POLIANA ALVES PATAH

**Análise do perfil imunofenotípico das células NK e sua
correlação com a expressão de PD-1 e PD-L1 em indivíduos
infectados pelo HIV**

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

Programa de: Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges
Kallás

(Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Patah, Poliana Alves

Análise do perfil imunofenotípico das células NK e sua correlação com a expressão de PD-1 e PD-L1 em indivíduos infectados pelo HIV / Poliana Alves Patah. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Immunopatologia.

Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.HIV 2.Células matadoras naturais 3.Linfócitos T 4.Receptor de morte celular programada 1 5.Citometria de fluxo 6.Receptores KIR3DL1

USP/FM/DBD-415/16

Para Pedro, que vê o mundo de um jeito que ninguém mais vê.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por terem transmitido, a mim e aos meus irmãos, a importância fundamental da educação; e por terem compreendido minhas faltas e ausências, pois foram muitas. Vocês estão comigo em cada uma das minhas conquistas.

Aos pacientes que tanto me ensinaram nestes vinte anos.

Aos mestres e mentores que pavimentaram o caminho por onde trilhei minha história. Em particular, à Profa. Belinda Simões, ao Dr. Marcos de Lima e ao Dr. Luiz Fernando Reis, aos quais além de mentores hoje considero amigos.

Ao Professor Esper Kallás, exemplo como pesquisador, como médico e como ser humano.

Ao Professor Kerry Campbell, uma das pessoas mais gentis que já conheci, por ter me recebido em seu laboratório.

Aos colegas e funcionários do LIM-60 e do Fox Chase Cancer Center, por toda a ajuda.

Ao meu marido Pedro, meu companheiro de jornada, pelo apoio incondicional e companheirismo durante a realização deste trabalho. E por tudo, tudo.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Epidemia HIV/AIDS: panorama atual	2
1.2 As células NK	4
1.3 PD-1 e seus ligantes	14
1.4 O papel de PD-1 em neoplasias e infecções crônicas.....	16
2 OBJETIVOS	21
3 MÉTODOS	23
3.1 Casuística e considerações éticas	23
3.1.1 Grupos de estudo.....	23
3.1.2 Critérios de inclusão	24
3.1.3 Critérios de exclusão	25
3.1.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	25
3.2 Informações clínicas	26
3.3 Procedimentos laboratoriais	26
3.3.1 Amostras	26
3.3.2 Imunofenotipagem	28
3.3.2.1 Tubo Mono/NK – avalia células NK e seus subtipos, além de monócitos	30
3.3.2.2 Tubo NK2 – avalia células NK e seus subtipos.....	32
3.3.2.3 Tubo NK3 – avalia células NK e seus subtipos.....	34
3.3.2.4 Tubo T – avalia subpopulações de células T	36
3.3.2.5 Tubo Isotipo – contém marcadores populacionais e alguns controles de isotipos	37

3.3 Avaliação de resultados	38
3.3.1 Estratégia de análise.....	38
3.3.1.1 Tubo Mono/NK:	38
3.3.1.2 Tubo NK2	40
3.3.1.2.1 <i>Análise de KIR3DL1 versus KIR3DL1/S1</i>	42
3.3.1.3 Tubo NK3	44
3.3.1.3.1 <i>Análise de KIR2DL1 versus KIR2DL1/S1</i>	46
3.3.1.4 Tubo T	48
3.3.1.5 Tubo Isotipo.....	51
3.4 Análise estatística	52
4 RESULTADOS.....	54
4.1 Características demográficas e clínicas dos grupos estudados	54
4.2 Resultados dos experimentos de imunofenotipagem	55
4.2.1 CD7/CD16 versus CD7/NKp46 como estratégia de isolamento de células NK CD56^{neg}	55
4.2.2 Proporção de subtipos de células NK.....	57
4.2.3 Subpopulações de células T	59
4.2.4 KIR3DL1 versus KIR3DS1.....	60
4.2.5 A expressão de KIR3DL1 nos diferentes subtipos de células NK	61
4.2.6 Outros KIRs	64
4.2.7 Relação entre expressão de CD57 e de PD-1 em células NK.....	65
4.2.8 Outros marcadores	66
4.2.8.1 NKG2D	66
4.2.8.2 NKp30	67
4.2.8.3 NKG2A	67
4.2.8.4 DNAM-1.....	68
4.2.8.5 NKG2C, NTBA, NKp44 e NKp46	68
4.2.9 Contagens de subpopulações de células T.....	69
4.2.10 Expressão de PD-1 em subpopulações de células T.....	70
4.2.11 Relação entre expressão de PD-1 em células NK e contagens de CD4⁺	72
4.2.12 Relação entre expressão de PD-1 em células T e NK.....	73
4.2.13 Expressão de PD-L1 em Monócitos	77

4.2.14 Expressão de CD69 em células NK, células T e monócitos.....	78
5 DISCUSSÃO	81
6 CONCLUSÕES	96
7 ANEXOS	98
7.1 ANEXO A – Termo de Aprovação do estudo na CaPPesq	98
8 REFERÊNCIAS.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ADCC	<i>Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i> (Citotoxicidade Mediada por Anticorpo)
AF700	<i>Alexa Fluor 700</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
APC	<i>Allophycocyanin</i> (Aloficocianina)
BCR	<i>B-cell Receptor</i> (Receptor de células B)
BV	<i>Brilliant Violet</i>
cat.	Catálogo
CCR2	<i>C-C Chemokine Receptor type 2</i> (Quimiorreceptor C-C do tipo 2)
CCR5	Idem, tipo 5
CCR7	Idem, tipo 7
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i> (Citomegalovírus)
Cy	<i>Cyanine</i> (Cianina)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i> (Proteína associada a linfócito T citotóxico 4)
DNAM-1	<i>DNAX Accessory Molecule-1</i> (Molécula acessória 1 DNAX)
DSTs	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein</i> (Fluoresceína)
FSC-A	<i>Forward Scatter – Area</i> (Dispersão frontal – área)
FSC-H	<i>Forward Scatter – Height</i> (Dispersão frontal – altura)
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
HAART	<i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i> (Terapia Anti-Retroviral de Alta Eficácia)

HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (Solução balanceada de sais de Hank)
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> (Vírus da Hepatite C)
HEPES	Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-Piperazina Etanol Sulfônico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus causador da Imunodeficiência Humana)
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
HSH	Homens que fazem Sexo com Homens
IFN γ	Interferon-gamma
IgV	Porção variável da imunoglobulina
IL	Interleucina
ILCs	<i>Innate Lymphoid Cells</i> (células linfoides da imunidade inata)
ILxR	Receptor da respectiva interleucina (aqui representada pela letra x)
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif</i> (Motif de inibição baseado em tirosina do imunorreceptor)
ITSM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif</i> (Motif tipo interruptor baseado em tirosina do imunorreceptor)
KIR	<i>Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor</i> (Receptor do tipo imunoglobulina das células NK)
KLRG1	<i>Killer-cell Lectin like Receptor G1</i> (Receptor G1 do tipo lectina das células NK)
LCA	<i>Leucocyte Common Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Comum)
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo de Histocompatibilidade Maior)
MIC-A	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i> (Sequência A relacionada a polipeptídeos de MHC de classe I)
MIC-B	Idem, sequência B
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i> (Molécula de adesão da célula neural)
NCR	<i>Natural Cytotoxicity Receptor</i> (Receptor Natural de Citotoxicidade)

NK	<i>Natural Killer</i>
NKG2A	<i>Natural Killer Group 2</i> , molécula A do grupo de moléculas classificado como parte dos KARs, receptores ativadores das células NK
NKG2C	Idem, molécula C
NKG2D	Idem, molécula D
NKp30	Receptor incluído no grupo NCR
NKp44	Idem
NKp46	Idem
NTB-A	<i>NK-, T-, and B-cell Antigen</i> (Antígeno de Células NK, T e B)
PacBlue	<i>Pacific Blue</i>
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i> (Proteína de morte celular programada 1)
PD-L1	<i>Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1</i> (Ligante 1 da proteína PD-1)
PD-L2	<i>Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 2</i> (Ligante 2 da proteína PD-1)
PE	<i>Phycoeritrin</i> (Ficoeritrina, molécula)
PECy7	PE conjugado com 7 moléculas de cianina adicionais
PerCP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein</i> (Proteína Clorofil Peridina)
Qdot	<i>Quantum Dot</i>
rpm	<i>Rotations per minute</i> (rotações por minuto)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institution</i> (meio de cultura RPMI)
SA	<i>Streptavidin</i> (Streptavidina)
SLAMF6	<i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family, member 6</i> (membro 6 da família SLAM – Molécula Sinalizadora de Ativação Linfocitária)
SSC-A	<i>Side Scatter – Area</i> (Dispersão lateral – área)
SHP	<i>Src homology region</i> (Região homóloga de Src)
TCR	<i>T-cell receptor</i> (Receptor do linfócito T)
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral alfa)
TIGIT	<i>T Cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i> (Imunoreceptor de células T com domínios imunoglobulina e ITIM)
Treg	Célula T regulatória
ULBP	<i>UL16 binding proteins</i> (Proteínas ligantes a UL16)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Taxa de mortalidade por HIV/AIDS nos EUA, para todas as idades, ao longo do tempo.....	3
Figura 2 -	Características das células NK CD56 ^{dim} e CD56 ^{hi}	6
Figura 3 -	Funções biológicas das células NK.	8
Figura 4 -	Receptores da célula NK.	10
Figura 5 -	A regulação dinâmica da função efetora das células NK.....	12
Figura 6 -	Estratégia de isolamento de populações de células NK no tubo Mono/NK	39
Figura 7 -	Definição das populações positiva e negativa para cada marcador no tubo Mono/NK, em células NK (A a D) e em monócitos (E a G)	40
Figura 8 -	Estratégia de isolamento de populações de células NK no tubo NK2	41
Figura 9 -	Definição das populações positiva e negativa para cada marcador no tubo NK2, em células NK CD56 ^{neg} , CD56 ^{dim} e CD56 ^{hi}	42
Figura 10 -	Marcação positiva para KIR3DS1 e negativa para KIR3DL1...43	
Figura 11 -	Marcação positiva para KIR3DL1 e incerta para KIR3DS1	43
Figura 12 -	Marcação positiva para ambos os marcadores, permitindo identificar uma população provavelmente KIR3DL1 ⁺ e uma população KIR3DL1 ⁺ /KIR3S1 ⁺	44
Figura 13 -	Estratégia de isolamento de populações de células NK no tubo NK3	45
Figura 14 -	Definição das populações positiva e negativa para cada marcador no tubo NK3, em células NK CD56 ^{neg} , CD56 ^{dim} e CD56 ^{hi}	46
Figura 15 -	Marcação positiva para KIR2DL1 e KIR2DL1/S1, de padrão homogêneo	47

Figura 16 - Marcação positiva para KIR2DL1 e KIR2DL1/S1, de padrão heterogêneo	47
Figura 17 - Marcação positiva para KIR2DS1 e negativa para KIR2DL1...	48
Figura 18 - Marcação duplo negativa para KIR2DL1 e KIR2DS1	48
Figura 19 - Estratégia de isolamento de células T e subpopulações no tubo T	50
Figura 20 - Separação de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em <i>naïve</i> , memória central, efectoras e efectoras de memória	50
Figura 21 - Definição das populações positiva e negativa para PD-1 e CD69 no tubo T. As subpopulações T apresentam boa separação de populações positiva e negativa para PD-1	51
Figura 22 - Comparação da população CD56 ^{neg} identificada com as estratégias “CD7 x CD16” e “CD7 x NKp46”	56
Figura 23 - Isolamento da população CD56 ^{neg} nos 3 tubos na amostra PrEP-56.....	57
Figura 24 - Isolamento da população CD56 ^{neg} nos 3 tubos na amostra KIR-36	57
Figura 25 - Distribuição dos subtipos de células NK entre os participantes infectados e não infectados	59
Figura 26 - Proporção de células KIR3DL1 ⁺ nas subpopulações NK entre os participantes infectados e não infectados	62
Figura 27 - Expressão de PD-1 medida por MFI nas subpopulações de células NK, em comparação entre Grupo 1 e Grupo 2	66
Figura 28 - Porcentagens de células PD-1+ nas subpopulações CD4 ⁺ e CD8 ⁺ nos participantes infectados por HIV e não infectados ..	71
Figura 29 - Correlação entre a expressão de PD-1 medida por MFI em células CD56 ^{neg} e a contagem de CD4 ⁺	72
Figura 30 - Correlações entre a expressão de PD-1 em células CD56 ^{neg} , CD56 ^{dim} e CD56 ^{hi} e em células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ , para os participantes infectados por HIV e não infectados.....	75
Figura 31 - Correlações entre a expressão de PD-1 medida por MFI em células CD56 ^{neg} , CD56 ^{dim} e CD56 ^{hi} , e em células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no Grupo 1	76

Figura 32 -	Comparações entre a expressão de PD-L1 em monócitos nos	
	diferentes grupos	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Painel de imunofenotipagem utilizado no estudo.....	29
Tabela 2 -	Características demográficas e clínicas dos participantes do estudo.	55
Tabela 3 -	Porcentagens de células positivas para demais marcadores KIR, de acordo com cada subpopulação de células NK	64

RESUMO

Patah PA. *Análise do perfil imunofenotípico das células NK e sua correlação com a expressão de PD-1 e PD-L1 em indivíduos infectados pelo HIV* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A evolução do conhecimento sobre o HIV e seus efeitos sobre as diferentes células do sistema imune possibilitaram a criação e o aperfeiçoamento de um grande arsenal terapêutico. Atualmente, a sobrevivência de casos recém-diagnosticados é medida em décadas; entretanto, alguns pacientes não apresentam recuperação do sistema imune após a agressão inicial sofrida pelo vírus, a despeito de tratamento adequado. As células NK são identificadas como componentes da imunidade inata, responsáveis pelo combate a infecções virais e tumores. Elas são divididas em CD56^{dim} e CD56^{hi}, com diferentes capacidades citotóxicas e de produção de citocinas; uma terceira subpopulação composta por células CD56^{neg} está presente em proporções mínimas em adultos saudáveis, porém tem maior importância em neonatos e está expandida em indivíduos cronicamente infectados pelo HIV, podendo ser identificada pelos marcadores CD7 e CD16. Dentre diversos outros, as células NK expressam receptores ativadores e inibitórios chamados KIR, que interagem com moléculas HLA, identificando células próprias e aquelas que reduzem sua expressão como mecanismo de escape imunológico; a interação entre KIR e HLA tem papel na evolução clínica da infecção por HIV/AIDS, particularmente envolvendo o receptor KIR3DL1. PD-1 é um *checkpoint* do sistema imunológico que pode ter sua expressão aumentada em tumores e infecções virais crônicas. A expressão de PD-1 em células T correlaciona-se a marcadores prognósticos na infecção por HIV/AIDS; sua expressão em células NK já foi documentada, porém temos poucas informações a respeito. Este trabalho buscou detalhar a expressão de PD-1 e seu ligante PD-L1 em células NK e monócitos em participantes infectados pelo HIV e controles. Foram recrutados participantes diagnosticados e acompanhados desde a infecção aguda, participantes diagnosticados após um intervalo de tempo desconhecido desde a soroconversão e controles não infectados sob alto risco por exposição sexual. As amostras foram processadas a fresco no LIM-60; PD-1 e outros marcadores foram analisados por citometria de fluxo multicor. A expressão de PD-1 em células NK correlacionou-se a contagens de células T CD4⁺ e expressão de PD-1 em células T nos participantes infectados; dentre estes, os participantes seguidos desde a infecção aguda tiveram menor expressão de PD-1. Os participantes seguidos desde a infecção aguda tiveram ainda menor expressão de PD-L1 em monócitos quando comparados aos participantes diagnosticados em fase desconhecida da doença, e também quando comparados aos controles não infectados. Houve aumento expressivo da proporção de células KIR3DL1⁺ entre as células CD56^{neg} nos participantes

infectados em comparação ao grupo não infectado. Concluimos que a expressão de PD-1 em células NK está aumentada em pessoas infectadas pelo HIV e correlaciona-se a outros parâmetros imunológicos, como contagem de células T CD4⁺ e expressão de PD-1 em células T. A exaustão das células NK pode, portanto, contribuir para o dano imunológico causado pelo HIV e pode ser explorada como um alvo para novas modalidades terapêuticas.

Descritores: HIV; células matadoras naturais; linfócitos T; receptor de morte celular programada 1; citometria de fluxo; receptores KIR3DL1.

ABSTRACT

Patah PA. *Analysis of immunophenotypic profile of NK cells and correlation to PD-1 and PD-L1 expression in HIV-infected individuals* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

The expansion of our knowledge about the HIV and its effects on the entire immune system has led the development of a vast therapeutic arsenal. Survival for newly diagnosed cases is now measured in decades; some patients, however, never recover full immune function following the initial aggression inflicted by HIV, despite adequate treatment. NK cells are identified as innate immunity components, responsible for fighting viral infections and tumors. They are separated in CD56^{dim} and CD56^{hi} cells, which present different cytotoxicity and cytokine production capacity. A third distinct subpopulation constituted by CD56^{neg} cells can be found in minimal counts in healthy adults, but is present in newborns and is expanded in chronically HIV-infected subjects; these cells can be identified as CD7⁺CD16⁺. Among others, NK cells express activating and inhibitory receptors called KIR, which interact with HLA molecules and identify "self" cells and cells that have downregulated its expression as an immunologic evasion strategy. Studies have documented the importance of KIR and HLA interaction in HIV/AIDS infection clinical course, particularly involving the receptor KIR3DL1. PD-1 is an immune checkpoint that can be upregulated by tumors and chronic viral infections. PD-1 expression on T cells is correlated to prognostic factors in HIV/AIDS infection; NK cells have been shown to express it, but further information is necessary. This study aimed at investigating PD-1 and its ligand PD-L1 expression on NK and monocytes in HIV-infected participants and controls. We recruited a group of participants who were diagnosed during acute phase of HIV infection and have been followed ever since, a group of participants who were diagnosed after unknown interval since seroconversion, and a group of uninfected controls who have a high risk due to sexual exposure. Samples were freshly processed at LIM-60; PD-1 and other markers were analyzed by multicolor flow cytometry. We found PD-1 expression on NK cells was correlated to T CD4⁺ cell counts and PD-1 expression on T cells, in infected participants; among them, participants followed since acute infection expressed less PD-1. They also expressed less PD-L1 in monocytes, as compared to participants diagnosed after unknown interval since seroconversion, as well as compared to the uninfected group. We found significant increase in proportion of KIR3DL1-expressing cells among CD56^{neg} cells in infected participants compared to the uninfected group. We concluded that PD-1 expression on NK cells is increased in people infected by HIV and correlated to other immunologic parameters such as T CD4⁺ counts and PD-1 expression on T cells. NK cell exhaustion may, therefore, contribute to the

immune damage induced by HIV-1 infection and can be also explored as a target to find new ways to restore antiviral immunity.

Descriptors: HIV; Killer Cells, Natural; T-lymphocytes; programmed cell death 1 receptor; flow cytometry; receptors, KIR3DL1.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemia HIV/AIDS: panorama atual

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2015 aproximadamente 36,7 milhões de pessoas eram portadoras de HIV mundialmente; destas, 2,1 milhões haviam sido infectadas naquele ano. Um milhão e meio de mortes por doenças relacionadas à AIDS ocorreram no mesmo período¹, o que representa uma queda de 35% desde 2005². No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, nos últimos 5 anos o Brasil tem registrado, em média, 40,6 mil casos de AIDS anualmente; desde o início da epidemia até junho de 2015, foram registrados 798.366 casos de AIDS³.

Desde os primeiros casos reportados em 1981 pelo CDC⁴, mais de 78 milhões de pessoas foram infectadas com o HIV e 39 milhões morreram de causas relacionadas à AIDS⁵. Neste período, o curso clínico da doença mudou muito. Durante os primeiros anos da epidemia, o tratamento era praticamente restrito a suporte e cuidados paliativos. O advento da Zidovudina, conhecido como AZT, em 1986^{6,7}, marcou o início de uma era de esperança para pacientes e profissionais de saúde. A década seguinte veria o advento da terapia com associação de drogas antirretrovirais⁸ e finalmente, após mais de dez anos de estudos clínicos, o conceito de terapia tripla, conhecida a partir de então como HAART⁹⁻¹¹. O uso de HAART rapidamente reduziu as taxas de mortalidade, complicações e hospitalizações em 60 a 80%¹² e sua chegada

ao cotidiano clínico representou o início de uma transição entre a visão da infecção pelo HIV como uma doença aguda e de alta letalidade para uma doença crônica, manejável. A Figura 1 ilustra o impacto que a introdução de HAART representou nas taxas de mortalidade para diferentes grupos populacionais nos EUA.

Figura 1 - Taxa de mortalidade por HIV/AIDS nos EUA, para todas as idades, ao longo do tempo.

Adaptado de [http://www.cdc.gov/nchs/hus/chartbook.htm#chartbook_special_feature].

A década seguinte trouxe novas drogas^{13,14}, maior conhecimento sobre combinações entre as diferentes classes de drogas^{15,16} e sobre o manejo adequado da terapia^{17,18} e o conceito de terapia de resgate¹⁹. A evolução do tratamento culminou na possibilidade de taxas de sobrevida global atuais entre os pacientes tratados as quais aproximam-se dos números da população geral^{20,21}.

Durante este caminho, tivemos considerável expansão do conhecimento sobre a fisiopatologia da infecção pelo HIV, com descobertas que têm levado

a uma nova forma de enxergar a doença: informações sobre o ciclo replicativo do HIV²², mecanismos de latência e reativação²³, o tecido imunológico associado ao sistema gastrointestinal como local de replicação inicial e estabelecimento de reservatório pró-viral^{24,25}, a importância dos reservatórios virais na reativação da infecção²⁶, o papel da imunidade inata no controle viral²⁷, a relevância da apoptose na depleção linfocitária²⁸, a ativação generalizada do sistema imunológico levando à exaustão celular²⁹ e, finalmente, a participação crucial de outras células além dos linfócitos T – como, por exemplo, as células NK, que têm capacidade de suprimir a replicação viral tão efetivamente quanto linfócitos T citotóxicos³⁰ – têm mudado a percepção de que a AIDS é apenas uma doença infecciosa para a compreensão de que se trata de um complexo distúrbio *imunológico*.

1.2 As células NK

As células NK são um importante componente da resposta imune antitumoral e antiviral, constituindo aproximadamente 10% dos linfócitos em circulação. Embora tenham sido nomeadas por sua capacidade de matar células tumorais ou infectadas por vírus, por meio da liberação de perforina e granzima, elas também são capazes de produzir IFN- γ , TNF- α , GM-CSF e outras citocinas³¹, deste modo desempenhando um papel importante no recrutamento e no estímulo a outras células imunes. As células NK fazem parte do grupo 1 de ILCs³², distintas por sua capacidade de secretar IFN- γ

mas não IL-1, IL-13, IL-17 ou IL-22³³. Elas podem originar-se de precursores linfoides ou mieloides^{34,35} e dependem de IL-15, IL-2 e IL-1 para maturação e sobrevivência³⁶.

As células NK são encontradas principalmente no sangue periférico, na medula óssea, no baço e no fígado, e em pequeno número em linfonodos. Elas são classicamente identificadas pela presença do marcador CD56 e ausência de CD3, separadas, portanto, da população CD56⁺CD3⁺ que é formada por células T que expressam marcadores típicos de células NK³⁷. O receptor NKp46, ou NCR1, também é um marcador virtualmente presente em todas as células NK em indivíduos saudáveis, embora sua expressão esteja reduzida em pacientes infectados pelo vírus HIV com viremia³⁸.

Classicamente, as células NK são divididas em CD56^{dim}, com pouca expressão de CD56, e CD56^{hi}, com alta expressão³⁹, e que apresentam diferentes características. As células CD56^{hi}, que geralmente representam 5 a 15% das células NK em circulação, são consideradas imaturas, apresentam pouca capacidade citotóxica e predominantemente produzem citocinas. Em oposição, as células CD56^{dim} apresentam grande capacidade citotóxica, embora também possam produzir grandes quantidades de IFN γ mediante ativação⁴⁰, e são consideradas maduras; elas totalizam aproximadamente 90% das células NK CD56⁺^{41,42}. A Figura 2 ilustra as diferentes características das células NK CD56^{dim} e CD56^{hi}.

Figura 2 - Características das células NK CD56^{dim} e CD56^{hi}.

Várias das funções e dos receptores expressos pelas células NK CD56^{dim} (retratada em azul) e CD56^{hi} (retratada em vermelho) estão presentes nesta figura. Células CD56^{hi} produzem grande quantidade de citocinas, porém exibem pouca capacidade citotóxica, enquanto células CD56^{dim} produzem pouca quantidade de citocinas, porém têm grande capacidade citotóxica e de ADCC (adaptado de Cooper *et al*, 2001).¹

Embora em indivíduos saudáveis elas estejam presentes em baixíssimos números e por esta razão sejam menos estudadas, no contexto da infecção pelo HIV foram descritas células CD56 negativo (CD56^{neg}) que sofrem expansão e apresentam aumento da expressão de receptores inibitórios e baixos níveis de receptores de citotoxicidade^{43,44}. Em pacientes portadores de hepatite crônica por vírus C, a expansão desta população foi associada a piora considerável da resposta ao tratamento com IFN peguado e ribavirina, caracterizando uma disfunção da imunidade celular⁴⁵. A mesma população, expandida, foi descrita em neonatos saudáveis⁴⁶. Entretanto, em 2013 um estudo demonstrou que a população CD56^{neg}CD16⁺ é, na verdade, heterogênea, composta tanto por células mieloides pouco diferenciadas

¹ Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheer BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 bright subset. *Blood*. 2001;97:3146-51.

quanto por células NK; ao adicionar o marcador CD7 ao painel, foi então caracterizada a população de células NK CD56^{neg} como CD7⁺/CD16⁺. Esta população é madura, expressa KIRs, NKG2A e NKG2C em níveis semelhantes às células CD56 clássicas e apresenta capacidade citotóxica semelhante a células CD56^{dim} ⁴⁷. É, portanto, de extremo interesse em pacientes infectados pelo HIV.

As células NK respondem rapidamente a infecções virais e a células tumorais, antes da resposta das células T. Elas são capazes de reconhecer células sob estresse, o qual pode traduzir-se pela expressão de marcadores específicos de superfície (como ULBP ou MICA/MICB) ou pela diminuição de expressão de moléculas HLA, resultando em ativação da célula NK e morte por lise. Elas receberam o nome de “natural killer” por sua capacidade de agir rapidamente mesmo sem uma pré-exposição antigênica que resulte em imunização como ocorre com células T³⁶.

Contudo, há uma noção cada vez maior de que as células NK não são apenas “assassinas” de células infectadas por vírus ou células tumorais, mas sim de que participam ativamente também na resposta imunológica adaptativa, produzindo citocinas que ativam macrófagos e neutrófilos, e trabalhando conjuntamente com as células B por meio da ADCC (processo no qual a célula-alvo é recoberta por IgG, a qual se liga a receptores Fc na superfície da célula NK, ativando a citotoxicidade). Marcadamente, a descoberta de que as células NK demonstram um comportamento *memory-like* específico para a infecção por citomegalovírus, com a permanência de exemplares em estado latente e que promovem uma resposta rápida

mediante reexposição antigênica^{48,49}, reforçou a ideia de que elas são uma “ponte” entre a resposta imune inata e a adaptativa em termos de desenvolvimento. A Figura 3 esquematiza as funções desempenhadas pelas células NK.

Figura 3 - Funções biológicas das células NK.

As células NK são capazes de reconhecer células-alvo, que expressam moléculas de estresse ou deixam de expressar moléculas MHC, marcadas por anticorpos (ADCC) ou não (citotoxicidade direta). Elas interagem com células dendríticas por meio da secreção de IFN γ e TNF α , que promovem maturação e melhora da apresentação de antígenos para as células T. A secreção de IFN γ estimula células T e macrófagos, enquanto IL-10 inibe. Ou seja, as células NK não são apenas *natural killers*, mas participam ativamente da regulação da resposta inflamatória (adaptado de Vivier *et al*, 2011).²

² Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-9.

As células NK expressam uma variedade de receptores que podem ativar ou inibir a formação de sinapse imunológica e ataque à célula-alvo. Estes receptores são expressos de maneira variável em milhares de diferentes clones em um mesmo indivíduo; foi recentemente demonstrado que este repertório aumenta ao longo da vida e reflete a experiência imunológica do indivíduo; anda mais impressionante – um repertório mais extenso deixa menores possibilidades de variabilidade restantes e reduz a capacidade de resposta antiviral NK contra o HIV⁵⁰.

Receptores ativadores incluem os receptores de citotoxicidade NKp46, NKp30 e NKp44, NKG2D e CD94/NKG2C, NTBA, CD16 e moléculas KIR do tipo S, ou seja, com cauda citoplasmática curta. Receptores inibitórios incluem CD94/NKG2A, KLRG1, TIGIT e moléculas KIR do tipo L, ou seja, com cauda citoplasmática longa. As células NK expressam ainda receptores quimiotáticos, a exemplo de CCR2, CCR5 e CCR7; receptores de citocinas, como IL1R, IL2R, IL12R e IL15R, e moléculas de adesão, como CD2 e DNAM-1. A Figura 4 apresenta uma lista não exaustiva de receptores expressos na superfície das células NK.

Figura 4 - Receptores da célula NK.

A lista de receptores ativadores, inibitórios, quimiotáticos, de citocina ou moléculas de adesão retratada na figura não é completa, mas apenas representativa. As letras *h* ou *m* antes das moléculas representam humanos e camundongos, respectivamente; quando não há letra, a molécula é comum às duas espécies (adaptado de Vivier *et al*, 2011).³

Os receptores ativadores têm a capacidade de detectar moléculas que são induzidas em situações de estresse. Um exemplo é NKG2D, que tem entre seus ligantes MICA, MICB, e ULBPs, moléculas que podem ser expressas em baixos níveis em tecidos normais, mas que são superexpressas em situações de dano celular, como infecções virais e transformação

³ Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-9.

tumoral⁵¹. Outras moléculas, como KIRs e NKG2A, interagem com moléculas de HLA de classe I e, deste modo, conseguem reconhecer células autólogas e evitar autoimunidade. No entanto, em situações de transformação tumoral ou infecção viral pode ocorrer redução da expressão de HLA, que funciona como uma tentativa de escape da ação de linfócitos T; nesta situação, a não atuação dos receptores inibitórios leva à ativação da célula NK e ataque à célula-alvo⁵² – situação descrita na *Hipótese de “missing self”*, em que o reconhecimento de moléculas de HLA próprias na superfície da célula-alvo inibe a citotoxicidade⁵³. A decisão de atacar a célula-alvo ou poupá-la, portanto, é resultado de um balanço entre a ação de receptores ativadores e inibitórios, ação esta que depende dos estímulos – ou da falta deles – providos pela célula-alvo. A célula NK mata a célula-alvo por meio da secreção de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzimas, os quais levam à formação de poros na membrana celular e apoptose, respectivamente⁵⁴. A Figura 5 ilustra o balanço entre estímulos inibitórios e ativadores na função efetora das células NK.

Figura 5 - A regulação dinâmica da função efetora das células NK.

As células NK são estimuladas pela densidade das várias moléculas expressas na superfície da célula com a qual está interagindo. O balanço entre estes sinais dirá qual o resultado da interação. Em a) a célula-alvo expressa HLA, que liga os receptores inibitórios, e não expressa ligante para o receptor ativador; como resultado, não ocorre lise; b) a célula-alvo não expressa HLA e expressa ligante para o receptor ativador da célula NK e, como resultado, ocorre citotoxicidade; c) a célula-alvo expressa HLA, mas também expressa ligantes para os receptores ativadores; a densidade dos receptores ativadores dita o destino da célula-alvo; d) a célula-alvo, embora expresse ligante para o receptor ativador, expressa HLA em grande densidade, e, por esta razão, não sofre citotoxicidade (adaptado de Farag & Caligiuri, 2006).⁴

Cada família de receptores KIR reconhece uma subclasse do HLA de classe I (HLA-A, HLA-B ou HLA-C)⁵⁵. Clones de células NK diferentes num mesmo indivíduo expressam apenas uma pequena parte dos KIRs herdados geneticamente, e, portanto, alguns clones podem não reconhecer antígenos

⁴ Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 2006;20(3):123-37.

HLA próprios. Esta diversidade deve-se à herança genética KIR em haplótipos, além de polimorfismo alélico tanto no sistema HLA quanto no KIR⁵⁶.

Para evitar autorreatividade, as células NK passam por um processo chamado de “licenciamento” que ocorre antes que a célula amadureça e esteja pronta para agir de acordo com os princípios da teoria “missing self”. As células NK jovens são “não licenciadas”, capazes de responder a estímulos intensos de citocinas ou ADCC, porém incapazes de atacar uma célula-alvo por meio da mediação de moléculas HLA. Os clones que expressam KIR capaz de reconhecer HLA próprio, ao terem o primeiro contato com células expressando HLA de classe I, são estimulados, aumentando sua capacidade de ataque, mas também aumentando a inibição na presença de HLA correlato – adquirem, então, sua “licença”⁵⁷. Os clones que não expressam KIR capaz de reconhecer HLA próprio, por não receberem este estímulo, tornam-se incapazes de matar, porém ainda são capazes de produzir citocinas e, deste modo, colaborar com a imunovigilância⁵⁸.

A importância deste mecanismo de interação KIR-HLA em suas múltiplas combinações já foi documentada em diferentes cenários clínicos. Indivíduos portadores de uma combinação KIR/HLA-C inibitória de baixa afinidade (portanto, menor inibição) em homozigose apresentam maior chance de resolver infecção pelo vírus da hepatite C⁵⁹. O bloqueio de receptores inibitórios, impedindo-os de interagir com ligantes HLA de classe I, resultou em aumento da atividade ADCC num modelo de terapia para linfoma⁶⁰. Ainda,

em pacientes portadores de HIV, a combinação genética entre KIR e HLA tem grande importância na evolução clínica da doença^{61,62}.

Com a expansão do conhecimento sobre as diferentes funções e capacidades das células NK, o desenvolvimento de terapias-alvo utilizando estas células tem sido crescente nos últimos anos, com ênfase na área de Imunoterapia em Oncologia. Deste esforço podemos trazer importantes lições para o campo das doenças infecciosas virais.

Embora o papel de PD-1 na exaustão das células T e sua influência na evolução de tumores e infecções virais crônicas venham sendo bastante documentados, muitas questões permanecem abertas a respeito do efeito nas células NK. A relação entre progressão da doença pelo HIV e modulação da expressão de HLA nas células infectadas⁶³ indica um papel importante desempenhado pelas células NK no controle da infecção. PD-1, por sua vez, poderia atuar prejudicando este mecanismo de controle do vírus?

1.3 PD-1 e seus ligantes

PD-1 é uma proteína membro da família CD28/CTLA4 de reguladores de células T codificada pelo gene *PDCD1*⁶⁴ e funciona como uma molécula coestimulatória negativa, regulando processos de autoimunidade e infecção⁶⁵. Possui 268 aminoácidos, cuja estrutura inclui um domínio extracelular do tipo IgV, uma região transmembrana e uma cauda intracelular. A porção intracelular contém dois sítios de fosforilação localizados em um ITIM e um

receptor do tipo ITSM, correspondentes às funções de regulação negativa dos sinais do TCR⁶⁶. Fosfatases do tipo SHP-1 e SHP-2 ligam-se à cauda citoplasmática da proteína a partir da ativação por seus ligantes.

PD-1 é expresso constitutivamente em células T, células B e monócitos, mas não em células NK. Entretanto, a proteína já foi descrita em células NK de pacientes portadores de infecção pelo HIV⁶⁷ e pelo HCV⁶⁸, além de tumores como mieloma múltiplo⁶⁹ e, mais recentemente, em carcinoma renal metastático⁷⁰ e leucemia linfocítica crônica pela equipe do Prof. Kerry Campbell no Fox Chase Cancer Center, em Philadelphia (dados ainda não publicados).

PD-1 tem 2 ligantes descritos, PD-L1 e PD-L2, que são membros da família B7. A proteína PD-L1 é expressa em macrófagos e células dendríticas em resposta a sinais inflamatórios, como a liberação de LPS, por exemplo⁷¹; também é expressa em células não hematopoéticas, como células epiteliais. PD-L1 já foi descrito em várias linhagens de tumores murinos e humanos. Já PD-L2 é expresso principalmente em células dendríticas⁷² e foi encontrado em uma menor variedade de tumores.

Diversas evidências mostram que PD-1 é responsável por regular negativamente a resposta imunológica. Camundongos CD57BL6 e BALB/c *knockout* para PD-1 desenvolveram doenças autoimunes como glomerulonefrite semelhante à lúpica⁷³ e cardiomiopatia dilatada⁷⁴. A estimulação de PD-1 pelo ligante PD-L1 induz a produção de IL-10 por monócitos, o que inibe a ativação das células T CD4⁺ em cocultura, em pacientes cronicamente infectados pelo HIV⁷⁵.

1.4 O papel de PD-1 em neoplasias e infecções crônicas

Vários estudos têm demonstrado o envolvimento do eixo PD-1/PD-L1 na atenuação da resposta imunológica a tumores. Células tumorais P815, que expressam PD-L1, mostraram-se menos vulneráveis ao ataque por linfócitos T citotóxicos, e este efeito foi revertido com o uso de anticorpo anti-PD-L1⁷⁶. Há evidências de escape imune associado à expressão de PD-1 em câncer de mama⁷⁷, câncer de pulmão⁷⁸ e câncer gastrointestinal⁷⁹. Foi documentada a hiperexpressão de PD-1 em células NK em pacientes portadores de mieloma múltiplo cujas células tumorais expressam PD-L1; o uso de anticorpo anti-PD-1 melhorou a citotoxicidade mediada por células NK nestes tumores *in vitro*⁸⁰.

Estudos clínicos demonstraram a segurança de anticorpos anti-PD-1 em casos avançados de melanoma, carcinoma de pulmão, câncer de próstata hormônio-refratário, e câncer renal⁸¹; a eficácia em combinação com Rituximab (anticorpo monoclonal anti-CD20) em linfoma folicular⁸²; e a eficácia em casos de melanoma avançado, em estudos de fase 2⁸³ e de fase 3⁸⁴, o que fez com que o FDA aprovasse o Nivolumab e o Ipilimumab, anticorpos anti-PD-1, para o tratamento de melanoma em primeira linha. Nivolumab recebeu aprovação acelerada para uso em casos de Linfoma de Hodgkin⁸⁵. Outro anticorpo anti-PD-1, o Pembrolizumab, foi aprovado para uso em tumor de pulmão não pequenas células em pacientes que expressam PD-L1⁸⁶.

A detecção de níveis elevados de PD-1 em células CD8⁺ citotóxicas e em células NK que demonstram sinais de exaustão está também relacionada à incapacidade do sistema imunológico de debelar infecções virais que se tornam crônicas. A expressão de PD-1, que se encontra elevada na fase aguda da infecção pelo HCV, diminui em pacientes que conseguem eliminar o vírus, enquanto permanece elevada naqueles que persistem com infecção viral, acompanhada por disfunção de células T CD8⁺ específicas para HCV^{87,88}. Pacientes que respondem a terapia antiviral para HCV baseada em interferon apresentam redução dos níveis de PD-1 em células T e células NK⁶⁸.

Em pacientes cronicamente infectados por HIV, a expressão de PD-1 correlaciona-se com redução da produção de citocinas e menor capacidade proliferativa em células T CD4⁺⁸⁹ e CD8⁺⁹⁰ específicas para HIV; a expressão de PD-1 em células T também correlaciona-se com marcadores prognósticos como carga viral plasmática e contagem de células CD4⁺^{91,92} e é associada à incapacidade de reconstituição celular, que se caracteriza por recuperação das contagens CD4⁺ com tratamento antirretroviral⁹³, intercorrência que pode afetar até 20% dos pacientes infectados^{94,95}. Ainda mais interessante, foi demonstrado que o uso de anticorpo anti-PD-1 é capaz de suprimir a carga viral de camundongos humanizados cronicamente infectados com HIV, por meio da recuperação da população de linfócitos T CD8⁺⁹⁶.

Foi demonstrado que células B de pacientes infectados pelo HIV com viremia apresentam aumento da frequência de células positivas para PD-1 em comparação a voluntários soronegativos; em experimentos *in vitro*, o uso de

anticorpo para bloqueio de PD-1 melhorou a resposta das células B a peptídeos do HIV⁹⁷. A disfunção de células B certamente é acentuada pelo prejuízo da função T helper específica para HIV das células CD4⁺ na vigência da infecção. Foi também encontrado aumento de expressão de PD-L1 em monócitos de pacientes infectados não tratados, de maneira proporcional à viremia e inversamente proporcional à contagem de células CD4⁺; o tratamento antirretroviral resulta na redução da expressão de PD-L1⁹⁸. Também são afetados os neutrófilos de pacientes infectados, resultando em alto nível de expressão de PD-L1, o qual se correlaciona com a expressão de PD-1 e CD57 em células T CD4⁺ e CD8⁺; estes neutrófilos suprimem a função das células T por meio da interação PD-1/PD-L1 e também da produção de espécies reativas de oxigênio⁹⁹. Por fim, foi identificada em 31 pacientes cronicamente infectados pelo HIV uma população mínima, abaixo de 0,5% das células NK viáveis, que expressa PD-1; porém este estudo não detalha as características destas células¹⁰⁰.

Dado que células NK que expressam PD-1 apresentam características imunofenotípicas de maturidade e redução de capacidade proliferativa e atividade antitumoral¹⁰¹, estas alterações poderiam, em teoria, contribuir para a persistência da replicação viral ou resultar em disfunção imunológica. A progressão da doença afeta as contagens de células NK CD56^{dim} de maneira similar às contagens CD4⁺^{102,103}, porém pouco se sabe sobre o papel de PD-1 na exaustão das células NK no contexto na infecção crônica pelo HIV. É possível, então, que a expressão de PD-1 em infecções virais esteja relacionada à incapacidade do sistema imunológico de não apenas debelar a

infecção, mas de mostrar resiliência frente à agressão imposta pela infecção aguda, impedindo o sistema imune de recuperar-se uma vez controlada a viremia? Qual o papel das células NK neste contexto? As células NK CD56^{neg} são afetadas de maneira semelhante às células CD56⁺?

Nosso objetivo neste estudo é avaliar a expressão de PD-1 e seu ligante PD-L1 em diferentes populações celulares de pacientes cronicamente infectados pelo HIV, utilizando amostras de grupos acompanhados em situações clínicas distintas – um grupo de pacientes acompanhado desde a soroconversão, e um grupo diagnosticado e acompanhado com um intervalo de tempo indeterminado após a soroconversão. Compreender o efeito da expressão de PD-1 sobre as células NK e, caso positivo, se há alguma consequência clínica, é importante uma vez que o bloqueio da via PD-1 está sendo testado como opção de tratamento para doenças virais crônicas¹⁰⁴ e, futuramente, poderá vir a ser utilizado inclusive em combinações com terapias específicas para células NK. A opção por avaliar amplamente os marcadores expressos em pacientes infectados pelo HIV adiciona importante conhecimento à imunopatologia da infecção e usufrui de coortes de pacientes já existentes na Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da USP.

2 OBJETIVOS

1. Verificar a expressão de PD-1 em células NK de indivíduos infectados pelo HIV comparados a pessoas não infectadas, sob risco;
2. Comparar a expressão de PD-L1 em monócitos nestes mesmos grupos de pacientes;
3. Avaliar a expressão de outros marcadores em diferentes subpopulações de células NK e correlacionar com a expressão de PD-1 e PD-L1 em pacientes infectados pelo HIV.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística e considerações éticas

Os pacientes foram recrutados na Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo após a aprovação deste estudo pelo CEP da instituição, conforme documentação anexa. Este projeto está registrado na Plataforma Brasil sob o N° CAAE 40512915.7.0000.0068 e foi aprovado pela CAPPesq sob o N° 13197/15.

Estudos de titulação de anticorpos e padronização dos experimentos foram realizados no laboratório do Prof. Kerry Campbell no Fox Chase Cancer Center, em Philadelphia, EUA. As amostras clínicas foram processadas no laboratório LIM-60 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob a supervisão do Prof. Esper G. Kallás.

3.1.1 Grupos de estudo

Foram definidos 3 grupos de amostras para análise:

Grupo 1 – composto por amostras de voluntários que fazem parte de uma coorte de seguimento de longo tempo de pacientes cronicamente infectados por HIV que estão em seguimento contínuo desde a infecção

aguda. Resumidamente, a infecção aguda foi determinada pelo teste STARHS (*Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion*)^{105,106} e os indivíduos foram incluídos na coorte quando eles tinham um teste ELISA HIV-1 negativo dessensibilizado, o que indicava uma resposta de anticorpos incompleta como consequência de infecção recente. Estes voluntários iniciaram terapia ARV antes de desenvolverem imunodeficiência grave, isto é, o nadir de contagem T CD4⁺ foi acima de 250/mm³, e apresentam supressão virológica. Os voluntários deste grupo são provenientes dos projetos KIR (Nº CAPPesq 0458/08) e AMPLIAR 020 (Nº CAPPesq 0645/08).

Grupo 2 – composto por sujeitos de pesquisa cronicamente infectados por HIV, em supressão virológica por terapia antirretroviral, que foram diagnosticados e iniciaram seguimento após um intervalo de tempo desconhecido desde a soroconversão. Os participantes deste grupo são provenientes do projeto Yakult (Nº CAPPesq 11156/2013).

Grupo 3 – grupo-controle composto por amostras de voluntários sadios sem infecção pelo HIV, com exposição sexual de risco, recrutados para o estudo PrEP Brasil (Nº CAPPesq 9987).

3.1.2 Critérios de inclusão

- Para as pessoas que vivem com HIV: infecção documentada pelo HIV, diagnosticada por um teste sorológico e um teste confirmatório (Western Blot ou carga viral) – Grupos 1 e 2;

- Para o Grupo 3: sorologia ou teste rápido para detecção de anticorpos específicos para HIV com resultado não reagente;
- Idade acima de 18 anos.

3.1.3 Critérios de exclusão

- Diagnóstico pregresso ou atual de doenças inflamatórias, autoimunes, tuberculose ou hepatites crônicas, incluindo hepatite B ou C (sorologia demonstrando imunização por exposição ao vírus B não configura critério de exclusão);
- História pregressa ou atual de doença neoplásica (exceto câncer de pele não melanoma; inclui neoplasias definidoras de AIDS, como Sarcoma de Kaposi ou linfoma); tratamento concluído há mais de 5 anos com seguimento sem sinais de doença não configura critério de exclusão.

3.1.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A CAPPESQ autorizou a dispensa do TCLE por tratar-se de estudo não intervencionista e que utilizaria amostras coletadas para outros projetos previamente aprovados pela CAPPesq. A Comissão também dispensou análise da CONEP.

3.2 Informações clínicas

Foram coletados os seguintes dados dos sujeitos de pesquisa:

- número de registro para identificação da amostra;
- idade e sexo;
- data do diagnóstico de infecção pelo HIV, se aplicável;
- uso e data de início de terapia ARV, se aplicável;
- resultados mais recentes de contagem de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ circulantes e carga viral plasmática, se aplicável;
- histórico médico, especialmente história pregressa ou atual de doenças neoplásicas ou inflamatórias.
- Carga viral em seis meses após a coleta da amostra, para os participantes do Grupo 3.

3.3 Procedimentos laboratoriais

3.3.1 Amostras

Amostras de sangue (20 mL) foram coletadas em tubos com EDTA e subsequentemente processadas a fresco. As células mononucleares foram separadas por meio do processo de diferença de gradiente de densidade por solução de Ficoll-Paque Plus® (GE Healthcare, cat. 17-1440-03). De maneira

resumida, cada amostra de sangue total coletado em tubo de EDTA foi transferida para um tubo Falcon de 50mL e diluída em proporção 1:1 em solução HBSS (*Gibco/Life Technologies*, cat. 14175-079). A solução composta por sangue e HBSS foi então colocada cuidadosamente sobre o Ficoll na proporção 1:3 de forma lenta, de modo a minimizar a mistura entre as fases. A seguir, cada tubo foi centrifugado por 30 minutos a 2300rpm, em temperatura de 18 a 23°C, com aceleração e desaceleração mínima. Após a centrifugação, a camada intermediária, conhecida como *buffy coat*, foi coletada e transferida para um tubo cônico de 50mL. Ao conteúdo do tubo foi adicionado HBSS até completar 45mL e centrifugado por 10 minutos a 1700rpm. O sobrenadante foi descartado e o “botão” celular foi ressuspensionado em 45mL de HBSS e repetida a centrifugação. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o botão celular foi ressuspensionado em 5mL de HBSS para a contagem de células. Uma alíquota de 10µL da suspensão celular foi adicionada a 90µL de solução de Azul de Tripán 0,4% e 10µL dessa mistura foi transferida à Câmara de Neubauer para a contagem. Foram contados 4 quadrantes para a obtenção da quantidade de células viáveis totais. O cálculo é realizado pela fórmula:

$$\frac{\text{Total de células}}{\text{nº de quadrantes}} \times \text{vol. suspensão} \times \text{fator diluição (10)} \times \text{fator correção da câmara (10}^4\text{)}$$

O tubo contendo as células foi centrifugado novamente, o sobrenadante dispensado e o “botão” celular, ressuspensionado na concentração de 10^7

células/mL em meio RPMI 1640 (Gibco/Life Technologies, cat. 11875-013) sem biotina ou fenol vermelho e suplementado com 2.0 g/l NaHCO₃ and 2.4g/l HEPES, pH 7.0.

3.3.2 Imunofenotipagem

Um milhão de células de cada amostra foram marcadas em cada tubo com uma combinação de 11 anticorpos conjugados com fluorocromos e incubados por 20 minutos sob proteção da luz, em temperatura ambiente, em aproximadamente 200 µL de buffer de marcação. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes. Anticorpos secundários foram adicionados e o mesmo processo foi repetido.

As amostras foram adquiridas no citômetro BD LSR Fortessa (BD Biosciences) no LIM-60 e analisadas no *software* FACSDiva (BD Biosciences). Foram analisados 400 mil eventos totais. Por tratar-se de material processado e examinado a fresco, os experimentos realizaram-se durante vários dias. Diariamente, as potências dos lasers do citômetro foram ajustadas com base na fluorescência das CompBeads positiva e negativa (Compbeads anti-mouse IGk, BD Biosciences, cat. 51-90-9001229 e Compbeads negative control, BD Biosciences, cat. 51-90-9001291). A seguir, soluções de CompBeads marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos de cada um dos canais presentes no painel foram analisadas e adquiridas para posterior elaboração da matriz de compensação para cada

experimento. Algumas MFIs estão expressas em valores negativos como resultado de compensação matemática por sobreposição do espectro de fluorescência; estes valores devem ser considerados como zero.

Este foi o painel de marcadores utilizado:

Tabela 1 - Painel de imunofenotipagem utilizado no estudo.

	Mono/NK#1	NK2	NK3	Tcell	Isotype1
FITC	CD7	DNAM-1	NKG2A	CD4	mIgG1-k (DNAM)
PE	CD57	KIR3DL1/S1	KIR2DL1	CD62L	N/A
APC	PD-1	NTB-A	KIR2DL2/3	PD-1	mIgG1-k (PD-1)
PerCP/Cy5.5	CD45	CD7	CD7		CD45
Cy7/APC	CD3 + CD19	CD3 + CD19 + CD14	CD3 + CD19 + CD14	CD3	CD3
AF700	CD16	CD16	NKG2C	CD8	mIgG1 (NKG2C)
Biotin/SA-Qdot605 ou eF605	CD14 eF605	NKG2D Biotin/SA	NKp44 Biotin/SA		CD14 eF605
Cy7/PE	PD-L1	Nkp30	KIR2DL1/S1	CD45RA	mIgG2b-k (PD-L1)
Pac Blue ou BV421 ou eF450	CD69 PacBlue	KIR3DL1 BV421	NKp46 eF450	CD69 PacBlue	mIgG1-k (CD69)
BV510	CD56	CD56	CD56	CD56	CD56
Indo-1 Violet	Live/Dead	Live/Dead	Live/Dead	Live/Dead	Live/Dead

O painel foi organizado em 4 tubos para avaliação de células e um tubo para marcadores de controle de isotipo. Os anticorpos monoclonais utilizados estão descritos a seguir.

3.3.2.1 Tubo Mono/NK – avalia células NK e suas subpopulações, além de monócitos

CD7 em FITC (clone M-T701, BD Biosciences, cat. 340738) – proteína transmembrana que é membro da superfamília imunoglobulina. É expressa por timócitos e células T maduras. A adição do marcador CD7 a um painel composto por CD56, CD3, CD19, CD14 e CD16 permitiu o isolamento da população de células NK CD56^{neg}.

CD57 em PE (clone NK-1, BD Biosciences, cat. 560844) – marcador de diferenciação terminal expresso em células mononucleares (como NK e T), aumentado em infecções virais crônicas, como CMV. Costumava ser considerado um marcador de senescência, porém células NK CD57⁺ são altamente citotóxicas.

PD-1 em APC (clone MIH4, eBioscience, cat. 17-9969-42) – ou CD279; para descrição da biologia de PD-1, consultar a seção “O papel de PD-1 em neoplasias e infecções crônicas”. Anticorpo utilizado para determinar a expressão de PD-1 em células NK, T e monócitos.

CD45 em PerCP/Cy5.5 (clone 2D1, eBioscience, cat. 45-9459-42) – tirosino-fosfatase também conhecida como LCA. A molécula CD45 é necessária para ativação de células B e T, e pode ser expressa em cinco isoformas diferentes dependendo da diferenciação da célula; o anticorpo utilizado reconhece todas estas formas. É utilizado para a determinação de *gates* linfóide e mieloide.

CD3 + CD19 em APC/Cy7

CD3 (clone SK7, BD Biosciences, cat. 641397) – é um correceptor composto de 4 cadeias distintas que se associam ao TCR para gerar um sinal de ativação na célula T. É, portanto, um marcador de células T maduras.

CD19 (clone HIB19, BioLegend, cat. 302218) – da mesma forma, CD19 é um correceptor associado ao receptor de células B, porém encontrado desde linhagens B imaturas até células diferenciadas, perdendo sua expressão somente na diferenciação terminal para células plasmablasticas.

Estes anticorpos são utilizados em conjunto como marcadores de exclusão para o isolamento de células NK CD56^{neg}.

CD16 em Alexa Fluor 700 (clone 3G8, BioLegend, cat. 302026) – receptor Fc de baixa afinidade. É expresso em células NK, neutrófilos, monócitos e macrófagos. Neste tubo, é utilizado para o isolamento das células NK CD56^{neg}.

CD14 em eF605 (clone 61D3, eBioscience, cat. 93-0149-42) – é um correceptor para a detecção de LPS bacteriano. É expresso principalmente por macrófagos, e em intensidade muito menor por neutrófilos. O anticorpo CD14 é utilizado tanto para identificação de monócitos quanto como marcador de exclusão para células NK CD56^{neg}.

PD-L1 em PE/Cy7 (clone 29E.2A3, BioLegend, cat. 329718) – ou CD274; ligante de PD-1. Para maiores detalhes, consultar a seção “O papel de PD-1 em neoplasias e infecções crônicas”. Utilizado para avaliar a expressão de PD-L1 em células NK, T e monócitos.

CD69 em Pacific Blue (clone FN50, BioLegend, cat. 310920) – proteína envolvida na proliferação linfocitária e que funciona como receptor de transmissão de sinais em linfócitos e monócitos. É, portanto, um marcador de ativação para células NK, T e monócitos.

CD56 em BV510 (clone HCD56, BioLegend, cat. 318340) – também chamada NCAM, por sua função em adesão celular e sua expressão em neurônios, glia e músculo esquelético. É expressa em células NK, e em todos os tubos este marcador é utilizado para o isolamento desta população.

Live/Dead em Indo-1 Violet (*LiveDead Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, for UV excitation*, Invitrogen, cat. L23105) – o corante reage com moléculas amino na superfície e no interior da célula que apresenta moléculas comprometidas, desta maneira marcando células inviáveis. É utilizado, portanto, para análise de viabilidade celular.

3.3.2.2 Tubo NK2 – avalia células NK e seus subtipos

DNAM-1 em FITC (clone TX25, BioLegend, cat. 337104) – ou CD226; glicoproteína expressa na superfície de células NK, plaquetas e monócitos, e alguns linfócitos T. Media a adesão celular com outras células que expressam seus ligantes CD112 e CD155, controlando a citotoxicidade e produção de IFN γ .

KIR3DL1/S1 em PE (clone Z27, Beckman Coulter, cat. IM3292) – ou CD158e1/CD158e2. Receptores de MHC de classe I com 3 domínios Ig (por esta razão 3D) e caudas citoplásmicas longas (L) ou curtas (S). KIR3DL1 codifica um sinal inibitório, enquanto KIR3DS1 codifica um sinal ativador nas células NK. Foi analisado em oposição ao marcador KIR3DL1 no canal BV421, buscando identificar células que expressam apenas um dos marcadores ou ambos.

NTB-A em APC (clone #292811, R&D Systems, cat. FAB19081A) – ou CD352; membro da superfamília da Ig e também conhecido como SLAMF6. É expresso em células NK, células T e células B. A interação de NTBA está envolvida na indução de citotoxicidade NK, coestimulação T independente de CD28 e regulação de tolerância em células B.

CD7 em PerCP/Cy5.5 (clone M-T701, BD Biosciences, cat. 561602) – para descrição da função do marcador, consultar “Tubo Mono/NK”, acima.

CD3+CD19+CD14 em APC/Cy7 – Estes anticorpos são utilizados em conjunto como marcadores de exclusão para o isolamento de células NK CD56^{neg}. Para descrição da função de cada um dos marcadores, consultar “Tubo Mono/NK”, acima.

CD3 (clone SK7, BD Biosciences, cat. 641397) – idem “Tubo Mono/NK”.

CD19 (clone HIB19, BioLegend, cat. 302218) – idem “Tubo Mono/NK”.

CD14 (clone MØP9, BD Biosciences, cat. 557831) – para descrição da função do marcador, consultar “Tubo Mono/NK”, acima.

CD16 em Alexa Fluor 700 – idem “Tubo Mono/NK”.

NKG2D em Biotin (clone 1D11, eBioscience, cat. 13-5878-80) – receptor ativador expresso em células NK e células T CD8+. Seus ligantes são proteínas induzidas por estresse, como MIC-A, MIC-B, ULBP1-4, o que torna a célula que as expressa susceptível a lise.

*Utilizado com anticorpo secundário Streptavidin-Qdot605 (Life Technologies, cat. Q10101MP).

NKp30 em PE/Cy7 (clone AF29-4D12, eBioscience, cat. 25-3379-42) – ou CD337; é um receptor natural de citotoxicidade. Sua expressão aumenta a função citotóxica de células NK contra células tumorais deficientes em MHC de classe I.

KIR3DL1 em BV421 (clone DX9, BioLegend, cat. 312714) – para descrição da função de KIR3DL1, vide “KIR3DL1/S1 em PE”, acima.

CD56 em BV510 – idem “Tubo Mono/NK”.

Live/Dead em Indo-1 Violet – idem “Tubo Mono/NK”.

3.3.2.3 Tubo NK3 – avalia células NK e seus subtipos

NKG2A em FITC (clone REA110, Miltenyi Biotech, cat. 130-098-818) – ou CD159a; receptor inibitório de células NK que forma um heterodímero com CD94. É expresso principalmente em células NK e em alguns grupos de células T CD8+.

KIR2DL1 em PE (clone #143211, R&D Systems, cat. #143211) – KIR inibitório que interage com moléculas de HLA de classe C.

KIR2DL2/3 em APC (clone DX27, Miltenyi Biotech, cat. 130-092-617) – ou CD158b; KIR inibitório que interage com antígenos HLA de classe C. É expresso em células NK e em pequenos grupos de linfócitos T.

CD7 em PerCP/Cy5.5 – idem “Tubo NK2”.

CD3+CD19+CD14 em APC/Cy7 – idem “Tubo NK2”.

NKG2C em Alexa Fluor 700 (clone #134591, R&D Systems, cat. FAB138N-025) – assim como NKG2A, NKG2C também é uma proteína transmembrana que forma um heterodímero com CD94 que tem como ligante moléculas de HLA-E. NKG2C/CD94, entretanto, é um receptor ativador. É expresso em células NK e em alguns subtipos de células T.

NKp44 em Biotin (clone P44-8, BioLegend, cat. 325106) – também conhecido como CD336 ou NCR2. É um dos receptores naturais de citotoxicidade de células NK; pode ser expresso em células T γ/δ .

KIR2DL1/S1 em PE/Cy7 (clone EB6B, Beckman Coulter, cat. A66899) – KIR2DS1 é um KIR ativador que interage com moléculas de HLA de classe C, enquanto KIR2DL1 é um KIR inibitório. A análise conjunta dos dois marcadores permite determinar a expressão de cada um dos marcadores ou de ambos simultaneamente.

NKp46 em eF450 (clone FN50, BioLegend, cat. 310920) – ou CD335; também é um receptor de citotoxicidade natural de células NK. É expresso exclusivamente em células NK, porém sua expressão é reduzida em pacientes portadores de infecção pelo HIV virêmicos.

CD56 em BV510 – idem “Tubo Mono/NK”.

Live/Dead em Indo-1 Violet – idem “Tubo Mono/NK”.

3.3.2.4 Tubo T – avalia subpopulações de células T

CD4 em FITC (clone SK3, BD Biosciences, cat. 340133) – glicoproteína membro da família da Ig expressa em timócitos, uma parte das células T e monócitos. CD4 reconhece antígenos associados com moléculas do MHC de classe II e participa em interações celulares, diferenciação tímica e transdução de sinal. Além disso, CD4 age como receptor primário para o HIV. Utilizado neste tubo para identificação da população de linfócitos T CD4⁺.

CD62L em PE (clone DREG-56, BioLegend, cat. 304806) – ou L-selectina. É expresso na maior parte das células B circulantes, populações de T e células NK, monócitos e granulócitos. CD62L é importante na migração de linfócitos *naïve* para linfonodos periféricos e placas de Peyer, além do processo de rolamento dos leucócitos nas células endoteliais. Utilizado neste tubo para identificação de subpopulações de linfócitos T.

PD-1 em APC – idem “Tubo Mono/NK”

CD3 em APC/Cy7 (clone SK7, BD Biosciences, cat. 641397) – para descrição da função de KIR3DL1, vide “Tubo Mono/NK”. Utilizado neste tubo para identificação da população de linfócitos T.

CD8 em Alexa Fluor 700 (clone HIT8a, BioLegend, cat. 300920) – correceptor para MHC de classe I, expresso na maioria dos timócitos, um grupo das células T circulantes e células NK. Neste tubo, é utilizado para identificação da população T CD8⁺.

CD45RA em PE/Cy7 (clone L48, BD Biosciences, cat. 337167) – variante da tirosino-fosfatase CD45 expressa em células T *naïve*, timócitos medulares, células B e monócitos, que aumenta o sinal de TCR e BCR. É utilizado neste tubo para identificação de subpopulações de linfócitos T.

CD69 em Pacific Blue – idem “Tubo Mono/NK”.

CD56 em BV510 – idem “Tubo Mono/NK”.

Live/Dead em Indo-1 Violet – idem “Tubo Mono/NK”.

3.3.2.5 Tubo Isotipo – contém marcadores populacionais e alguns controles de isotipos

mlgG1-k em FITC (clone x40, BD Biosciences, cat. 340755) – isotipo para DNAM-1.

mlgG1-k em APC (clone MOPC-21, BioLegend, cat. 400119) – isotipo para PD-1.

CD45 em PerCP/Cy5.5 – idem “Tubo Mono/NK”.

CD3 em Cy7/APC – idem “Tubo T”.

mlgG1-k em Alexa Fluor 700 (clone MOPC-21, BioLegend, cat. 400144) – isotipo para NKG2C.

CD14 em eF605 – idem “Tubo Mono/NK”.

mlgG2b-k em Cy7/PE (clone MPC-11, BioLegend, cat. 400326) – isotipo para PD-L1.

mlgG1-k em Pacific Blue (clone MOPC-21, BioLegend, cat. 400151) – isotipo para CD69.

CD56 em BV510 – idem “Tubo Mono/NK”.

Live/Dead em Indo-1 Violet – idem “Tubo Mono/NK”.

3.3 Avaliação de resultados

A análise dos dados obtidos de cada amostra foi feita por representação gráfica gerada por meio da intensidade de fluorescência capturada pelo citômetro. A análise dos dados foi feita no *software* FlowJo® versão 9.8.5 (FlowJo, LLC – Ashland, Oregon, USA). As regiões de aquisição foram definidas por meio de análise em comparação a populações que não expressam o respectivo marcador, como a população negativa para todos os marcadores populacionais presentes no tubo (“Lineage-“), ou por controle de isotipo. A estratégia de análise está descrita a seguir.

3.3.1 Estratégia de análise

3.3.1.1 Tubo Mono/NK:

- a) Isolamento de *singlets*;
- b) Definição de *gates* linfóide e mieloide em SSC-A x CD45;
- c) Definição de células viáveis em ambos os *gates* linfóide e mieloide, por meio da expressão de *Live/Dead*;

Passos (d), (e) e (f) referem-se ao *gate* linfóide:

- d) No *plot* CD3+CD19 versus CD56: separação de *gates* CD3⁻CD19⁻CD56⁺ (células NK CD56⁺) e CD3⁻CD19⁻CD56⁻;
- e) Dentro da população CD3⁻CD19⁻CD56⁻: separar a população CD14⁻;
- f) Dentro da população CD3⁻CD19⁻CD56⁻CD14⁻: definição da população de células NK CD56^{neg} no *gate* CD7⁺CD16⁺ e da população “Lineage⁻” no *gate* CD7⁻CD16⁻;
- g) Separação de células NK CD56⁺ em CD56^{dim} e CD56^{hi};
- h) No *gate* mieloide, definição da população de monócitos que são CD14⁺.

Os marcadores de interesse são, então, analisados nas diferentes populações: PD-1, PD-L1, CD57 e CD69. As figura 6 e 7 ilustram o processo.

Figura 6 - Estratégia de isolamento de populações de células NK no tubo Mono/NK.

Figura 7 - Definição das populações positiva e negativa para cada marcador no tubo Mono/NK, em células NK (A a D) e em monócitos (E a G).

3.3.1.2 Tubo NK2

- Isolamento de *singlets*;
- Definição de *gate* linfoide em SSC-A x FSC-A;
- Definição de células viáveis no *gate* linfoide, por meio da expressão de Live/Dead;

- d) No *plot* CD3/CD19/CD14 versus CD56: separação de *gates* CD3⁻CD19⁻CD14⁻CD56⁺ (células NK CD56⁺) e CD3⁻CD19⁻CD14⁻CD56⁻;
- e) Dentro da população CD3⁻CD19⁻CD14⁻CD56⁻: plotar CD7 versus CD16 e definir a população de células NK CD56^{neg} como CD7⁺CD16⁺ e a população Lineage⁻ como CD7⁻CD16⁻;
- f) Separação de células NK CD56⁺ em CD56^{dim} e CD56^{hi}.

Os marcadores de interesse são, então, analisados em células NK e suas subpopulações: DNAM-1, KIR3DL1, KIR3DL1/S1, NTBA, NKG2D e NKp30. As figuras 8 e 9 ilustram o processo.

Figura 8 - Estratégia de isolamento de populações de células NK no tubo NK2.

Figura 9 - Definição das populações positiva e negativa para cada marcador no tubo NK2, em células NK CD56^{neg}, CD56^{dim} e CD56^{hi}. Isotipo é utilizado para ajudar a definir a população positiva para DNAM-1 e a marcação inespecífica em células negativas para todos os marcadores populacionais ("Lin⁻") é utilizada para os demais marcadores.

3.3.1.2.1 Análise de KIR3DL1 versus KIR3DL1/S1

Encontramos somente dois padrões distintos na análise do *plot* KIR3DL1 versus KIR3DL1/S1:

- 1) KIR3DL1⁺ e KIR3DL1⁻, conforme exemplificado na Figura 10.

Figura 10 - Marcação positiva para KIR3DS1 e negativa para KIR3DL1. A comparação com a população “Lin-” permite reconhecer as células positivas para KIR3DS1.

2) Uma única população com marcação positiva, não permitindo a diferenciação entre KIR3DL1⁺ ou duplo positivo, conforme exemplificado na Figura 11.

Figura 11 - Marcação positiva para KIR3DL1 e incerta para KIR3DS1.

3) Duas populações positivas, provavelmente uma KIR3DL1⁺ e outra KIR3DS1⁺/KIR3DL1⁺, conforme exemplificado na Figura 12.

Figura 12 – Marcação positiva para ambos os marcadores, permitindo identificar uma população provavelmente KIR3DL1⁺ e uma população KIR3DL1⁺/KIR3S1⁺.

3.3.1.3 Tubo NK3

- Isolamento de *singlets*;
- Definição de *gate* linfóide em SSC-A x FSC-A;
- Definição de células viáveis no *gate* linfóide, por meio da expressão de Live/Dead;
- No *plot* CD3/CD19/CD14 versus CD56: separação de *gates* CD3⁻CD19⁻CD14⁻CD56⁺ (células NK CD56⁺) e CD3⁻CD19⁻CD14⁻CD56⁻;
- Dentro da população CD3⁻CD19⁻CD14⁻CD56⁻: plotar CD7 versus NKp46 e definir a população de células NK CD56^{neg} como CD7⁺NKp46⁺ e a população Lineage⁻ como CD7⁻NKp46⁻;
- Separação de células NK CD56⁺ em CD56^{dim} e CD56^{hi}.

Os marcadores de interesse são, então, analisados em células NK e seus subtipos: NKG2A, KIR2DL1, KIR2DL1/S1, KIR2DL2/3, NKG2C, NKp44 e NKp46. As Figuras 13 e 14 ilustram o processo.

Figura 13 - Estratégia de isolamento de populações de células NK no tubo NK3.

Figura 14 - Definição das populações positiva e negativa para cada marcador no tubo NK3, em células NK CD56^{neg}, CD56^{dim} e CD56^{hi}. A marcação inespecífica em células negativas para todos os marcadores populacionais ("Lin⁻") é utilizada para ajudar a definir a população positiva para NKp44 e NKp46, embora no exemplo citado não seja necessário.

3.3.1.3.1 Análise de KIR2DL1 versus KIR2DL1/S1

Encontramos quatro padrões distintos na análise do *plot* KIR2DL1 x KIR2DL1/S1:

- 1) KIR2DL1⁺ e KIR2DL1/S1⁺, com população homogênea, conforme exemplificado na Figura 15.

Figura 15 - Marcação positiva para KIR2DL1 e KIR2DL1/S1, de padrão homogêneo, não permitindo definir se as células são positivas para KIR2DS1, conforme exemplificado na Figura 16.

2) KIR2DL1⁺ e KIR2DS1⁺

Figura 16 - Marcação positiva para KIR2DL1 e KIR2DL1/S1, de padrão heterogêneo, permitindo identificar um grupo de células que é positivo somente para KIR2DS1, o que permite inferir que este paciente é positivo para ambos os marcadores.

3) KIR2DL1⁻ e KIR2DS1⁺, conforme exemplificado na Figura 17.

Figura 17 - Marcação positiva para KIR2DS1 e negativa para KIR2DL1, conforme exemplificado na Figura 18.

4) KIR2DL1⁻ e KIR2DS1⁻.

Figura 18 - Marcação duplo negativa para KIR2DL1 e KIR2DS1.

3.3.1.4 Tubo T

- Isolamento de *singlets*;
- Definição de *gate* linfóide em SSC-A x FSC-A;

- c) Definição de células viáveis no *gate* linfoide, por meio da expressão de *Live/Dead*;
- d) No *plot* CD3 versus CD56: separação de *gates* CD3⁺CD56⁻ (células T) e CD3⁺CD56⁺;
- e) Dentro da população CD3⁺CD56⁻, plotar CD4 versus CD8 e separar as populações CD4⁺CD8⁻ (população T CD4⁺), CD4⁻CD8⁺ (população T CD8⁺) e CD4⁺CD8⁺ (população duplo positivo);
- f) Dentro das populações CD4⁺ e CD8⁺, plotar CD45RA versus CD62L e separar as 4 subpopulações em cada quadrante: células *naïve* (CD45RA⁺CD62L⁺), memória central (CD45RA⁻CD62L⁺), efetoras (CD45RA⁺CD62L⁻) e efetoras de memória (CD45RA⁻CD62L⁻);

Os marcadores de interesse são, então, analisados em células T e seus subtipos: PD-1 e CD69. As Figuras 19 a 21 ilustram o processo.

Figura 19 - Estratégia de isolamento de células T e subpopulações no tubo T.

Figura 20 - Separação de células $CD4^+$ e $CD8^+$ em *naïve*, memória central, efectoras e efectoras de memória.

Figura 21 - Definição das populações positiva e negativa para PD-1 e CD69 no tubo T. As subpopulações T apresentam boa separação de populações positiva e negativa para PD-1.

3.3.1.5 Tubo Isotipo

- Isolamento de *singlets*;
- Definição de *gates* linfoide e mieloide em SSC-A x CD45;
- Definição de células viáveis em ambos os *gates* linfoide e mieloide, por meio da expressão de *Live/Dead*;
- No *plot* CD3 versus CD56: separação de *gates* CD3⁻CD56⁺ (células NK CD56⁺) e CD3⁺CD56⁻ (células T);
- No *gate* mieloide, definição da população de monócitos, que são CD14⁺.

Os controles de isotipo são, então, analisados em cada população, conforme a correspondência com o marcador de interesse em cada tubo.

3.4 Análise estatística

As características clínicas e demográficas dos participantes em cada grupo são descritas utilizando frequências, porcentagens, medianas e intervalos interquartis. Comparações entre os grupos de participantes infectados por HIV e não infectados, como também entre os Grupos 1 e 2, foram realizadas usando o teste Wilcoxon rank-sum para variáveis contínuas e Chi-quadrado ou teste exato de Fisher para variáveis categóricas, conforme apropriado. Correlações entre variáveis numéricas foram exploradas usando o coeficiente de correlação não paramétrico Spearman's rank. Não foi realizado ajuste estatístico para múltiplas comparações devido à natureza não independente das variáveis. O erro assumido foi de 0,05. Todas as análises foram feitas no *software* Stata versão 13.1 (StataCorp. College Station, TX: StataCorp LP).

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas e clínicas dos grupos estudados

Foram coletadas 56 amostras de voluntários dos três grupos: 31 para o grupo Crônicos, 10 para o grupo YAK e 15 para o grupo PrEP. Ao fazermos a análise dos dados clínicos e demográficos, 4 participantes do grupo Crônicos foram identificados como “controladores de elite”, ou seja, pacientes que não apresentam queda de contagem $CD4^+$ e manifestações clínicas de progressão de doença mesmo após anos de infecção. Outros 3 participantes tiveram carga viral positiva > 1000 cop/μl. Optamos por excluir estas 7 amostras da análise, buscando uma população mais homogênea: 49 participantes, sendo 15 controles e 34 com carga viral supressa sob terapia antirretroviral.

As características demográficas e clínicas dos sujeitos de pesquisa estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2 - Características demográficas e clínicas dos participantes do estudo

	HIV positivo Grupo 1 N=24	HIV positivo Grupo 2 N=10	HIV negativo Grupo 3 N=15
Idade	39.4 (33.2-45.9)	41.9 (30.7-47.7)	30.2 (26.7-36.6)
Sexo masc (%)	23 (96)	8 (80)	15 (100)
Dados clínicos para os participantes HIV positivo, N=34			
	Grupo 1 N=24	Grupo 2 N=10	P-value
Meses desde o diagnóstico de HIV*	97 (18-131)	104 (24-170)	0.35
Meses desde início de ART	21 (10-82)	79 (56-124)	0.07
Contagem de células CD4 ⁺ T cel/mL	701 (573-820)	435 (401-549)	0.0018
Contagem de células CD8 ⁺ T cel/mL	798 (665-1090)	953 (711-1144)	0.57
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.77 (0.60 to 1.26)	0.48 (0.39-0.60)	0.0007
CV HIV >1000 cópias/mL	0 (0)	0 (0)	-

Variáveis contínuas estão apresentadas como medianas e intervalos interquartis.

ART, terapia antirretroviral; CV, carga viral

* Disponível para 8 participantes do Grupo 2

4.2 Resultados dos experimentos de imunofenotipagem

4.2.1 CD7/CD16 versus CD7/NKp46 como estratégia de isolamento de células NK CD56^{neg}

Durante a elaboração do painel de imunofenotipagem, testamos a possibilidade de utilizar NKp46 como marcador para isolamento de células NK CD56^{neg}. O experimento teste, feito com amostras de 2 voluntários sadios e 2 voluntários portadores de leucemia linfóide crônica, foi realizado no Fox Chase Cancer Center, como parte de um estudo em andamento naquela

instituição. Ambas as estratégias resultaram em isolamento de populações semelhantes, razão pela qual optamos por utilizar o marcador NKp46 no Tubo NK3. Um exemplo é mostrado na Figura 22.

Figura 22 - Comparação da população CD56^{neg} identificada com as estratégias “CD7 x CD16” e “CD7 x NKp46”. A identificação é feita dentro do *gate* CD3⁻CD19⁻CD56⁻CD14⁻ no mesmo tubo, marcado com todos os marcadores. O exemplo ilustra um paciente portador de leucemia linfóide crônica do Fox Chase Cancer Center, em Philadelphia, EUA.

Entretanto, ao aplicar o painel às amostras deste estudo, a associação de NKp46 e CD7 mostrou-se uma estratégia falha, pois alguns voluntários portadores de infecção crônica pelo HIV apresentam uma redução da expressão de NKp46 tanto em células CD56⁺ quanto no *gate* CD3⁻CD19⁻CD14⁻CD56⁻, conforme mostrado nas Figuras 23 e 24.

Figura 23 - Isolamento da população $CD56^{neg}$ nos 3 tubos na amostra PrEP-56. Não há prejuízo na obtenção de células $CD56^{neg}$ com o uso do marcador NKp46.

Figura 24 - Isolamento da população $CD56^{neg}$ nos 3 tubos na amostra KIR-36. A obtenção de células $CD56^{neg}$ com o uso do marcador NKp46 é intensamente prejudicada.

4.2.2 Proporção de subtipos de células NK

O isolamento de células NK $CD56^{neg}$ foi feito de 3 maneiras diferentes:

- 1) Tubo Mono/NK: CD3 e CD19 estão no canal Cy7/APC e CD14 está no canal Qdot605; o isolamento da população NK $CD56^{neg}$ é feito utilizando o *plot* CD7 x CD16;

- 2) Tubo NK2: CD3, CD19 e CD14 estão no canal Cy7/APC e o isolamento é feito utilizando o *plot* CD7 x CD16;
- 3) Tubo NK3: o isolamento é feito utilizando o *plot* CD7 x NKp46, conforme descrito acima.

A utilização de três estratégias diferentes para o isolamento das células NK CD56^{neg} resultou em diferenças na proporção de células obtidas nos diferentes tubos, entre os diferentes grupos de amostras. Houve pequena diferença entre os tubos Mono/NK e NK2, que diferem apenas no passo adicional de separar as células CD3⁻CD19⁻CD56⁻ em CD14⁺ e CD14⁻. Entretanto, houve uma diferença considerável entre ambos os tubos e o tubo NK3 nas amostras de participantes infectados, devido à redução da expressão de NKp46 – o que não resultou em redução da contagem de células NK CD56^{neg} no grupo controle.

Desta maneira, durante o exame de qualificação, foi sugerido pela banca examinadora a adoção das contagens realizadas no tubo NK2 como padrão para o estudo, uma vez que, neste tubo, os marcadores de exclusão CD3, CD19 e CD14 estão todos no mesmo canal. Esta sugestão foi acatada e adotada neste trabalho.

Quando comparados aos 15 voluntários não infectados, os 34 participantes infectados não mostraram redução do número total de células NK: a mediana do total de células NK foi de 14.707 (9.629-22.291) para o grupo de participantes não infectados versus 13.852 (9.022-30.172) para o grupo de participantes infectados ($p=0,66$). Entretanto, houve uma diferença

em termos de proporção das células NK CD56^{neg}, as quais tiveram mediana de 7,05% (3,6-10,7) nos participantes infectados contra 3,9% (2,2-5,9) nos participantes não infectados ($p=0,0118$). Este aumento compensou a menor proporção de células NK CD56^{dim} nos participantes infectados, que tiveram mediana de 83,1% (79,4-88,9) comparado a 90,1% (84,9-95,1) dos participantes não infectados ($p=0,186$). As proporções de subpopulações de células NK estão retratadas na Figura 24. Quando analisamos Grupo 1 e Grupo 2 separadamente, não encontramos diferença nos números ou na proporção de células NK e subpopulações.

Figura 25 - Distribuição dos subtipos de células NK entre os participantes infectados e não infectados.

4.2.3 Subpopulações de células T

Em termos de subpopulações de células T, não houve diferença nas proporções de células *naïve*, de memória central, efetoras e efetoras de memória entre o grupo de participantes com infecção crônica pelo HIV e o

grupo de participantes soronegativos. Os participantes do Grupo 1 tiveram maior proporção de células T CD4⁺ *naïve*, com mediana de 48,6% (39,66-58,73), comparado ao Grupo 2, com 33,29% (15,67-38,68) ($p=0,014$). A mediana de proporção de células T CD4⁺ de memória central foi de 30,92% (25,89-35,91) no Grupo 1 versus 40,18% (36,09-43,51) no Grupo 2 ($p=0,0156$). Não houve diferença na proporção de células T CD4⁺ efectoras e efectoras de memória entre Grupo 1 e Grupo 2.

Os participantes infectados tiveram menor proporção de células T CD8⁺ *naïve*, com medianas de 38,59% (25,56-52,9) para o grupo de participantes infectados e de 54,53% (37,97-64,88) para os participantes não infectados ($p=0,0105$); entretanto, houve maior proporção de células de memória central, com 7,65% (5,84-13,16) versus 5,0% (2,29-10,19), respectivamente ($p=0,046$). Não houve diferença na proporção de células T CD8⁺ efectoras e efectoras de memória.

4.2.4 KIR3DL1 versus KIR3S1

Utilizamos o anticorpo anti-KIR3DL1/S1, juntamente com anti-KIR3DL1. Esta abordagem permite a identificação de populações que expressam somente KIR3DS1 ou populações que expressam KIR3DL1, porém há uma dificuldade de definição de populações que coexpressam ambos os marcadores e os homozigotos para KIR3DL1. Neste estudo encontramos três padrões de marcação das células no *plot* KIR3DL1 x KIR3DL1/S1: somente

KIR3DS1⁺, uma população positiva ou duas populações positivas, provavelmente tratando-se de uma população KIR3DL1⁺ e uma população KIR3DL1⁺/KIR3DS1⁺. Foram 9 amostras positivas para KIR3DS1 somente e 40 amostras com padrão duplo positivo, o qual pode significar a presença de uma população KIR3DL1⁺ ou uma população duplo positivo. Algumas amostras claramente apresentam uma população que pode ser determinada como KIR3DL1⁺ somente (com maior MFI no canal PE), porém não conseguimos separar claramente as populações KIR3DL1⁺ e KIR3DL1⁺/KIR3DS1⁺. Em contraste, ao analisarmos a expressão de KIR2DL1 e KIR2DL1/S1, analisados de forma paralela no tubo NK3, encontramos 22 amostras que expressam KIR2DL1 (padrão homogêneo), 25 amostras que expressam ambos os marcadores, 1 amostra que expressa somente KIR2DS1 e 1 amostra duplo negativo.

4.2.5A expressão de KIR3DL1 nos diferentes subtipos de células NK

Quando analisamos a expressão de KIR3DL1 nas subpopulações CD56^{neg}, CD56^{dim} e CD56^{hi} de células NK, notamos um aumento importante de células KIR3DL1 positivas na população de células CD56^{neg} entre os participantes infectados. A mediana de proporção de células KIR3DL1⁺ na subpopulação CD56^{neg} foi de 27,95% (9,7-49,5) entre os participantes infectados em comparação com 7,3% (0-10,2) nos voluntários não infectados (p=0,0083). Não encontramos diferenças nas outras subpopulações de

células NK: na subpopulação $CD56^{dim}$, as medianas de proporção são 4,8% (0,6-13,2) versus 3,1% (0-7) ($p=0,28$), respectivamente; e, na população $CD56^{hi}$, foram 1,35% (0,2-2,6) versus 0,5% (0-1,6) ($p=0,3$), respectivamente (Figura 26). Não houve diferença entre a expressão de KIR3DL1 medida por MFI entre os grupos de participantes infectados e não infectados em nenhuma das subpopulações.

Figura 26 - Proporção de células $KIR3DL1^+$ nas subpopulações NK entre os participantes infectados e não infectados. neg, $CD56^{neg}$; dim, $CD56^{dim}$; hi, $CD56^{hi}$.

Quando analisamos os participantes infectados separadamente, vemos uma maior mediana de proporção de células KIR3DL1 positivo entre os indivíduos do Grupo 2, com 46,85% (17-55) em comparação ao Grupo 1, com 24,2% (8,6-46), mas este resultado não atingiu significância estatística. Não houve diferença na expressão de KIR3DL1 avaliada por MFI entre estes dois grupos. Também não houve diferença nas subpopulações NK $CD56^{dim}$ e $CD56^{hi}$.

Estas células $CD56^{neg}KIR3DL1^{+}$ apresentaram um comportamento imunofenotípico distinto das células $CD56^{neg}KIR3DL1^{-}$ na população infectada. Houve menor expressão, medida por MFI, de NTBa, com mediana de 6.875 (4.937-7.809) comparado com 8.404 (6.606-9.327) ($p < 0,0001$ sign-rank test), respectivamente. NKG2D apareceu com maior intensidade na população $CD56^{neg}KIR3DL1^{+}$, com mediana de 311 (182-427), em relação à população $CD56^{neg}KIR3DL1^{-}$, com 179,5 (60,0-259) ($p < 0,0001$). A expressão de DNAM foi maior nas células $CD56^{neg}KIR3DL1^{+}$, com mediana de 5.125 (3.570-5.584) do que nas células $CD56^{neg}KIR3DL1^{-}$, com 3.424 (1.870-4.361) ($p = 0,00125$). E encontramos menor expressão de NKp30 na população $CD56^{neg}KIR3DL1^{+}$, com mediana de 75,9 (-111 a 225) em relação às células $CD56^{neg}KIR3DL1^{-}$ que tiveram mediana de 177 (-42,1 a 541) ($p = 0,0043$).

Já no Grupo 2, comparado ao Grupo 1, as células $CD56^{neg}KIR3DL1^{+}$ expressaram mais NKG2D, com mediana de 126.5 (6,26-376) que a população $CD56^{neg}KIR3DL1^{-}$, com 43.9 (-26,6 a 119) ($p = 0,313$ sign-rank test); e DNAM, com 6.330 (4.482-6.546) comparado a 4.255 (3.332-4.974) ($p = 0,313$), respectivamente; mas não houve diferença nos parâmetros de NTBa e NKp30.

Por fim, é importante ressaltar que com os anticorpos utilizados neste estudo, o padrão de marcação obtido não permite definir se estas células são positivas para KIR3DS1 além de KIR3DL1.

4.2.6 Outros KIRs

Encontramos algumas diferenças na expressão dos outros KIRs analisados neste estudo, porém não com o mesmo padrão de KIR3DL1. KIR2DL1 e KIR2DL1/S1 tiveram maior expressão em células CD56^{hi} no grupo de participantes infectados em comparação ao grupo de não infectados, na análise por MFI. KIR2DL1/S1 também teve maior MFI nas subpopulações CD56^{neg} e CD56^{dim} na análise por MFI. Não houve diferença quanto à proporção de células positivas. Também não houve diferença na expressão de KIR2DL2/3 entre os grupos de participantes infectados e não infectados. Estes resultados estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 - Porcentagens de células positivas para demais marcadores KIR, de acordo com cada subpopulação de células NK

		HIV-	HIV+	p-value
CD56 ^{neg}	KIR3DL2/3	15,5 (13-22)	15,3 (13,3-20,2)	0,7366
	KIR2DL1	8,3 (6,3-15,4)	9,6 (7,5-16,5)	0,368
	KIR2DS1	14,7 (10,4-17,3)	11,6 (8,5-18,8)	0,5081
Cd56 ^{dim}	KIR3DL2/3	30,4 (24,6-60,4)	36,4 (26,8-50,8)	0,7123
	KIR2DL1	18 (8,1-28,5)	12,6 (9,1-22,8)	0,6564
	KIR2DS1	29 (11,8-35,3)	17,5 (11,6-28)	0,1821
CD56 ^{hi}	KIR3DL2/3	4,6 (1,6-6)	3,8 (2,2-5,6)	0,9136
	KIR2DL1	2,7 (1,2-6,5)	1,8 (1,5-3,4)	0,8113
	KIR2DS1	3,7 (1,5-7,3)	2,1 (1,5-4,4)	0,2731

Porcentagens apresentadas como medianas e intervalos interquartis.

4.2.7 Relação entre expressão de CD57 e de PD-1 em células NK

As células CD56^{neg} demonstraram um fenótipo mais experiente nos voluntários infectados em comparação com o Grupo 3: maior MFI de CD57, com 1.446 (169-8.187) versus 79,3 (47,6-1.603) ($p=0,018$), e maior proporção de células CD57⁺, com 50,9% (41,0-60,9) versus 35,7% (21,4-54,6) ($p=0,02$). A expressão de PD-1 em células CD56^{neg} não foi superior em termos de MFI – 361 (0-609) versus 103 (0-318) ($p=0,18$). Há, porém, uma maior proporção de células CD56^{neg} que expressam PD-1 nos participantes infectados, com 1,9% (0,5-14,0), quando comparado ao grupo não infectado com 0,3% (0-2,8) ($p=0,0296$). Mais ainda, há uma correlação entre a expressão de CD57 e de PD-1 nas células CD56^{neg}, medido pelo número de células positivas nos participantes infectados ($Rho=0,4651$; $p=0,0056$) e também nos participantes não infectados ($Rho=0,5791$; $p=0,0237$). Não encontramos a mesma correlação entre expressão de CD57 e de PD-1 nas células NK CD56^{dim} e CD56^{hi}.

Quando analisamos os 2 grupos de participantes infectados separadamente, encontramos maior expressão de PD-1 medida pela MFI no Grupo 2 comparado ao Grupo 1 em todas as subpopulações NK: células CD56^{neg} com 274 (126-636) versus -96,9 (-111 a 257) ($p=0,02$), CD56^{dim} com 397,5 (102-538) versus -111 (-111 a 8,8) ($p=0,0007$) e CD56^{hi} com 502 (227-687) versus 32,6 (-58,1 a 432,5) ($p=0,0091$), respectivamente (Figura 27). Não encontramos, porém, diferenças na proporção de células PD-1⁺ em qualquer

das subpopulações NK, ou diferenças na expressão de CD57, entre os Grupos 1 e 2.

Figura 27 - Expressão de PD-1 medida por MFI nas subpopulações de células NK, em comparação entre Grupo 1 e Grupo 2.

4.2.8 Outros marcadores

4.2.8.1 NKG2D

Participantes infectados tiveram maior expressão de NKG2D em células CD56^{neg} em comparação com participantes não infectados, tanto medida por MFI, com medianas de 224,5 (133-291) versus 111 (-25,8 a 125) ($p=0,0036$), quanto pela proporção de células positivas para o marcador, com medianas de 68,45% (28,3-77,7) versus 44,7% (29-49,1) ($p=0,0156$), respectivamente. Não encontramos diferenças na expressão de NKG2D nas subpopulações CD56^{dim} e CD56^{hi} entre os participantes infectados e não infectados. Também não houve diferenças entre os Grupos 1 e 2.

4.2.8.2 NKP30

Encontramos perda de expressão de NKp30 nos participantes infectados em comparação aos participantes não infectados. Nas células CD56^{neg}, os participantes infectados tiveram medianas de MFI de 161 (-111 a 326) versus 1209 (412-1728) ($p < 0,0001$) nos participantes não infectados; as medianas das proporções de células positivas foram 18,55% (7,4-34,5) versus 43,7% (29,5-69,6) ($p = 0,0003$), respectivamente. Nas células CD56^{dim}, os participantes infectados tiveram mediana de MFI de 211 (-57,4 a 417), enquanto os participantes não infectados tiveram mediana de 609 (196-875) ($p = 0,0027$). Nas células CD56^{hi}, encontramos diferenças na expressão de NKp30 medida por MFI, com medianas de 2.032 (1711-3133) versus 4.266 (2756-4594) ($p = 0,0003$), respectivamente; não houve diferença na proporção de células positivas para o marcador nesta população.

Não houve diferenças na expressão de NKp30 medida por MFI ou proporção de células positivas para o marcador em qualquer das subpopulações NK entre os Grupos 1 e 2.

4.2.8.3 NKG2A

Curiosamente, encontramos diferenças na expressão de NKG2A entre os participantes infectados e não infectados somente na subpopulação CD56^{hi}, com menor expressão do marcador pelos sujeitos infectados. As

medianas de MFI foram 15.099 (11.541-20.422) versus 21.311 (16.570-22.984) ($p=0,0051$), respectivamente; e as medianas de proporção de células positivas para o marcador foram 85,85% (80,5-94,3) versus 94,1 (87,3-05,9) ($p=0,0621$), respectivamente.

Não encontramos diferenças entre a expressão de NKG2A entre os Grupos 1 e 2.

4.2.8.4 DNAM-1

A expressão de DNAM-1 medida por MFI foi equivalente nas células CD56^{neg}, com medianas de 4.493 (3.605-6.444) entre os participantes não infectados versus 4.069 (2.416-4.745) entre os participantes infectados ($p=0,152$). Encontramos, entretanto, redução de expressão de DNAM-1 nos participantes infectados em relação ao grupo de participantes não infectados, em células CD56^{dim} e CD56^{hi}, com medianas de 5.386 (3.750-6.364) versus 7.263 (5.202-8.717) ($p=0,0069$) e de 6.756 (3.187-8.313) versus 8.209 (7.790-9.006) ($p=0,0148$), respectivamente.

4.2.8.5 NKG2C, NTBA, NKp44 e NKp46

Não foram encontradas diferenças dignas de nota na expressão de NKG2C, NTBA e NKp44 entre os grupos estudados, nas diferentes

subpopulações de células NK. O marcador NKp46 foi utilizado no tubo NK3 para isolamento da população CD56^{neg}, portanto está presente universalmente nesta subpopulação, o que inviabiliza qualquer comparação; porém não foram encontradas diferenças significativas em sua expressão entre as subpopulações CD56^{dim} e CD56^{hi}.

4.2.9 Contagens de subpopulações de células T

Em termos de subpopulações T CD4⁺, não houve diferença nas proporções de células *naïve*, de memória central, efectoras de memória e efectoras entre o grupo de indivíduos soronegativos e o grupo de indivíduos infectados. A proporção de células T CD8⁺ *naïve* foi menor nos participantes infectados, com mediana de 38,59% (25,56-52,9) versus 54,53% (37,97-64,88) (p=0,0105) nos participantes não infectados. Já a proporção de células T CD8⁺ de memória central foi maior, com 7,65% (5,84-13,16) versus 5,0% (2,29-10,19) (p=0,046), respectivamente. Células T CD8⁺ efectoras e efectoras de memória tiveram proporções semelhantes entre participantes infectados e não infectados.

Quando comparamos os Grupos 1 e 2, não encontramos diferença nas proporções de células T CD4⁺ efectoras e efectoras de memória; a proporção de células *naïve*, no entanto, foi maior no Grupo 1, com mediana de 48,6% (39,66-58,73), comparado a 33,29% (15,67-38,68) no Grupo 2 (p=0,014). Já a proporção de células T CD4⁺ de memória central foi menor, com 30,92%

(25,89-35,91) versus 40,18% (36,09-43,51) ($p=0,0156$), respectivamente. Não houve diferença nas proporções de células efectoras e efectoras de memória entre os grupos. As subpopulações de $CD8^+$ tiveram proporções similares nos 2 grupos.

4.2.10 Expressão de PD-1 em subpopulações de células T

Encontramos maior proporção de células $PD-1^+$ nas populações $CD4^+$ e $CD8^+$ nos participantes infectados em relação aos não infectados, com 17,7% (12,6-23,1) versus 8,1% (4,2-14,3), respectivamente, para células $CD4^+$ ($p=0,0001$), e 22,2% (14,1-28) versus 11% (5,3-15,3), respectivamente, para células $CD8^+$ ($p=0,002$). Também encontramos maior proporção de células que expressam PD-1 em algumas subpopulações $CD4^+$ e $CD8^+$ nos participantes infectados em relação aos não infectados. A mediana de proporção de células $PD1^+$ na população *naïve* $CD4^+$ foi de 1,6% (0,7-3,2) versus 0,6% (0,4-0,9), dos voluntários infectados e não infectados, respectivamente ($p=0,006$); células $CD4^+$ de memória central foram 23,8% (17,9-32,1) versus 13,2% (7,5-20,2), respectivamente ($p=0,0003$); e células efectoras de memória $CD4^+$ foram 45,9% (37,2-53,4) versus 26,8% (12-38,6), respectivamente ($p=0,0002$). Subpopulações T- $CD8^+$ também apresentaram maior proporção de células $PD-1^+$ nos participantes infectados em relação aos não infectados: células *naïve* $CD8^+$ foram 5,3% (3,4-8,5) versus 2,1% (0,7-3,3), respectivamente ($p=0,0006$); e células de memória central $CD8^+$ foram

35,6% (24,9-47,7) versus 17,9% (9-40,3), respectivamente ($p=0,04$). (Figura 28). As diferenças entre a expressão de PD-1 medida por MFI entre voluntários infectados e não infectados não foram estatisticamente significativas.

Figura 28 - Porcentagens de células PD-1⁺ nas subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ nos participantes infectados por HIV e não infectados.

Separando os dois grupos de voluntários infectados, os participantes do Grupo 1 apresentaram maior expressão de PD-1 medida por MFI nas células T CD8⁺ comparado ao grupo Grupo 2, com 209,5 (0,2-425) versus -34,9 (-111

a 62,5) ($p=0,0089$); células *naïve* e células efetoras tiveram comportamento similar, com 20,1 (-111 a 191,0) versus -111 (-111 a -111) ($p=0,0069$) e 242,5 (75,4-452,0) versus 21,0 (-85,1 a 124,0) ($p=0,0131$), respectivamente. As diferenças na proporção de células positivas para PD-1 não foram estatisticamente significativas entre estes dois grupos.

4.2.11 Relação entre expressão de PD-1 em células NK e contagens de células $CD4^+$

Numa observação bastante interessante, encontramos uma correlação inversa entre a contagem de $CD4^+$ e a expressão de PD-1 medida pela MFI ($Rho=-0,3604$; $p=0,0428$) em células NK $CD56^{neg}$ quando analisados todos os voluntários infectados em conjunto, conforme mostra a Figura 29.

Figura 29 - Correlação entre a expressão de PD-1 medida por MFI em células $CD56^{neg}$ e a contagem de $CD4^+$.

4.2.12 Relação entre expressão de PD-1 em células T e NK

Comparando a expressão de PD-1 em células T e NK, encontramos correlações na expressão de PD-1, medida por MFI, entre células T (ambos $CD4^+$ e $CD8^+$) e as três subpopulações NK nos voluntários infectados (Figura 30A); e também diversas correlações entre subpopulações NK e células T quando a expressão de PD-1 foi medida por porcentagem de células positivas (Figura 30B). Já no grupo de participantes não infectados, encontramos correlações entre a expressão de PD-1 medida por MFI entre células T $CD8^+$ e as subpopulações $CD56^{neg}$, $CD56^{dim}$ e $CD56^{hi}$, mas não encontramos correlações entre as proporções de células positivas para PD-1 nestas populações celulares. Ainda no grupo de participantes não infectados, analisando as células T $CD4^+$, houve correlação somente entre a proporção de células PD-1 positivas entre células $CD4^+$ e células NK $CD56^{dim}$, mas não houve correlação com as outras duas subpopulações NK; ou qualquer correlação quando analisado MFI de PD-1 nestas populações.

A)

B)

Figura 30 - Correlações entre a expressão de PD-1 em células CD56^{neg}, CD56^{dim} e CD56^{hi} e em células CD4⁺ e CD8⁺, para os participantes infectados por HIV e não infectados. Em A, expressão medida por MFI; em B, expressão medida por porcentagem de células positivas para PD-1.

Quando analisamos os voluntários infectados separadamente em Grupos 1 e 2, encontramos todas as correlações entre expressão de PD-1 em células $CD4^+$ e as três subpopulações de células NK – tanto em termos de MFI quanto proporção de células expressando PD-1 – no Grupo 1; e também correlações entre a proporção de células PD-1 positivas nas células $CD8^+$ e nas subpopulações NK $CD56^{neg}$, $CD56^{dim}$ e $CD56^{hi}$, porém não encontramos correlações em termos de MFI (Figura 31). Já no Grupo 2, não há correlação entre a expressão de PD-1 em células T e células NK.

Figura 31 - Correlações entre a expressão de PD-1 medida por MFI em células $CD56^{neg}$, $CD56^{dim}$ e $CD56^{hi}$, e em células $CD4^+$ e $CD8^+$ no Grupo 1.

4.2.13 Expressão de PD-L1 em Monócitos

Não encontramos diferenças na expressão de PD-L1 em monócitos entre os participantes cronicamente infectados e os participantes não infectados em termos de proporção de células positivas para PD-L1, ou quando analisamos, separadamente, Grupo 1 e Grupo 2. Encontramos uma correlação entre a proporção de células CD56^{neg} positivas para PD-1 e a proporção de monócitos positivos para PD-L1 quando analisados todos os participantes do estudo ($Rho=0.3173$; $p=0.0263$), porém esta correlação desaparece quando analisamos separadamente os participantes infectados e não infectados.

Quando analisamos a expressão de PD-L1 medida por MFI, no entanto, encontramos um resultado curioso. Não houve diferença entre a expressão de PD-L1 entre os participantes infectados, com mediana de 471 (245-1244) e os não infectados, com mediana de 650 (471-945) ($p=0,3247$). Entretanto, ao separarmos os participantes infectados, o Grupo 1 teve uma mediana de expressão de PD-L1 medida por MFI de 290,5 (46,25-560) comparada com 1167 (743-2.124) no Grupo 2 ($p=0,0004$). A Figura 32 mostra estas comparações. Curiosamente, quando comparamos somente os participantes do Grupo 1 e os participantes soronegativos, encontramos medianas de 290.5 (46-560) versus 650 (471-945), respectivamente ($p=0,0156$), ou seja, os participantes do Grupo 1, acompanhados desde a fase aguda da infecção, apresentam menor expressão de PD-L1 que os pacientes soronegativos.

Figura 32 - Comparações entre a expressão de PD-L1 em monócitos nos diferentes grupos.

4.2.14 Expressão de CD69 em células NK, células T e monócitos

Não encontramos diferenças na expressão de CD69 nas subpopulações de células NK entre participantes cronicamente infectados e participantes não infectados. Analisando as subpopulações de células T, encontramos maior proporção de células CD69+ entre células *naïve* CD8⁺, com 7,93% (1,01-24,5) em participantes infectados versus 3,93% (0,36-6,95) ($p=0,0269$) nos participantes não infectados; e de memória central CD8⁺, com medianas de 8,94% (1,22-20,59) em participantes infectados versus 1,7% (0,34-7,02) ($p=0,0317$) em participantes não infectados. Encontramos uma tendência à maior proporção de monócitos que expressam CD69 entre os participantes infectados. A mediana de expressão de CD69 medida por MFI foi de 148,5 (73,5-237,25) entre os participantes infectados versus 86,2 (49,7-146) entre

os participantes não infectados ($p=0,0563$). Analisando Grupo 1 e Grupo 2 separadamente, encontramos medianas de 114 (63,2-173,5) e 241,5 (166,25-797,5), respectivamente ($p=0,013$).

5 DISCUSSÃO

O papel de PD-1 na disfunção de células T durante a infecção pelo HIV é bem estabelecido, mas não temos muita informação a respeito de como PD-1 impacta as células NK. Já foi demonstrado que, além de células T, linfócitos B, neutrófilos e monócitos apresentam alterações na expressão de PD-1 e PD-L1 durante a infecção crônica pelo HIV^{97,98,99}. Também foi publicada uma “brief communication” descrevendo uma pequena subpopulação de células NK positiva para PD-1 durante a infecção pelo HIV¹⁰⁰, porém este estudo não incluiu células CD56^{neg} ou aprofundou o perfil imunofenotípico destas células. Havia, portanto, muito pouco conhecimento a respeito do papel de PD-1 na disfunção de células NK durante a infecção pelo HIV. O presente estudo oferece um vislumbre de como as células NK podem sofrer com aumento da expressão de PD-1 de uma maneira paralela às células T durante a infecção crônica pelo HIV, ainda que numa escala menor.

Escolha dos participantes

A análise dos dados dos grupos estudados mostrou que eles têm medianas e faixas de idade semelhantes, o que é um fator favorável à análise, uma vez que o repertório NK tende a mudar com a idade⁵⁰. A distribuição de gênero entre os Grupos 1 e 2 é semelhante, com absoluta maioria de voluntários do sexo masculino, assim como, por definição, todas as amostras provenientes de voluntários do Grupo 3 são do sexo masculino – embora não

haja na literatura referência a diferenças na expressão de PD-1 de acordo com o gênero. Grupo 1 e Grupo 2 apresentam tempo de diagnóstico e tempo de uso de antirretroviral semelhantes (com uma tendência a maior tempo de tratamento entre os participantes do Grupo 2). Há uma diferença na contagem de células CD4⁺ em favor do Grupo 1, diagnosticado em fase aguda e seguido continuamente desde então, em comparação ao Grupo 2, com participantes cronicamente infectados que foram diagnosticados após um período indeterminado de tempo. Ambos os grupos são constituídos por participantes virologicamente supressos mediante uso de terapia antirretroviral; nossa opção por excluir os participantes com viremia > 1000 cop/mL teve o objetivo de atingirmos um grupo mais homogêneo para a análise dos dados (razão pela qual também foram excluídos os participantes controladores de elite); entretanto, também tivemos a intenção de estudar um grupo de pacientes que nos ajudasse a responder perguntas que vão além do controle da replicação viral: quais os mecanismos de disfunção imune e o que podemos fazer para revertê-la, uma vez controlada a viremia? Como podemos ajudar um paciente além do uso de drogas antirretrovirais?

Escolha do painel

O painel de anticorpos monoclonais definido para este estudo foi desenvolvido e testado no laboratório do Prof. Kerry Campbell no Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, EUA, em constante discussão com o Prof. Esper Kallás. Alguns dos marcadores utilizados vinham em uso frequente em outros estudos no laboratório, enquanto outros foram testados e titulados para este

projeto. É natural, portanto, que, num painel tão extenso, tenhamos tido falhas em algumas análises. Particularmente, o anticorpo para NKp44 mostrou uma marcação falha em todos os grupos. NKp44, como um receptor de citotoxicidade natural (NCR), tem sua expressão reduzida em pacientes cronicamente infectados pelo HIV; porém não encontramos diferença entre participantes infectados e não infectados, e acreditamos que o anticorpo escolhido não funcionou adequadamente.

Não tivemos sucesso também ao tentar definir uma nova estratégia para a identificação da população NK CD56^{neg} com o uso dos marcadores CD7 e NKp46, este considerado um marcador universal para células NK; a assimetria na proporção de células NK CD56^{neg} entre o Tubo NK3 e os tubos Mono/NK e NK2, que identificam a mesma população por meio dos marcadores CD7 e CD16, é marcante. A estratégia que utiliza NKp46 foi testada com sucesso e está sendo usada num estudo em pacientes portadores de Leucemia Linfocítica Crônica pela equipe do Prof. Kerry Campbell no Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, EUA. Entretanto, pacientes portadores de infecção crônica pelo HIV podem ter diminuição da expressão de NKp46³⁸, dado este que não foi levado em conta ao transpormos o painel daquela instituição para esta, especialmente para um estudo em infecção pelo HIV. Acreditamos, então, que o Tubo NK2 é o que melhor replica a estratégia utilizada por Milush e cols.⁴⁷ para o isolamento das células CD56^{neg}, além de haver sido sugerido pela banca durante o exame de qualificação; foi, portanto, nossa fonte de comparação numérica entre os diferentes grupos de estudo.

Por fim, tivemos um impasse na análise de KIR3DL1/S1, marcador presente no tubo NK2 e analisado em conjunto com o marcador KIR3DL1. Conforme descrito na subseção “3.3.1.2.1. Análise de KIR3DL1 versus KIR3DL1/S1” e ilustrado nas Figuras 10 a 12, encontramos apenas 3 padrões de marcação das células no *plot* KIR3DL1 x KIR3DL1/S1: KIR3DS1⁺, uma população positiva ou duas populações positivas. Sabemos que as populações são positivas para KIR3DL1, mas não sabemos se também o são para KIR3DS1. No estudo que identificou que o clone Z27 também é reativo a KIR3DS1¹⁰⁷, os autores demonstraram por meio de análise de doadores homozigotos e de células transfectadas com ambos os receptores que a MFI das células KIR3DS1⁺ é mais baixa que a das células KIR3DL1⁺, porém ressaltaram que uma porcentagem das células KIR3DL1⁺ também expressa KIR3DS1 nos indivíduos heterozigotos, devido à distribuição estocástica dos marcadores nos diferentes clones de células NK. No estudo publicado por Milush e cols.⁴⁷, o qual utilizou exatamente o mesmo marcador KIR3DL1/S1-PE que o utilizado em nosso estudo (clone Z27), os autores relatam uma manutenção da porcentagem de células que expressam KIR3DL1/S1 em células NK CD56^{neg} em pacientes infectados pelo HIV. Acreditamos no entanto que há um aumento na expressão de KIR3DL1 na população CD56^{neg} nos participantes deste estudo; encontramos uma situação muito semelhante em um estudo realizado paralelamente em pacientes portadores de Leucemia Linfocítica Crônica no *Fox Chase Cancer Center* (dados não publicados). Entretanto, a ausência de um anticorpo monoclonal específico para KIR3DS1

impossibilita a definição precisa da expressão de KIR3DL1 e KIR3DS1 nas diferentes populações.

PD-1 e CD57 em células NK, relação com contagens CD4⁺ e com expressão de PD-1 em células T

É conhecido o fato de que à medida que a infecção pelo HIV progride e as contagens de células CD4⁺ caem, as contagens de células NK CD56^{dim} também tendem a declinar, de maneira similar à que descrevemos aqui. Nós encontramos células CD56^{neg} expandidas nos grupos de participantes infectados, como relatado na literatura^{43,44}; e também verificamos que estas células expressam mais CD57 e PD-1 que suas contrapartes CD56⁺, mostrando que elas apresentam um fenótipo mais maduro e possivelmente de exaustão. De acordo com o nosso conhecimento, este achado não foi descrito anteriormente. Se o significado deste achado é que estas células são mais susceptíveis aos efeitos deletérios do HIV no sistema imune ou, ao invés disso, que estas células têm um papel crítico no combate à infecção e, desta maneira, adquirem mais sinais de maturidade e exaustão, está além do escopo deste estudo exploratório, mas é um assunto que merece investigação futura. Pesce e cols.¹⁰¹ descreveram, num artigo recente, a expressão de PD-1 numa pequena população de células CD56^{dim} que também coexpressa CD57, em doadores saudáveis que são sorologicamente positivos para CMV. Não temos sorologia para CMV nos participantes deste estudo, mas não podemos descartar a possibilidade de que nossos participantes sejam CMV positivo, devido à alta prevalência de sorologia positiva para CMV na

população brasileira. Assim sendo, a coexpressão de CD57 e PD-1 pode ser devida à coinfeção por CMV; assim como a associação entre PD-1 e CD57 pode ser simplesmente causada pela presença de uma infecção viral crônica, no caso, pelo HIV.

Adicionalmente, nós encontramos correlação inversa entre as contagens $CD4^+$ e a expressão de PD-1 em células NK $CD56^{neg}$, o que demonstra que a contagem $CD4^+$ realmente funciona como um bom marcador para o extenso prejuízo sofrido pelo sistema imune durante a infecção, e não apenas pelas células T. De maneira similar, foi descrita uma correlação inversa entre expressão de PD-L1 em monócitos e contagens $CD4^+$ em pacientes cronicamente infectados por HIV⁹⁸. Mais ainda, a correlação entre a expressão de PD-1 em todas as subpopulações de células NK e em células T encontrada no presente estudo sugere que PD-1 possa ter um papel muito mais abrangente na falência imunológica causada pela infecção pelo HIV do que consideramos atualmente.

CD69

Encontramos algumas diferenças entre a expressão de CD69 em subpopulações de células T e monócitos, com maior expressão nos participantes infectados em relação aos soronegativos. Mas, curiosamente, não encontramos diferenças na expressão de CD69 nas subpopulações de células NK entre os diferentes grupos. Uma potencial razão para este achado é que não estamos comparando os 2 grupos de participantes cronicamente infectados pelo HIV a uma população controle saudável, mas sim a um grupo

constituído por indivíduos com comportamento sexual de risco, recrutados para um estudo de profilaxia primária. Por esta razão, temos sorologias de, ao menos, 6 meses após a data da amostra analisada de cada um dos participantes do Grupo 3, e sabemos que nenhum deles estava infectado no momento da coleta da amostra para este estudo. Estes participantes, no entanto, devido ao comportamento sexual de risco, apresentam maior incidência de DSTs. Então, é possível que não tenhamos encontrado diferenças entre a expressão de CD69 entre os grupos devido ao fato de todos os participantes terem aumento da expressão de CD69, mesmo que por diferentes razões.

PD-L1 em monócitos

Encontramos aumento da expressão de PD-L1 em monócitos nos participantes do Grupo 2 em relação ao Grupo 1, embora não tenhamos encontrado uma diferença entre a expressão de PD-L1 em monócitos quando comparados todos os participantes infectados com os participantes não infectados – não encontramos aumento da proporção de células que expressam PD-L1, pois o marcador apresenta pouca separação entre células positivas e negativas; porém encontramos aumento da expressão medida por MFI. Foi demonstrado anteriormente que a infecção crônica pelo HIV leva a aumento da expressão de PD-L1 em monócitos⁹⁸ e que a hiperexpressão de PD-L1 pode ser induzida em monócitos de doadores saudáveis pela cocultura *in vitro* com o vírus HIV¹⁰⁸. O fato mais interessante nesta análise é que não somente os participantes do Grupo 1, acompanhados desde a fase aguda da

infecção, apresentam menor expressão de PD-L1 em monócitos quando comparados aos participantes do Grupo 2, que foram diagnosticados após um período indeterminado de infecção; eles também apresentam menor expressão de PD-L1 quando comparados aos participantes soronegativos deste estudo. Este achado pode dever-se a uma de duas possibilidades: o acompanhamento desde a fase aguda ajuda a proteger o sistema imune de um dano extenso e permanente; ou os participantes soronegativos, devido ao comportamento sexual de alto risco, apresentam grande elevação da expressão de PD-L1 em monócitos devido a coinfeções, como, por exemplo, DSTs (importante lembrarmos que todos têm sorologia negativa para HCV e HBV, ou, ainda, imunização para HBV).

KIR3DL1 x KIR3DL1/S1

Um dos achados mais interessantes deste estudo foi o aumento expressivo da proporção de células KIR3DL1⁺ entre as células CD56^{neg} nos participantes infectados. Não encontramos diferença entre a expressão de KIR3DL1 medida por MFI entre os grupos de participantes infectados e não infectados em nenhuma das subpopulações, possivelmente pela característica de marcação do anticorpo utilizado, que resulta em grande separação entre as células marcadas e não marcadas – portanto, a não ser que mais de 50% das células sejam positivas, a MFI ficará muito próxima da população negativa. Não há, entretanto, dúvidas quanto ao aumento da população KIR3DL1⁺ nas células CD56^{neg} dos participantes infectados – apenas não conseguimos esclarecer se estas células são KIR3DL1⁺ ou

KIR3DL1⁺/KIR3DS1⁺, uma vez que a expressão de KIR3DS1 utilizando o marcador KIR3DL1/S1-PE (clone Z27) é mascarada pela coexpressão de KIR3DL1 que apresenta MFI maior. Pascal e cols.¹⁰⁷ demonstraram a coexpressão de ambos os receptores por RT-PCR em células NK separadas por *sorting*.

KIR3DL1 e KIR3DS1 constituem um par único dentro do espectro dos genes KIR, uma vez que eles dividem o mesmo *locus* – embora tenham funções opostas – com mais de 95% de homologia entre eles¹⁰⁹. O ligante para KIR3DL1 foi identificado como HLA-Bw4 (que engloba proteínas codificadas por HLA-A e -B), entretanto, a polêmica sobre o ligante de KIR3DS1 persistiu até recentemente, com alguns autores defendendo e outros refutando a interação com HLA-Bw4. No mês passado, foi identificado o ligante para KIR3DS1, HLA-F em sua forma não conformacional¹¹⁰; os autores demonstraram que este ligante é expresso na superfície de células T CD4⁺ ativadas, o que explica a relevância de KIR3DS1 sobre o curso clínico da infecção pelo HIV (os autores identificaram a redução de expressão de HLA-F em células T CD4⁺ infectadas pelo HIV, mas sem prejuízo da supressão viral por células NK KIR3DS1⁺ cocultivadas *in vitro*). KIR3DS1 já foi correlacionado a evolução clínica favorável em hepatite C⁵⁹ e infecção pelo HIV^{61,111}, além de desenvolvimento de tumores^{112,113}. Um estudo, paradoxalmente, correlacionou a expressão de KIR3DL1 e HLA-Bw4 com bom prognóstico na evolução da infecção pelo HIV⁶². Trata-se de um estudo com mais de 1.500 participantes, portanto, com resultados bastante conclusivos. Os autores encontraram diferenças na expressão de alelos de

KIR3DL1 com perfis distintos de expressão e concluíram que o resultado “poderia ser explicado por um modelo em que uma maior dependência da expressão de pares específicos de receptor e ligante KIR3DL1-Bw4 para a inibição das células NK num estado de repouso (onde $KIR3DL1^h > KIR3DL1^l$) resulta em respostas das células NK mais pronunciadas quando a inibição é anulada face a infecção”.

Embora esteja claro que tanto KIR3DS1 quanto KIR3DL1 podem exercer impacto sobre a evolução clínica da infecção pelo HIV, não encontramos na literatura menção a aumento da proporção de células que expressam KIR3DL1, ou, ainda, KIR3DS1 (a qual seria mais difícil de identificar, devido aos motivos já discutidos anteriormente), em uma determinada subpopulação NK, como encontramos nas células $CD56^{neg}$ dos participantes infectados. Um trabalho publicado por Mavilio e cols.⁴⁴ analisou a expressão de diversos marcadores, entre eles KIR3DL1, nas subpopulações de NK, e encontrou “alguns participantes” com elevada proporção, com até 73% de células $KIR3DL1^+$ na população $CD56^{neg}$; porém estes autores definiram a população NK $CD56^{neg}$ como $CD56^-CD16^+$ e, como discutido anteriormente, esta seleção pode abranger uma população heterogênea e não somente células NK. Com a expansão da população $CD56^{neg}$ encontrada em indivíduos cronicamente infectados pelo HIV e a associação entre KIR3DS1 e progressão mais lenta para AIDS, este achado é, no mínimo, intrigante. Entretanto, acreditamos que a interpretação deste resultado demanda a investigação complementar com tipagem KIR e HLA.

Outros marcadores

No trabalho publicado por Mavilio e cols.⁴⁴, no qual foram avaliadas células CD56⁺ e CD56^{neg}, os autores não encontraram alteração da expressão de NKG2D em sujeitos infectados pelo HIV, na vigência de viremia ou após a supressão viral com terapia ARV. Neste trabalho, porém, como já discutimos anteriormente, a identificação de células CD56^{neg} utilizou apenas o marcador CD16. No presente trabalho, encontramos aumento da expressão de NKG2D somente na população CD56^{neg} quando comparamos participantes infectados e não infectados, achado não reportado previamente na literatura. O mesmo trabalho mostrou redução expressiva de NKp30, resultado semelhante ao que tivemos aqui. Quanto a NKp46, como o utilizamos para isolar a população CD56^{neg} no tubo NK3 (estratégia falha, como já discutimos anteriormente), não temos como comparar nossos achados com os previamente relatados. Tivemos expressão semelhante de NKp44 nos diferentes grupos. A redução de expressão de NKp30, NKp44 e NKp46 em células NK em indivíduos infectados na vigência de viremia foi correlacionada a ativação e perda de citotoxicidade das células NK^{114,115}, porém foi demonstrada a reversão mediante supressão viral com tratamento ARV⁶³.

Nosso achado de níveis comparáveis de NTBA em participantes infectados e não infectados corrobora o previamente encontrado por Mavilio e cols., que não encontraram alterações em indivíduos com viremia ou em supressão viral por tratamento ARV. DNAM-1, por sua vez, é uma molécula de adesão envolvida no processo de citotoxicidade; sua redução em células NK nos indivíduos infectados acompanha outros receptores de citotoxicidade.

Não foram encontradas diferenças dignas de nota na expressão de NKG2C, e encontramos aumento da expressão de NKG2A somente na população CD56^{hi}. A expressão de NKG2C é aumentada nos indivíduos soropositivos para CMV, nos quais está associada a CD57 na subpopulação descrita como células NK “memory-like”; em comparação com indivíduos saudáveis, portadores de infecção crônica pelo HIV avirêmicos apresentam níveis semelhantes de expressão de NKG2C após correção para sorologia positiva para CMV¹¹⁶. A população brasileira apresenta alto índice de soroconversão para CMV e isto pode, portanto, ter contribuído para não encontrarmos diferenças na expressão de NKG2C entre indivíduos infectados e não infectados.

Reflexões e perspectivas futuras

Os benefícios do início precoce de terapia ARV em termos de reduzir eventos relacionados à AIDS são incontestáveis^{117,118}, mas nem todas as populações têm acesso à medicação ou nem todos os pacientes sentem-se inclinados a iniciar o tratamento quando ainda estão assintomáticos.

Neste estudo, nós avaliamos como um grupo de voluntários que são parte de uma coorte em seguimento desde a infecção aguda – mas não necessariamente recebendo terapia ARV desde o diagnóstico, de acordo com guidelines clínicos contemporâneos – e, portanto, nunca tendo sido permitidos atingirem um estado de profunda imunossupressão, se compara a pacientes encaminhados ao nosso serviço após terem sido diagnosticados em intervalo de tempo desconhecido desde a soroconversão, sob supressão virológica

com terapia ARV. Indivíduos diagnosticados durante a fase crônica podem ter permanecido por longos períodos com contagens T CD4⁺ baixas antes do diagnóstico e podem até buscar atenção médica devido a infecções oportunistas, ao contrário dos nossos participantes do Grupo 1. Já foi demonstrado que o momento de início da terapia ARV não está associada à expressão de PD-1 em células T CD8⁺ ¹¹⁹ e, embora PD-1 esteja aumentado em pacientes não tratados, uma vez iniciada a terapia ARV, os níveis de PD-1 caem tanto em indivíduos recebendo tratamento precoce como tratamento tardio¹²⁰. O presente estudo não foi desenhado especificamente para investigar a questão de se o diagnóstico durante a fase aguda pode beneficiar os pacientes mesmo quando o tratamento ARV não é iniciado imediatamente, em relação à preservação das células NK; no entanto, várias comparações mostradas aqui sugerem que os pacientes diagnosticados precocemente ou tardiamente podem sofrer dano imunológico e recuperações bastante diferentes, não apenas em relação às células T, mas também células NK e monócitos.

Embora tenhamos demonstrado que os participantes infectados pelo HIV têm uma maior proporção de células positivas para PD-1 quando comparados aos controles, e que os participantes diagnosticados na fase precoce da infecção expressam menos PD-1 em células NK que os indivíduos que tiveram imunodeficiência mais significativa, nosso estudo não contempla as consequências funcionais deste achado. Outros autores demonstraram que a expressão de PD-1 em células NK resulta em prejuízo da ação antitumoral e redução da secreção de IFN- γ *in vitro*; se os pacientes que têm

o benefício de serem diagnosticados e seguidos desde a infecção aguda são poupados de tal disfunção não está claro.

O uso dos chamados inibidores de *checkpoints* imunológicos no tratamento de câncer está mudando a história de diversos tipos de tumores; seu uso pode, futuramente, mostrar-se válido, também, no manejo de infecções virais crônicas.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

A expressão de PD-1 nas células NK está aumentada nos indivíduos infectados pelo HIV avaliados neste estudo, quando comparada a pessoas não infectadas, sob risco.

A expressão de PD-L1 em monócitos está aumentada nos indivíduos infectados pelo HIV avaliados neste estudo que foram diagnosticados após um período indeterminado de tempo, quando comparada aos indivíduos infectados que foram acompanhados desde a fase aguda da infecção. Estes, por sua vez, apresentam menor expressão de PD-L1 que os indivíduos não infectados, sob risco.

A expressão de PD-1 correlaciona-se a outros parâmetros imunológicos como contagens T CD4⁺ e expressão de PD-1 em células T.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO A – TERMO DE APROVAÇÃO DO ESTUDO NA CAPPESQ.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do perfil imunofenotípico das células NK e sua correlação com a expressão de PD1 e PDL1 em pacientes portadores de HIV

Pesquisador: Esper Georges Kallás

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 40512915.7.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 998.533

Data da Relatoria: 27/01/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo para testar a hipótese de que a expressão de PD1 (Programmed Death 1) em células NK é induzida pela infecção pelo HIV e que a presença de PD1 resulta em outras mudanças no perfil imunofenotípico destas células, quando comparadas a controles sadios. A PD-1 é expresso constitutivamente em células T, células B e monócitos, mas não em células NK. Entretanto, a proteína já foi descrita em células NK de pacientes portadores de infecção pelo HIV. Há evidências que PD1 seja responsável por regular negativamente a resposta imunológica. Além disso, o uso de anticorpo anti-PD1 é capaz de suprimir a carga viral de camundongos BLT humanizados cronicamente infectados com HIV, através da recuperação da população de linfócitos T CD8+. Muitas questões permanecem abertas a respeito da função da população NK e do papel de PD1 no estabelecimento da imunodeficiência pelo vírus HIV.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão de PD1 em células NK de pacientes portadores de HIV e avaliar a expressão do ligante PDL1 por células T CD4+ e macrófagos/monócitos em indivíduos infectados pelo HIV, para se investigar se existe correlação entre o comportamento fenotípico e funcional das células NK e os níveis de expressão de PD1 e PDL1 em indivíduos portadores de HIV.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 998.533

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos e não há benefícios diretos para os indivíduos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O assunto é original, pertinente, os riscos são praticamente inexistentes e as perguntas que a investigação pretende responder são relevantes para se entender o mecanismo pelo qual o sistema imunológico não reage adequadamente frente à infecção pelo vírus HIV.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores solicitam dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O estudo apresenta todas as condições de ser aprovado pela CAPPesq, inclusive com a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 998.533

SAO PAULO, 25 de Março de 2015

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. HIV/AIDS. W.H.O. *Global AIDS Update* - UNAIDS 2016.
2. Piot PA, Hecht R, Legido-Quigley H, Buse K, Stover J, Resch S, et al. UNAIDS–Lancet Commission, Defeating AIDS - advancing global health. *Lancet*. 2015;386(9989):171-218.
3. *Boletim epidemiológico HIV/AIDS 2015*, publicado pelo Ministério da Saúde. ISSN: 1517-1159.
4. (CDC), C.f.D.C. *Pneumocystis pneumonia* - Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1981;30:250-2.
5. UNAIDS. *The Gap Report. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*; 2014.
6. KW. AIDS therapy. First tentative signs of therapeutic promise. *Nature*.1986;323(6086):283.
7. Fischl MA, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom JM, 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(4):187-91.
8. Hammer SM, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haubrich RH, Henry WK, et al. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter, AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *N Engl J Med*. 1996;335(15):1081-90.
9. Hammer SM, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJ Jr, et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med*. 1997;337(11):725-33.
10. Gulick RM, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, Richman DD, et al. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med*. 1997;337(11):734-39.

11. Staszewski S, Tashima KT, Rachlis A, Skiest D, Stanford J, Stryker R, et al. Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team. *N Engl J Med*. 1999;341(25):1865-73.
12. Palella FJ Jr, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;338(13):853.
13. Walmsley S, King M, Arribas J, Beall G, Ruane P, Johnson M, et al. M98-863 Study Team, Lopinavir-ritonavir versus nelfinavir for the initial treatment of HIV infection. *N Engl J Med*. 2002;346(26):2039-46.
14. Gallant JE, Pozniak AL, De Jesus E, Suleiman JM, Miller MD, Coakley DF, et al. Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients: a 3-year randomized trial. *JAMA*. 2004;292(2):191-201.
15. Robbins GK, Shafer RW, Smeaton LM, Snyder SW, Pettinelli C, Dubé MP, et al. AIDS Clinical Trials Group 384 team, comparison of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2293-303.
16. Gulick RM, Shikuma CM, Lustgarten S, Squires KE, Meyer WA 3rd, Acosta EP, et al. AIDS Clinical Trials Group Study A5095 Team, Triple-nucleoside regimens versus efavirenz-containing regimens for the initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 2004;350(18):1850-61.
17. Deeks SG, Liegler T, Hoh R, Hayden M, Barbour JD, Hellmann NS, et al. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med*. 2001;344(7):472-80.
18. Deeks SG, Neilands TB, Liegler T, Aweeka F, Petropoulos CJ, Grant RM, Martin JN. Interruption of treatment with individual therapeutic drug classes in adult with multidrug-resistant HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2005;192(9):1537-44.
19. Lalezari JP, O'Hearn M, Montaner JS, Piliero PJ, Trottier B, Walmsley S, et al. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N Engl J Med*. 2003;348(22):2175-85.
20. van Sighem AI, Reiss P, Brinkman K, de Wolf F. ATHENA national observational cohort study, Life expectancy of recently diagnosed asymptomatic HIV-infected patients approaches that of uninfected individuals. *AIDS*. 2010;24(10):1527-35.

21. McManus H, Boyd M, Broom J, Russell D, Watson K, Roth N, et al. Australian HIV observational database., long-term survival in HIV positive patients with up to 15 Years of antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2012;7(11):e348839.
22. Dragic T, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. 1996;381(6584):667-73.
23. Bosque A. Induction of HIV-1 latency and reactivation in primary memory CD4+ T cells. *Blood*. 2009;113(1):58-65.
24. Brenchley JM, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2004;200(6):749-59.
25. Mehandru S, Tenner-Racz K, Jean-Pierre P, Manuelli V, Lopez P, Shet A, et al. Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS One*. 2006;3(12):e484.
26. Rothenberger MK, Wietgreffe SW, Fletcher CV, Beilman GJ, Chipman JG, Khoruts A, et al. Large number of rebounding/founder HIV variants emerge from multifocal infection in lymphatic tissues after treatment interruption. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(10):E1126-34.
27. Altfeld M. Innate immunity against HIV-1 infection. *Nat Immunol*. 2015;16(6):554-62.
28. Badley AD, Landay A, Lynch DH. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood*. 2000;96(9):2951-64.
29. Sachdeva M, Pahwa R, Sachdeva N, Pahwa S. Immune exhaustion occurs concomitantly with immune activation and decrease in regulatory T cells in viremic chronically HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;54(5):1038-45.
30. Kottlilil S, Moir S, Liu S, McLaughlin M, Hallahan CW, Maldarelli F, et al. Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function. *J Infect Dis*. 2003;187(7):1038-45.
31. Fauriat C, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010;115(11):2167-76.
32. Walker JA, McKenzie AN. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):75-87.

33. Spits H, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, et al. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):145-9.
34. Grzywacz B, Kataria N, Kataria N, Blazar BR, Miller JS, Verneris MR. Natural killer-cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood*. 2011;117(13):3548-58.
35. Chen Q, Ye W, Jian Tan W, Mei Yong KS, Liu M, Qi Tan S, et al. Delineation of natural killer cell differentiation from myeloid progenitors in human. *Sci Rep*. 2015;5:15118.
36. Vivier E, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-9.
37. Caliguri M. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461-9.
38. De Maria A, Costa P, Murdaca G, Puppo F, Mavilio D, Moretta A, Moretta L. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *Eur J Immunol*. 2003;33(9):2410-8.
39. Fehniger TA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003;101(8):3052-7.
40. De Maria A, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(2):728-32.
41. Korbel DS, Newman KC, Horowitz A, Gendzekhadze K, Parham P, Riley EM. Killer Ig-like receptor (KIR) genotype predicts the capacity of human KIR-positive CD56dim NK cells to respond to pathogen-associated signals. *J Immunol*. 2009;182(10):6426-34.
42. Vivier E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9(5):503-10.
43. Hu PF, Hultin P, Hausner MA, Hirji K, Jewett A, Bonavida B, et al. Natural killer cell immunodeficiency in HIV disease is manifest by profoundly decreased numbers of CD16+CD56+ cells and expansion of a population of CD16dimCD56- cells with low lytic activity. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1995;10(3):331-40.

44. Mavilio D, Benjamin J, Kim D, Follman D, Marcenaro E, O'Shea MA, et al. Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(8):2886-91.
45. Gonzalez VD, Björkström NK, Blom KG, Weiland O, Ljunggren HG, Alaeus A, Sandberg JK. Expansion of functionally skewed CD56-negative NK cells in chronic hepatitis C virus infection: correlation with outcome of pegylated IFN- α and ribavirin treatment. *J Immunol*. 2009;183(10):6612-18.
46. Jacobson A, Lejarcegui N, Mitchell C, Frenkel L, Horton H. Healthy neonates possess a CD56-negative NK cell population with reduced anti-viral activity. *PLoS One*. 2013;8(6):67700.
47. Milush JM, York VA, Deeks SG, Martin JN, Hecht FM, Lanier LL, Nixon DF. CD56negCD16+ NK cells are activated mature NK cells with impaired effector function during HIV-1 infection. *Retrovirology*. 2013;18(10):158.
48. Sun JC, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 2009;457(7229):557-61.
49. Lopez-Vergès S, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, Houchins JP, et al. Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(36):14725-32.
50. Strauss-Albee DM, Liang EC, Yao Y, Jarrell JA, Drake AL, Kinuthia J, et al. Human NK cell repertoire diversity reflects immune experience and correlates with viral susceptibility. *Sci Transl Med*. 2015;7(297):297ra115.
51. Raulet DH. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):568-80.
52. Kärre K, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 1986;319(6055):675-8.
53. Ljunggren HG. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990;11(7):237-44.
54. Krzewski K. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol*. 2012;3(335).
55. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):201-14.
56. Vilches C. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:217-51.

57. Kim S, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 2005;436(7051):709-13.
58. Orr MT, Lanier LL. 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol*. 2010;11(4):321-7.
59. Khakoo SI, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 2004;305(5685):872-4.
60. Binyamin L, Hughes TL, Lutz CT, Campbell KS, Weiner LM. Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy. *J Immunol*. 2008;180(9):6392-401.
61. Martin MP, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*. 2002;31(4):429-34.
62. Martin MP, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, Colombo S, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet*. 2007;39(6):733-40.
63. Mavilio D, Daucher M, Lombardo G, Kottlil S, Planta MA, Marcenaro E, et al. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(25):15011-6.
64. Shinohara T, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics*. 1994;23(3):704-6.
65. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007;8(3):239-45.
66. Blank C. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56(5):739-45.
67. Norris S, Kuri-Cervantes L, Bower M, Nelson M, Goodier MR. PD-1 expression on natural killer cells and CD8(+) T cells during chronic HIV-1 infection. *Viral Immunol*. 2012;25(4):329-32.
68. Golden-Mason, Wahed AS, Rosen HR. Cutting edge: programmed death-1 expression is increased on immunocytes in chronic hepatitis C virus and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences. *J Immunol*. 2008;180(6):3637-41.

69. Paiva B, Puig N, Ocio EM, Sharma R, Oyajobi BO, Labiano S, et al. PD-L1/PD-1 presence in the tumor microenvironment and activity of PD-1 blockade in multiple myeloma. *Leukemia*. 2015 Oct;29(10):2110-3.
70. MacFarlane A, Plimack ER, Hudes GR, Uzzo RG, Litwin S, Dulaimi E, et al. PD-1 expression on peripheral blood cells increases with stage in renal cell carcinoma patients and is rapidly reduced after surgical tumor resection. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(4):320-31.
71. Freeman GJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-34.
72. Latchman Y, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001;2(3):261-8.
73. Nishimura H, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141-51.
74. Nishimura H, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*. 2001;291(5502):319-22.
75. Said EA, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, Hill BJ, et al. Programmed death-1 induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med*. 2010;16(4):452-9.
76. Iwai Y, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12293-7.
77. Ghebeh H, Tulbah A, Elkum N, Al-Tweigeri T, Dermime S. FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: implication for immunotherapy. *BMC Cancer*. 2008;8:57.
78. Konish J, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1. *Clin Cancer Res*. 2004;10(15):5094-100.

79. Lee H, Yang SY, Kong J, Oh M, Jeong DH, Chung JI, et al. Peripheral blood gene expression of B7 and CD28 family members associated with tumor progression and microscopic lymphovascular invasion in colon cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(9):1445-52.
80. Benson DM Jr, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B, Baiocchi RA, et al. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood*. 2010;116(13):2286-94.
81. Topalian SL, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443-54.
82. Westin JR, Zhang M, Fayad LE, Kwak LW, Fowler N, Romaguera J, et al. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(1):69-77.
83. Topalian SL, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, Brahmer JR, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol*. 2014;32(10):1020-30.
84. Robert C, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 2015;372(4):320-30.
85. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2015;372:311-19.
86. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372:2018-28.
87. Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari C. PD-1 Expression in acute hepatitis c virus (hcv) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol*. 2006;80(22):11398-403.
88. Rutebemberwa A, Ray SC, Astemborski J, Levine J, Liu L, Dowd KA, et al. High-programmed death-1 levels on hepatitis C virus-specific T cells during acute infection are associated with viral persistence and require preservation of cognate antigen during chronic infection. *J Immunol*. 2008;181(12):8215-25.

- 89 D'Souza M, Fontenot AP, Mack DG, Lozupone C, Dillon S, Meditz A, et al. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. *J Immunol.* 2007;179(3):1979-87.
- 90 Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 2006;12(10):1198-202.
91. Day CL, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006;443(7109):350-4.
- 92 Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y, et al. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood.* 2007;109(11):4671-8.
93. Grabmeier-Pfistershammer K, Rieger A, Leitner J, Kohrgruber N. Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;56(2):118-24.
- 94 Robbins GK, Spritzler JG, Chan ES, Asmuth DM, Gandhi RT, Rodriguez BA, et al. Incomplete reconstitution of T cell subsets on combination antiretroviral therapy in the AIDS Clinical Trials Group protocol 384. *Clin Infect Dis.* 2009;48:350-61.
- 95 Valdez H, Connick E, Smith KY, Lederman MM, Bosch RJ, Kim RS, et al. Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. *AIDS.* 2002;16:1859-66.
96. Seung E, Allen TM, Freeman GJ, Luster AD, Tager AM. PD-1 blockade in chronically HIV-1 infected humanized mice suppresses viral loads. *PLoS One.* 2013;8(10): e77780.
97. Nicholas KJ. B cell responses to HIV antigen are a potent correlate of viremia in HIV-1 infection and improve with PD-1 blockade. *PLoS One.* 2013;8(12):e84185.
- 98 Trabattoni D. B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression. *Blood.* 2003;101(7):2514-20.
- 99 Bowers NL. Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS Pathog.* 2014;10(3):e1003993.
- 100 Norris S, Coleman A, Kuri-Cervantes L, Bower M, Nelson M, Goodier MR. PD-1 Expression on natural killer cells and CD8+ T Cells during chronic HIV-1 infection. *Viral Immunol.* 2012;25(4):329-32.

- 101 Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D, et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: a phenotypic and functional characterization. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 May 27. pii: S0091-6749(16)30360-8.
- 102 Hong H, Eberhard JM, Keudel P, Bollmann BA, Ballmaier M, Bhatnagar N, et al. HIV Infection is associated with a preferential decline in less-differentiated CD56dim CD16+ NK cells. *J Virol*. 2010;84(2):1183-8.
- 103 Tarazona R, Casado JG, Delarosa O, Torre-Cisneros J, Villanueva JL, Sanchez B, Galiani MD, et al. Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56 (bright) NK cells in treatment-naïve HIV-1-seropositive individuals. *J Clin Immunol*. 2002;22(3):176-83.
- 104 Gardiner D, Lalezari J, Lawitz E, DiMicco M, Ghalib R, Reddy KR, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled assessment of BMS-936558, a fully human monoclonal antibody to programmed death-1 (PD-1), in patients with chronic hepatitis C virus infection. *PLoS One*. 2013;8(5):e63818.
- 105 Sanabani SS, Pastena ÉR, da Costa AC, Martinez VP, Kleine-Neto W, de Oliveira AC, et al. Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in São Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011;6(10):e25869.
- 106 Kallas EG, Bassichetto KC, Oliveira SM, Goldenberg I, Bortoloto R, Moreno DMFC, et al. Establishment of the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion (STARHS) strategy in the city of Sao Paulo, Brazil. *Braz J Infec Dis*. 2004;8:399-406
- 107 Pascal V. Detection of KIR3DS1 on the cell surface of peripheral blood NK cells facilitates identification of a novel null allele and assessment of KIR3DS1 expression during HIV infection. *J Immunol*. 2007;179:1625-33.
- 108 Boasso A. PDL-1 upregulation on monocytes and T cells by HIV via type I interferon: restricted expression of type I interferon receptor by CCR5-expressing leukocytes. *Clin Immunol*. 2008;129(1):132-44.
- 109 Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Guethlein LA. Variable NK cell receptors exemplified by human KIR3DL1/S1. *J Immunol*. 2011;187:11-9.
- 110 Garcia-Beltran WF. Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. *Nat Immunol*. 2016;17(9):1067-74.

- 111 Jiang Y, Chen O, Cui C, Zhao B, Han X, Zhang Z, et al. KIR3DS1/L1 and HLA-Bw4-80I are associated with HIV disease progression among HIV typical progressors and long-term nonprogressors. *BMC Infect Dis.* 2013;13:405.
- 112 López-Vázquez A, Rodrigo L, Martínez-Borra J, Pérez R, Rodríguez M, Fdez-Morera JL, et al. Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2005;192:162-5.
- 113 Besson C, Roetynck S, Williams F, Orsi L, Amiel C, Lependeven C, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study. *PLoS One.* 2. 2007;e406.
- 114 De Maria A, Fogli M, Costa P, Murdaca G, Puppo F, Mavilio D, et al. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *Eur J Immunol.* 2003;33:2410-8.
- 115 Fogli M, Costa P, Murdaca G, Setti M, Mingari MC, Moretta L, et al. Significant NK cell activation associated with decreased cytolytic function in peripheral blood of HIV-1-infected patients. *Eur J Immunol.* 2004;34:2313-21.
- 116 Gumá M, Cabrera C, Erkizia I, Bofill M, Clotet B, Ruiz L, López-Botet M, et al. Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. *J Inf Dis.* 2006;194(1):38-41.
- 117 The INSIGHT START Study Group. Initiation of antiretroviral therapy in early asymptomatic HIV infection. *N Engl J Med.* 2015;373:795-807.
- 118 Grinsztejn B, Hosseinipour MC, Ribaudo HJ, Swindells S, Eron J, Chen YQ, et al. Effects of early versus delayed initiation of antiretroviral treatment on clinical outcomes of HIV-1 infection: results from the phase 3 HPTN 052 randomized controlled trial. *Lancet Inf Dis.* 2014;14(4):281-90.
- 119 Jensen SS, Fomsgaard A, Larsen TK, Tingstedt JL, Gerstoft J, Kronborg G, et al. Initiation of antiretroviral therapy (ART) at different stages of HIV-1 disease is not associated with the proportion of exhausted CD8+T cells. *PLoS One.* 10(10):e0139573.
- 120 Cockerham LR, Jain V, Sinclair E, Glidden DV, Hartogenesis W, Hatano H, et al. Programmed death-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells in treated and untreated HIV disease. *AIDS.* 2014; 28(12):1749-58.