200-250 mL de sobrenadante comprovadamente positivo para p24 as culturas foram

finalizadas, sendo as PBMCs armazenadas em nitrogênio líquido e o sobrenadante aliquotado e congelado a -70°C .

3.4 Inativação do vírus HIV

Para a inativação dos vírus obtidos por expansão em PBMCs de doador sadio, foi utilizado o protocolo descrito por Rossio et al. (1998), com algumas modificações.

O volume total dos sobrenadantes obtidos nas culturas de expansão viral foi incubado com $250\text{ }\mu\text{M}$ de Aldrithiol-2 (AT-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) sob agitação constante por 1 hora a 37°C a fim de se preservar intacta a conformação nativa do vírus e manter a capacidade da gp120 de se fundir à célula.

Após a inativação, o material foi centrifugado a 3.000g por 20 minutos para remoção de *debris* celulares e a seguir, concentrados em dispositivo de ultrafiltração Amicon (Millipore, Billerica, MA, USA) com membrana de 100 kDa , através de centrifugação a 2880 g por 20 minutos em cada ciclo. Após a concentração de todo o volume, o material foi lavado 2 vezes em PBS estéril para remoção do AT-2.

A purificação dos vírus foi realizada por ultracentrifugação em centrífuga L80 Beckman, utilizando rotor de ângulo móvel (SW41 Ti). Para tanto, o material foi acondicionado sobre solução de sacarose 20% em TNE (20 mM de Tris/HCl, 20 mM de NaCl e $2,5\text{ mM}$ de EDTA), na proporção de 1/3 de sacarose: 2/3 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. Procedeu-se à nova centrifugação por mais 1 hora a 100.000 g e em seguida o *pellet* foi ressuspensionado em meio de cultura (AIMV) e quantificado com relação ao número de partículas virais através da reação de cadeia de polimerase (PCR), utilizando kit Cobas Amplicor (Roche Diagnostics).

O controle do processo de inativação foi realizado através da cultura durante 4 semanas de uma alíquota de partículas virais inativadas, na presença de PBMCs previamente estimuladas com PHA. O sobrenadante foi recolhido a cada 3 dias e monitorado com relação aos níveis de p24, dosados através da técnica de ELISA.

3.5 Geração e estímulo de células dendríticas

Para a obtenção de células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) de indivíduos infectados pelo HIV foram coletados 70 mL de sangue periférico e as células mononucleares foram separadas por gradiente Ficoll/Hipaque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Em seguida, células CD14⁺ foram purificadas por seleção magnética (VARIOMACS, Miltenyi Biotech, Alemanha). Para tanto, as *PBMCs* foram incubadas com microesferas magnéticas conjugadas a anticorpo monoclonal anti-CD14 humano (Miltenyi Biotech, Alemanha) e após lavagem foram acondicionadas em colunas magnéticas. Após exaustiva lavagem para retirada de células não marcadas, a coluna foi removida do campo magnético e as células CD14⁺ foram eluídas e cultivadas em meio de cultura (AIM-V; Adoptive Immunotherapy Media - Gibco, Langley, OK, USA) suplementado com 50 ng/mL de IL-4 e 50 ng/mL de GM-CSF (R&D Systems, Wiesbaden, Germany). No 3º dia a cultura foi suplementada pela adição de IL-4 e GM-CSF nas mesmas concentrações. No 6º dia de cultura as células foram pulsadas por 2 horas com HIV autólogo inativado e após 2 ciclos de lavagem, foi adicionado reforço de IL-4 e GM-CSF (50 ng/mL de cada citocina), acrescentando-se ainda um *pool* de citocinas pró-inflamatórias (50ng/mL de TNF α , 10ng/mL de IL-1 β e 100ng/mL de IL-6) (R&D Systems, Wiesbaden, Germany). As células foram então cultivadas por mais 48 horas para completa ativação (Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Romani *et al*, 1996). Após 48 horas de cultivo as células foram utilizadas para ensaios de citometria e co-cultivo com linfócitos.

As células CD14⁻, constituídas predominantemente por linfócitos, foram congeladas a -70°C para uso posterior.

3.6 Caracterização fenotípica de células dendríticas

MoDCs pulsadas ou não com vírus, foram analisadas com relação à expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo (FacsCalibur, BD Bioscience).

Para tanto foi analisado o percentual de células expressando CD1a, CD11c, CD14, CD80, CD83, CD86, HLADR e DC-SIGN, utilizando anticorpos monoclonais específicos para cada marcador, conjugados a fluorocromos e seus respectivos isótipos (BD Bioscience Pharmingen, California, USA). Foram analisados no mínimo 10.000 eventos de um *gate* determinado segundo as características de tamanho e granulosidade, excluindo-se a região de células mortas. O software FlowJo™ (Tree Star, Ashland, OR) foi utilizado para análise dos dados.

3.7 Interação de células dendríticas com linfócitos

A fração de células CD14- constituída predominantemente por linfócitos T autólogos, e conservados por congelamento, foi cultivada na concentração de 2×10^5 células/poço na presença de MoDCs maduras previamente pulsadas com HIV autólogo inativado (1×10^9 partículas virais/mL). Foram utilizadas as proporções linfócito/DC de 5:1. As células foram distribuídas em duplicatas em placas de 96 poços (Corning Incorporated Costar, NY, USA) e incubadas a 37° C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 5 dias (Weissman et al., 2000; Moris et al., 2006).

3.8 Análise da apoptose

A viabilidade tanto das MoDCs pulsadas com vírus autólogo quanto dos linfócitos T por elas estimulados foi avaliada após cocultivo, com a finalidade de quantificar as células em apoptose em comparação ao cocultivo estimulado com DC não pulsadas com o vírus. Para tanto foi estabelecida uma cinética em 3 tempos: 0, 96 e 120 horas após o cocultivo. Amostras contendo cerca de 2×10^5 células, analisadas em duplicata, foram coradas com os marcadores de superfície celular através da incubação por 30 minutos com anticorpos monoclonais específicos, em ambiente escuro a 4° C. Os anticorpos monoclonais utilizados foram CD3 (PCy5), CD4 (PE), CD8 (PE), CD11c (PCy5) e CD14 (PE) (BD Bioscience Pharmingen, California, USA), além dos respectivos controles isotípicos.

Durante o início do processo de apoptose celular ocorre uma perda do potencial da membrana interna da mitocôndria. Essa mudança no potencial da

membrana pode ser avaliada pela marcação da mitocôndria com corantes catiônicos e lipofílicos dependentes de potencial, como o 3, 3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6), permitindo análise por citometria de fluxo (Sgonc & Gruber, 1998). Portanto, após o período de incubação dos marcadores de superfície, a apoptose foi determinada pela perda do potencial da membrana da mitocôndria, através da marcação com 40 nM de DiOC6 (Calbiochem, EMD Biosciences) por 15 min a 37°C.

As amostras foram em seguida adquiridas em citômetro de fluxo e a porcentagem de perda celular foi analisada de acordo com a seguinte fórmula: $[(\text{número de células vivas antes do cocultivo} - \text{número de células vivas após o cocultivo}) / \text{número de células vivas antes do cocultivo}] \times 100$. A sobrevivência celular foi calculada da seguinte maneira: $100 - \% \text{ de perda celular}$ (Oliveira et al., 2007). O software FlowJo™ (Tree Star, Ashland, OR) foi utilizado para análise dos dados.

3.9 Análise da produção de IFN- γ por citometria de fluxo

A análise da produção de IFN- γ foi realizada após cocultivo com MoDCs pulsadas ou não pulsadas com HIV autólogo inativado nos tempos 0, 96 e 120 horas, sendo que 22 horas antes do término, cada cultura foi tratada com 20 $\mu\text{g/mL}$ de brefeldina A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). O controle positivo da marcação intracelular foi constituído pela cultura de MoDCs+linfócitos estimulados por 21 horas com 20 ng/mL de forbol miristato acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) + 10 $\mu\text{g/mL}$ de ionomicina (IONO) (Sigma-Aldrich).

Para a análise da produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e CD8⁺ foi utilizada a combinação de anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD8 e anti-IFN- γ conjugados respectivamente a PE-Cy5, FITC e PE (BD Bioscience Pharmingen).

Inicialmente foram marcadas as moléculas de superfície celular (CD3 e CD8) através da adição de 10 μL de cada anticorpo e as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C. Em seguida as células foram lavadas com tampão de coloração e então se iniciou o protocolo para marcação intracelular, utilizando o kit Fix & Perm (Caltag, Burlingame, CA). As células foram fixadas (reagente A) por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com tampão de marcação e

permeabilizadas (reagente B) por 20 minutos a 4°C conforme protocolo padronizado pelo fabricante (Caltag) sendo nesta etapa incubadas com anticorpo anti-IFN- γ (Caltag). Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS para aquisição no citômetro de fluxo. Foram analisados no mínimo 50.000 eventos de um *gate* determinado segundo as características de tamanho e granulosidade, excluindo-se a região de células mortas. O software FlowJo™ (Tree Star, Ashland, OR) foi utilizado para análise dos dados.

3.10 Análise da população de células T reguladoras

A frequência de T regs, caracterizadas pelo fenótipo CD4+CD25+Foxp3+, foi analisada nas culturas de linfócitos estimulados por MoDCs pulsadas ou não com vírus inativado, em diferentes tempos, quais sejam 0, 96 e 120 horas.

Cerca de 2×10^5 células foram coletadas e ressuspensas em meio RPMI com 1% de soro fetal bovino e as moléculas de superfície (CD4 e CD25) foram marcadas utilizando os anticorpos monoclonais conjugados respectivamente aos fluorocromos PE e PCy5 (BD Bioscience Pharmingen).

A suspensão de células foi então marcada intracelularmente com o anticorpo anti-FOXP3 utilizando-se o kit PE anti-human Foxp3 Staining Set (eBioscience San Diego, CA, USA), segundo especificações do fabricante. Em suma, após a marcação das moléculas de superfície, as células foram lavadas com PBS e então incubadas com 1mL da solução de fixação/permeabilização por 30 minutos no escuro a 4 °C. Em seguida, as amostras foram lavadas 2 vezes com 1 mL do tampão de permeabilização e em seguida ressuspensas com 100 μ L do mesmo tampão e incubadas com 20 μ L do anticorpo anti-Foxp3 (eBioscience) a 4 °C por 30 minutos no escuro. Após este período as amostras foram lavadas novamente e então ressuspensas em 200 μ L de PBS.

As amostras foram então analisadas no citômetro de fluxo adquirindo-se no mínimo 50.000 células de uma população determinada segundo suas características de tamanho e granulosidade, excluindo-se a região de células mortas. Os dados adquiridos foram analisados utilizando-se software FlowJo™ (Tree Star, Ashland, OR).

3.11 Determinação da concentração de citocinas por citometria de fluxo

A dosagem de citocinas de IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17 no sobrenadante de coculturas de linfócitos e MoDC pulsadas e não pulsadas com AT-2-HIV foi realizada por citometria de fluxo utilizando o Kit Human Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array (CBA, BD Pharmingen, CA, EUA).

As amostras de sobrenadantes e a curva de concentração padrão foram incubadas com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, foi acrescentado 1mL da solução de lavagem e centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. Retirou-se o sobrenadante e com 300 μ L da solução de lavagem ressuspendeu-se as amostras para as aquisições no citômetro de fluxo.

As aquisições das amostras foram realizadas no citômetro BD FACS Calibur (BD&Bioscience) e os resultados foram gerados em formato gráfico e tabular utilizando BD CBA Analysis Software (BD&Bioscience). O limite de detecção fornecido pelo fabricante é de 2,6 pg/mL (IL-2), 2,4 pg/mL (IL-6), 4,5 pg/mL (IL-10), 3,8 pg/mL (TNF- α), 3,7 pg/mL (IFN- γ) e 18,9 pg/mL (IL-17).

3.12 Congelamento e descongelamento de células

Células obtidas por depleção de monócitos CD14⁺ foram congeladas para uso posterior. Para tanto, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em solução de soro fetal bovino contendo 10% de DMSO (Sigma-Aldrich), em caixa de congelamento com isopropanol. Os tubos foram armazenados a -80° C por 24h e posteriormente transferidos para nitrogênio líquido.

Para descongelamento, o criotubo contendo as células foi rapidamente imerso em banho-maria a 37° C e as células lavadas por 2 vezes em meio de cultura para retirada do meio de congelamento. A viabilidade das células descongeladas foi avaliada através da utilização do corante azul de tripan.

3.13 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (versão 4.0). Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Wilcoxon comparando o início do cocultivo com os diferentes momentos após a cocultura. Mann-Whitney foi utilizado para comparar diferenças entre os grupos de indivíduos. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para determinar a correlação entre duas variáveis. A significância estatística foi definida como $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Características demográficas e dados laboratoriais dos pacientes

Selecionamos pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1 com carga viral plasmática (CV) detectável, acima de 50 cópias/mL para obtenção do isolado viral e contagem de células T CD4+ igual ou acima de 350 células/ μ L.

O grupo de pacientes estudados foi constituído por 71% de indivíduos do sexo masculino (10/14), com contagem média de células T CD4+ de 553 células/ μ L (range, 351 - 921 células/ μ L) e contagem média de células T CD8+ de 1214 células/ μ L (660 – 3099 células/ μ L) (Tabela I). A média de nadir de células T CD4+ dos pacientes estudados foi de 474 células/ μ L (351–753 células/ μ L).

Tabela I. Características demográficas e dados laboratoriais dos pacientes.

Pacientes	Sexo	Idade	Contagem de células T CD4+ (cél/s/ μ L)		Contagem de células T CD8+ (cél/s/ μ L)	Carga Viral (cópias/mL)	Carga Viral (Log)
			Basal	Nadir	Basal		
1	F	39	518	473	1.069	3. 679	3,6
2	M	48	534	534	1.160	21.189	4,3
3	F	30	904	447	3.099	102.000	5,0
4	F	42	619	570	1.294	7.597	3,9
5	M	49	852	624	1.952	8.427	3,9
6	M	40	921	753	764	145.000	5,2
7	M	40	413	413	1.303	53.300	4,7
8	M	35	477	494	810	32.906	4,5
9	F	40	607	369	680	548	2,7
10	M	32	474	460	660	6.983	3,8
11	M	27	595	595	907	3.985	3,6
12	M	31	380	380	1.373	2.923	3,5
13	M	24	351	351	935	18.503	4,3
14	M	41	371	371	988	23.566	4,4
média $\pm$							
D.P.		38,4 $\pm$ 7,4	553 $\pm$ 201	474 $\pm$ 124	1.214 $\pm$ 641	30.757 $\pm$ 42.671	4,1 $\pm$ 0,6

4.2 Monitoramento da viabilidade celular em cocultivos de linfócitos estimulados com MoDCs pulsadas com vírus inativado

Para avaliar se o vírus inativado (AT-2-HIV) poderia induzir apoptose nas MoDCs ou se MoDCs pulsadas com AT-2-HIV teriam a capacidade de alterar a viabilidade dos linfócitos estimulados por essas células, avaliamos a viabilidade celular após 96 e 120 horas de cocultivo. Para isso, utilizamos o corante catiônico DiOC6, cuja fluorescência reflete o potencial transmembrana mitocondrial, que é um marcador precoce de apoptose. Considerou-se o início do cocultivo (tempo 0) como 100% da viabilidade celular.

As Figuras 1A-C ilustram um exemplo representativo da estratégia de *gate* utilizada para contemplar as duas populações analisadas (linfócitos e DCs). Inicialmente consideramos o tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) das células (Figura 1A), seguido do marcador específico de cada população (Figura 1B). Utilizando o *gate* específico, analisamos através de um histograma a expressão do marcador de viabilidade Dioc6 (Figura 1 C).

Por sua vez, as Figuras 1D-F mostram os resultados obtidos nas amostras de cocultivos. Observamos que houve uma diminuição gradual da viabilidade celular após 96 e 120 h de cocultivo, em relação ao tempo 0. Esta redução foi observada tanto nas MoDCs quanto nos linfócitos, independente das MoDCs terem sido pulsadas ou não com AT-2-HIV. Além disso, não foi detectada diferença na taxa de apoptose de MoDCs pulsadas ou não com AT-2-HIV (Fig. 1D) e nos linfócitos T CD8 + (Fig. 1E) e T CD4 + (Fig. 1F) estimulados por essas DCs.

Estes resultados sugerem que o AT-2-HIV não induziu morte celular nas MoDCs pulsadas e, além disso, MoDCs pulsadas não interferiram na viabilidade de linfócitos estimulados por essas células.

Figura 1 - Viabilidade de MoDCs pulsadas com vírus inativado e de linfócitos estimulados após cocultivo. Gráfico (*dotplot*) representativo da estratégia de *gate* para análise de células viáveis na população de linfócitos T CD4+ de pacientes HIV+ (A, B, C). Linfócitos de pacientes infectados pelo HIV-1 (n = 14) foram cultivados com MoDCs pulsadas (grupo DC-HIV) ou não pulsadas com vírus autólogo inativado (grupo DC) e o percentual das MoDCs (D), células T CD8 + (E) e células T CD4 + (F) viáveis foi determinado por citometria de fluxo utilizando o corante DiOC6. Os resultados são expressos em média $\pm$ SEM.

4.3 Perfil imunofenotípico das MoDCs pulsadas com AT-2-HIV

Para avaliarmos o perfil fenotípico de MoDCs após pulso com HIV autólogo inativado, inicialmente diferenciamos DCs a partir de monócitos (n = 14 pacientes). Nesta fase obtivemos DCs com perfil de imaturidade. As células apresentaram-se com aspecto arredondado como observado na figura 2A e B. Em seguida as MoDCs foram pulsadas com AT-2-HIV e induzidas a maturação com citocinas pró-inflamatórias. Nesta fase, as DCs ativadas foram caracterizadas morfológicamente por seu aspecto estrelado devido às projeções dos dendritos (Figura 2 C, D). O aspecto das culturas de MoDCs não pulsadas com o vírus foi semelhante ao das MoDCs pulsadas. Após 48h estas culturas contendo MoDCs pulsadas e não pulsadas foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à expressão das moléculas HLADR, CD80, CD86, DC-SIGN, CD1a e CD83.

A Figura 3 ilustra um ensaio representativo da estratégia de escolha do *gate* para análise das populações de MoDCs. Inicialmente, considerou-se o tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) destas células, seguido do marcador específico CD11c (marcador de células dendríticas) versus a expressão das moléculas de coestimulação/ativação em questão.

A Figura 4 representa as médias do percentual de células positivas e da intensidade média de fluorescência obtida para cada marcador. Observamos que dentre as células CD11c positivas analisadas, os resultados foram semelhantes entre MoDCs pulsadas e não pulsadas com o vírus em pacientes infectados pelo HIV-1, sugerindo que o AT-2-HIV não interferiu na expressão das moléculas de coestimulação/ativação das MoDCs.

Figura 2 - Análise morfológica das células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes infectados pelo HIV-1. Imagem representativa de cultura de MoDCs de pacientes infectados pelo HIV-1. No estágio imaturo, as MoDCs são caracterizadas através de seu aspecto arredondado (A, aumento de 10x e B, aumento de 20x). Uma vez pulsadas com o vírus inativado e então induzidas à maturação com citocinas pró-inflamatórias, obtemos o perfil de MoDCs ativadas, ou seja, as células apresentam-se com projeções dos dendritos caracterizando um aspecto estrelado (C, aumento 10x e D, aumento de 20x).

Figura 3 - Estratégia de *gate* para definir população de MoDCs CD11c⁺ e suas respectivas moléculas coestimuladoras. Dado representativo do gráfico de pontos de um paciente infectado pelo HIV-1. Após o processo de diferenciação de monócitos em células dendríticas de pacientes infectados pelo HIV-1 e do pulso com o vírus inativado, foi realizada uma análise imunofenotípica na população de células CD11c⁺ e avaliados a expressão das moléculas constitutivas e coestimuladoras HLA-DR (C), CD83 (D), CD80 (E), CD86 (F), CD1a (G) e DC-SIGN (H).

A.

B.

Figura 4 - Perfil fenotípico de MoDCs de pacientes infectados pelo HIV-1 após pulso com o vírus inativado. MoDCs de pacientes infectados pelo HIV-1 (n = 14) pulsadas (grupo DC-HIV) ou não com vírus inativado (grupo DC) foram estimuladas com citocinas pró-inflamatórias. As células expressando a molécula CD11c foram analisadas por citometria de fluxo com relação à expressão de HLA-DR, CD80, CD86, DC-SIGN, CD1a e CD83. Os gráficos representam as médias dos resultados expressos em porcentagem (A) e intensidade média de fluorescência (IMF) (B), e seus respectivos Erros-padrão.

4.4 Indução de células T CD8+ e T CD4+ secretoras de IFN- γ após estímulo com MoDCs pulsadas com o vírus inativado

Para verificar a indução de linfócitos efetores capazes de secretar IFN- γ , após estímulo com DC pulsadas com vírus autólogo, foi realizada a cultura com MoDC e linfócitos autólogos na proporção de 5 linfócitos para 1 DC. Após 96 e 120h de cocultivo, foi avaliada a presença de IFN- γ intracelular nos linfócitos T CD8+ e T CD4+, por citometria de fluxo.

A Figura 5 ilustra um ensaio representativo da estratégia de escolha do *gate* utilizada para contemplar a população de linfócitos. Inicialmente foi considerado o tamanho (SSC) e a granulosidade (FSC) das células (Figura 5A). Após selecionar a população de interesse, delimitou-se a população positiva para a molécula CD3, expressa exclusivamente por linfócitos T (Figura 5B). A partir do *gate* de CD3+, analisamos a subpopulação CD4+ e CD8+ que expressa IFN- γ intracelularmente (Figura 5C). A figura 5D ilustra um perfil representativo de culturas CD3+CD8+IFN- γ +, previamente estimuladas com PMA+IONO, que constitui o controle positivo do ensaio.

A Figura 6 ilustra os resultados obtidos nas culturas de cada paciente, estimuladas com MoDCs pulsadas (Figura 6B) ou não (Figura 6A) com AT-2 HIV, e a média destes resultados (Figura 6C) expressos em percentual de células CD3+CD8+IFN- γ +

A análise individual dos dados (Figuras 6A e B) revelou uma grande variabilidade nos níveis basais (tempo 0) de células T CD8+ produtoras de IFN- γ . Durante o cocultivo, a maioria dos pacientes apresentou uma diminuição de células T CD8+ produtoras de IFN- γ . Entretanto, após 120h do início da cultura a média de porcentagem dessas células se mostrou significativamente maior nas culturas estimuladas com MoDCs pulsadas com o AT-2-HIV quando comparada ao grupo não pulsado (Figura 6C). Apenas 2/14 pacientes (pacientes 8 e 9) apresentaram aumento na frequência de células T CD8+ produtoras de IFN- γ após estimulação com MoDCs pulsadas, enquanto em outros dois pacientes (pacientes 5 e 12) este aumento foi mais moderado. Os pacientes restantes apresentaram um declínio na

frequência de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ após 96 e 120h, sob as duas condições de cultivo.

Os resultados referentes a análise individual de células T CD4⁺ estão representados na Figura 7A,B e a média destes resultados na figura 7C. Observou-se em comparação aos níveis basais, que a porcentagem destas células produtoras de IFN- γ apresentou após 120 h de cocultivo um aumento de 4,2 e 3,3 vezes após estimulação com MoDCs pulsadas ou não com o AT-2-HIV, respectivamente (Figura 7C). Não foi observada diferença significativa entre os cocultivos com MoDCs pulsadas e não pulsadas.

Em conjunto os resultados sugerem que a estimulação com MoDCs pulsadas ou não com vírus autólogo inativado resulta na geração de células T CD4⁺ efectoras. No entanto, apenas MoDCs pulsadas com HIV foram capazes de retardar o declínio das células T CD8⁺ efectoras durante o cocultivo.

A.

B.

C.

DC+HIV

D.

PMA + IONO

Figura 5 - Estratégia de *gate* para definir população de linfócitos produtores de IFN- γ . Após cocultivo de linfócitos com MoDCs pulsadas com AT-2-HIV de pacientes infectados pelo HIV-1, foi avaliada a população de linfócitos T CD8+ que expressaram IFN- γ intracelular. Como controle positivo do experimento foi utilizado linfócitos estimulados com PMA + IONO.

Figura 6 - Cinética da expressão de IFN- γ por linfócitos T CD8 + após estímulo com MoDCs pulsadas com HIV autólogo. Linfócitos de pacientes (P1, P2, etc) foram cultivados com MoDCs autólogas não pulsadas (A) ou pulsadas com AT-2-HIV (B) e a detecção de IFN- γ intracelular em células T CD8 + foi realizada por citometria de fluxo em 0, 96 e 120 h após cocultivo. Resultados representam a média $\pm$ SEM (C). * $P \leq 0,05$ quando os resultados obtidos de MoDCs pulsadas com HIV foram comparados aos de MoDCs não pulsadas.

Figura 7 - Cinética da expressão de IFN- γ por linfócitos T CD4 + cocultivados com MoDCs pulsadas com HIV autólogo. Linfócitos de pacientes (P1, P2, etc) foram cultivados com MoDCs autólogas não pulsadas (A) ou pulsadas com vírus inativado (B) e a detecção de IFN- γ intracelular em células T CD4 + foi realizada por citometria de fluxo em 0, 96 e 120 h após cocultivo. Resultados representam a média $\pm$ SEM (C).

4.5 Análise da produção de IFN- γ por linfócitos T de acordo com o número de células T CD4+ e a Carga Viral

Considerando a heterogeneidade da produção de IFN- γ por células T CD8+ dos pacientes e a indução de células T CD4+ secretoras de IFN- γ no cocultivo com MoDCs, resolvemos avaliar a influência da contagem de células T CD4+ na porcentagem de células T secretoras de IFN- γ em pacientes infectados pelo HIV.

Para tanto os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com critérios utilizados por Piconi et al (2010): número de células T CD4+ < 500 e número de células T CD4+ > 500. Os dados laboratoriais dos pacientes analisados conforme níveis de células T CD4+ estão descritos na Tabela II.

A segregação dos pacientes em dois grupos revelou perfis distintos de produção de IFN- γ por células T CD4+. Observamos que os pacientes com contagem de células T CD4+ > 500 apresentaram um aumento significativo no número de células T CD4+ secretoras de IFN- γ após 96 e 120 h de cocultivo com MoDCs pulsadas com AT-2-HIV (Figura 8D). Um perfil similar de resposta foi observado nas culturas estimuladas por MoDCs não pulsadas. Entretanto não houve diferença significativa entre os dois grupos de pacientes (Figura 8C).

Estes resultados sugerem que os pacientes que apresentam maior número de células T CD4+ são capazes de responder de forma mais eficiente à estimulação com MoDCs pulsadas com vírus

Com relação às células T CD8+ produtoras de IFN- γ não observamos diferenças entre os perfis de resposta dos dois grupos de pacientes (Figura 8A-B).

Tabela II. Dados laboratoriais de pacientes infectados pelo HIV analisados de acordo com o número de células T CD4+

	Contagem de células T CD4+ (cél/s/ μ L)	Contagem de células T CD8+ (cél/s/ μ L)	Carga Viral (cópias/ml)	Log Viral	CD3+CD4+IFN γ + Basal (% células)	CD3+CD8+IFN γ + Basal (% células)
T CD4+ > 500 (n=9)	694 $\pm$ 169	1.366 $\pm$ 804	36.553 $\pm$ 55.223	4,0 $\pm$ 0,79	0,34 $\pm$ 0,38	4,45 $\pm$ 2,0
T CD4+ < 500 (n=5)	411 $\pm$ 54	1.011 $\pm$ 278	23.030 $\pm$ 18.419	4,2 $\pm$ 0,46	0,26 $\pm$ 0,34	4,28 $\pm$ 1,6

Figura 8 - Indução de células T CD8+ e T CD4+ secretoras de IFN- γ após estímulo com MoDCs pulsadas com HIV de pacientes infectados pelo HIV-1 agrupados de acordo com o número de células T CD4+. Linfócitos de pacientes com contagem de células T CD4+ > 500 células/ μ L (n = 9) e com contagem de células T CD4+ < 500 células/ μ L (n = 5) foram cultivados com MoDCs autólogas pulsadas com vírus inativado (B, D) e não pulsadas (A, C). Resultados representam médias $\pm$ SEM. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,001$ em comparação com contagem de células T CD4+ < 500 células/ μ L.

Em seguida foi avaliada a resposta caracterizada pelos níveis de IFN- γ intracelular dos pacientes com base na CV. Dividimos os pacientes de acordo com os critérios utilizados por Guiguet et al (2008) em alta CV ($> 4,0$ log) e baixa CV ($< 4,0$ log) (Tabela III). A Figura 9 mostra a produção de IFN- γ por células T CD8 $^{+}$ e por células T CD4 $^{+}$ durante o cocultivo com MoDCs pulsadas ou não com HIV autólogo inativado. Observamos que durante a cinética houve uma tendência à queda no número de células T CD8 $^{+}$ produtoras de IFN- γ nos pacientes com maior CV, mas sem significância estatística (Figura 9A, B). Por outro lado, ambos os grupos analisados foram capazes de gerar células T CD4 $^{+}$ produtoras de IFN- γ (Figura 9C, D).

Tabela III. Dados laboratoriais de pacientes infectados pelo HIV analisados de acordo com a carga viral

	Contagem de células T CD4+ (cél/s/ μ L)	Contagem de células T CD8+ (cél/s/ μ L)	Carga Viral (cópias/ml)	Log Viral	CD3+CD4+IFN γ + Basal (% células)	CD3+CD8+IFN γ + Basal (% células)
Log Viral < 4,0 (n= 7)	578 $\pm$ 148	1.133 $\pm$ 454	1.497 $\pm$ 2.643	3,6 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,3	3,9 $\pm$ 1,4
Log Viral > 4,0 (n= 7)	562 $\pm$ 249	1.294 $\pm$ 818	56.638 $\pm$ 48.725	4,6 $\pm$ 0,35	0,4 $\pm$ 0,4	4,9 $\pm$ 2,1

Figura 9 - Indução de células T CD8 + e CD4 + secretoras de IFN- γ após estímulo com MoDCs pulsadas com HIV-1 de pacientes agrupados de acordo com a carga viral. Linfócitos de pacientes com baixa carga viral (<4,0 log, n = 7) e alta carga viral (> 4,0 log, n = 7) foram cultivados com MoDCs autólogas pulsadas (b, d) e não pulsadas (a, c) com vírus inativado. Foi adicionado Brefeldina 20 horas antes do fim da cultura com a finalidade de impedir a secreção de citocinas e foram avaliados os níveis de IFN- γ intracelular em células T CD8 + e T CD4 + por citometria de fluxo. Resultados representam médias $\pm$ SEM.

Foram realizadas também análises referentes à expressão de moléculas de coestimulação/ativação dos pacientes segundo critérios de contagem de células T CD4+ (< ou > 500 células / μ L) (Figura 10) e segundo classificação de acordo com a CV (alta ou baixa) (Figura 11). Nesta análise não observamos nenhuma diferença na expressão das moléculas estudadas.

A.

B.

Figura 10 - Perfil fenotípico de MoDCs de pacientes infectados pelo HIV-1 divididos de acordo com o número de células T CD4+ após pulso com o vírus inativado. MoDCs de pacientes com HIV-1 (n = 14) pulsadas com vírus inativado durante 2 horas foram estimuladas com citocinas pró-inflamatórias por 48 horas e analisadas por citometria de fluxo a expressão de HLA-DR, CD80, CD86, DC-SIGN, CD1a e CD83 em porcentagem (A) e intensidade média de fluorescência (IMF) (B).

A.

B.

Figura 11- Perfil fenotípico de MoDCs de pacientes infectados pelo HIV-1 divididos de acordo com a carga viral após pulso com o vírus inativado. MoDCs de pacientes com HIV-1 ($n = 14$) pulsadas com vírus inativado durante 2 horas foram estimuladas com citocinas pró-inflamatórias por 48 horas e analisadas por citometria de fluxo quanto à expressão de HLA-DR, CD80, CD86, DC-SIGN, CD1a e CD83 em porcentagem (A) e intensidade média de fluorescência (IMF) (B).

4.6 Indução de células T reguladoras após estímulo com MoDCs pulsadas com vírus inativado

Para entender melhor a variação da resposta de células T *in vitro*, analisamos a indução de T regs caracterizadas pela expressão de CD4+CD25+Foxp3+ neste sistema celular. A frequência de T regs após cocultivo com MoDCs pulsadas ou não com vírus inativado foi avaliada por citometria de fluxo.

A Figura 12 ilustra um ensaio representativo da estratégia de escolha de *gate* utilizada para identificar a população de T regs. Inicialmente, foi considerado o tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) das células (Figura 12A). Após selecionar a população de interesse (linfócitos), delimitou-se a população positiva para a molécula CD4 (Figura 12B). A partir do *gate* de CD4+, analisamos a expressão de Foxp 3 e CD25 simultaneamente (Figura 12C), representando por fim a porcentagem de T regs.

A cinética de indução de T regs mostrou que existe uma grande variação já nos níveis basais de células T regs (tempo 0) entre os indivíduos estudados, conforme os gráficos que apresentam os dados individualizados (Figuras 13A e B).

A maioria dos pacientes apresentou uma maior porcentagem de células T regs em 120 horas de cocultivo, em comparação aos valores basais (Figura 13). Poucos pacientes (pacientes 6, 8 e 11) não apresentaram um aumento na frequência de T regs após estimulação com MoDCs pulsadas com AT-2-HIV (Figura 13B). Curiosamente, o paciente 8 apresentou a frequência mais pronunciada de células produtoras de IFN- γ para ambas populações (T CD8 + e T CD4 +) após 120h de cocultivo.

A análise das médias obtidas mostra que houve um aumento significativo na porcentagem de T regs após 120 h de cocultivo na presença de MoDCs pulsadas com o AT-2-HIV, em comparação com MoDCs não pulsadas (Figura 13 C).

Estes resultados sugerem que as condições de cultura *in vitro* utilizadas para o desenvolvimento de vacina com DCs podem induzir a geração de ambas as populações de T regs e células T efectoras.

Figura 12 - Estratégia de *gate* para a subpopulação de células T reguladoras. Gráfico representativo de pontos (*Dot Plot*) de paciente HIV+ da população de linfócitos delimitados pelo SSC x FSC (A) com estratégia de *gate* para a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ (B) que expressam CD25⁺ e Foxp3 simultaneamente (C). A porcentagem indica a frequência de T regs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺).

Figura 13 - Indução de células T reguladoras, após cocultivo com MoDCs pulsadas com vírus inativado. Linfócitos de pacientes (P1, P2, etc) foram cultivados na presença de MoDCs autólogas não pulsadas (A) ou pulsadas com vírus inativado (B) e a frequência de células T CD4 + CD25 + Foxp3 + foi avaliada por citometria de fluxo em 0, 72 e 120 horas. Resultados representam médias $\pm$ SEM (C). * $P \leq 0,05$ quando comparado o percentual de T regs após estímulo de MoDCs pulsadas com MoDCs não pulsadas com HIV-1.

4.7 Correlação entre percentual de células T reguladoras e carga viral ou número de células T CD4+

Em seguida, avaliamos a correlação entre os níveis basais de T regs (mensurados no tempo 0) e a CV (expressa em log ou em cópias de RNA viral plasmático) dos pacientes estudados. Também foi avaliada a correlação entre os níveis basais de T regs e o número de células TCD4+.

Os resultados referentes à correlação com a CV estão expressos na figura 14. Observa-se que houve uma relação inversa entre a frequência de T regs e a CV dos pacientes. Tal fato é observado tanto se a análise é realizada com dados de CV expressos em log ou em cópias de RNA viral, respectivamente ($r^2 = 0,66$, $P = 0,0002$; $r^2 = 0,33$, $P = 0,03$).

A partir destes resultados os pacientes foram segregados de acordo com os critérios utilizados de alta carga viral ($> 4,0$ log) e baixa carga viral ($< 4,0$ log). Pacientes com baixa CV apresentaram aumento no número de células T regs basais quando comparados com os pacientes com alta CV (Figura 15). Estes resultados sugerem que a viremia persistente na infecção crônica pelo HIV pode estar associada significativamente com a perda de T regs.

A análise entre os níveis basais de T regs e o número de células TCD4+ mostrou que não houve correlação entre estes dois parâmetros (Figura 16).

A.

B.

Figura 14 - Correlação entre a carga viral e a porcentagem basal de T regs em pacientes infectados pelo HIV. Correlação inversa entre a porcentagem basal de T regs e a CV em cópias/mL (A) e em Log viral (B).

Figura 15 - Porcentagem basal de células T reguladoras em pacientes infectados pelo HIV. Os pacientes foram divididos de acordo com a carga viral baixa (<4,0 log, n = 7) e carga viral alta (> 4,0 log, n = 7). ** $P \leq 0,001$ quando comparado ao número de T regs de pacientes com baixa carga viral.

Figura 16 - Correlação entre porcentagem basal de T regs e o número de células T CD4+ em pacientes infectados pelo HIV. Não houve correlação entre os níveis basais de T regs e o número de células TCD4+.

4.8 Produção de citocinas após estímulo com MoDCs pulsadas com AT-2-HIV

Para avaliar o perfil de produção de citocinas por linfócitos estimulados com MoDCs pulsadas com AT-2-HIV foram coletados os sobrenadantes das culturas 72, 96 e 120 horas após o início do cocultivo. As citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-6 e IL-17 foram dosadas por citometria de fluxo utilizando a metodologia de *bead array*.

Nestes ensaios encontramos níveis detectáveis das citocinas IL-2 e IL-6. Os resultados obtidos estão ilustrados respectivamente nas Figuras 17 e 18. Inicialmente os dados foram analisados separando em amostras de células estimuladas com MoDCs pulsadas ou não com vírus inativado e em seguida as amostras foram segregadas de acordo com a classificação dos pacientes, divididos conforme a CV (alta CV e baixa CV) e contagem de células TCD4+ (> 500 céls/ μ L e < 500 céls/ μ L).

Em relação à produção de IL-2, não encontramos diferença significativa em nenhum dos grupos analisados, porém observamos que a IL-2 foi detectável somente nos pacientes com CV baixa, ou seja, a produção de IL-2 nos indivíduos com CV alta está inibida (Figura 17).

Ao avaliar a produção de IL-6, não houve diferença significativa quando comparamos os grupos em relação ao estímulo de MoDCs pulsadas ou não com o vírus (Figura 18A) e quando comparamos os pacientes em relação a CV (Figura 18C). Entretanto, quando avaliamos os pacientes de acordo com a contagem de T CD4+, observamos uma maior secreção de IL-6 nas culturas estimuladas com MoDCs pulsadas dos pacientes com T CD4+ < 500 céls/ μ L comparados com os pacientes com T CD4+ > 500 céls/ μ L (Figura 18B).

Não encontramos níveis detectáveis das citocinas IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-17 (abaixo do limite de detecção do kit correspondendo a 4,5 pg/mL, 3,7 pg/mL, 3,8 pg/mL e 18,9 pg/mL, respectivamente).

Figura 17 - Dosagem de IL-2 em sobrenadante de cocultivo de linfócitos e MoDCs pulsadas com vírus inativado. Linfócitos de pacientes infectados pelo HIV-1 foram estimulados por MoDCs pulsadas com vírus inativado e quantificado a produção de IL-2 nos tempos 72, 96 e 120h após o início do cocultivo (A). A dosagem foi realizada através de citometria de fluxo. Os pacientes foram analisados também de acordo com a contagem de células T CD4+ (B) e com a carga viral (C) após 96h de cocultivo. A linha tracejada representa o limite de detecção da citocina.

A.

B.

C.

Figura 18 - Dosagem de IL-6 em sobrenadante de cocultivo de linfócitos e MoDCs pulsadas com vírus inativado. Linfócitos de pacientes infectados pelo HIV-1 foram estimulados por MoDCs pulsadas com vírus inativado e quantificado a produção de IL-6 nos tempos 72, 96 e 120h após o início do cocultivo (A). A dosagem foi realizada através de citometria de fluxo. Os pacientes foram analisados também de acordo com a contagem de células T CD4+ (B) e com a carga viral (C) após 120 h de cocultivo. A linha tracejada representa o limite de detecção da citocina. * $P < 0.05$ quando comparado com MoDCs sem pulso.

DISCUSSÃO

5. Discussão

No presente estudo investigamos *in vitro* a capacidade de MoDCs pulsadas com AT-2-HIV autólogo de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV e cocultivados com linfócitos autólogos de gerar células T efetoras, células T reguladoras, e/ou induzirem apoptose celular. Partiu-se do suposto que a indução de mecanismos imunoreguladores poderia ter um efeito negativo quando as DCs são administradas *in vivo*, e poderia explicar porque alguns pacientes não desenvolveram uma supressão prolongada da carga viral após a vacinação em trabalho anteriormente publicado (Lu et al., 2004).

Nossos resultados demonstraram que as MoDCs de pacientes infectados pelo HIV apresentam uma baixa expressão de moléculas de coestimulação/ativação, tais como CD80, CD86 e CD83 quando comparado com dados da literatura (Mallon et al., 1999; Buisson et al., 2009; Hsieh et al., 2003). A expressão dessas moléculas é extremamente necessária para uma resposta imune adaptativa efetiva (Majumder et al., 2005), e a baixa expressão de CD86, CD80 e CD83 tem sido considerada uma característica de DCs em estágio semimaduro, capazes de induzir T regs (Benson et al., 2007; Beikaid & Oldenhove, 2008). Neste sentido, os resultados obtidos revelam que somente um número pequeno de MoDCs de pacientes infectados pelo HIV foi capaz de alcançar a maturação plena. Isto sugere que a atividade funcional destas células voltadas para indução de uma resposta imune específica contra o vírus está prejudicada ou poderia estar favorecendo a geração de T regs.

Por outro lado alguns estudos demonstraram que o fenótipo e a maturação funcional de precursores de DCs em indivíduos infectados pelo HIV não se alteram até os estágios mais avançados da infecção (Connolly et al., 2007; Hsieh et al., 2003). Neste sentido, é importante considerar que embora o protocolo básico de obtenção de DCs a partir de monócitos esteja bem definido, inúmeros aspectos, tais como o método para isolamento dos monócitos, a natureza do estímulo para a ativação destas células, o tempo de cultivo, o antígeno empregado para sensibilizar a MoDCs, entre outros, podem interferir diretamente no fenótipo das MoDCs (Rinaldo, 2009; Oshiro et al., 2009).

Apesar do processo de inativação química do HIV-1 pelo AT-2 revogar a sua infecciosidade, a integridade conformacional e funcional do vírus encontra-se preservada (Rossio et al., 1998) e, portanto, continua capaz de induzir em conjunto com as MoDCs a diferenciação de linfócitos autólogos efetores. Neste contexto, observamos que o vírus quimicamente inativado não promove apoptose de MoDCs e, além disso, MoDCs pulsadas com estes vírus não são capazes de induzir morte celular dos linfócitos.

A diminuição gradual na viabilidade tanto das MoDCs quanto das células T CD8+ e T CD4+ observada nos nossos resultados pode estar relacionada com a duração da cultura (120 horas), uma vez que tanto culturas pulsadas quanto não pulsadas com os vírus apresentaram a mesma cinética de viabilidade. Soma-se a isto que resultados semelhantes de cinética de viabilidade são observados em diferentes protocolos em nosso laboratório (dados não apresentados).

A viabilidade celular é um aspecto importante a ser considerado na análise da resposta imunológica *in vitro*, visto que DCs de pacientes infectados pelo HIV podem ativar células T CD4+ e células T CD8+, quando cocultivados com células apoptóticas infectadas (Larsson et al., 2002; Zhao et al., 2002). Por outro lado, as células apoptóticas também podem exercer regulação negativa sobre as células T induzindo morte celular (Liu et al., 2002; Mougneau et al., 2002).

De importância, ressalta-se ainda que nosso estudo demonstrou que as MoDCs pulsadas com o HIV inativado induzem células T CD4+ efectoras. Isso se revelou significativamente mais pronunciado em pacientes com contagem de células T CD4 + > 500 células/ μ L. Desta forma, no contexto de um protocolo clínico de vacinação com MoDCs, tais resultados poderiam ajudar a selecionar eficientemente pacientes com potencial de resposta à vacina com DCs pulsadas. Colabora com esta proposta, o fato das MoDCs pulsadas serem capazes de manter níveis maiores de células T CD8+ secretoras de IFN- γ .

Um outro parâmetro imunológico importante que pode interferir na resposta imune efetora no contexto de imunoterapia com células dendríticas é a geração de T regs. Nossos estudos demonstraram que MoDCs pulsadas com HIV são capazes de induzir T regs na maioria dos pacientes cronicamente infectados pelo HIV.

De fato, de acordo com o grau de maturação das DCs, alguns estudos indicam que essas células podem induzir a diferenciação de T regs produtoras de IL-10 (Dhodapkar & Steinman, 2002; Jonuleit et al., 2000), ou induzir a expressão do fator de transcrição Foxp3 em células T *naive* (Luo et al., 2007). Ainda neste contexto, os antígenos do HIV apresentados às células T através das DCs com baixa expressão de moléculas coestimuladoras podem desencadear anergia ou tolerância ao invés de imunidade (Donaghy et al., 2004).

Vários grupos têm postulado que T regs ajudariam a limitar a ativação crônica imune associada com a infecção pelo HIV-1 e, deste forma, seria benéfica para o hospedeiro (Eggena et al., 2005; Baker et al., 2007; Kinter et al., 2004). Por outro lado, outros estudos têm demonstrado que a supressão de células efectoras específicas contra o HIV-1 pode ser prejudicial para o hospedeiro (Kinter et al., 2007; Aandahl et al., 2004; Lim et al., 2007). Permanece indeterminado qual o papel mais importante que as células T regs desempenham na patogênese do HIV-1, ou seja, se prevalecem os efeitos vantajosos de controlar a ativação imune, ou os efeitos nocivos causados pela limitação de uma resposta imune antiviral. Uma consideração razoável é que o papel das Tregs na patogênese induzida pelo HIV poderia estar diretamente relacionado à fase da infecção. Com efeito, durante a fase aguda da doença altos níveis de T regs desempenhariam um papel prejudicial ao hospedeiro por suprimir a resposta anti-HIV, consequentemente aumentando a replicação viral. Por outro lado, na fase crônica da infecção, as T regs teriam uma importante função no controle da ativação imunológica e da infecção pelo HIV. Ou seja, níveis elevados de T reg ou o aumento de sua atividade, nesta fase da infecção poderia retardar a progressão da doença (Holmes et al., 2008).

Confirmam esta hipótese nossos achados que revelam uma relação inversa entre a frequência de T regs e a CV em pacientes infectados, ou seja, pacientes com maior CV apresentaram menor frequência de T regs. Ainda neste sentido, tem sido descrito que a viremia persistente na infecção crônica pelo HIV é significativamente associada com perda de T regs (Baker et al., 2007) e que há uma diminuição na frequência dessas células no sangue periférico de pacientes com doença progressiva (Pakker et al., 1999; Tsunemi et al., 2005).

Um número significativo de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ foi detectado durante o cocultivo, o que significa que, apesar da CV alta e da presença das T regs, mesmo em baixa frequência, células T efectoras foram eficientemente geradas. Neste contexto, os pacientes que apresentaram carga viral > 4,0 log mostraram um percentual menor de T regs. Esta redução nos níveis de células T regs não pode ser atribuída ao esgotamento de células T CD4⁺, considerando que todos eles tinham uma contagem de T CD4⁺ superior a 350 céls/ μ L. Uma possível explicação para número menor de T regs em pacientes com carga viral elevada é que essas células são seqüestradas preferencialmente no tecido linfóide durante a replicação do HIV (Andersson et al., 2005).

Em conjunto estes resultados mostraram que as DCs pulsadas com AT-2-HIV autólogo foram capazes de induzir aumento dos níveis de células T efectoras e células T reguladoras *in vitro*, o que *in vivo* poderia ajudar os pacientes submetidos à vacinação a combater a replicação viral ou atenuar a ativação de células T.

Importante salientar, que não foram realizados testes funcionais para verificar a função das T regs. Apesar de algumas tentativas, devido ao fato do ensaio funcional requerer um número elevado de células T CD4⁺ CD25⁺, isto foi um fator limitante para execução do ensaio com amostras de pacientes infectados por HIV.

Deve também ser considerado que a produção de IFN- γ foi o único aspecto mensurado para avaliação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ efectoras. A detecção de células T CD4⁺ e células T CD8⁺ polifuncionais, ou seja, células que expressam simultaneamente mais de uma citocina intracelular, é um método altamente sensível e tem sido amplamente utilizado para estudar a resposta imune em infecções crônicas (Macatangay et al., 2010; Kutscher et al., 2008). Neste contexto, tem sido demonstrado em estudos com indivíduos não progressores uma correlação inversa entre a presença de células polifuncionais e a baixa viremia (Baker et al., 2009; Pereyra et al., 2008).

Os resultados da dosagem de citocinas do cocultivo de linfócitos e MoDCs não revelaram níveis detectáveis de IL-10. Isso nos leva a sugerir que as T regs geradas durante o cocultivo não sejam as produtoras de IL-10, uma vez que o papel supressor das T regs pode ser mediado por outras citocinas ou por contato célula-célula.

As culturas estimuladas com MoDCs pulsadas com AT-2-HIV mostraram um aumento significativo na produção de IL-6 no grupo de pacientes com contagem de células T CD4+ < 500 céls/μL em comparação ao grupo com contagem de T CD4+ > 500 céls/μL. É possível que estes pacientes apresentem um perfil de resposta pró-inflamatória após os estímulos das DCs, ao contrário dos pacientes com contagem de células T CD4+ > 500 céls/μL que apresentaram um número significativo de células T CD4+ produtoras de IFN-γ.

A presença ou ausência de IL-6 pode regular respectivamente a indução da resposta pró-inflamatória ou da resposta tolerogênica de células T. A IL-6 pode também influenciar a estabilidade e função das T regs naturais. Por exemplo, a estimulação das T regs na presença de IL-6 resulta na perda de expressão de Foxp3 e na aquisição do fenótipo e função de Th17 (Zheng et al., 2008; Xu et al., 2007). Além disso, a IL-6 produzida bloqueia a inibição mediada pelas T regs sobre a ativação de células T, e isso se dá provavelmente devido ao efeito direto da IL-6 sobre as T regs e devido a habilidade da IL-6 em tornar as células T resistentes a supressão mediada por estas células supressoras (Pasare & Medzhitov, 2003).

Alguns autores mostraram a existência de uma relação direta entre a presença de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α e a IL-6, e o aumento da replicação viral (Chun et al., 1997; Lawn et al., 2001; Ganesh et al., 2003). Este dado nos sugere que o aumento de IL-6 após estímulo de MoDC pode estar relacionado com fatores associados à imunoativação encontrada nos indivíduos crônicos infectados por HIV, que em geral é observado nos pacientes com menor número de células T CD4+.

Desta forma, mediante estas funções atribuídas a IL-6, o grupo de pacientes com contagem de células T CD4+ > 500 céls/μL mostra-se mais uma vez, um grupo promissor no que diz respeito a resposta eficiente a vacinação com MoDCs pulsadas com HIV *in vivo*.

Atualmente, nosso grupo está desenvolvendo no LIM-56 um estudo clínico de fase II utilizando MoDCs pulsadas com AT-2-HIV para o tratamento de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1 sob coordenação do Prof. Alberto J. S. Duarte. Tal estudo poderá proporcionar uma melhor compreensão dos mecanismos imunes envolvidos na resposta à vacina. Nesse sentido, o estudo do papel das T regs na

resposta vacinal poderá trazer elementos importantes para o aperfeiçoamento desta estratégia terapêutica.

Em suma, demonstramos que as DCs pulsadas com HIV-1 são capazes de induzir resposta efetora e elevar a frequência de T regs em pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1. Nossos resultados mostram que MoDCs pulsadas com vírus inativado foram capazes de induzir um aumento na frequência de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , principalmente em pacientes com contagem de células T CD4⁺ > 500 células / μ L. Estes resultados evidenciam que as MoDCs pulsadas com AT-2-HIV foram capazes de induzir a geração de ambas as populações, as células T efetoras e células T reguladoras antígeno-específicas.

Desta forma, admitimos que a vacinação terapêutica com DCs pode diminuir a replicação do HIV e retardar a progressão da Aids em pacientes com CV elevada. Uma melhor compreensão do papel das T regs na modulação da resposta imune em diferentes estágios da doença crônica causada pelo HIV pode contribuir para a melhoria desta e de outras estratégias terapêuticas imunológicas.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- O HIV inativado por AT-2 não induziu apoptose celular nas MoDCs pulsadas.
- O HIV inativado por AT-2 presente em MoDCs pulsadas não induziu apoptose em linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+ após cocultivo.
- MoDCs pulsadas com HIV-1 são capazes de induzir células T CD4+ efectoras e isso se mostrou mais pronunciado em pacientes que apresentam o número de células T CD4+ > 500.
- MoDCs pulsadas com HIV-1 elevaram a frequência de T regs em pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1.
- A vacinação terapêutica com DC poderia diminuir a replicação do HIV e retardar a progressão da Aids em pacientes com carga viral elevada.
- O número de células T CD4+ > 500 e a viremia alta podem ser utilizados como critérios para seleção de pacientes a serem submetidos à imunoterapia.

ANEXOS

Anexo A: Termo de consentimento livre e esclarecido.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

- 1. NOME DO PACIENTE:**.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: **SEXO:** M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:..... **Nº**..... **APTO:**
BAIRRO:.....**CIDADE:**.....
CEP:.....**TELEFONE:** DDD (.....)
- 2. RESPONSÁVEL LEGAL:**
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : **SEXO:** M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO:..... **Nº** **APTO:**
BAIRRO:**CIDADE:**
CEP:**TELEFONE:** DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

- 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** ESTUDO SOBRE A IMUNÔMICA FUNCIONAL DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS PULSADAS COM VÍRUS AUTÓLOGOS OU ANTÍGENOS DE HIV.
- 2. PESQUISADOR:** Dr. Alberto José da Silva Duarte
CARGO/FUNÇÃO: Chefe de laboratório LIM-56 **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº :** 16915
UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia
- 3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. **Justificativa e os objetivos da pesquisa:** Nem todos os pacientes HIV+ são capazes de responder de forma eficiente aos medicamentos antirretrovirais e, além disso, muitas vezes o uso destes medicamentos por muito tempo pode provocar efeitos colaterais indesejáveis. Neste sentido, é muito importante estudar novos métodos para o tratamento destas pessoas. Recentemente foi descrita uma nova forma de tratamento no qual células brancas (chamadas monócitos) retiradas do sangue do paciente foram modificadas em laboratório especializado e então reinjetadas no próprio paciente. Este processo trouxe resultados satisfatórios que permitiu adiar o uso dos medicamentos antirretrovirais. Considerando que isto pode vir a ser um novo método de tratamento, o objetivo deste trabalho é estudar, em laboratório especializado, estas células modificadas e, além disso, avaliar quais pacientes poderiam se beneficiar deste tratamento, ou seja, se o tratamento com estas células poderia ou não ter sucesso no paciente. Além disso, investigar os mecanismos de regulação do sistema de defesa (sistema imune) envolvidos na resposta a este tratamento. Os resultados obtidos deste trabalho contribuirão imensamente para o desenvolvimento desta vacina, permitindo o tratamento de muitos pacientes infectados pelo HIV.
2. **Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** Neste trabalho, após avaliação clínica feita pelo médico, será coletado um volume de 15 mL de sangue que será levado para um laboratório para a obtenção do HIV. Após cerca de 30 dias nova coleta de 70 mL de sangue será realizada. Este sangue também será levado a um laboratório, onde as células serão separadas para os testes. Após a separação as células brancas (monócitos) já modificadas entrarão em contato com o vírus obtido anteriormente e então serão avaliadas com relação à capacidade de estimular o sistema imunológico. Após isto, estas células modificadas (agora chamadas de células dendríticas) serão colocadas em contato com outras células de defesa, chamadas linfócitos. Será feita a análise do DNA destas células dendríticas, a fim de entender que mudanças serão induzidas nos genes destas células. Sua capacidade de ativar os linfócitos será avaliada pela produção de proteínas chamadas citocinas, pela capacidade de induzir multiplicação dos linfócitos, pelas subpopulações de linfócitos geradas, além da capacidade de sobrevivências destes linfócitos.

Uma vez que fatores genéticos (herdados) podem influenciar na resposta imune, estudaremos alguns genes relacionados ao sistema imunológico. Diferentes formas de colocar o vírus no interior das células serão também estudadas. Com objetivo de tornar viáveis estes experimentos, serão avaliados alguns indivíduos expostos, mas não infectados pelo HIV.

3. **Desconfortos e riscos esperados:** O maior desconforto será no momento da coleta do sangue, porém este procedimento não trará nenhum risco à saúde do paciente. Todos os materiais utilizados serão descartáveis.
4. **Benefícios que poderão ser obtidos:** O voluntário não terá nenhum benefício adicional por participar deste protocolo, mas estará contribuindo enormemente para o desenvolvimento de uma nova estratégia de tratamento que poderá trazer muitos benefícios futuramente. É prevista uma ajuda de custo de R\$10,00 (dez reais) por visita, por indivíduo, com objetivo de auxiliar nas despesas com transporte e alimentação. Não está previsto nenhum outro tipo de auxílio financeiro.
5. **Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:** Não haverá procedimentos alternativos

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. **Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.** O voluntário poderá obter informações e esclarecer qualquer tipo de dúvida sempre que desejar. Além disso, será avisado sobre qualquer nova informação relacionada a este trabalho.
2. **Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.** A participação é voluntária e o paciente pode se retirar da pesquisa a qualquer momento se assim desejar.
3. **Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.** A participação do voluntário é totalmente confidencial e a identidade do paciente é mantida em sigilo, bem como todos os resultados de testes relacionados a este estudo.

4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa. A pesquisa não envolve nenhum risco à saúde do voluntário, porém para qualquer eventualidade que possa ocorrer durante a coleta de sangue é assegurada a assistência por médicos do HCFMUSP.

5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. É assegurada a assistência médica ao paciente para qualquer eventualidade ocorrida durante a coleta de sangue.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Em caso de dúvidas entrar em contato com Dr. Alberto Duarte ou Dra. Telma Oshiro - LIM 56 FMUSP – tel. 3061-7499 - Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 IMT prédio 2 – 3º andar Cerqueira César – São Paulo

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20.....

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo B : Aprovação do comitê de ética

Ref.: Carta datada de 12.11.07

Ao**Departamento de Dermatologia**

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 29.11.07, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº 730/06, intitulado: **"Estudo sobre a imunômica funcional de células dendríticas derivadas de monócitos pulsadas com vírus autólogos e antígenos de HIV"**, contempla o sub-projeto intitulado **"Avaliação in vitro da apoptose de células mononucleares e da proliferação de células T regulatórias após estímulo de células dendríticas pulsadas com vírus autólogos em pacientes HIV+"**, que será tese de doutorado da Sra. Cláudia Finazzo, tendo como orientador Dr. Alberto José da Silva Duarte.

CAPPesq, 29 de novembro de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
matc

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

- Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol*. 2004; 78: 2454-2459.
- Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. Recent Advances in Dendritic Cell Biology. *Journal of Clinical Immunology*. 2005; 25: 87-98.
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP- β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 1996; 272:1955-1958.
- Ameisen JC e Capron A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immuno. Today*. 1991; 12:102-105.
- Andersson J, Boasso A, Nilsson J, Zhang R, Shire NJ, et al. The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol*. 2005;174: 3143-3147.
- Apostolou I e Von Boehmer H. *In vivo* intruction of supressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med*. 2004;199:1401-1408.
- Asquith B, Hanon E, Taylor GP, Bangham CR. Is human T-cell lymphotropic virus type I really silent? *Philos. Trans. R. Soc. London Ser*. 2000; B355:1013-19.
- Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med*. 1999; 190:995.
- Autran B, Debré P, Walker B, Katlama C. Therapeutic vaccines against HIV need international partnerships. *Nature*. 2003;3:503-508.
- Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol*. 2001;167:1245-1253.
- Baker BM, Block BL, Rothchild AC, Walker BD. Elite control of HIV infection: implications for caccine design. *Expert Opin Biol Ther*. 2009; 9:55-69.
- Baker CA, Clark R, Ventura F, Jones NG, Guzman D, Bangsberg DR, et al. Peripheral CD4 loss of regulatory T cells is associated with persistent viraemia in chronic HIV infection. *Clin Exp Immunol*. 2007;147: 533-539.
- Banchereau J e Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-52.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ., et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review Immunology*. 2000; 18: 767–811.

Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, MaWhinney S, Wilson CC. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus infected individuals. *J. Infect. Dis.* 2003;187:26-37.

Bass HZ, Nishanian P, Hardy WD, Mitsuyasu RT, Esmail E, Cumberland W, et al. Immune changes in HIV-1 infection: significant correlations and differences in serum markers and lymphoid phenotypic antigens. *Clin. Immunol Immunopathol.* 1992; 64:63-70.

Beilharz MW, et al. Timed ablation of regulatory CD4+ T cells can prevent murine AIDS progresión. *J. Immunol.* 2004;172:4917-4925.

Belkaid Y e Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature immunology.* 2005; 6:353-360.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach Em, Sacks DL. CD4RCD25R regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature.* 2002; 420:502–507.

Belkaid Ye Oldenhove G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity.* 2008;29: 362-371.

Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med.* 2007;204:1765-1774.

Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* 2007;204: 1303.

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte activity associated with control viremia in primary human immunodeficiency virus type I infection. *J. Virol.* 1994; 68:6103-10.

Buisson S, Benlahrech A, Gazzard B, Gotch F, Kelleher P, Patterson S. Monocyte-Derived dendritic cells from HIV type-1-infected individuals show reduced ability to stimulate T cells and have altered production of interleukin (IL)-12 and IL-10. *J infec dis.* 2009;199:1862-71.

Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 2007;27:635.

Carr A . HIV protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome. *Clin Infect Dis.* 2000;30(Suppl 2):S135-42.

Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 1999;5:919-23.

Chase AJ, Yang HC, Zhang H, Blankson JN, Siliciano RF. Preservation of FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1-infected elite suppressors correlates with low CD4+ T-cell activation. *J. Virol.* 2008;82, 8307–8315.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naïve T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF β induction of transcription factor Foxp3+. *J. Exp. Med.* 2003;198: 1875-1886.

Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV infection. *Nature.* 1997;387:183-188.

Chun TW, Davey RT, Engel D, Lane HC, Fauci AS. Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature.* 1999;401:874-875.

Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS, et al. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4+ T cells during primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998;95:8869-73.

Cohen OJ, Fauci AS, eds. Pathogenesis and Medical Aspects of HIV-1 infection, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001;p.2043-94.

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007;450:566.

Collman RG, Perno CF, Crowe SM, Stevenson M, Montaner LJ. HIV and cells of macrophage/ dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *J. Leukoc. Biol.* 2003;74: 631–634.

Connolly N, Riddler S, Stanson J, Gooding W, Rinaldo CR, Charles R, et al. Levels of antigen processing machinery components in dendritic cells generated for vaccination of HIV-1+ subjects. *AIDS.* 2007;21: 1683-1692.

Connolly NC, Whiteside TI, Wilson C, Kondragunta V, Rinaldo CR, 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. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15: 284-292.

Curotto De Lafaille MA e Lafaille JJ. Natural and adaptive Foxp3+ regulatory T cells: More of the same or a division of labor? *Immunity.* 2009;1:626-635.

Curotto De Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol.* 2004;173(12):7259-68.

Damoiseaux J. Regulatory T cells: back to the future. *The Netherlands journal of medicine*. 2006; 64:1-9.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 2007;204: 1257.

Derdeyn CA, Silvestri G. Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Curr Opin Immunol*. 2005;17: 366–373.

Dhodapkar MV, Steinman RM. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood*. 2002;100: 174-177.

Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T e Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4+CD25+ T cells with regulatory properties from human blood. *J.Exp.Med.* 2001; 193:1303-1310.

Dittmer U, He H, Messer RJ, Schimmer S, Olbrich AR, Ohlen C, et al. Functional impairment of CD8+ T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity*. 2004;20:293-303.

Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, Gotch F, et al. Loss of blood CD11c+ myeloid and CD11c+ plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood*. 2001;98(8): 2574-2576.

Donaghy H, Stebbing J, Patterson S. Antigen presentation and the role of dendritic cells in HIV. *Curr Opin Infect Dis*. 2004;17: 1-6.

Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:265-304.

Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, et al. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol*. 2005;174: 4407-4414.

Egger M, Hirshel B, Francioli P, Sudre P, Wirz M, Flepp M, et al. Impact of new antiretroviral combination therapies in HIV infected patients in Switzerland: prospective multicentre study. *Swiss HIV Cohort Study BMJ*. 1997;315: 1194-9.

Epple HJ, Loddenkemper C, Kunkel D, Troger H, Maul J, Moos V, et al. Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. *Blood*. 2006;108, 3072–3078.

Eron JJ, Benoit SL, Jemsek J, MacArthur RD, Santana J, Quinn JB, et al. Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+

cells per cubic millimeter. North American HIV Working Party. *N Engl J Med*. 1995;335:1662-9.

Eron JJ. The treatment of antiretroviral-naïve subjects with the 3TC/zidovudine combination: a review of North American (NUCA 3001) and European (NUCB 3001) trials. *AIDS*. 1996; 10 S5: S11-19.

Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺ CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol*. 2004;172 : 5149-5153.

Fazekas De St Groth B, Landay AL. Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response? *AIDS*. 2008;22, 671–683.

Fehervari Z e Sakaguchi S. Control of Foxp3+CD25+CD4⁺ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Inter. Immunol*. 2004;16:1769-1780.

Février M, Dorgham K, Rebollo A. CD4⁺ T cell depletion in Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection: Role of apoptosis. *Viruses*. 2011;3: 586-612.

Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*. 1997; 278:1295-1300.

Fischl MA, Richman DD, Causey DM, Grieco MH, Bryson Y, Mildvan D, et al. Prolonged zidovudine therapy in patients with AIDS and advanced AIDS-related complex. AZT Collaborative Working Group. *JAMA*. 1989;262(17): 2405-10.

Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*. 1987;317:185-191.

Fischl MA, Richman DD, Hansen N, Collier AC, Carey JT, Para MF, et al. The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection. A double-blind, placebo-controlled trial. The AIDS Clinical Trials Group. *Ann Int Med*. 1990;112: 727-737.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299:1057-1061.

Ganesh L, Burstein E, Guha-Niyogi A, Louder MK, Mascola JR, Klomp LW, et al. The gene product murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4⁺ lymphocytes. *Nature*. 2003;426:853-857.

Garcia F, Lejeune M, Climent N, Gil C, Alcamí J, Morente V, et al. Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2005;191: 1680-1685.

Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*. 2007;109: 2058.

Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, Van Vliet SJ, Van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells [see comments]. *Cell*. 2000;100:587-597.

Ginaldi L, De Martinis M, D'ostilio A, Di Gennaro A, Marini L, Profeta V, et al. Activated naive and memory CD4+ and CD8+ subsets in different stages of HIV infection. *Pathobiology*. 1997; 65:91-99.

Gluckman JC, Canque B, Rosenzweig M. Dendritic Cells: A Complex Simplicity. *Transplantation*. 2002;73: S3–S6.

Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol*. 2005;174:1783.

Gougeon ML e Montagnier L. Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell depletion in AIDS: molecular control and effect of highly active antiretroviral therapy. *Ann. NY Acad. Sci*. 1999;887:199-212.

Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A., Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J. Immunol*. 1996;156:3509-3520.

Gougeon ML. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nature*. 2003;3:392-404.

Granelli-Piperno A, Golebiowska A, Trumpfheller C, Siegal FP, Steinman, R.M. HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *PNAS*. 2004;101:7669-7674.

Grassi F, Hosmalin A, McIlroy D, Calvez V, Debré P, Autran B. Depletion in blood CD11c-positive dendritic cells from HIV-infected patients. *AIDS*. 1999;13 (7): 759-766.

Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human, T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 2004;21: 589-601.

Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC. Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J. Exp. Med.* 1992;175:331-340.

Guiguet M, Porter K, Phillips A, Costagliola D, Babiker A, on Behalf Of The CASCADE Collaboration. Clinical Progression Rates By Cd4 Cell Category Before And After The Initiation Of Combination Antiretroviral Therapy (Cart). *The Open Aids Journal*. 2008;2:3-9.

Hazenber MD, Stuart JC, Otto SA, Borleffs JCC, Boucher CAB, De Boer RJ, et al. Activation of HIV-1 specific CD4 and CD8 T cells by human dendritic cells: roles for cross-presentation and non-infectious HIV-1 virus. *Blood*. 2000; 95:249-55.

Hengel RL, Watts NB, Lennox JL. Benign symmetric lipomatosis associated with protease inhibitors. *Lancet*. 1997;350:1596.

Herry I, Bernard L, De Truchis P, Perrone C. Hypertrophy of the breasts in a patient treated with indinavir. *Clin Infect Dis*. 1997;25:937-38.

Hewson T, Lone N, Moore M, Howie S. Interactions of HIV-1 with antigen-presenting cells. *Imunol Cell Biol*. 1999;77:289-303

Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat. Med*. 2004;10:29-30.

Hogan CH, Hamer SM. Host determinants in HIV infection and disease. *Ann. Intern. Med*. 2001;134:761-76.

Hogan D, Hutton LA, Smith EM, Opp MR. Beta (CC)-chemokines as modulators of sleep: implications for HIV-induced alterations in arousal state. *J Neuroimmunol*. 2001;119(2):317-26.

Holmes D, Jiang Q, Zhang L, Su L. Foxp3 and Treg cells in HIV-1 infection and immuno-pathogenesis. *Immunol Res*. 2008;41:248–66.

Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur. J. Immunol*. 2002;32: 1282-1291.

Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv. Immunol*. 2003;81:331-371.

Hsieh SM, Pan SC, Hung CC, Chen MY, Chang SC. Differential impact of late-stage HIV-1 infection on in vitro and in vivo maturation of myeloid dendritic cells. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;33: 413-419.

Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):503-13.

Iwashiro M, Messer MJ, Peterson KE, Stromnes IM, Sugie T, Hasenkrug KJ. Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2001;98:9226-230.

Ji J, Cloyd MW. HIV-1 binding to CD4 on CD4+CD25+ regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression. *Int. Immunol*. 2009;21, 283–294.

Jiao Y, Fu J, Xing S, Fu B, Zhang Z, Shi M, et al. The decrease of regulatory T cells correlates with excessive activation and apoptosis of CD8+ T cells in HIV-1-infected typical progressors, but not in long-term non-progressors. *Immunology*. 2009;128, e366–375.

Jones GJ, Watera C, Patterson S, Rutebemberwa A, Kaleebu P, Whitworth JA, et al. Comparative loss and maturation of peripheral blood dendritic cell subpopulations in African and non-African HIV-1-infected patients. *AIDS*. 2001;15(13):1657-1663.

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*. 2000;192: 1213-1222.

Kahn JO e Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. 1998;339(1):33-9.

Khatti R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol*. 2003;4:337-342.

Kinter AL, Hennessey M, Bell A, Kern S, Lin Y, Daucher M, et al. CD25+CD4+ regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4+ and CD8+ HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J. Exp. Med*. 2004;200:331-343.

Kinter AL, Horak R, Sion M, Rigglin L, McNally J, Lin Y, et al. CD25+ regulatory T cells isolated from HIV-infected individuals suppress the cytolytic and nonlytic antiviral activity of HIV-specific CD8+ T cells in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23: 438-450.

Knight SC e Stagg AJ. Antigen-presenting cell types. *Curr. Opin. Immunol.* 1993;5:374-82.

Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, Mcleod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus –1 syndrome. *J. Virol.* 1994;68:4650-4655.

Kronenberg M. e Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature.* 2005;435(7042): 598-604.

Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. Naturally anergic and suppressive CD25+CD4+ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell population. *Int Immunol.* 2000;12:1145.

Kutscher S, Dembek CJ, Allgayer S, Heltai S, Stadlbauer B, Biswas P, et al. The intracellular detection of MIP-1beta enhances the capacity to detect IFN-gamma mediated HIV-1-specific CD8 T-cell responses in a flow cytometric setting providing a sensitive alternative to the ELISPOT. *AIDS Res Ther.* 2008;5: 22.

Laforge M, Campillo-Gimenez L, Monceaux V, Cumont MC, Hurtrel B, Corbeil J, et al. HIV/SIV infection primes monocytes and dendritic cells for apoptosis. *Plos Pathogens.* 2011;7(6): 1-16.

Larsson M, Fonteneau JF, Lirvall M, Haslett P, Lifson JD, Bhardwaj N, et al. Activation of HIV-1 specific CD4 and CD8 T cells by human dendritic cells: roles for cross-presentation and non-infectious HIV-1 virus. *AIDS.* 2002;16: 1319-1329.

Lawn SD, Butera ST, Folks TM. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection. *Clinical Microbiology Reviews.* 2001;14:753-777.

Leaderman MM, Kalish LA, Asmuth D, Fiebig E, Mileno M, Busch MP. “Modeling” relationships among HIV-1 replication, immune activation and CD4+ T cell losses using adjusted correlative analyses. *AIDS.* 2000;14:951-958.

Lee S, Gao W, Mazzola S, Thomas MN, Csizmadia E, Otterbein LE, et al. Heme oxygenase-1 carbon monoxide, and bilirubin induce tolerance in recipients toward islet allografts by modulating T regulatory T cells. *FASEB J.* 2007;21:3450.

Leng Q, Borkow G, Weisman Z, Stein M, Kalinkovich A, Bentwich Z. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 2001;27:389-397.

Leonardo MJ, Angleman SB, Bounkeua V, Dimas J, Duvall MG, Graubard MB, et al. Cytopathic killing of peripheral blood CD4+ T lymphocytes by human immunodeficiency

virus type I appears necrotic rather than apoptotic and does not require env. *J. Virol.* 2002;76:5082-93.

Lim A, Tan D, Price P, Kamarulzaman A, Tan HY. Proportions of circulating T cells with a regulatory cell phenotype increase with HIV-associated immune activation and remain high on antiretroviral therapy. *AIDS.* 2007;21: 1525-1534.

Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, Steinman RM. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med.* 2002;196: 1091-1097.

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with Foxp3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* 2006; 203:1701-1711.

Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature Immunology.* 2001;2: 585-589

Lo JC, Mulligan K, Tai VW, Algren H, Schambelan M. Body shape changes in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998;19(3):307-8.

Lu W e Andrieu JM. In vitro human immunodeficiency virus eradication by autologous CD8+ T cells expandend with inactivated-virus-pulsed dendritic cells. *J. Virol.* 2001;75(19): 8949-56.

Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med.* 2004;10(12):1359-65.

Luo X, Tarbell KV, Yang H, Pothoven K, Bailey SL, Ding R, et al. Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104: 2821-2826.

Lyles RH, Munoz A, Yamashita TE, Bazmi H, Detels R, Rinaldo CR, et al. Natural history of human immunodeficiency virus type I viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS cohort study. *J. Infect. Dis.* 2000;181:872-80.

Macatangay BJ, Szajnik ME, Whiteside TL, Riddler SA, Rinaldo CR. Regulatory T cell suppression of Gag-specific CD8 T cell polyfunctional response after therapeutic vaccination of HIV-1-infected patients on ART. *PLoS One.* 2010;5: e9852.

Macdougall THJ, Shattock RJ, Madsen C, Chain BM, Katz DR. Regulation of primary HIV-1 isolated replication in dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2002;127:66-71.

Madge S, Kinloch-De-Loes S, Mercey D, Johnson M A, Weller IVD. Lipodystrophy in patients naive to HIV protease inhibitors. *AIDS.* 1999;13(6):735-7.

Majumder B, Janket ML, Schafer EA, Schaubert K, Huang XL, Kan-Mitchell J, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr impairs dendritic cell maturation and T-cell activation: implications for viral immune escape. *J Virol.* 2005;79: 7990-8003.

Mallon DFJ, Buck A, Reece JC, Crowe SM, Cameron PU. Monocyte-derived dendritic cells as a model for the study of HIV-1 infection: Productive infection and phenotypic changes during culture in human serum. *Immunol Cell Biol.* 1999; 77:442-450.

McIlroy D, Autran B, Cheynier R, Wain-Hobson S, Clauvel JP, Oksenhendler E, et al. Infection frequency of dendritic cells and CD4⁺ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Virol.* 1995; 69:4737-45.

Meltzer MS, Skillman DR, Hoover DL, Hanson BD, Turpin JA, Kalter DC, et al. Macrophages and the human immunodeficiency virus. *Immunol Today.* 1990;11:217-223.

Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RP, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science.* 1992;257:217-219.

Meyaard L, Otto SA, Keet RP, Roos MT, Miedema F. Programmed death of T cells in human immunodeficiency virus infection. No correlation with progression to disease. *J.Clin. Invest.* 1994;93:982-988.

Meyaard L, Schuitemaker H, Miedema F. T-cell dysfunction in HIV infection: anergy due to defective antigen-presenting cell function. *Immunol Today.* 1993;14:161-164.

Michel P, Balde AT, Roussillon C, Aribot G, Sarthou JL, Gougeon ML. Reduced immune activation and T cell apoptosis in human immunodeficiency virus type 2 compared with type 1: correlation of T cell apoptosis with β 2 microglobulin concentration and disease evolution. *J. infect. Dis.* 2000;181:67-75.

Mills, K.H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4:841-55.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST/Aids. Bol. Epidem. Aids e DST 2011; 1(1).

Mohri H, Bonhoeffer S, Monard S, Perelson AS, Ho DD. Rapid turnover of T lymphocytes in SIV-infected rhesus macaques. *Science.* 1998;279:1223-1227.

Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Mosci P, Sharpe AH, et al. B7/CD28-dependent CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J. Immunol.* 2002;169:6298-6308.

Moris A, Pajot A, Blanchet F, Guivel-Benhassine F, Salcedo M, Schwartz O. Dendritic cells and HIV-specific CD4⁺T cells: HIV antigen presentation, T cell activation, viral transfer. *Blood (first edition paper)*. DOI 10.1182/blood-2006-02-006361, 2006.

Mougneau E, Hugues S, Glaichenhaus N. Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2002;196: 1013-1016.

Muro-Cacho CA, Pantaleo G, Fauci AS. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden. *J. Immunol*. 1995;5555-5566.

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med*. 2001;194:629.

Nilsson J, Boasso A, Velilla PA, Zhang R, Vaccari M, Franchini G, et al. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood*. 2006;108, 3808–3817.

Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by *in vivo* and *in vitro* antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cell. *Int. Immunol*. 2004;16: 1189-201.

Nixon DF, Aandahl EM, Michaelsson J. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in HIV infection. *Microbes and Infection*. 2005;7:1063-1065.

Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Oderup FI, Cederbom L, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006;118(2): 240–249.

Ogg GS, Kostense S, Klein MR, Jurriaans S, Hamann D, McMichael AJ, et al. Longitudinal phenotypic analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 – specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with disease progression. *Journal of virology*. 1999; 73:9153-60.

Oliveira JB, Bidere N, Niemela JE, Zheng L, Sakai K, Leonardo MJ, et al. (2007) NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8953-8958.

Oshiro TM, De Almeida A, Duarte AJS. Dendritic cell immunotherapy for HIV infection: from theory to reality. *Immunotherapy*. 2009;1(6):1-13.

O'sullivan B e Thomas R. CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol*. 2003;23: 83-107.

Oswald-Richter K, Grill SM, Shariat N, Leelawong M, Sundrud MS, Haas DW, et al. HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells. *PLoS Biol.* 2004; 2, e198.

Pakker NG, Kroon ED, Roos MT, Otto SA, Hall D, Wit FW, et al. Immune restoration does not invariably occur following long-term HIV-1 suppression during antiretroviral therapy. INCAS Study Group. *AIDS.* 1999;13:203-212.

Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1993, 328:327-335.

Pasare C e Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell – mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 2003;299:1033-1036.

Patterson S, Rae A, Hockey N, Gilmour J, Gotch F. Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J. Virol.* 2001;75:6710-13.

Paust S, Lu L, Mccarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc. Nat.l Acad. Sci.* 2004;101:10398.

Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J infect Dis.* 2008; 197:563-571.

Piconi S, Trabattoni D, Gori A, Parisotto S, Magni C, Meraviglia P, et al. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4+ T-cell counts during antiretroviral therapy. *AIDS.* 2010; 24: 1991-2000.

Pitcher CJ, Quittner C, Peterson DM, Connors M, Koup RA, Maino VC, et al. HIV-1 specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat. Med.* 1999;5:518-525.

Prendergast A, Prado JG, Kang YH, Chen F, Riddell LA, Luzzi G, et al. HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. *AIDS.* 2010; 24, 491–502.

Puccetti P e Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signaling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nature Reviews Immunology.* 2007;7(10): 817-823.

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 2000;192:295.

Reis E Sousa, C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* 2006;6: 476-483.

Ribeiro RM, Mohri HD, Ho D, Perelson A. In vivo dynamics of T cell activation, proliferation, and death in HIV-1 infection: Why are CD4+ but not CD8+ T cells depleted? *PNAS*. 2002; 99:24:15572-577.

Rinaldo CR. Dendritic cell-based human immunodeficiency virus vaccine. *J Intern Med*. 2009;265: 138-158.

Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods*. 1996;196(2):137-51.

Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, et al. Vigorous HIV-1 specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 1997;278:1447-1450.

Rosenzweig M, Demaria MA, Harper DM, Friedrich S, Jain RK, Johnson RP. Increased rates of CD4(+) and CD8(+) T lymphocyte turnover in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1998; 95:6388-93.

Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K, Schneider DK, Bess JW Jr, Vasquez GM, et al. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J Virol*. 1998;72: 7992-8001.

Saelens X, Festjens N, Walle LV, Van Gurp M, Van Loo G, Vandenabeele P. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004; 23: 2861-2874.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995; 155:1151–1164.

Sakaguchi S. Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express toll-like receptors. *J Exp Med*. 2003;197(4):397-401.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol*. 2004;22:531-562.

Sallusto F e Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994;179(4):1109-18.

Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of IL-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006; 203:1693-1700.

Selliah N e Finkel TH. Biochemical mechanism of HIV induced T cell apoptosis. *Cell Death Differ*. 2001;8:127-36.

Sgonc R e Gruber J. Apoptosis detection: an overview. *Exp. Gerontol*. 1998;33(6):525-33.

Shevach EM. CD4+CD25+ supressor T cells: more quentions than answers. *Nat. Rev. Immunol*. 2002;2:389-400.

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999;284:1835-7.

Sinkovics JG e Horvath JC. Vaccination against human cancers (review). *Int J Oncol*. 2000;16: 81-96.

Sousa AE, Carneiro J, Méier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM. J. Immunol. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the patogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J. Immunol*. 2002;169:3400-06.

Steinman RM e Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2002;99:351-358.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol*. 2003;21:685-711.

Steinman RM. Dendritic Cells and the Control of Immunity: Enhancing the Efficiency of Antigen Presentation. *The Mount Sinai Journal of Medicine*. 2001;68: 160-166.

Suffia IJ, Recking SK, Piccirillo CA, Goldszmid RS, Belkaid Y. Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J. Exp. Med*. 2006;203:777-788.

Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol*. 1998;160:1212–1218.

Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J. Exp. Med*. 2003;198:889-901.

Tanchot C, Vasseur F, Pontoux C, Garcia C, Sarukhan A. Immune regulation by self-reactive T cells is antigen specific. *J. Immunol.* 2004;172:4285-291.

Taylor PA, Lees CJ, Blazer BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood.* 2002; 99:3493–3499.

Taylor PA, Noelle RJ, Blazer BR. CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J. Exp. Med.* 2001;193:1311–1318.

Terabe M, Berzofsky JA. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr Opin. Immunol.* 2004;16:157–162.

Thorton AM e Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 1998;188:287-296.

Tsunemi S, Iwasaki T, Imado T, Higasa S, Kakishita E, et al. Relationship of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients. *AIDS.* 2005;19: 879-886.

Tsunemi S, Iwasaki T, Imado T, Higasa S, Kakishita E, Shirasaka T, et al. Relationship of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients. *AIDS.* 2005; 19:879-886.

Turville SG, Cameron Pu, Handley A, Lin G, Pöhlmann S, Doms RW, et al. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol.* 2002;3:975-983.

Usharauli D. Dendritic cells and the immunity/tolerance decision. *Medical Hypotheses.* 2005;64: 112–113.

Vanbervliet B, Homey B, Durand I, Massacrier C, Aït-Yahia S, de Bouteiller O, et al. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur. J. Immunol.* 2002;32 (1): 231-242.

Walker M, Kaspirowicz DJ, Gersuk VH, Bernard A, Van Landeghen M, Buckner JH, et al. Induction of Foxp3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁺ T cells. *J. Clin. Invest.* 2003;112:1437-1443.

Wan Z e Chen X. Mechanisms of HIV envelope-induced T lymphocyte apoptosis. *Virologica Sinica.* 2010;25(5) : 307-315.

Weiss L, Donkova-Petrini V, Caccavelli L, Balbo M, Carbonneil C, Levy Y. Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells which suppress HIV-specific CD4 T cell responses in HIV-infected patients. *Blood*. 2004;104:3249-3256.

Weissman D, Ni H, Scales D, Dude, A, Capodici J, McGibney K, et al. HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response. *J Immunol*. 2000;165(8):4710-7.

Westby M, Manca F, Dalgleish AG. The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol Today*. 1996;17:120-26.

World Health Organization (WHO), 2010. UNAIDS: AIDS epidemic update, dec.2010. Disponível em: http://www.who.int/hiv/data/2011_epi_core_en.png

Wierdecky J, Mueller M, Brossart P. Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55: 63-67.

Xu D, Liu H, Komai-Koma M, Campbell C, Mcsharry C, Alexander J, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, Leishmania major infection, and Colitis in mice. *J Immunol*. 2003; 170:394–399.

Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- β . *J. Immunol*. 2007; 178:6725-6729.

Yamazaki S e Steinman RM. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. *J Dermatol*. 2009;Sci 54: 69-75.

Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, et al. Direct expansion of functional CD25+CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med*. 2003;198:235-247.

Zaitseva M, Blauvet A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, et al. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat. Med*. 1997; 3:1369-1375.

Zhao XQ, Huang XL, Gupta P, Borowski L, Fan Z, Watkins SC, et al. Induction of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD8(+) and CD4(+) T-cell reactivity by dendritic cells loaded with HIV-1 X4- infected apoptotic cells. *J Virol*. 2002;76: 3007-3014.

Zheng S, Wang J, Horwitz DA. Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF- β are resistant to TH17 conversion by IL-6. *J. Immunol*. 2008;180:7112-7116.