## Adriana Coutinho da Silva

Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos T de memória de indivíduos infectados pelo HIV reativos a epitopos T CD4<sup>+</sup> derivados de sequências do consenso B do HIV-1

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

> Área de concentração: Alergia e Imunopatologia Orientador: Dra. Simone Gonçalves da Fonseca

São Paulo 2009

## Adriana Coutinho da Silva

Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos T de memória de indivíduos infectados pelo HIV reativos a epitopos T CD4<sup>+</sup> derivados de sequências do consenso B do HIV-1

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

> Área de concentração: Alergia e Imunopatologia Orientador: Dra. Simone Gonçalves da Fonseca

São Paulo 2009

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

| infe      | Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos T de memória de indivíduos ectados pelo HIV reativos a epitopos T CD4+ derivados de sequências do consenso i |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| do I      | HIV-1 / Adriana Coutinho da Silva Sao Paulo, 2009.<br>Face(doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.                                      |
| Der       | partamento de Clínica Médica                                                                                                                                     |
| 4         | Área de concentração: Alergia e Imunopatologia.                                                                                                                  |
| (         | Drientadora: Simone Gonçalves da Fonseca.                                                                                                                        |
| ]<br>aids | Descritores: 1.HIV 2.Linfócitos T 3.Epitopos de linfócito T 4.Vacinas contra<br>s                                                                                |
| US        | P/FM/SBD-420/09                                                                                                                                                  |

# KC

## APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14.06.06, APROVOU Protocolo de Pesquisa nº 528/06 intitulado: "Estudo de subpopulações de linfócitos T de indivíduos infecctados pelo vírus da imunodeficiência humana em resposta a epitopos não descritos T CD4+derivados do HIV-1", apresentando pelo Departamento de Clínica Médica, inclusive Termo de Consentimento Livre e esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Dra. Simone Gonçalves da Fonseca Pesquisador(a) Executante: Adriana Coutinho<sup>-</sup>da Fonseca

CAPPesq, 14 de Junho de 2006.

July willes

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

## Dedico a tese

#### A Deus

Por seu infinito amor. Por ter me propiciado a realização deste projeto, que na verdade é a concretização de um sonho. Por ter me inspirado durante toda essa trajetória e me dado forças e saúde para concluir este trabalho. Por ter me amparado nas horas difíceis, jamais me deixando desanimar. Por ter me concedido a vitória em todas as minhas batalhas.

## Ao meu amado Daniel

A você meu amor que trouxe ingredientes novos para minha vida. Que me faz sentir a cada novo dia seu amor sincero e aconchegante. Obrigada por sempre estar ao meu lado quando preciso. Ao seu lado me sinto a pessoa mais feliz do mundo. Sei que nossa história está apenas no começo e que os frutos serão sempre doces. Sua paciência, dedicação e ajuda foram preciosas na finalização dessa tese. Amo-te.

## Aos meus amados país

*Luís e Laudeci* que são a razão da minha existência. Aqueles que me ensinaram a dar os primeiros passos na estrada da vida e me incentivaram a perseguir meus próprios sonhos com afinco e dedicação. Aqueles que sempre acreditaram em mim. Aqueles com quem sempre pude contar e com quem sempre poderei contar. Aqueles com quem aprendi coisas símples, mas de valor inestimável. Enfim, agradeço aos meus país por cada gesto de amor, de carinho, de atenção e de compreensão a mim dispensado.

## Aos meus irmãos Aline, Auriane e Airton

Pessoas muito especiais com as quais aprendi a partilhar, a amar, a desculpar. Pessoas ao lado das quais desfrutei momentos alegres e que agora as lembranças destes me trazem imensas saudades.

### Aos meus írmãos André Luís e Luisínho

Aqueles para quem a vida está apenas começando e a quem eu desejo um futuro próspero e repleto de conquistas.

## Aos meus querídos familiares

Ao meu tio Lindomar e sua esposa Morena (minha grande amiga, irmã e comadre), ao meu tio Sivanildo e sua esposa Irene, à minha tia Marlene e aos pequeninos Gustavo (meu afilhado) e Yasmin. Vocês são pessoas especiais, com um imenso coração iluminado por Deus. Dedico esse trabalho a vocês por me acolherem e sempre cuidarem de mim como filha.

## Agradecimento Especial

#### À Dra. Simone Fonseca, minha orientadora

A você, querida Símone, agradeço de forma muito especial. Sua confiança, apoio, incentívo e orientação me renderam um rico crescimento e aprendizado científico, profissional e pessoal em todos esses anos de convivência que levarei sempre comigo pelo mundo afora. É enorme minha admiração por seu brilhantismo acadêmico. Contudo, não posso deixar de dizer que é seu lado humano que mais me encanta. Você é uma orientadora em todas as nuances que essa palavra abrange. Foi muito agradável trilhar essa etapa tão importante da minha carreira ao seu lado. As experiências acumuladas foram riquíssimas.

A você meu mais sincero 'muito obrigada'!

Esta tese é a realização de um projeto pessoal que não seria possível sem a ajuda, o apoio e os ensinamentos de pessoas pelas quais tenho grande admiração e que sinceramente agradeço neste momento:

Ao **Dr. Edecio Cunha Neto** pelo imenso aprendizado durante as discussões e reuniões científicas, que muito contribuiram na minha constante busca pelo saber.

À **Dra. Verônica Coelho** por ter sido meu primeiro contato com o Laboratório, me abrindo os caminhos para o mundo da ciência. Por ter sido sempre solícita em todos os momentos. Agradeço pelo carinho e incentivo constante.

À Dra. Luíza Guilherme pelo incentivo e críticas valiosas

Ao **Prof. Dr. Jorge Kalíl** por me receber no Laboratório e me ter proporcionado a aquisição de um aprendizado rico e sólido.

À banca examinadora da qualificação Dra Myrthes Maragna, Dra. Cristina Caldas e Dr. Pedro Bianchi pela revisão e comentários precisos.

Aos professores **Dr. Luís Augusto Fonseca**, **Dr. Aluísio Segurado** e **Dr. Esper Kallás** pelo auxílio na obtenção das amostras dos pacientes portadores do vírus da aids e pela disponibilização das informações clínicas destes pacientes que foram de grande valia para a realização deste trabalho.

Às querídas Dra. Luciana Nogueira, Dra. Denise Rodrígues, Dra. Luciana Marti, Dra. Sandra Moraes, e Dra. Kellen Faé que foram sempre solícitas, autoras de discussões, sugestões e críticas construtivas que enriqueceram grandemente este trabalho. Foram pessoas com quem pude contar de forma muito próxima em todas as etapas deste trabalho e a quem sou imensamente grata. Aos meus colegas: **Andréia**, **Carlos**, **Dani**, **Natalie**, **Priscila**, **Susan** pelo aprendizado através de reuniões científicas, do trabalho de bancada ou simplesmente de uma conversa informal.

Aos cordiais amigos Iolanda Oruê, Eliane Mairena, Sandra Maria, Malú, Natália, Sandra Emiko, Carla Ronda, Hélcio Rodrígues, Claudio Puschel e Washington Robert pelo apoio com as técnicas de laboratório, pela convivência sempre prazerosa e principalmente pela a amizade sincera.

A todos os meus colegas de Laboratório, **funcionários e alunos**, que dedicaram um pouco de seus tempos para compartilhar conhecimentos, sejam eles técnicos ou científicos.

*E por fim e não menos importante, aos pacientes portadores do HIV que com a satisfação de contribuir com as pesquisas científicas na esperança de uma solução para o problema da*  aíds, doaram seu sangue sem o qual sería impossível dar andamento ao trabalho.

*Obrigado também à FAPESP pelo suporte financeiro desse trabalho de Doutorado.* 

## Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

| 1. | INTRODUÇÃO1                                                                                                     |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | 1.1. SITUAÇÃO GLOBAL DA EPIDEMIA DO HIV2                                                                        |
|    | 1.2. HIV – O AGENTE CAUSADOR DA AIDS                                                                            |
|    | 1.3. A INFECÇÃO PELO HIV4                                                                                       |
|    | 1.4. IMUNIDADE CELULAR ADAPTATIVA AO HIV5                                                                       |
|    | 1.5. A HETEROGENEIDADE DOS LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA8                                                             |
|    | 1.6. LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA HIV-ESPECÍFICOS14                                                                  |
|    | 1.7. VACINAS ANTI-HIV                                                                                           |
|    | 1.8. EPITOPOS DE LINFÓCITOS T CD4+ DERIVADOS DESEQÜÊNCIAS DO CONSENSO B DO HIV-1 E LIGADORES DEMÚLTIPLOS HLA-DR |
|    | 1.9. JUSTIFICATIVA DO PROJETO24                                                                                 |
| 2. | OBJETIVOS27                                                                                                     |
|    | 2.1. OBJETIVO GERAL                                                                                             |
|    | 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                                                      |
| 3. | METODOS                                                                                                         |
|    | 3.1. INDIVÍDUOS DO ESTUDO                                                                                       |
|    | 3.2. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE<br>PERIFÉRICO                                                  |

3.3. CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS 3.6. ESTIMULAÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO 3.7. MARCAÇÃO CELULAR DE SUPERFÍCIE COM ANTICORPOS CITOCINAS INTRACELULARES COM 3.8. MARCAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS 48 3.9. AQUISIÇÃO E ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO......49 3.10. 3.11. PADRONIZAÇÃO E ESTRATÉGIA DA ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO POR CFSE......55 ELISA PARA DETECÇÃO DE IGM E IGG ESPECÍFICAS 3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS ......62 3.13. 4.2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE SUBPOPULAÇÕES DE 4.3. ANÁLISE **FUNCIONAL** DAS **SUBPOPULACÕES** DF 4.4. ANÁLISE **FUNCIONAL** DAS SUBPOPULACÕES DE 4.5. CORRELAÇÃO ENTRE A FREQÜÊNCIA DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA SECRETORES DE CITOCINAS E A CARGA VIRAL DO HIV-1 ......86

4.

| 8. | REFERÊNCIAS175                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7. | ANEXOS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 6. | CONCLUSÕES158                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 5. | DISCUSSÃO125                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|    | 4.9. ANÁLISE FUNCIONAL DA CAPACIDADE DE PROLIFERAÇÃO<br>ANTÍGENO-ESPECÍFICA DAS SUBPOPULAÇÕES <i>NAIVE</i> E DE<br>MEMÓRIA DE LINFÓCITOS T ESTIMULADOS COM O POOL DE<br>PEPTÍDEOS DO HIV-1 E DO CMV                                                                                                                                                       |
|    | 4.8. COMPARAÇÕES       ENTRE       AS       RESPOSTAS       DE         SUBPOPULAÇÕES       DE       MEMÓRIA       T       CD4 <sup>+</sup> E       T       CD8 <sup>+</sup> ESPECÍFICAS         PARA       O       POOL       DE       PEPTÍDEOS       DO       HIV-1       E       PARA       O       POOL       DE         PEPTÍDEOS       DO       CMV |
|    | 4.7. ANÁLISE FUNCIONAL DAS SUBPOPULAÇÕES DE<br>LINFÓCITOS T CD8 <sup>+</sup> DE MEMÓRIA CMV-ESPECÍFICOS96                                                                                                                                                                                                                                                 |
|    | <ul> <li>4.6. ANÁLISE FUNCIONAL DAS SUBPOPULAÇÕES DE</li> <li>LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup> DE MEMÓRIA CMV-ESPECÍFICOS91</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                        |

## Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

- AIDS Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
- APC Célula Apresentadora de Antígeno Profissional
- **ART** Terapia antiretroviral
- AZT Zidovudina
- BCI2 B-cell lymphoma 2
- CCR Receptor de quimiocina C C
- **CD** Cluster of differentiation (designação de grupos)
- CCR7 Receptor de quimiocina tipo 7
- CFSE 5- (and –6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
- CMV Citomegalovírus
- **CV** Carga viral
- CTL Linfócitos T CD8+ citotóxicos
- **CXCR4** Receptor de quimiocina C X C
- ddl Didanosina
- DMSO Dimetilsulfóxido
- DNA Ácido desoxirribonucléico
- d4T Estavudina
- EBV Epstein-barr
- EFZ Efavirenz
- **ELISPOT** Enzyme-linked immuno spot assay
- et al e outros
- FMO fluorescence minus one

- HAART Terapia Antiretroviral Altamente Ativa
- HEV High endothelial venules (vênulas endoteliais altas)
- HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
- HLA Antígeno Leucocitário Humano
- **HSV** Vírus Herpes simplex
- **IFN-***γ* Interferon gama
- **IDV** Indinavir
- IL Interleucina
- LPV Lopinavir
- LTNP Long-term nonprogressors (não progressores)
- LTR Longa Repetição Terminal
- **MALDI-TOF** Espectrometria de massa por desorção e ionização por laser assistida por matriz e medida por tempo de vôo
- **MHC** Complexo de Histocompatibilidade Principal
- MTB Mycobacterium tuberculosis
- NFV Nelfinavir
- **NVP** Nevirapina
- NSI Não indutores de sincício
- OMS Organização Mundial de Saúde
- PBMC Células mononucleares do sangue periférico
- PBS Tampão de salina-fosfato
- **RNA** Ácido ribonucléico
- RPMI Meio de cultura Roswell Park
- **RTV** ritonavir

- SEB enterotoxina B de Staphylococcus aureus
- SFB Soro Fetal Bovino
- SI Indutores de sincício
- SIV Vírus da Imunodeficiência Símia
- TCM Células de memória central
- TEM Células de memória efetora
- **TEMRA** Células de memória efetora altamente diferenciadas
- TCR Receptores de células T
- TFA Fenol:anisol:água:etanoditiol
- **UNAIDS** Joint United Programme on HIV/AIDS
- 3TC Lamivudina
- **ZDV** Zidovudina

## Lista de Figuras

| Figura 1 – Estratégia de análise através do FMO (Fluorescence Minus                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| One)48                                                                                                   |
| Figura 2 - Estratégia de análise para caracterização fenotípica e funcional                              |
| de subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> antígeno-                         |
| específicas52                                                                                            |
| Figura 3 - Definição da região de linfócitos para a análise da proliferação por                          |
| CFSE de subpopulações de linfócitos T em resposta aos pools de peptídeos                                 |
| do HIV-1 e CMV58                                                                                         |
| Figura 4 - Percentual de células divididas dentro das subpopulações Naive,                               |
| TCM, TEM e TEMRA CD4⁺ após o ensaio de proliferação por                                                  |
| CFSE                                                                                                     |
| Figura 5 - Estratégia de análise do ensaio de proliferação por CFSE no                                   |
| compartimento total e em subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> em          |
| resposta aos pools de peptídeos do HIV-1 e CMV60                                                         |
| Figura 6 - Subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (A) e T CD8 <sup>+</sup> (B) <i>naive</i> e de |
| memória em PBMC de indivíduos controles sadios e pacientes HIV <sup>+</sup> 73                           |
| Figura 7 - Freqüência de subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> respondedores                    |
| ao <i>pool</i> de peptídeos do HIV-1 em PBMC de pacientes HIV <sup>+</sup> 77                            |
| Figura 8: Freqüência de subpopulações de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> respondedores                     |
| ao <i>pool</i> de peptídeos do HIV-1 em PBMC de pacientes HIV <sup>+</sup> 83                            |
| Figura 9 - Correlação entre a freqüência (%) de subpopulações T de                                       |
| memória HIV-específicas e a carga viral do HIV-1 em pacientes LTNP e VI                                  |
| sem ART89                                                                                                |

Figura 10 - Correlação entre a freqüência (%) de subpopulações T de memória HIV-específicas e a carga viral do HIV-1 de pacientes virêmicos......90 Figura 11 - Freqüência de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> respondedores ao pool de peptídeos do CMV em PBMC de pacientes HIV<sup>+</sup>......93 Figura 12 - Freqüência de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> respondedores ao pool de peptídeos do CMV em PBMC de pacientes **Figura 13** - Percentual das subpopulações de memória T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /IL-2, ou IL-2 respondedoras ao *pool* de peptídeos do HIV-**Figura 14:** Percentual das subpopulações de memória T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN-y, IFN-y/IL-2, ou IL-2 respondedoras ao pool de peptídeos do CMV... **Figura 15** - Percentual das subpopulações de memória T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN-y, IFN-y/IL-2, ou IL-2 respondedoras ao pool de peptídeos do HIV-**Figura 16** - Percentual das subpopulações de memória T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN-y, IFN-y/IL-2, ou IL-2 respondedoras ao pool de peptídeos do Figura 17 - Comparação entre as respostas das subpopulações de memória T CD4<sup>+</sup> HIV-específicas e CMV-específicas......110

| Figura 18 - Comparação entre as respostas das subpopulações de memória     |
|----------------------------------------------------------------------------|
| T CD8 <sup>+</sup> HIV-específicas e CMV-específicas113                    |
| Figura 19 - Avaliação do percentual de proliferação antígeno-específica de |
| subpopulações de linfócitos T do paciente A7120                            |
| Figura 20 - Avaliação do percentual de proliferação de subpopulações de    |
| linfócitos T antígeno-específica em células de pacientes HIV+123           |

## Lista de Tabelas

| Tabela 1 - Seqüências dos peptídeos derivados do consenso B do HIV-1                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| selecionados pelo algoritmo TEPITOPE41                                                                    |
| Tabela 2- Seqüências dos peptídeos derivados do consenso do CMV                                           |
| selecionados pelo algoritmo TEPITOPE42                                                                    |
| <b>Tabela 3 -</b> Epitopos de células T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> descritos na literatura com |
| seqüências compartilhadas com os nossos peptídeos HIV-143                                                 |
| Tabela 4 - Anticorpos para marcação de superfície celular e citocinas                                     |
| intracitoplasmáticas47                                                                                    |
| Tabela 5 - Características dos pacientes HIV <sup>+</sup> (conclusão)68                                   |
| <b>Tabela 6 -</b> Proliferação por CFSE de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> totais de   |
| pacientes HIV+ e indivíduo controle sadio em resposta aos pools de                                        |
| peptídeos do HIV-1 e do CMV122                                                                            |

### Resumo

Coutinho-Silva A. Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos T de memória de indivíduos infectados pelo HIV reativos a epitopos T CD4<sup>+</sup> derivados de sequências do consenso B do HIV-1 [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

A persistência de células T de memória funcionais é importante para garantir uma imunidade protetora na infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). As células T de memória têm sido subdivididas em memória central (TCM), memória efetora (TEM) e memória efetora altamente diferenciada (TEMRA) com base na expressão de moléculas de superfície como CCR7 e CD45RA, e na capacidade de produzir citocinas e proliferar. Recentemente, identificamos 18 peptídeos derivados de següências do consenso B do HIV-1, ligadores de múltiplas moléculas HLA-DR e amplamente reconhecidos por linfócitos T de sangue periférico de pacientes infectados pelo HIV. Diante disso e considerando a importância das células T de memória na manutenção da resposta imune específica, nosso objetivo foi caracterizar fenotípica e funcionalmente as subpopulações de células T de memória de indivíduos infectados pelo HIV envolvidas no reconhecimento in vitro desses epitopos. Foram incluídos 14 indivíduos controles sadios e 61 pacientes  $HIV^+$  com contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> maior que 250 células/mm<sup>3</sup>. Os pacientes HIV<sup>+</sup> foram divididos em seis diferentes grupos clínicos de acordo com o estágio da infecção, carga viral (CV) plasmática e uso de terapia anti-retroviral (ART): não progressores por longo tempo (LTNP), avirêmicos em uso de ART (AV-ART), virêmicos em uso de ART (VI-ART), virêmicos sem uso de ART (VI sem ART), virêmicos recéminfectados sem uso de ART (VI-RI) e controladores. Células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos do estudo foram estimuladas com o conjunto de peptídeos do HIV-1 e com um conjunto de peptídeos do Citomegalovírus (CMV). A freqüência de células de memória produtoras de IFN-y e IL-2 e a proliferação celular antígeno-específica foram detectadas por citometria de fluxo de multiparâmetros. Nossos resultados mostraram que o conjunto de peptídeos do HIV-1 foi capaz de ativar subpopulações funcionais de memória TCM, TEM e TEMRA secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-2 em 100% dos pacientes HIV<sup>+</sup> dos diferentes grupos clínicos. O conjunto de peptídeos do HIV-1 também induziu proliferação das subpopulações de linfócitos T de memória. As freqüências de TEMRA CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$ , TEMRA

CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$  total, TCM CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$ , TCM CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$  total, TEM CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$ , TEM CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$  total e TEMRA CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$  correlacionaram-se negativamente com a carga viral do HIV em pacientes virêmicos. Esses dados sugerem que essas subpopulações de memória funcionais são importantes no controle da viremia. Comparando as respostas HIV e CMVespecíficas observamos freqüências mais elevadas de células T de memória produtoras de IL-2, IFN- $\gamma$ /IL-2 e IFN- $\gamma$  em respostas ao *pool* de peptídeos do HIV. Esses dados sugerem que esse conjunto de peptídeos derivados de següências do HIV-1 ativa respostas polifuncionais de subpopulações de linfócitos T de memória. Nossos resultados mostraram que o conjunto de peptídeos do HIV-1 foi capaz de estimular diferentes subpopulações distintas de linfócitos T de memória produtores de IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ,/IL-2 e IL-2 de indivíduos em diferentes estágios da infecção pelo HIV e sugerem o envolvimento de subpopulações de memória funcionais no controle da viremia. Estes achados fortalecem a possibilidade de uso desses peptídeos em uma formulação vacinal bem-sucedida em humanos.

Descritores: 1.HIV 2.Linfócitos T 3.Epitopos de linfócito T 4.Vacinas contra aids

## Summary

Coutinho-Silva A. Phenotypic and functional characterization of memory T lymphocytes from HIV infected individuals reactive to CD4-T epitopes derived from sequences of the HIV-1 B consensus [thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2009.

The persistence of functional memory T cell is important to ensure a protective immunity to Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. Memory T cells have been subdivided into central memory (TCM), effector memory (TEM) and highly differentiated effector memory (TEMRA) based on the expression of surface molecules such as CCR7 and CD45RA, and the ability to produce cytokines and proliferate. Recently, we identified 18 peptides derived from B consensus sequences of HIV-1 that bind to multiple HLA-DR molecules and are widely recognized by peripheral blood T lymphocytes from HIV-infected patients. Given this and considering the importance of memory T cells in the maintenance of specific immune response, our objective was to characterize phenotypic and functionally memory T cell subsets from HIV-infected individuals involved in the recognition of these epitopes in vitro. The study included 14 healthy control subjects and 61  $HIV^{+}$  patients with CD4<sup>+</sup> lymphocytes counts higher than 250 cells/mm3. The HIV<sup>+</sup> patients were divided into six different clinical groups according to the stage of infection, plasma viral load (VL) and antiretroviral therapy use (ART): long-term non-progressors (LTNP), aviremic under ART (AV-ART), viremic under ART (VI-ART), viremic without using ART (VI without ART), recently infected viremic without using ART (VI-RI) and controllers. Peripheral blood mononuclear cells from study subjects were stimulated with HIV-1 peptide pool and with a cytomegalovirus (CMV) peptide pool. The frequencies of IFN- $\gamma$  and IL-2 producing memory cells and antigenspecific cell proliferation were detected by multiparametric flow cytometry. Our results showed that the HIV-1 set of peptides was able to activate TCM, TEM and TEMRA functional memory subsets that secrete IFN-y and IL-2 in 100% of the HIV patients from the different clinical groups. The HIV-1 set of peptides also induced memory T lymphocyte subsets proliferation. TEMRA CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$ , total TEMRA CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$ , TCM CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$ , total TCM CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$ , total TEM CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$ , TEM CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$  and TEMRA CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma^{+}$  frequencies negatively correlated with HIV viral load in viremic patients. These data suggest that these functional memory subsets are important to control the viremia. When comparing the HIV and CMV-specific responses we observed higher frequencies of IL-2, IFN- $\gamma$ /IL-2 and IFN- $\gamma$  producing memory T cells in response to HIV peptide pool. These data suggest that this set of HIV sequence derived peptides activates polyfunctional response of memory T lymphocyte subsets. Our results showed that the HIV-1 peptide set was able to stimulate different IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /IL-2 e IL-2 producing memory T lymphocytes from individuals in different stages of HIV infection and suggest the involvement of functional memory subsets in the control of viremia. These findings strengthen the possibility of using these peptides in a successful vaccine formulation in humans.

Descriptors: 1.HIV 2.T-Lymphocytes 3.Epitopes, T-lymphocyte 4.Aids vaccines

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. SITUAÇÃO GLOBAL DA EPIDEMIA DO HIV

A síndrome da imunodeficiência humana adquirida – aids - consiste em uma pandemia que tem como agente infeccioso um retrovírus denominado vírus da imunodeficiência humana – HIV. A aids é hoje uma preocupação global que tem exigido esforços conjuntos da comunidade científica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2002 apontou a aids como a quarta principal causa de mortalidade no mundo.

De acordo com dados do Programa das Nações Unidas para HIV e aids, o UNAIDS (do inglês: *Joint United Programme on HIV/AIDS*), estima-se que cerca de 33 milhões (30,3 – 36,1 milhões) de indivíduos estejam infectados pelo HIV em todo o globo terrestre. Apenas em 2007 houve 2,7 milhões (2,2 – 3,2 milhões) de novas infecções e 2 milhões (1,8 – 2,3 milhões) de mortes em decorrência da aids (UNAIDS, 2008). A África Subsaariana responde por 67% das pessoas convivendo com HIV/aids no mundo e por 75% das novas infecções ocorridas em 2007 (UNAIDS, 2008). Desde o primeiro diagnóstico em 1981 nos Estados Unidos, a aids foi a causa de 25 milhões de mortes no mundo (UNAIDS, 2008). No nosso país, 506.499 casos de infecção pelo HIV já foram notificados pelo Ministério da Saúde até junho de 2007, dos quais 66% são do sexo masculino (Boletim Epidemiológico DST/AIDS, 2007). Dentre os casos notificados 80% concentram-se nas regiões Sudeste e Sul. Entretanto a estimativa é que 730.000 pessoas estejam infectadas no Brasil, o que corresponde a mais de 40% das pessoas vivendo com HIV/aids na América Latina (UNAIDS, 2008).

#### **1.2. HIV – O AGENTE CAUSADOR DA AIDS**

O HIV é membro da família de vírus Retroviridae e subfamília Lentiviridae. Existem dois tipos conhecidos: o HIV-1 e o HIV-2. O HIV-1 está globalmente distribuído e é o principal responsável pela epidemia mundial, tendo sido isolado em 1983 pelos pesquisadores Luc Montagnier e colaboradores na França (Barre-Sinoussi et al., 1983) e Robert Gallo e colaboradores nos EUA (Gallo et al., 1984). Esta descoberta rendeu aos cientistas franceses Luc Montagnier e Françoise Barre-Sinoussi o Prêmio Nobel de Medicina 2008.

O genoma do HIV-1 é constituído de duas moléculas de RNA, sendo formado por nove genes codificadores das proteínas: Gag, Env, Pol (estruturais); Vif, Vpr, Vpu (acessórias) e Rev, Nef e Tat (reguladoras) (revisado por Potter et al., 2004; revisado por Burger e Poles, 2003). O conjunto gênico do HIV-1 está localizado entre duas regiões genômicas denominadas Longas Repetições Terminais (LTRs). Este vírus é altamente polimórfico compreendendo três grupos: M (*major*), O (*outlier*) e N (*new*) (Gao et al., 1999; Lemey et al., 2004). No grupo M identificam-se pelo menos 9 subtipos: A, B, C, D, F, G, H, I e J (Louwagie et al., 1993; Janssens et al., 1994; Kostrikis et al., 1995; Leitner et al., 1995; Louwagie et al., 1995), além

de formas recombinantes. No Brasil, o subtipo B do HIV-1 é o predominante, sendo responsável por 80% das infecções, seguido dos subtipos F e C (de Martinez et al., 2002). O HIV-2 tem menor disseminação mundial, sendo o principal vírus causador da aids na África Ocidental (Lemey et al., 2003) e está associado com menor grau de infectividade e virulência (revisado por Markovitz et al., 1993).

## 1.3. A INFECÇÃO PELO HIV

Para infectar uma célula, o HIV necessita que esta expresse primariamente a molécula CD4 (Dalgleish et al., 1984). O linfócito T CD4<sup>+</sup> é o principal alvo do HIV, embora outras células do sistema imunológico sejam infectadas em menor freqüência, incluindo os monócitos, os macrófagos e as células dendríticas (McIlroy et al., 1995). No processo de replicação do HIV, um complexo glicoprotéico do envelope viral formado por seis subunidades, três gp120 e três gp41, interage especificamente com a molécula CD4 e com um co-receptor de entrada na membrana da célula-alvo. A função de coreceptor é exercida pelos receptores de quimiocinas, tais como, CCR1, CCR2b, CCR3, CCR5 e CXCR4, sendo os dois últimos os de maior relevância (revisado por Burger e Poles, 2003). O CCR5 é o co-receptor mais comumente utilizado pelo HIV e está presente sob células T primárias e macrófagos. O CXCR4 é expresso em vários tipos celulares incluindo timócitos, células T primárias e macrófagos. Os isolados virais que utilizam o CCR5 são ditos não-indutores de sincício (NSI) ao passo que aqueles que utilizam o CXCR4 induzem a formação de sincício em linhagens de células T e por isso são chamados de vírus indutores de sincício (SI). O uso diferencial destes co-receptores define as variantes biológicas do HIV-1 como R5 e X4, respectivamente, ou ainda R5X4 para as cepas de HIV-1 com duplo tropismo (Collin et al., 1994). A superfície de interação do HIV-1 com o co-receptor é uma região altamente conservada, entretanto esta é mantida em uma conformação críptica, sendo exposta por poucos segundos, apenas após a ligação da gp120 com a molécula CD4. Tal fato dificulta o acesso e bloqueio dessa região por anticorpos neutralizantes (Labrijn et al., 2003). A replicação do HIV ocorre predominantemente em células T *helper* 1 e está associada com a ativação imune e regulação positiva de Bcl-2 (do inglês: '*B-cell lymphoma 2*'), o que confere às células produtivamente infectadas, proteção contra a apoptose (Bahbounhi et al., 2004).

### 1.4. IMUNIDADE CELULAR ADAPTATIVA AO HIV

A infecção pelo HIV é caracterizada pela diminuição progressiva tanto quantitativa quanto funcional da imunidade do hospedeiro. Acredita-se que inúmeros fatores estejam envolvidos no desenvolvimento da aids, entretanto estes não são inteiramente conhecidos e compreendidos.

Os linfócitos T são os protagonistas da imunidade celular adaptativa e desempenham importante papel na resposta imune anti-HIV. Linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> reconhecem antígenos na forma de peptídeos (epitopos) ligados, respectivamente, às moléculas de classe I e II do Complexo de

Histocompatibilidade Principal (MHC) ou Antígeno Leucocitário Humano (HLA), presentes na superfície de uma célula apresentadora de antígeno.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem e podem matar células infectadas por vírus. Linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs) têm um papel reconhecido no controle viral através da lise celular direta e da secreção de citocinas e quimiocinas que aumentam a imunidade antiviral e suprimem a infecção (Walker et al., 1987; Plata et al., 1987; Borrow et al., 1994; Cocchi et al., 1995). Durante a fase aguda da doença do HIV ocorre uma grande atividade destes linfócitos citotóxicos. CTLs específicos para o HIV-1 podem ser facilmente detectados na maioria dos portadores do vírus durante a infecção primária (Pantaleo et al., 1994; Schmitz et al., 1999). Estes linfócitos T CD8<sup>+</sup> têm um papel importante no declínio da viremia (Borrow et al., 1994; Koup et al., 1994; Greenough et al., 1997; Ogg et al., 1998). Na fase crônica da infecção ocorre uma diminuição nas respostas das células T citotóxicas por razões não inteiramente conhecidas. Recentemente Schellens at al., (2008) mostraram que o elevado número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> funcionais secretores de citocinas presentes durante a fase inicial da infecção pelo HIV não é preditivo de maior tempo de sobrevida para os pacientes bem como não se correlaciona com a taxa de declínio de linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectados pelo HIV.

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> contribuem para o controle das infecções virais indiretamente através de auxílio na indução e/ou manutenção das respostas de células T CD8<sup>+</sup>, linfócitos B (produtores de anticorpos) e macrófagos e/ou pela mediação direta de suas funções efetoras antivirais tais como produção de citocinas e, eventualmente citólise (revisado por Hogan e Hammer, 2001).

A cooperação entre as respostas das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> parece ser essencial para o controle da infecção promovida pelo HIV. Entretanto, durante o curso da doença, ocorre uma diminuição progressiva da contagem das células T CD4<sup>+</sup> circulantes que se intensifica na fase crônica. Observase um processo dinâmico de infecção e morte em grande número dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (revisado por Dewhurst e Whetter, 1997), prejudicando sua função no desenvolvimento de respostas proliferativas ao HIV-1 (Musey et al., 1999). A replicação ativa do HIV contribui diretamente para a depleção destas células (Terai et al., 1991; Mellors et al., 1996; Gandhi et al., 1998). Na infecção crônica a taxa de destruição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> é estimada em 3 x 10<sup>9</sup> células por dia (Ho et al., 1995). Em contrapartida, a taxa de proliferação compensatória destas células é inadequada para manter um número suficiente de células. A perda das células T CD4<sup>+</sup> é sem dúvida o evento central da patogênese da aids. Contudo, provavelmente o efeito citopático do HIV não é o único fator envolvido na depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Corrobora esse raciocínio a observação de que hospedeiros naturais do vírus da imunodeficiência símia (SIV), tais como os macacos 'sooty mangabey', não apresentam essa perda massiva dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> apesar das elevadas cargas virais detectadas nesses animais (Silvestri et al., 2003). Diversos trabalhos dão suporte à hipótese de que o fenômeno da hiperativação crônica das células T CD4<sup>+</sup> possui um importante papel na depleção destas células durante a infecção pelo HIV (Hazenberg et al., 2000; revisado por McCune et al., 2001; Grossman et al., 2002; Choudhary et al., 2007). O nível de ativação das células T CD4<sup>+</sup>, mais do que a carga viral plasmática, se correlaciona com a redução da contagem destes linfócitos (Leng et al., 2001; Sousa et al., 2002). Os mecanismos propostos através do quais a ativação crônica levaria à perda dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> são a aceleração da senescência destas células, exaustão das células T CD4<sup>+</sup> e a morte celular induzida por ativação (Dockrell et al., 1999; Grossman et al., 2002; Ribeiro et al., 2002; Yates et al., 2007).

# 1.5. A HETEROGENEIDADE DOS LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA

As células de memória são células de longa vida que surgem na resposta imune antígeno-específica, após o encontro com o antígeno, durante a expansão clonal e diferenciação dos linfócitos em resposta a uma estimulação antigênica (revisado por Ahmed e Gray, 1996). Os linfócitos de memória conferem proteção imediata em casos de reencontros com o antígeno gerando uma resposta qualitativa e quantitativamente aumentada comparada àquela oriunda das células *naive*, ou seja, células que ainda não encontraram o antígeno (revisado por Ahmed e Gray, 1996).

Embora os mecanismos de geração e manutenção das células T de memória ainda não estejam completamente esclarecidos, a importância destas células para a resposta imune advém do fato delas persistirem por tempo prolongado no hospedeiro e serem prontamente ativada nos casos de reencontros com o patógeno, resultando em intensa proliferação e levando à ativação de outras células da resposta imune. Disto resulta a montagem de respostas efetivas por estas células, as quais são capazes de secretar citocinas rapidamente em resposta ao estímulo antigênico previamente conhecido (revisado por Butcher e Picker, 1996; revisado por Dutton et al., 1998; Appay et al., 2002; Wherry et al., 2003).

De particular interesse, as células T de memória e *naive* apresentam diferenças entre si quanto à expressão do antígeno leucocitário comum CD45. O CD45 é uma tirosina fosfatase envolvida na transmissão de sinais entre células T e B (revisado por Trowbridge e Thomas, 1994). Diferentes isoformas desse antígeno são expressas na superfície dos linfócitos T durante o processo de diferenciação celular. A isoforma CD45RA é típica de linfócitos T naive e a isoforma CD45RO está associada com linfócitos T de memória (Michie et al., 1992). Além do CD45, duas outras moléculas de superfície são também capazes de distinguir linfócitos T naive e de memória: o CD62L e o CCR7. Essas moléculas são necessárias para a entrada das células T nos linfonodos através das vênulas endoteliais altas (HEV). O CD62L é uma selectina responsável pela interação dos linfócitos e outros leucócitos com o endotélio das HEV (Campbell et al., 1998). O CCR7 é o receptor das guimiocinas CCL19 e CCL21 (anteriormente denominadas ELC e SLC, respectivamente) expressas nas HEV nos locais de entrada dos linfócitos para os linfonodos (Forster et al., 1999). A totalidade dos linfócitos T naive apresenta altos níveis de ambas as moléculas, enquanto alguns linfócitos T de memória perdem a expressão do CD62L e/ou do CCR7 (Sallusto et al., 1999). Estas moléculas têm recebido considerável atenção, no contexto de células T de memória, a partir de estudos mostrando que células T humanas CD45RO<sup>+</sup> podiam ser divididas, com base na expressão do CD62L e do CCR7, em duas subpopulações: CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> e CD62L<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> (Sallusto et al., 1999). Estas subpopulações foram respectivamente denominadas de células de memória central (**TCM**) e células de memória efetora (**TEM**) (Sallusto et al., 1999). (Geginat et al., 2003) identificaram uma terceira subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória efetora humana. Essa subpopulação possui alta expressão da molécula CD57 que é um marcador de células terminalmente diferenciadas (Brenchley et al., 2003), sendo designada de células de memória efetora altamente diferenciadas (**TEMRA**) (Geginat et al., 2003). Uma população com este mesmo fenótipo foi identificada por (Harari et al., 2004a) no *pool* de células de memória T CD4<sup>+</sup>, através de estudos do padrão das respostas de células T CD4<sup>+</sup> de memória sob diferentes condições de persistência e carga do antígeno utilizando lisados de Citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV), vírus Herpes Simplex (HSV), além de toxóide tetânico e Gag p55 do HIV-1.

Atualmente diversos outros marcadores fenotípicos que podem auxiliar na caracterização destas subpopulações celulares de memória já foram identificados. Dentre estas moléculas podemos ressaltar a cadeia  $\alpha$  do receptor da interleucina 7 (IL-7R $\alpha$ ), o CD127 (Kaech et al., 2003) e as moléculas co-estimulatórias CD27 e CD28 (Tomiyama et al., 2002; Appay et al., 2002).

Além do fenótipo, os linfócitos T de memória em humanos atualmente podem ser caracterizados funcionalmente da seguinte forma: a) TCM – possuem pouca ou nenhuma função efetora; possuem capacidade de se
auto-renovarem e secretam principalmente IL-2. b) TEM – possuem função efetora imediata e secretam IL-2 e IFN-γ. c) TEMRA - possuem potente função efetora e pequena capacidade de replicação e são secretoras únicas de IFN-γ. (Sallusto et al., 1999; Geginat et al., 2003; Harari et al., 2004a).

Células de memória efetora TEM e TEMRA parecem desempenhar uma função efetora protetora imediata, entretanto a imunidade prolongada parece estar a cargo das células TCM dado o potencial atribuído a elas de auto-renovação, proliferação e diferenciação em células com função efetora, portanto de reabastecimento contínuo do compartimento de memória (revisado por Lanzavecchia e Sallusto, 2000; Campbell et, 2001). Estas características têm rendido às TCM especial atenção. Células T CD4<sup>+</sup> de memória central estão associadas com proteção após a depuração de antígenos virais ou imunização (Heller et al., 2007). Além disso, estas células parecem possuir importância fundamental para o estabelecimento de células T CD8<sup>+</sup> de memória funcionais (revisado por Bourgeois e Tanchot, 2003).

Atualmente existem várias hipóteses a respeito da origem das subpopulações de células T de memória. Uma das hipóteses mais difundida e aceita defende que estas células constituam subtipos celulares distintos, ocorrendo uma diferenciação linear das TCM em TEM e destas em TEMRA (Sallusto et al., 1999; Geginat et al., 2001). Tem sido proposto que as subpopulações T de memória representariam estágios de um processo contínuo de diferenciação cujos principais fatores envolvidos seriam a força do sinal de ativação via receptor de célula T (TCR), a concentração do antígeno bem como das moléculas co-estimulatórias e a duração da interação entre linfócitos T e APCs. Ou seja, durante a estimulação antigênica, fraca ativação via TCR, escassez de antígeno e curta interação com APCs privariam os linfócitos T de adquirir função efetora imediata dando origem aos linfócitos T de memória central. Devido à estimulação subótima, estas células seriam mantidas em um estágio intermediário de diferenciação celular sem perder os receptores de migração para os órgãos linfóides secundários e adquirindo alto potencial de diferenciação e reabastecimento do pool de memória sob estimulação secundária. Por outro lado, ativação adequada dos linfócitos T naive levaria, após a fase de contração da resposta imune adaptativa, a manutenção de um pool de memória com capacidade efetora imediata (revisado por Sallusto et al., 2004). Existe outra hipótese propondo que as subpopulações de memória T CD8<sup>+</sup> são independentes entre si e com origens distintas (Baron et al., 2003). Baron et al. (2003) analisaram a composição de clones de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória central e de memória efetora, específicos para um peptídeo do vírus da influenza A, em indivíduos controles saudáveis. A maioria destes clones manteve seus tamanhos altamente estáveis por um período superior a nove meses em ambos os subgrupos de memória avaliados. Os autores sugerem que durante o curso da resposta imune, células naive poderiam ser estimuladas em diferentes condições e, conseqüentemente gerar ou células de memória efetora ou células de memória central ou ainda ambas a partir de precursores distintos. Outros autores propõem que células T de memória central e efetora não necessariamente constituem subgrupos distintos e que integrem uma via de diferenciação linear de naive (N)→células efetoras (E)→TEM→TCM (Wherry et al., 2003). Com base nas diferentes hipóteses apresentadas acima é possível visualizar diferentes destinos de diferenciação para os linfócitos T durante a resposta imune adaptativa. Portanto, o assunto é ainda muito controverso. Recentemente tem sido discutido um modelo de divisão celular assimétrica para linfócitos T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos murinos (Chang et al., 2007). De acordo com esse modelo, um único linfócito pode dar origem aos diferentes fenótipos celulares, ou seja, efetor e de memória, necessários para a resposta imune adaptativa, gerando diversidade intraclonal de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. É proposto que a divisão celular assimétrica ocorra na primeira divisão celular após o reconhecimento antigênico específico, sendo dependente de contato prolongado com a célula dendrítica apresentadora de antígeno. Assim, durante a sinapse imunológica, ocorreria uma polarização de receptores sinápticos específicos, sendo estes mais abundantes na célula-filha pertencente ao pólo proximal à sinapse. Isto resultaria em disparidade morfológica, funcional e de marcadores fenotípicos entre as células-filhas proximal e distal. De acordo com os estudos realizados TCD8<sup>+</sup> TCR-transgênicos, utilizando linfócitos murinos os autores observaram que as células-filhas proximais eram maiores e mais granulosas que as células-filhas distais, bem como, expressavam baixos níveis de CD62L e níveis maiores de CD69, CD43, CD25, e CD44. O inverso foi observado para as células-filhas distais. Funcionalmente, as células-filhas proximais apresentaram maior expressão de produtos de genes efetores, IFN- $\gamma$  e granzima B. Por outro lado, as células-filhas-distais tinham maior expressão de RNA mensageiro para IL-7Rα. Portanto, de acordo com o modelo de divisão assimétrica, as características apresentadas pelas células-filhas proximal e distal, resultantes da primeira divisão celular antígeno-específica, são consistentes com as linhagens efetora e de memória, respectivamente. (Chang et al., 2007). Permanece para ser esclarecido se esses achados podem ser extrapolados para células humanas e para linfócitos TCD4<sup>+</sup>.

## 1.6. LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA HIV-ESPECÍFICOS

Diversos trabalhos mostram que as células T CD4<sup>+</sup> de memória constituem a população mais freqüentemente infectada pelo vírus da aids, fato este que parece contribuir de forma significativa para a perda das respostas dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> HIV-específicos (Demoustier et al., 2002; Douek et al., 2002; Harari et al., 2002; Brenchley et al., 2004). Segundo Grossman et al. (2006), as células de memória de vida curta constituem a principal subpopulação alvejada pelo HIV. Nesse sentido, recentemente Okoye et al. (2007), através do estudo da infecção de macacos Rhesus pelo SIV, demonstraram que devido à hiperativação imune, as TEM CD4<sup>+</sup> são essencialmente células de vida curta que têm sua homeostasia estreitamente dependente da produção de novas células TEM a partir de precursores TCM. Portanto, a depleção destas células de memória de vida curta seria determinada pela destruição, falha na produção e declínio

gradual das TCM CD4<sup>+</sup>. Ou seja, os efeitos diretos e indiretos da infecção sobre as TCM, determinariam a velocidade de progressão da doença durante a infecção crônica.

Na infecção pelo HIV, as respostas mais robustas de células de memória estão presentes em pacientes LTNP (do inglês 'long-term nonprogressors') que em pacientes avirêmicos e virêmicos progressores da infecção. LTNP são indivíduos que na ausência de tratamento anti-retroviral permanecem assintomáticos por mais de sete anos após a infecção, com contagem de células T CD4<sup>+</sup> estável e maior que 500 células/µL, baixos níveis do vírus no sangue periférico e sem sinais de progressão imunológica da doença induzida pelo HIV (Paroli et al., 2001; revisado por Burger e Poles, 2003). De acordo com a literatura, o estado de não-progressão desses pacientes tem sido associado com fortes respostas de CTL e linfócitos T CD4<sup>+</sup> vírus-específicos, além de potentes respostas proliferativas linfocitárias (Pontensilli et al., 1999; Wilson et al., 2000; Boaz et al., 2002; Betts et al., 2006). Estes indivíduos também apresentam respostas de anticorpos neutralizantes mais potentes e mais freqüentes que em outros pacientes HIV<sup>+</sup>. Entretanto, a real contribuição da presença destes anticorpos para a manutenção do estado de não-progressão não foi ainda esclarecida (Cao et al., 1995; Pilgrim et al., 1997; Carotenuto et al., 1998).

Em relação às células T CD4<sup>+</sup> de memória, os três fenótipos de memória descritos acima já foram observados em pacientes soropositivos como mostram diversos estudos. Younes et al. (2003) verificaram que em pacientes avirêmicos, ou seja, com carga viral indetectável, as TCM HIV-

específicas produziam IL-2 e as TEM produziam IL-2 e IFN- $\gamma$ , enquanto que nos virêmicos as TCM estavam ausentes e as TEM eram secretoras únicas de IFN- $\gamma$ . Além disso, a capacidade proliferativa das células T CD4<sup>+</sup> HIVespecíficas a peptídeos das proteínas Gag e Nef, avaliada por ensaio de proliferação por CFSE (do inglês: '5- (and –6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester'), foi cerca de 30 vezes maior nos indivíduos avirêmicos, demonstrando que a resposta de células T CD4<sup>+</sup> HIV-específicas está prejudicada nos indivíduos com viremia persistente e sugerindo que o controle da viremia pode estar associado à manutenção de um *pool* de células T CD4<sup>+</sup> de memória de vida longa, ou seja, células de memória central.

Harari et al. (2004b) avaliaram em seus estudos a presença de três populações definidas como células secretoras únicas de IL-2, células secretoras de IL-2 e IFN- $\gamma$  e células secretoras únicas de IFN- $\gamma$  entre as células T CD4<sup>+</sup> HIV-específicas no sangue e linfonodos de pacientes infectados pelo HIV. Os autores do estudo avaliaram indivíduos HIV<sup>+</sup> progressores e LTNP e observaram que as células T CD4<sup>+</sup> HIV-específicas de indivíduos LTNP estavam uniformemente distribuídas entre as três populações de células T CD4<sup>+</sup> avaliadas. Entretanto nos pacientes com doença progressiva cerca de 70% das células T CD4<sup>+</sup> HIV-específicas eram secretoras únicas de IFN- $\gamma$ . Os autores destacam que a maioria das células secretoras únicas de IFN- $\gamma$  e secretoras de IL-2 e IFN- $\gamma$  era células de memória CCR7- (memória efetora) e a maioria das células secretoras únicas de IL-2 eram células de memória CCR7<sup>+</sup> (memória central). Avaliando a

resposta de células T CD4<sup>+</sup> específicas para o Citomegalovírus (CMV), nos mesmos indivíduos, não foram observadas diferenças entre o grupo de pacientes LTNP e pacientes progressores. Resultados interessantes foram obtidos em indivíduos desse estudo selecionados aleatoriamente dentre os pacientes com doença progressiva e submetidos à terapia anti-retroviral (ART) indicando que a terapia prolongada é capaz de recuperar, pelo menos parcialmente, células de memória central HIV-específicas (Harari et al., 2004b).

É importante mencionar que Elrefaei et al. (2004) observaram em seus estudos que a HAART não restaura a população de TCM específica para os patógenos oportunistas, vírus da caxumba e vírus da influenza A e B, em indivíduos cronicamente infectados pelo HIV mesmo quando ocorre a restauração das contagens de células T CD4<sup>+</sup> totais e a completa supressão da carga viral. Este mesmo estudo mostrou que o nadir (a menor contagem registrada) baixo de linfócitos T CD4<sup>+</sup> pode resultar em perda permanente das células TCM antígeno-específicas de vida longa.

Em um estudo mais recente conduzido pelo grupo do pesquisador Giuseppe Pantaleo foi investigada a resposta antígeno-específica de células T CD4<sup>+</sup> em humanos em diferentes modelos de exposição e/ou persistência do antígeno, utilizando células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígenos de CMV, EBV, HSV, HIV e toxóide tetânico. De interesse vale ressaltar que em células mononucleares do sangue de indivíduos LTNP e indivíduos HIV<sup>+</sup> sob HAART, estimuladas com Gag p55 do HIV-1, foram detectadas as três subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória funcionalmente distintas: secretoras únicas de IL-2, secretoras de IL-2/IFN-γ e secretoras únicas de IFN-γ, definidas como sendo TCM, TEM e TEMRA, nesta ordem. Entretanto em indivíduos com doença progressiva e virgens de terapia anti-retroviral, mais de 90% das células T CD4<sup>+</sup> de memória HIV-específicas secretavam apenas IFN-γ, as quais foram fenotipicamente caracterizada como TEM. Os autores também confirmaram resultados prévios do mesmo grupo mostrando que em todos os participantes do estudo as populações de células T CD4<sup>+</sup> CMV-específicas apresentavam um padrão homogêneo nas proporções de TCM, TEM e TEMRA (Harari et al., 2004a; Harari et al., 2005).

Indicações para um papel protetor das células T CD4<sup>+</sup> de memória contra a infecção do HIV-1 foram também observadas nos indivíduos altamente expostos, mas ainda soronegativos (SNE). Utilizando células do sangue, estimuladas com Gag p17 e Gag p24 do HIV-1, de 15 indivíduos SNE e de 14 indivíduos progressores da doença do HIV, sendo que 9 destes indivíduos HIV<sup>+</sup> estavam sob terapia anti-retroviral e apresentavam contagem de células T CD4<sup>+</sup> variando de 250-750 células/µL e com carga viral menor que 50 cópias/mL e 15 indivíduos saudáveis, foi observado que as células T CD4<sup>+</sup> HIV-específicas secretavam principalmente IL-2 em SNE e IFN-γ em indivíduos HIV<sup>+</sup>. Nestes indivíduos a população de TCM estava aumentada e a de TEM estava diminuída em comparação aos pacientes HIV<sup>+</sup> progressores da infecção e aos indivíduos saudáveis participantes do estudo (Schenal et al., 2005).

As três subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória também já foram detectadas na resposta HIV-específica. Entretanto, Zimmerli et al. (2005) observaram que as subpopulações TEM e TEMRA são mais freqüentes que TCM e são secretoras de IFN-y/IL-2 e secretoras únicas de IFN-y, respectivamente. Estes dados corroboram os de outros autores que afirmaram que na resposta ao HIV, as células T CD8<sup>+</sup> de memória são predominantemente TEM, enquanto resposta CMV-específica na predominam as TEMRA (Champagne et al., 2001; Nomura et al., 2006). De forma interessante, Nomura et al. (2006) observaram uma correlação positiva entre os números absolutos de linfócitos T CD8<sup>+</sup> IL2<sup>+</sup> HIVespecíficos e de TEMRA CD8<sup>+</sup> HIV-específicas. Estes autores observaram uma menor proporção de linfócitos T CD8<sup>+</sup> secretores de IL-2 na resposta HIV-específica em relação à resposta CMV-específica. Para Betts et al. (2006) a qualidade funcional é um importante atributo para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> HIV-específicos. Examinando cinco funções simultaneamente dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em resposta a *pools* de peptídeos derivados das diversas proteínas do HIV, estes autores observaram que respostas multifuncionais envolvendo mobilização de CD107a, produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 e produção da quimiocina MIP-1<sub>β</sub> estão correlacionadas com proteção em pacientes HIV<sup>+</sup>. Estas respostas foram qualitativamente maiores em indivíduos LTNP do que em pacientes progressores. Contudo, a resposta de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes HIV<sup>+</sup> progressores a antígenos de outros patógenos estava preservada. Segundo Betts et al. (2006) aparentemente a funcionalidade dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> HIV-específicos não está associada ao HLA dos indivíduos e é independente do fenótipo de memória. Além disso, a multifuncionalidade não é completamente restaurada pela terapia antiretroviral. Neste estudo os autores observaram diminuição da freqüência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória secretores de IL-2 em pacientes HIV<sup>+</sup> cronicamente infectados com ou sem tratamento anti-retroviral, entretanto estas células estavam preservadas em pacientes LTNP e pacientes que iniciaram o tratamento dentro dos primeiros 4 meses de soroconversão. Um estudo funcional de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória de pacientes infectados pelo subtipo C do HIV-1 mostrou uma forte correlação inversa entre a capacidade proliferativa epitopo-específica e a carga viral do HIV-1 (Day et al., 2007). Assim como para os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, para os linfócitos TCD8<sup>+</sup>, a capacidade de proliferação antígeno-específica parece ser um importante indício funcional de controle viral.

#### 1.7. VACINAS ANTI-HIV

O desenvolvimento de uma vacina eficaz anti-HIV tem sido alvo de muito esforço e estudos de vários grupos de pesquisa no mundo. No entanto, até o momento nenhuma vacina terapêutica ou profilática eficaz e segura foi encontrada. Apenas dois grandes ensaios clínicos de teste de eficácia de vacina anti-HIV foram concluídos e os mesmos não foram bem sucedidos. A primeira vacina candidata testada em um número grande de indivíduos teve como princípio a indução de anticorpos neutralizantes, que supostamente impediriam a entrada do vírus nas células, através da injeção

da proteína gp120. No entanto, apesar da vacina ter induzido a produção de anticorpos, esses não foram protetores, provavelmente devido às altas taxas de mutação na região gênica que codifica a proteína Env do HIV (Pitisuttithum et al., 2006). Em 2003 um novo grande ensaio clínico foi iniciado utilizando como vetor o Adenovírus do tipo 5 (Ad5) com següências gênicas das proteínas inteiras Gag, Pol e Nef. O princípio dessa vacina baseou-se no possível controle da viremia pela indução da resposta de linfócitos T, especialmente CD8<sup>+</sup> citotóxicos. Em 2007, esse ensaio clínico foi interrompido devido à falha em evitar a infecção pelo HIV e controlar o vírus nos indivíduos vacinados. Os resultados mostraram que indivíduos vacinados apresentaram respostas de linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos de baixa frequência e magnitude. Uma possível explicação para a falha da vacina Ad5 Gag/Pol/Nef é que essas respostas de CTL não foram suficientes para reduzir o impacto da replicação viral nos indivíduos vacinados. Um dos resultados inesperados dos ensaios clínicos dessa vacina foi que os indivíduos vacinados que já possuíam anticorpos anti-adenovírus apresentaram maior susceptibilidade à infecção pelo HIV (Steinbrook et al., 2007). A falha da vacina anti-HIV Ad5 em proteger os indivíduos vacinados deixa claro que é necessário identificar correlatos de proteção de uma vacina em todos os compartimentos da resposta imune (Sekaly, 2008; Gaucher et al., 2008), incluindo as respostas tanto de linfócitos T CD8<sup>+</sup> guanto T CD4<sup>+</sup>, produção de anticorpos neutralizantes e a resposta imune inata. A dificuldade de desenvolvimento de uma vacina anti-HIV se deve muito as próprias características do HIV, incluindo a diversidade genética, mudanças rápidas nas proteínas do envelope viral e capacidade de estabelecer reservatórios no hospedeiro (Walker e Burton, 2008). Assim, novas estratégias envolvendo imunologia, virologia, biologia molecular, bioquímica, proteômica e genômica são necessárias para o desenvolvimento de uma vacina anti-HIV eficaz.

# 1.8. EPITOPOS DE LINFÓCITOS T CD4+ DERIVADOS DE SEQÜÊNCIAS DO CONSENSO B DO HIV-1 E LIGADORES DE MÚLTIPLOS HLA-DR

Com o intuito de estudar a resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de indivíduos HIV<sup>+</sup> LTNP e de pacientes progressores da infecção do HIV, nosso grupo selecionou 18 peptídeos abrangendo oito das nove proteínas do HIV, com base nas seqüências de consenso do subtipo B do HIV-1 de diferentes cepas (Fonseca, et al., 2006). Os peptídeos foram selecionados, utilizando o programa de predição de ligação TEPITOPE (Sturniolo et al., 1999), o qual é capaz de identificar epitopos reconhecidos preferencialmente por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Iwai et al., 2003). O TEPITOPE é um algoritmo que utiliza 25 matrizes virtuais que cobrem a maioria das especificidades de ligação do peptídeo ao HLA de classe II na população caucasiana. Esse algoritmo incorpora para cada uma das 25 moléculas HLA-DR, uma matriz de valores para cada resíduo de aminoácido, nas posições p2 e p9. Os valores específicos de

empírica peptídeo-HLA-DR (Hammer et al., 1994). O algoritmo garante um valor (*score*), que é a soma algébrica dos valores da matriz para cada posição do peptídeo, ou seja, para cada uma das janelas de 9 aminoácidos ao longo da seqüência. Os nonâmeros cujo *score* para uma dada molécula HLA-DR atinge um limiar 3%, ou seja, capaz de selecionar seqüências com *score* igual ou maior que aqueles 3% das seqüências com o mais alto *score* no banco de dados do TEPITOPE são selecionados por um *software*. O algoritmo também permite a seleção de seqüências previstas para se ligarem simultaneamente de forma promíscua a várias moléculas HLA-DR (Iwai et al., 2003). Utilizando as seqüências de consenso do subtipo B do HIV-1 foram identificados e selecionados os peptídeos previstos para se ligarem ao maior número de moléculas do HLA-DR com um limiar de 3%.

Dos 18 peptídeos derivados do HIV-1, selecionados e sintetizados por nosso grupo, onze eram seqüências ainda não descritas na literatura como epitopos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Fonseca et al., 2006). Muitos dos peptídeos identificados por nosso grupo contêm inseridos em suas seqüências epitopos para linfócitos T CD8<sup>+</sup> já descritos na literatura (Tabela 3).

Com a finalidade de confirmar se os peptídeos previstos como promíscuos pelo algoritmo TEPITOPE eram realmente capazes de se ligarem a diferentes moléculas HLA-DR, os peptídeos foram submetidos a teste de ligação com nove moléculas HLA-DR altamente prevalentes na população: HLA-DR1 (HLA-DR1\*0101), DR3 (DRB1\*0301), DR4 (DRB1\*0401 E DRB1\*0405), DR7 (DRB1\*0701), DR11 (DRB1\*0701), DR11 (DRB1\*0701), DR11 (DRB1\*1101), DR13 (DR1\*1302), DR15 (DRB1\*1501) e DR51 (DRB5\*0101).

Os peptídeos ligaram-se a no mínimo 33% das 9 moléculas HLA-DR testadas. Os peptídeos rev<sub>11-27</sub>, e p24<sub>131-150</sub> foram capazes de se ligarem a 100% das moléculas testadas e os peptídeos integrase<sub>70-84</sub>, gp160<sub>188-201</sub> e gp160<sub>481-498</sub> a 89% das moléculas HLA-DR testadas. Consideramos promíscuos os peptídeos que se ligaram a pelo menos 50% das moléculas HLA-DR testadas (5 de 9 moléculas HLA-DR). Assim, consideramos ligadores promíscuos de moléculas HLA-DR os peptídeos p17<sub>73-89</sub>, p24<sub>33-45</sub>, p6<sub>32-46</sub>, integrase<sub>70-84</sub>, gp160<sub>174-185</sub>, gp160<sub>188-201</sub>, gp160<sub>481-498</sub>, rev<sub>11-27</sub>, vpr<sub>58-72</sub>, vpr<sub>65-82</sub>, vif<sub>144-158</sub>, vpu<sub>6-20</sub>, nef<sub>180-194</sub>.

Estes peptídeos, testados individualmente e em *pools*, através de ELISPOT para IFN- $\gamma$ , foram freqüentemente reconhecidos por PBMC de pacientes HIV<sup>+</sup> de diferentes grupos clínicos (progressores, controlador parciais, reconstituídos e LTNP) (Fonseca et al., 2006), sugerindo o envolvimento de células de memória neste reconhecimento.

#### **1.9. JUSTIFICATIVA DO PROJETO**

A interação entre o receptor de célula T (TCR) com o complexo peptídeo-MHC (do inglês: *'Major Histocompatibility Complex'*) é essencial para a ativação dos linfócitos T e diferenciação em células efetoras e de memória. O TCR reconhece especificamente sítios em um antígeno peptídico complexado a uma molécula MHC ou HLA (do inglês: *'Human Leukocyte Antigen'*), chamados determinantes antigênicos ou epitopos (revisado por Takahashi, 2003). Em face aos numerosos danos ao sistema

imunológico desencadeados pela doença do HIV, para o desenvolvimento de tratamentos efetivos, faz-se necessária a identificação de epitopos virais que estimulem a imunidade protetora. Nos últimos anos tem se buscado identificar epitopos para os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, devido à importância destas células para a manutenção da resposta imune HIV-específica. O número de epitopos T CD4<sup>+</sup> derivados de seqüências do HIV conhecidos e já descritos é limitado. O alto grau de polimorfismo das moléculas HLA e a elevada taxa de mutação do HIV dificultam a identificação de epitopos que sejam convenientes tanto para uso em formulações vacinais quanto para a avaliação *in vitro* de imunidade ao vírus na população mundial. Portanto, para uma resposta eficaz anti-HIV parecem interessantes epitopos virais capazes de abranger a disparidade HLA da população e de induzir a proliferação das subpopulações de células de memória, especialmente as TCM, pois estas células parecem possuir o potencial de estimular a imunidade protetora anti-HIV.

Nossa hipótese é que possivelmente ocorra envolvimento de diferentes subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de memória no reconhecimento dos peptídeos identificados por nosso grupo. Nossa proposta é, portanto, caracterizar fenotipica e funcionalmente as subpopulações de células T de memória HIV-específicas, que respondem a estes peptídeos, em indivíduos HIV<sup>+</sup>. Pretendemos também observar o efeito da viremia nessas subpopulações.

A possibilidade de estes peptídeos induzirem em pacientes HIV<sup>+</sup> a ativação de diferentes subpopulações de células T de memória dotadas

funcionalmente de capacidade proliferativa e de secreção de citocinas, funções possivelmente envolvidas no controle da progressão da doença do HIV, os colocaria como candidatos a serem testados em formulações vacinais profiláticas ou terapêuticas.

# 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento de subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de memória, entre as células mononucleares do sangue periférico de pacientes infectados pelo HIV<sup>+</sup> de diferentes grupos no reconhecimento *in vitro* de epitopos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> derivados de seqüências de proteínas do consenso B do HIV-1.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Caracterizar fenotipicamente as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e
   T CD8<sup>+</sup> naive e de memória respondedoras ao *pool* de peptídeos do
   HIV-1 e *pool* de peptídeos do CMV;
- b. Caracterizar funcionalmente as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de memória em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1 e *pool* de peptídeos do CMV, através da detecção das citocinas IFN-γ e IL-2;

- c. Avaliar as respostas proliferativas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> naive
  e de memória após estímulo com o *pool* de peptídeos do HIV-1 e o *pool* de peptídeos do CMV;
- d. Investigar a existência de relação entre a carga viral do HIV ou o nadir de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e as freqüências de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> *naive* e de memória funcionais;
- e. Comparar qualitativa e quantitativamente as respostas de subpopulações de linfócitos T de memória aos *pools* de peptídeos do HIV-1 e do CMV.

# 3. MÉTODOS

## 3.1. INDIVÍDUOS DO ESTUDO

Foram incluídos no estudo 61 pacientes HIV<sup>+</sup> e 14 indivíduos controles sadios. Dos pacientes, 39 foram selecionados dentre os acompanhados no Ambulatório de aids da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e Casa da Aids. Além desses, utilizamos na células criopreservadas de 22 pacientes (Virêmicos-recém infectados e Controlador) oriundos de uma cohort que tem sido acompanhada longitudinalmente desde o período pré-infecção, que nos foram cedidas pelo Prof. Dr. Esper Kallás da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP e do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Estado de São Paulo, que é colaborador deste trabalho. Os pacientes expressaram sua concordância em participar voluntariamente desse estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual juntamente com o protocolo da pesquisa, foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP – CAPPesq. No processo de seleção dos participantes foram levantados os dados referentes à história clínica e laboratorial da infecção pelo HIV de cada paciente: data da realização da primeira sorologia anti-HIV positiva, data do início do tratamento anti-retroviral, drogas anti-retrovirais usadas, duração do tratamento e situação atual, resultados de exames de imunofenotipagem de linfócitos e carga viral. Essas informações foram coletadas por revisão do prontuário médico.

Os pacientes HIV<sup>+</sup> pertencem a seis grupos clínicos distintos e, assim como os indivíduos controles sadios, foram selecionados em função dos seguintes critérios de inclusão:

#### a. Grupo LTNP: Não progressores por longo tempo

- Idade maior que 18 anos;
- Infecção pelo HIV diagnosticada por métodos sorológicos a pelo menos sete anos;
- Contagem de células T CD4<sup>+</sup> em sangue periférico igual ou superior a 500 células/mm<sup>3</sup>;
- Virgens de tratamento com medicamentos anti-retrovirais e sem uso de vacinas e drogas imuno-estimuladoras nos últimos 30 dias.

## b. Grupo AV-ART: Pacientes avirêmicos em uso de terapia antiretroviral

- Idade maior que 18 anos;
- > Infecção pelo HIV diagnosticada por métodos sorológicos;
- Contagem de células T CD4<sup>+</sup> em sangue periférico igual ou superior a 250 células/mm<sup>3</sup>;

- Ausência de carga viral (CV) detectável no plasma, sendo assim considerados valores menores que 400 cópias de RNA do HIV-1 presentes por mL de plasma;
- Sob tratamento de pelo menos 12 meses com medicamentos antiretrovirais e sem uso de vacinas e drogas imuno-estimuladoras nos últimos 30 dias.
- c. Grupo VI-ART: Pacientes virêmicos em uso de terapia anti-retroviral
  - Idade maior que 18 anos;
  - > Infecção pelo HIV diagnosticada por métodos sorológicos;
  - Contagem de células T CD4<sup>+</sup> em sangue periférico igual ou superior a 250 células/mm<sup>3</sup>;
  - ➤ Carga viral detectável no plasma, ou seja, CV ≥ 400 cópias de RNA do HIV-1/mL;
  - Sob tratamento de pelo menos 12 meses com medicamentos antiretrovirais e sem uso de vacinas e drogas imuno-estimuladoras nos últimos 30 dias.

## d. Grupo VI sem ART: Pacientes virêmicos sem uso de terapia antiretroviral

- Idade maior que 18 anos;
- > Infecção pelo HIV diagnosticada por métodos sorológicos;
- Contagem de células CD4<sup>+</sup> em sangue periférico igual ou superior a 250 células/mm<sup>3</sup>;

- ➤ Carga viral detectável no plasma, ou seja, CV ≥ 400 cópias de RNA do HIV-1/mL;
- Virgens de tratamento com medicamentos anti-retrovirais e sem uso de vacinas e drogas imuno-estimuladoras nos últimos 30 dias.

## e. Grupo VI-RI: Pacientes virêmicos recém-infectados sem uso de terapia anti-retroviral

- Idade maior que 18 anos;
- > Infecção pelo HIV diagnosticada por métodos sorológicos;
- > Tempo de infecção pelo HIV inferior a oito meses;
- Contagem de células CD4<sup>+</sup> em sangue periférico igual ou superior a 250 células/mm<sup>3</sup>;
- ➤ Carga viral detectável no plasma, ou seja, CV ≥ 400 cópias de RNA do HIV-1/mL;
- Virgens de tratamento com medicamentos anti-retrovirais e sem uso de vacinas e drogas imuno-estimuladoras nos últimos 30 dias.

## f. Grupo CONTROLADOR: Pacientes virêmicos recém-infectados sem uso de terapia anti-retroviral

- Idade maior que 18 anos;
- > Infecção pelo HIV diagnosticada por métodos sorológicos;
- Tempo de infecção inferior a 2,5 anos;
- Contagem de células CD4<sup>+</sup> em sangue periférico igual ou superior a 400 células/mm<sup>3</sup>;

- ➤ Carga viral do HIV-1 indetectável ou ≤ 5000 cópias de RNA do HIV-1/mL;
- Parâmetros clínicos (contagem de linfócitos TCD4+ e carga viral) estáveis, confirmados através de coletas trimestrais seqüenciais;
- Virgens de tratamento com medicamentos anti-retrovirais e sem uso de vacinas e drogas imuno-estimuladoras nos últimos 30 dias.

Foram incluídos 14 indivíduos controles sadios, os quais foram doadores voluntários dentre os funcionários e alunos de pós-graduação do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração do HC-FMUSP.

#### g. Grupo de Indivíduos controles sadios

- Idade maior que 18 anos;
- Voluntários com sorologia anti-HIV negativa, sem diagnóstico de qualquer outra condição mórbida,
- Sem uso de vacinas e drogas imuno-estimuladoras nos últimos 30 dias.

# 3.2. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

O sangue heparinizado coletado dos pacientes HIV<sup>+</sup> (80 mL) e indivíduos controles saudáveis (40 mL) foi utilizado para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Estas células foram

separadas por gradiente de Ficoll Hypaque com densidade de 1,077 g/L (Ficoll: Pharmacia Biotech, Sweden e Hypaque: Urografine 370, Schering, Brasil) conforme o protocolo utilizado no nosso laboratório.

O sangue heparinizado estéril dos indivíduos soropositivos e soronegativos para o HIV foi inicialmente diluído 1:2 com solução de salina 0,9% estéril. Em seguida esta solução foi homogeneizada, sendo distribuídos cada 10 mL sobre 3 mL de Ficoll Hypaque em tubos de polipropileno com capacidade para 15 mL. Os tubos foram centrifugados por 25 minutos a 800 g. Após a centrifugação, retirou-se a nuvem de células mononucleares formada entre o Ficoll Hypaque e a salina, transferindo-a para tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL. O volume destes foi completado com salina e os mesmos foram centrifugados por 10 minutos a 950 g. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e o botão celular (pellet) foi lavado 1x com salina e 1x com meio RPMI 1640 (Gibco) sem adição de soro e suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco), 1% de piruvato de sódio 100mM (Gibco), 2% de solução de aminoácidos não-essenciais 50x (Gibco), 1% de solução de vitaminas 100x (Gibco) e 0,1% de gentamicina (Novafarma). Para estas lavagens, as células foram centrifugadas por 8 minutos a 800 g e a 400 g, respectivamente. Essa última centrifugação foi realizada para eliminar as plaquetas. Por fim, o botão celular foi ressuspendido em 10 mL de meio RPMI 1640 completo. O meio completo foi constituído de 90% de meio RPMI 1640 suplementado como descrito acima e de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Hyclone). Procedeu-se a contagem das células mononucleares em câmara de Neubauer. A leitura foi feita com auxílio do microscópio óptico em aumento de 400x.

## 3.3. CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

Após a separação das PBMC, estas foram criopreservadas para posteriormente serem utilizadas ensaios biológicos de em imunofluorescência e linfoproliferação por citometria de fluxo. Para o congelamento celular, inicialmente foi preparada e mantida até o momento do uso a 4 °C, a solução de congelamento. Esta solução foi constituída de 90% de soro fetal bovino inativado (Hyclone) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma). Após a contagem, as células de pacientes  $HIV^+$  e de indivíduos controles saudáveis obtidas por separação com gradiente de Ficoll Hypaque foram centrifugadas por 8 minutos a 800 g e ressuspendidas em 1 mL de solução de congelamento para cada 10-15 x 10<sup>6</sup> células. Os criotubos, devidamente identificados, foram deixados a – 80 °C por 18 horas em recipiente próprio para congelamento (Nalgene) contendo álcool isopropílico e posteriormente foram transferidos para o nitrogênio líquido.

No momento do descongelamento celular os tubos de criopreservação foram retirados do nitrogênio líquido e levados rapidamente ao banho-maria a 37 °C. Antes do descongelamento completo a solução de células foi transferida para um tubo contendo 10 mL de meio RPMI completo que foi mantido em gelo. As células foram imediatamente centrifugadas a 800 g por 8 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e a lavagem das células foi repetida 2x. Após a última lavagem, as células foram novamente ressuspendidas em meio RPMI completo. Antes da contagem em câmara de Neubauer, as células foram deixadas na estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C por no mínimo 2 horas, em tubos de cultura, para estabilização das mesmas, de forma a garantir posteriormente a determinação correta da viabilidade celular. A viabilidade celular foi medida após diluição das células 1:2 no corante vital Azul de Tripan (MCB Manufacturing Chemist Inc., Cincinatti, OH, EUA). Realizou-se a contagem no microscópio óptico em aumento de 400x discriminando-se entre células vivas e mortas (as células mortas coram-se de azul). Calculou-se o percentual das células vivas sendo consideradas passíveis de utilização as suspensões celulares com viabilidade ≥ 90%.

## 3.4. SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS DO HIV-1 E DO CMV

Para a estimulação *in vitro* das PBMC dos indivíduos do estudo, utilizadas nos ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo e proliferação celular, utilizou-se um conjunto (*pool*) de 18 peptídeos derivados das diferentes proteínas do HIV-1 e um *pool* de 10 peptídeos derivados de proteínas do Citomegalovírus (CMV). Os peptídeos do HIV foram selecionados a partir de seqüências do consenso B do HIV-1 que estão depositadas em banco de seqüência, que podem ser consultadas pelo site http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/map/map.html (Tabela 1). Os peptídeos do CMV são derivados das proteínas GlyP86 e Pp65 (Tabela 2).

Os peptídeos do HIV-1 e CMV foram selecionados com auxílio de um programa de predição de ligação às moléculas HLA-DR, o TEPITOPE (Sturniolo et al., 1999). Este algoritmo permite a seleção de seqüências previstas para se ligarem simultaneamente de forma promíscua a várias moléculas HLA-DR. Os peptídeos identificados e selecionados tiveram sua promiscuidade confirmada por ensaios de ligação às moléculas HLA-DR mais freqüentes.

Os peptídeos do HIV-1 foram identificados e sintetizados pelo nosso grupo como epitopos novos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Fonseca et al., 2006). As seqüências destes peptídeos foram depositadas no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) em setembro de 2005 sob o número PI 0504117-1 com participação da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), da Universidade de São Paulo (USP) e da Fundação Zerbini.

## 3.5. SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS DO HIV-1 E DO CMV

Os peptídeos foram sintetizados em nosso laboratório, com grau de pureza maior que 70%. As sínteses destes peptídeos foram realizadas em um sintetizador múltiplo de oito canais (PSSM8, Shimadzu, Japão), utilizando a metodologia FMOC de acordo com Atherton e Sheppard (1989). Os acoplamentos foram realizados na direção usual de carboxi para o amino

terminal sobre a resina tgr (Novabiochem, USA). Os peptídeos foram clivados da resina por tratamento com TFA: fenol:anisol:água:etanoditiol a 82,5:5,0:5,0:5,0:2,5 (v/v) e extraídos com ácido acético glacial 95% e liofilizados em liofilizador Edwards modelo super Modulyo, Pirani 501.

Os peptídeos foram então analisados por RP-HPLC (Shimadzu, Japão) empregando-se coluna C18 usando um gradiente de 5-95% de acetonitrila em 0,1% de TFA. A análise qualitativa dos peptídeos foi avaliada por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (TOFSPEC-E, Micromass, Inglaterra) utilizando matriz  $\alpha$ -ciano-4 hidroxycinâmico.

As seqüências dos peptídeos do HIV-1 e do CMV são mostradas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Vários dos peptídeos do HIV-1 contêm em suas seqüências epitopos T CD8<sup>+</sup> já descritos na literatura (Tabela 3)

| Posição          | Seqüência            |  |  |  |
|------------------|----------------------|--|--|--|
| P17(73-89)       | EELRSLYNTVATLYCVH    |  |  |  |
| P24(33-45)       | SPEVIPMFSALSE        |  |  |  |
| P24(131-150)     | KRWIILGLNKIVRMYSPTSI |  |  |  |
| P6(32-46)        | DKELYPLASLRSLFG      |  |  |  |
| Protease(7-21)   | QRPLVTIKIGGQLKE      |  |  |  |
| Protease(80-94)  | TPVNIIGRNLLTQIG      |  |  |  |
| Integrase(70-84) | GKIILVAVHVASGYI      |  |  |  |
| Gp41(261-276)    | RDLLLIVTRIVELLGR     |  |  |  |
| Gp160(19-31)     | TMLLGMLMICSAA        |  |  |  |
| Gp160(174-185)   | ALFYKLDVVPID         |  |  |  |
| Gp160(188-201)   | NTSYRLISCNTSVI       |  |  |  |
| Gp160(481-498)   | SELYLYKVVKIEPLGVAP   |  |  |  |
| Rev(11-27)       | ELLKTVRLIKFLYQSNP    |  |  |  |
| Vpr(58-72)       | EAIIRILQQLLFIHF      |  |  |  |
| Vpr(65-82)       | QQLLFIHFRIGCRHSRIG   |  |  |  |
| Vif(144-158)     | SLQYLALVALVAPKK      |  |  |  |
| Vpu(6-20)        | VLAIVALVVATIIAI      |  |  |  |
| Nef(180-194)     | VLEWRFDSRLAFHHV      |  |  |  |

Tabela 1 - Seqüências dos peptídeos derivados do<br/>consenso B do HIV-1 selecionados pelo<br/>algoritmo TEPITOPE.

| Posição          | Seqüência         |  |  |  |
|------------------|-------------------|--|--|--|
| glyp86 (6-20)    | PSYLIVLAVCLLSHL   |  |  |  |
| glyp86 (417-433) | TSLVRLVYILSKQNQQH |  |  |  |
| glyp86 (464-479) | RQELYLMGSLVHSMLV  |  |  |  |
| glyp86 (484-498) | RREIFIVETGLCSLA   |  |  |  |
| glyp86 (662-677) | GVINIMYMHDSDDVLF  |  |  |  |
| glyp86 (716-731) | SRLLMMSVYALSAIIG  |  |  |  |
| pp65 (54-68)     | SLILVSQYTPDSTPC   |  |  |  |
| pp65 (109-123)   | MSIYVYALPLKMLNI   |  |  |  |
| pp65 (237-251)   | SGKLFMHVTLGSDVE   |  |  |  |
| pp65 (370-383)   | TSQYRIQGKLEYRH    |  |  |  |
| pp65 (493-507)   | ARNLVPMVATVQGQN   |  |  |  |
|                  |                   |  |  |  |

 
 Tabela 2- Seqüências dos peptídeos derivados do consenso do CMV selecionados pelo algoritmo TEPITOPE.

| Peptídeos<br>Identificados | Epitopos         | topos descritos |  |  |
|----------------------------|------------------|-----------------|--|--|
|                            | CD4 <sup>+</sup> | CD8⁺            |  |  |
| P17(73-89)                 | +                | +               |  |  |
| P24(33-45)                 | +                | +               |  |  |
| P24(131-150)               | -                | +               |  |  |
| P6(32-46)                  | -                | -               |  |  |
| Protease(7-21)             | -                | -               |  |  |
| Protease(80-94)            | -                | -               |  |  |
| Integrase(70-84)           | -                | -               |  |  |
| Gp41(261-276)              | -                | -               |  |  |
| Gp160(19-31)               | -                | -               |  |  |
| Gp160(174-185)             | -                | -               |  |  |
| Gp160(188-201)             | -                | +               |  |  |
| Gp160(481-498)             | +                | +               |  |  |
| Rev(11-27)                 | +                | +               |  |  |
| Vpr(58-72)                 | +                | +               |  |  |
| Vpr(65-82)                 | +                | -               |  |  |
| Vif(144-158)               | -                | +               |  |  |
| Vpu(6-20)                  | -                | +               |  |  |
| Nef(180-194)               | +                | +               |  |  |

| Tabela 3 - | Epitopos c | le célu  | las T C | D4⁺ e | T CD8 <sup>+</sup> |
|------------|------------|----------|---------|-------|--------------------|
|            | descritos  | na liter | atura c | om se | qüências           |
|            | compartill | nadas    | com     | OS    | nossos             |
|            | nentídeos  | HIV_1    |         |       |                    |

(+) presença de epitopos já descritos no site <u>http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/map/map.h</u> <u>tml</u>, versão junho 2005; (-) ausência de epitopos descritos

# 3.6. ESTIMULAÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

PBMC criopreservadas estocadas em nitrogênio líquido foram rapidamente descongeladas em meio RPMI 1640 completo, conforme descrito anteriormente e, utilizadas no ensaio de citometria de fluxo. Após o descongelamento e determinação da viabilidade celular, as células em solução foram distribuídas em volumes de 1 mL em tubos de cultura fundo "U" estéreis com capacidade para 5 mL na concentração de 2 x 10<sup>6</sup> células por mL. As células foram estimuladas com 5 µM do pool de 18 peptídeos do HIV-1 ou 5 µM do pool de 10 peptídeos do CMV ou 2 µg/mL de SEB (enterotoxina B de Staphylococcus aureus) (Sigma) para controle positivo. As células foram deixadas por 1 h em estufa 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C e logo após foram acrescidas de 1 µg/mL de GolgiPlug (BD Biosciences). A solução de GolgiPlug contém brefeldina A, a qual é responsável pela inibição da secreção de proteínas pelas células, permitindo assim que fosse possível a posterior marcação intracelular das citocinas de interesse desse estudo. Ao controle negativo não-estimulado, ou seja, contendo apenas células sem nenhum dos estímulos citados acima, foi acrescentado DMSO na mesma concentração presente nos *pools* de peptídeos. Isto foi feito devido o DMSO ser o diluente dos peptídeos utilizados no estudo. Seguiu-se uma incubação de 11 h a 37 °C em estufa 5% de CO<sub>2</sub>. O tempo ótimo de estimulação in vitro foi definido por estudo de cinética no qual foram testados os seguintes tempos: 8, 12, 16 e 20 horas. Após completado o tempo de ativação in vitro, as células foram centrifugadas a 800 g por 8 min, ressupendidas em tampão salina-fosfato 2% de SFB (Hyclone) (tampão de lavagem) e distribuídas em placas fundo "U" de 96 poços (Falcon #3077, Beckton Dickinson) na concentração de 2 x 10<sup>6</sup> células por poço, num volume final de 200 µL/poço para realização do ensaio de imunofluorescência.

## 3.7. MARCAÇÃO CELULAR DE SUPERFÍCIE COM ANTICORPOS MONOCLONAIS

Após a estimulação celular in vitro com os pools de peptídeos do HIV-1 e do CMV as células foram distribuídas em placas de cultura fundo "U" de 96 poços (Falcon #3077, Beckton & Dickinson) como mencionado no tópico acima. Durante todo o procedimento manteve-se a placa, contendo as células, em banho de gelo. As células foram lavadas 2x em tampão de lavagem (250 µL/poço) sendo centrifugadas a 800 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado por inversão da placa em recipiente contendo hipoclorito de sódio a 2% e eliminando-se o excesso de líquido em papel absorvente. Após a retirada do sobrenadante foram adicionadas às células soluções de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, as conforme titulação realizada previamente. Estas soluções foram preparadas com antecedência em tampão de lavagem. Para marcação de superfície foram preparadas 3 soluções de anticorpos monoclonais: solução 1 -Marcação de superfície; solução 2 - .FMO CD45RA e solução 3 - FMO CCR7. A constituição de cada solução, bem como a titulação padronizada e

os respectivos fluorocromos dos anticorpos monoclonais utilizados são mostrados na Tabela 4.

As soluções 2 e 3 foram utilizadas para marcação de amostras controles oriundas de indivíduos saudáveis não infectados, denominadas FMO (do inglês: *'fluorescence minus one'*), definidas pelo emprego de todos os reagentes menos um, o que permite a identificação com precisão de uma dada população celular de interesse. Em nosso estudo realizamos FMO para os marcadores fenotípicos CCR7 e CD45RA, os quais nos permitiram identificar corretamente quatro subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> dentre as PBMC dos indivíduos participantes do estudo. Portanto, o tubo FMO para CCR7 continha anticorpos contra todos os marcadores avaliados no estudo, exceto para o CCR7 e o tubo FMO para CD45RA não continha anticorpo anti-CD45RA. Na Figura 1 está representado o gráfico de análise para as condições FMO, mostrando à esquerda a ausência de marcação com o anticorpo anti-CD45RA PE e à direita a ausência de marcação com o anticorpo anti-CCR7 PECy7 para os compartimentos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.

Em cada ensaio, além dos controles FMO, para cada indivíduo do estudo existiam 5 diferentes condições de estímulo *in vitro*: 1. apenas células, 2. células + DMSO, 3. células + 5  $\mu$ M do *pool* de 18 peptídeos do HIV-1, 4. células + 5  $\mu$ M do *pool* de 10 peptídeos do CMV e 5. Células + 2  $\mu$ g/mL de SEB. Com exceção da condição 1, as células que compunham as demais condições e os controles FMO, foram marcados com 25  $\mu$ L das respectivas soluções de anticorpos de superfície. As células foram incubadas por 30 minutos no escuro a 4 °C.
|         |        | Anticorpo  | Fluorocromo   | Marca         | Titulação |
|---------|--------|------------|---------------|---------------|-----------|
| ação de |        | anti-CD3   | APC Alexa 750 | Caltag        | 1/10      |
|         | đ      | anti-CD4   | PE Alexa 610  | Caltag        | 1/100     |
|         | fíci   | anti-CD8   | PE Cy5        | BD Pharmingen | 1/25      |
| larc    | ıədr   | anti-CCR7  | PE Cy7        | BD Pharmingen | 1/10      |
| 2       | SL     | anti-      | PE            | BD Pharmingen | 1/10      |
|         |        | CD45RA     |               |               |           |
|         |        |            |               |               | 4/40      |
| FMO     | CD45RA | anti-CD3   | APC Alexa 750 | Caltag        | 1/10      |
|         |        | anti-CD4   | PE Alexa 610  | Caltag        | 1/100     |
|         |        | anti-CD8   | PE Cy5        | BD Pharmingen | 1/25      |
|         |        | anti-CCR7  | PE Cy7        | BD Pharmingen | 1/10      |
|         |        | anti-CD3   | APC Alexa 750 | Caltag        | 1/10      |
|         |        | anti-CD4   | PE Alexa 610  | Caltag        | 1/100     |
| ЧO      | ~      | anti-CD8   | PE Cv5        | BD Pharmingen | 1/25      |
| Ľ       | CR1    | anti-      | PE            | BD Pharmingen | 1/10      |
|         | 0      | CD45RA     |               |               | -         |
|         | S      |            |               |               |           |
|         |        | anti-IFN-γ | FITC          | BD Pharmingen | 1/50      |
| Ċ       |        | anti-IL-2  | APC           | BD Pharmingen | 1/50      |
|         |        |            |               |               |           |

| Tabela | 4 | - | Anticorpos    | para   | marcação | de | superfície | celular | е | citocinas |
|--------|---|---|---------------|--------|----------|----|------------|---------|---|-----------|
|        |   |   | intracitoplas | smátic | as.      |    |            |         |   |           |

APC: aloficocianina; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PECy5: ficoeritrinacianina 5; PECy7: ficoeritrinacianina 7.



**Figura 1: Estratégia de análise através do FMO (***Fluorescence Minus One***<b>).** Para cada indivíduo do estudo foram feitos dois controles FMO, um para CCR7 PE Cy7 e outro para CD45RA PE, com a finalidade de determinar corretamente estas populações celulares quando estavam presentes as sete fluorescências simultaneamente.

## 3.8. MARCAÇÃO DE CITOCINAS INTRACELULARES COM ANTICORPOS MONOCLONAIS

Após a marcação de superfície, as células foram lavadas 2x em tampão de lavagem (250  $\mu$ L/poço) e centrifugadas a 800 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante, conforme descrito anteriormente, foi descartado por inversão da placa em recipiente contendo hipoclorito de sódio a 2%. Em seguida as células foram permeabilizadas e fixadas, adicionando-se 100  $\mu$ L/poço de Cytofix/cytoperm solution (BD Biosciences) e, incubadas no escuro por 20 minutos a 4 °C. Realizada a etapa de fixação, as células foram lavadas 2x em Perm/Wash solution 1x (BD Biosciences) (250  $\mu$ L/poço) e centrifugadas a 800 g por 5 minutos a 4 °C. Foi realizada a marcação intracitoplasmática das células dos indivíduos do estudo para as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2 através da adição de 25  $\mu$ L/poço de uma solução de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, contendo anti-IFN- $\gamma$  FITC (BD

Pharmingen) e anti-IL-2 APC (BD Pharmingen) diluídos 1:50 em Perm/Wash solution 1x (Tabela 4). As células foram incubadas por 30 minutos no escuro a 4 °C. Após o tempo de incubação as células foram novamente lavadas 2x em Perm/Wash solution 1x (BD Biosciences) (250  $\mu$ L/poço) e centrifugadas a 800 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e sobre o pellet foi distribuído 100  $\mu$ L/poço de solução de paraformaldeído 4%. As células foram incubadas a 4 °C por 30 minutos e depois transferidas para tubos de poliestireno com tampa, com filtro de nylon de 35  $\mu$ m, medindo 12 x 75 mm com capacidade de 5 mL. A estes tubos acrescentaram-se 300  $\mu$ L de tampão de lavagem. Em seguidas as células foram adquiridas no citômetro de fluxo modelo FACSAria (Beckton & Dickinson).

### 3.9. AQUISIÇÃO E ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

A aquisição das amostras e controles, marcadas com sete ou seis anticorpos conjugados a diferentes fluorocromos, foi feita através de citometria multiparamétrica em um citômetro de fluxo FACSAria (Becton & Dickinson). O FACSAria é um citômetro equipado com um laser de argônio e outro de hélio-neônio refrigerados à água, com potencial para analisar até 11 cores, além de possuir capacidade de separação de células. As voltagens das fluorescências e os valores de compensação foram definidos utilizando um conjunto de partículas de compensação (Compbeads) (BD Biosciences) sem marcação fluorescente como controle negativo ou marcadas com cada uma das fluorescências utilizadas no experimento isoladamente: FITC, PE, APC, PE Cy5, APC Cy7, PE Alexa 610 ou APC Alexa 750. Após a compensação automática do citômetro, foram adquiridos, pelo menos, 500.000 eventos de cada amostra na região de linfócitos, definida pelos parâmetros de tamanho e granulosidade no gráfico FSC (forward scatter) versus SSC (side scatter), respectivamente.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software FACSDiva (Becton & Dickinson). A estratégia de análise empregada teve como objetivo caracterizar fenotípica e funcionalmente as subpopulações T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> naive e de memória: 1) a partir da população de linfócitos, foi delimitada uma região CD3<sup>+</sup> no gráfico do tipo dot-plot de duas dimensões APC Cy7 versus SSC; 2) a região CD3<sup>+</sup> foi colocada em outro gráfico de duas dimensões, PE Alexa 610 versus PE Cy5; 3) as regiões CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foram analisadas guanto a expressão do CCR7 e CD45RA através do gráfico PE Cy7 versus PE, com base nos controles FMO, permitindo a discriminação das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em quatro subpopulações distintas. A fração de linfócitos localizada no quadrante duplo positivo (superior direito) expressava ambas moléculas, as isto é. era CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, sendo caracterizada como células *naive* (N), a fração de células localizada no quadrante superior esquerdo, que expressava apenas a molécula CCR7 correspondia às células de memória central (TCM), a subpopulação dupla negativa, ou seja, CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> localizadas no quadrante inferior esquerdo constituíam as células de memória efetora (TEM) e por fim, a fração situada inferiormente à direita do gráfico PE Cy7 versus PE expressando apenas CD45RA eram células de memória

altamente diferenciadas (TEMRA); 4) o último passo foi a determinação, dentro de cada um dos quatro quadrantes, da positividade para as citocinas IFN-γ e IL-2, possibilitando a identificação e caracterização fenotípica e funcional de subpopulações de células T *naive* e de memória (Figura 2).

Os resultados foram expressos como percentagens de subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> totais, *naive* ou de memória antígeno-específicas (estimuladas com *pool* de peptídeos do HIV-1 ou do CMV) subtraída da percentagem do controle negativo (células + DMSO) para cada indivíduo do estudo.



Figura 2: Estratégia de análise para caracterização fenotípica e funcional de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> antígenoespecíficas. Células do paciente VIRÊMICO-ART A63 foram estimuladas com o *pool* de peptídeos do HIV-1 na concentração de 5  $\mu$ M e incubadas por 12 horas e posteriormente marcadas com anticorpos anti-CD3 APC Alexa 750, anti-CD4 PE Alexa 610, anti-CD8 PE Cy5, anti-CCR7 PE Cy7, anti-CD45RA PE, anti-IFN- $\gamma$  FITC e anti-IL-2 APC. A aquisição celular foi realizada em citômetro de fluxo FACSAria. N: células *naive* (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>); TCM: células de memória central (CCR7<sup>+</sup>CD45RA-);

TEM: células de memória efetora (CCR7-CD45RA); TEMRA: células de memória efetora altamente diferenciada (CCR7-CD45RA<sup>+</sup>).

#### 3.10. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO POR CFSE

CFSE (do inglês: 5- (and -6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) é um corante citoplasmático verde permeabilizador de membrana baseado em fluoresceína que se difunde livremente dentro da célula. Após penetrar na célula, as duas cadeias laterais de acetato, responsáveis pela propriedade de permeabilização da membrana celular, são clivadas por esterases intracelulares, formando um composto, que sai da célula a uma velocidade muito menor que o composto original. Esta lenta velocidade de saída permite ao CFSE ligar-se covalentemente a moléculas intracelulares por longos períodos. O CFSE pode potencialmente reagir com uma ampla variedade de macromoléculas contendo amina dentro da célula. Muitos desses conjugados são de vida-curta e podem atravessar a membrana plamática, sendo perdido nas primeiras 24h após a marcação. Entretanto, quantidades suficientes de moléculas com marcação CFSE de vida-longa são retidas dentro da célula sem afetar a função celular. Quando a célula se divide as macromoléculas marcadas com CFSE são distribuídas entre as células-filhas. A intensidade de fluorescência de cada geração celular corresponde à metade da fluorecência da geração anterior (revisado por Parish, 1999). O CFSE tem um comprimento de excitação de 491 nm e de emissão de 518 nm, podendo ser facilmente detectado por citometria de fluxo. Portanto, a marcação com CFSE é um método simples e sensível que permite examinar populações específicas de células proliferantes e identificar 7-10 gerações celulares sucessivas.

Após o descongelamento, as células mononucleares dos pacientes HIV+ e controle sadio foram marcadas com CFSE, na concentração final de 1,25 µM, diluído em PBS 1X pré-aquecido a 37 °C. Adicionou-se 1 mL de solução de CFSE para cada 20 x 10<sup>6</sup> células em tubos com capacidade para 15 mL. Os tubos foram cobertos com papel alumínio e incubados a 37 °C por 10 minutos em estufa de CO<sub>2</sub>, sendo agitados periodicamente para garantir uma marcação homogênea das células com o CFSE. A reação de marcação foi interrompida adicionando-se 2 volumes de SFB gelado. Os tubos foram agitados gentilmente, deixados em temperatura ambiente por 1 minuto e, em seguida, centrifugados a 800 g por 6 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se, aos tubos contendo as células marcadas com CFSE, 5 mL de meio RPMI 10% SFB. Os tubos foram novamente centrifugados a 800 g por 6 minutos e o sobrenadante descartado. Esse processo de lavagem foi repetido por mais 2 vezes. Concluídas as lavagens, as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI 10% SFB e contadas com coloração de azul de tripan em câmera de Neubauer em aumento de 400x. As células marcadas com CFSE foram distribuídas em placas de 96 poços, fundo U, na concentração de 500.000 células/poço (100 uL/poço), em duplicata. Em seguida, as células foram estimuladas com 5 µM do pool de peptídeos do HIV-1 ou 5 µM do pool de peptídeos do CMV ou 2 µg/mL de SEB como controle positivo. Células em presença apenas de

DMSO foram utilizadas como controle negativo. As placas foram mantidas em cultura a 37° C por 5 dias (120h). Após o período de incubação, as células foram lavadas em tampão salina-fosfato 2% de SFB (tampão de lavagem FACS) e marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD3 APC Cy7, anti-CD4 APC, anti-CD8 PE Cy5, anti-CCR7 PE Cy7 e anti-CD45RA PE para avaliação da proliferação celular por citometria de fluxo. A compensação das fluorescências no citômetro foi realizada utilizando-se células marcadas apenas com CFSE para definição de FITC e células nãomarcadas com CFSE e não-estimuladas para cada uma das demais fluorescências. Foram adquiridos, pelo menos, 50.000 eventos na região de linfócitos no citômetro de fluxo FACSCanto (Becton & Dickinson). A percentagem das células que se dividiram foi determinada para os compartimentos totais T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> bem como para cada uma das 4 subpopulações, dentro destes compartimentos, definidas pelo gráfico de duas dimensões CCR7 versus CD45RA, isto é, *naive*, TCM, TEM e TEMRA.

## 3.11. PADRONIZAÇÃO E ESTRATÉGIA DA ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO POR CFSE

Para realização da análise de proliferação por CFSE das células dos pacientes HIV<sup>+</sup> e controle sadio utilizou-se o programa de análise para dados de citometria de fluxo FlowJo (Tree Star). Observamos no gráfico FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade) a existência de duas populações com características de linfócitos. Confirmamos através da construção do

gráfico SSC versus APC Cy7 que ambas as populações eram, em sua maioria, CD3<sup>+</sup> (Figura 3). Estas populações celulares, definidas como 'região 1' (Figura 3A) e 'região 2' (Figura 3B) foram analisadas isoladamente ou em conjunto (regiões 1 e 2) (Figura 3C) para a proliferação das subpopulações *Naive*, TCM, TEM e TEMRA CD4<sup>+</sup>. Conforme mostrado na Figura 4, tanto a 'região 1' quanto a 'região 2' é constituída de células viáveis e potencialmente proliferantes. Com base nessa constatação, para as análises de proliferação linfocitária por CFSE de nosso estudo, consideramos ambas as regiões de linfócitos, isto é, 'regiões 1 e 2', para todas as condições avaliadas. Contudo, pretendemos posteriormente, avaliar apoptose dentro dessas regiões devido ao diferente tamanho das células dentro de cada uma delas. A estratégia de análise que foi empregada para os ensaios de proliferação por CFSE é, portanto, mostrada na Figura 5. Essa análise seguiu os seguintes passos: 1) dentro da população de linfócitos (FSC X SSC), foi delimitada uma região  $CD3^+$  no gráfico do tipo dot-plot de duas dimensões APC Cy7 versus SSC; 2) a região CD3<sup>+</sup> foi colocada em outro gráfico de duas dimensões, APC versus PE Cy5 para delimitação das populações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, respectivamente; 3) as regiões CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foram analisadas quanto à expressão do CCR7 e CD45RA através do gráfico PE Cy7 versus PE, delimitando as subpopulações CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (*NAIVE*, quadrante superior direito), CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (TCM, quadrante superior esquerdo), CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> (TEM, quadrante inferior esquerdo) e CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> (TEMRA, quadrante inferior direito); 4) para cada uma dessas 4 subpopulações bem como para as populações CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> totais foi feito um gráfico do tipo histograma para avaliação do percentual de células divididas por diluição do CFSE (eixo das abscissas). Esses gráficos devem ser lidos da direita para a esquerda, sendo que o primeiro pico corresponde às células que não sofreram divisão e os demais picos, conseqüentemente, correspondem às células que proliferaram (Figura 5). Para essa análise utilizamos a plataforma de proliferação do programa FlowJo, a qual possui uma ferramenta (reta vertical) que deve ser arrastada para a posição ótima do pico correspondente às células que não se dividiram visualizado no gráfico do tipo histograma. A partir daí, o programa calcula a proliferação definindo, nos histogramas, um pico rosa para a população não-dividida e um número variável de picos em cor lilás correspondendo cada ciclo de divisão celular (Figura 5).



Figura 3: Definição da região de linfócitos para a análise da proliferação por CFSE de subpopulações de linfócitos T em resposta aos pools de peptídeos do HIV-1 e CMV. As células antígeno-estimuladas do paciente AVIRÊMICO-ART A7 marcadas com CFSE (1,25 µM) e com os anticorpos anti-CD3 APC Cy7, anti-CD4 APC, anti-CD8 PE Cy5, anti-CCR7 PE Cy7 e anti-CD45RA PE foram adquiridas em citômetro FACSCanto. As células adquiridas foram analisadas através do programa FlowJo. Para a padronização da análise, definiu-se 3 regiões de linfócitos: 'região 1' (A),

'região 2' (**B**) e 'regiões 1 e 2' (**C**). Dentro de cada uma dessas regiões definiu-se o percentual de células CD3<sup>+</sup>. Os números dentro das regiões demarcadas representam os percentuais das populações de linfócitos na coluna da esquerda e os percentuais das populações CD3+ na coluna da direita.



**Figura 4: Percentual de células divididas dentro das subpopulações** *Naive*, **TCM**, **TEM e TEMRA CD4<sup>+</sup> após o ensaio de proliferação por CFSE.** Para o paciente AVIRÊMICO-ART A7, dentro de cada uma das regiões de linfócitos definidas pelos parâmetros FSC versus SSC mostradas na Figura 4, definiu-se o percentual de células divididas dentro das subpopulações CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> *naive* (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>); TCM (CCR7<sup>+</sup>CD45RA-); TEM (CCR7-CD45RA) e TEMRA (CCR7-CD45RA<sup>+</sup>) para cada uma das condições avaliadas, ou seja, DMSO, HIV, CMV e SEB.



Figura 5: Estratégia de análise do ensaio de proliferação por CFSE no compartimento total e em subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em resposta aos pools de peptídeos do HIV-1 e CMV. Células dos pacientes HIV+ e controle sadio foram marcadas com CFSE (1,25  $\mu$ M) e estimuladas com o pool de peptídeos do HIV-1 (5  $\mu$ M), pool de peptídeos do

CMV (5 μM) ou SEB (2 μg/mL) por 5 dias para análise da proliferação antígeno-específica. Adicionou-se DMSO ao controle negativo. Posteriormente, as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD3 APC Cy7, anti-CD4 APC, anti-CD8 PE Cy5, anti-CCR7 PE Cy7 e anti-CD45RA PE. A aquisição celular foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto e a análise foi feita com auxílio do programa FlowJo. *NAIVE* (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>); TCM: células de memória central (CCR7<sup>+</sup>CD45RA-); TEM: células de memória efetora (CCR7-CD45RA); TEMRA: células de memória efetora altamente diferenciada (CCR7-CD45RA<sup>+</sup>).

## 3.12. ELISA PARA DETECÇÃO DE IGM E IGG ESPECÍFICAS PARA CITOMEGALOVÍRUS.

A detecção de anticorpos IgM (infecção aguda) e IgG (infecção crônica) específicos para citomegalovírus (CMV) no plasma de pacientes infectados pelo HIV foi realizada pela técnica de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). Foram utilizados *kits* comerciais (DiaSorin) e os ensaios realizados conforme instruções do fabricante. Assim, plasma de pacientes e os padrões (calibradores ou soros reagentes ao CMV) foram incubados em poços de placas de 96 poços revestidas de antígenos de CMV. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpos de camundongos anti-IgG ou anti-IgM humanas conjugadas com peroxidase (HPR). Foi adicionado o cromógeno e substrato, tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio, e a reação paralisada com ácido sulfúrico 0,4 N. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro e as absorbâncias detectadas em comprimentos de onda de 450/620 nm e 405/620 nm. Os valores obtidos foram subtraídos dos valores de absorbância obtidos a 620 nm dos calibradores e das amostras. O valor de absorbância equivalente a 450 nm

para uma amostra foi obtido multiplicando o valor de absorbância a 405 nm daquela amostra por 3,2. A presença ou a ausência de IgG anti-CMV foi determinada pela comparação da concentração de anticorpos das amostras com a do calibrador 1, que representa o valor limite. As amostras com concentrações de IgG anti-CMV maiores que 0,4 UI/mL foram consideradas reativas. As amostras com concentrações de IgG anti-CMV maiores que 0,4 UI/mL foram consideradas não reativas. A presença ou a ausência de IgM anti-CMV foi determinada pela comparação dos valores de absorvância das amostras com o valor do controle de *cut-off* (valor limite). As amostras com valores de absorbância maiores ou iguais a o valor limite foram consideradas não reativas com valores de absorbância maiores ou iguais ao valor limite foram consideradas não reativas com valores de absorbância maiores ou iguais ao valor limite foram consideradas reativas para IgM anti-CMV. As amostras com valores de absorbância menores que o valor limite foram consideradas não reativas.

As amostras dos 61 pacientes HIV<sup>+</sup> do estudo foram reativas para IgG anti-CMV, mas não para IgM anti-CMV.

### 3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS

Os grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> do estudo foram comparados com o grupo de indivíduos controles saudáveis e entre si em relação à: 1) caracterização de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de memória específicas para o *pool* de peptídeos do HIV-1; 1) caracterização de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de memória específicas para o *pool* de peptídeos do CMV; 3) produção das citocinas IL-2 e/ou IFN- $\gamma$  em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1 e do CMV pelas subpopulações de linfócitos T *naive* e de memória.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando teste t monocaudal ou bicaudal não-paramétrico de soma de postos de Wilcoxon (teste U de Mann-Whitney) para calcular a significância estatística dos dados quantitativos, através do software GraphPad Prism 4.0. Foram considerados significativos os valores de P < 0,05. Foi investigada a existência de correlação entre as freqüências das subpopulações de células T antígenoespecíficas e a carga viral plasmática através da correlação de Spearman.

# 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS DO ESTUDO

Foram incluídos 61 pacientes  $HIV^+$  divididos em seis grupos diferentes de acordo com a história clínica de cada indivíduo: LTNP (n = 10), AV-ART (n = 10), VI-ART (n = 10), VI sem ART (n = 9), VI-RI (n = 10), CONTROLADOR (n = 12). As características clínicas que os pacientes infectados pelo HIV apresentavam no momento da inclusão no estudo estão descritas na Tabela 5 e foram obtidas a partir de revisão do prontuário médico de cada paciente. Os pacientes HIV<sup>+</sup> eram também soropositivos para CMV.

Além dos pacientes HIV<sup>+</sup>, fizeram parte do estudo treze voluntários não infectados pelo HIV, dos quais seis eram do sexo masculino (idade média  $\pm$ desvio-padrão = 38,5  $\pm$  13 anos) e sete do sexo feminino (idade média  $\pm$ desvio-padrão = 33,5  $\pm$  8,2 anos), constituindo o sétimo grupo da pesquisa, sendo denominados de indivíduos controles sadios. Células de um controle sadio adicional foram utilizadas para realização dos ensaios de proliferação por CFSE.

A 32

A 43

A 44

A 52

A 56

A 57

A 59

Média

55

45

33

60

45

30

35

44

| Pacientes | Idade | Sexo | Tempo de<br>infecção | ART         | Tempo sob<br>ART | CD4/µL | Nadir<br>CD4/µL | CV do HIV<br>Cópias/mL |
|-----------|-------|------|----------------------|-------------|------------------|--------|-----------------|------------------------|
| LTNP      |       |      |                      |             |                  |        |                 |                        |
| A 1       | 54    | F    | 11,8                 |             |                  | ND     | 343             | ND                     |
| A 2       | 30    | М    | 10                   |             |                  | 1177   | 812             | 41 600                 |
| A 5       | 47    | F    | 10                   |             |                  | 794    | 464             | 861                    |
| A 6       | 51    | Μ    | 9,7                  |             |                  | 645    | 338             | 5 930                  |
| 001       | 52    | М    | 10,9                 |             |                  | 821    | 729             | < 400                  |
| 004       | 68    | Μ    | 10,1                 |             |                  | 1074   | ND              | 7 330                  |
| 009       | 36    | М    | 7,9                  |             |                  | 1119   | 852             | 1 280                  |
| 010       | 40    | F    | 8                    |             |                  | 1150   | 1025            | < 400                  |
| 014       | 37    | М    | 9,2                  |             |                  | 593    | ND              | 5 390                  |
| 017       | 46    | М    | 20,1                 |             |                  | 694    | ND              | 655                    |
| Média     | 46,1  |      | 10,8                 |             |                  | 896    | 652             | 758                    |
| AV-AR     | Г     |      |                      |             |                  |        |                 |                        |
| Α7        | 46    | М    | 12,9                 | ZDV/3TC/IDV | 10,5             | 616    | 240             | < 400                  |
| A 15      | 44    | М    | 8                    | ZDV/3TC/IDV | 6,4              | 624    | 200             | < 400                  |
| A 24      | 44    | F    | 5                    | ZDV/3TC/EFV | 2.5              | 374    | 150             | < 400                  |

ZDV/3TC/EFV

ZDV/3TC/EFV

ZDV/3TC/EFV

ZDV/3TC/EFV

ZDV/DdI

ZDV/3TC/EFV

ZDV/3TC/NFV

---

2,5

1,2

5,3

7,9

5,1

2,8

552

303

360

403

752

657

| Tabela 5 - | Características | dos | pacientes l | $HIV^+$ |
|------------|-----------------|-----|-------------|---------|
|            |                 |     |             |         |

3,1

3

13,1

8,3

5,2

2,8

2,8

6,4

Μ

Μ

Μ

F

Μ

Μ

Μ

---

1,4 413 249 < 400 **4,6 505 222 ---**

66

continua

307 < 400

303 < 400

< 400

< 400

< 400

< 400

13

198

297

258

| Pacientes | Idade | Sexo | Tempo de<br>infecção | ART             | Tempo sob<br>ART | CD4/µL | Nadir<br>CD4/µL | CV do HIV<br>Cópias/mL |
|-----------|-------|------|----------------------|-----------------|------------------|--------|-----------------|------------------------|
| VI-ART    |       |      |                      |                 |                  |        |                 |                        |
| A 9       | 51    | М    | 16,8                 | 3TC/D4T/IDV     | 8                | 329    | 209             | 6 500                  |
| A 14      | 37    | М    | 1,9                  | ZDV/3TC/EFV     | 1,5              | 541    | 297             | 19 600                 |
| A 18      | 37    | М    | 4,4                  | ZDV/3TC/LPV/RTV | 4,1              | 277    | 133             | 19 900                 |
| A 25      | 41    | М    | 9,2                  | ZDV/3TC/LPV/RTV | 9                | 454    | 226             | 31 000                 |
| A 38      | 24    | М    | 10,3                 | ZDV/3TC/EFV     | 10               | 524    | 168             | 12 600                 |
| A 45      | 41    | М    | 5,1                  | ZDV/3TC/LPV/RTV | 5,1              | 391    | 52              | 30 900                 |
| A 63      | 35    | М    | 4,9                  | ZDV/3TC/EFV     | 4,6              | 579    | 224             | 2 260                  |
| A 70      | 36    | М    | 9,2                  | ZDV/3TC/NVP     | 8,8              | 680    | 273             | 25 300                 |
| A 73      | 40    | М    | 8,4                  | ZDV/3TC/EFV     | 3,3              | 456    | 297             | 14 200                 |
| A 75      | 38    | М    | 3,5                  | ZDV/3TC/EFV     | 1,1              | 489    | 251             | 82 200                 |
| Média     | 38    |      | 7                    |                 | 5,6              | 472    | 213             | 24 446                 |
| VI sem /  | ART   |      |                      |                 |                  |        |                 |                        |
| A 26      | 55    | F    | 3,3                  |                 |                  | 474    | 291             | 17 100                 |
| A 28      | 32    | М    | 4                    |                 |                  | 435    | 314             | 20 100                 |
| A 40      | 35    | М    | 6                    |                 |                  | 557    | 430             | 111 000                |
| A 54      | 29    | F    | 2,3                  |                 |                  | 565    | 565             | 78 100                 |
| A 60      | 32    | М    | 3,1                  |                 |                  | 601    | 429             | 72 200                 |
| A 64      | 38    | М    | 4,3                  |                 |                  | 452    | 348             | 698 000                |
| A 66      | 39    | М    | 2                    |                 |                  | 372    | 325             | 70 600                 |
| A 71      | 42    | М    | 3                    |                 |                  | 572    | 432             | 66 800                 |
| A 74      | 38    | Μ    | 3,5                  |                 |                  | 452    | 452             | 30 500                 |
| Média     | 38    |      | 3,5                  |                 |                  | 498    | 398             | 129 378                |

**Tabela 5** - Características dos pacientes HIV<sup>+</sup> (continuação)

continua

| Pacientes     | Idade    | Sexo | Tempo de<br>infecção | ART | Tempo sob<br>ART | CD4/µL            | Nadir<br>CD4/µL | CV do HIV<br>Cópias/mL |
|---------------|----------|------|----------------------|-----|------------------|-------------------|-----------------|------------------------|
| VI-RI         |          |      |                      |     |                  |                   |                 |                        |
| 1043          | 35       | Μ    | 0,04                 |     |                  | 591               | 591             | 54 700                 |
| 1133          | 25       | Μ    | 0,06                 |     |                  | 742               | ND              | 82 100                 |
| 1145          | 25       | М    | 0,32                 |     |                  | 630               | 630             | 106 000                |
| 2030          | 23       | Μ    | 0,05                 |     |                  | 546               | 546             | 53 000                 |
| 1052          | 27       | Μ    | 0,63                 |     |                  | 514               | ND              | 79 100                 |
| 1096          | 32       | Μ    | 0,12                 |     |                  | 604               | 604             | 84 100                 |
| 2016          | 28       | Μ    | 0,04                 |     |                  | 375               | 375             | 62 900                 |
| 1057          | 31       | Μ    | 0,02                 |     |                  | 693               | ND              | 334 000                |
| 2046          | 27       | Μ    | 0,19                 |     |                  | 585               | ND              | 132 000                |
| 1144<br>Módia | 43<br>30 | Μ    | 0,44<br><b>0 2</b>   |     |                  | 588<br><b>587</b> | 588<br>556      | 311 000                |
| CONTR         | OLAD     | OR   | ·                    |     |                  |                   |                 |                        |
| 1022          | 24       | Μ    | 0,9                  |     |                  | 437               | 437             | 1 370                  |
| 1041          | 39       | Μ    | 0,9                  |     |                  | 518               | 450             | 533                    |
| 1089          | 39       | Μ    | 1                    |     |                  | 1146              | 695             | 3 020                  |
| 1060          | 42       | Μ    | 2,3                  |     |                  | 991               | 635             | 606                    |
| 1068          | 48       | Μ    | 1,7                  |     |                  | 856               | 721             | 1 840                  |
| 1034          | 25       | Μ    | 1,6                  |     |                  | 640               | 507             | <400                   |
| 2044          | 31       | F    | 0,3                  |     |                  | 564               | 564             | <400                   |
| 1123          | 32       | Μ    | 0,8                  |     |                  | 562               | 562             | 784                    |
| 1122          | 33       | Μ    | 0,8                  |     |                  | 1043              | 808             | <400                   |
| 2017          | 41       | Μ    | 1                    |     |                  | 518               | 518             | <400                   |
| 1098          | 31       | М    | 0,7                  |     |                  | 810               | 654             | <400                   |
| 1138          | 33       | Μ    | 0,7                  |     |                  | 860               | 566             | <400                   |
| Média         | 35       |      | 1,06                 |     |                  | 745               | 593             | 641                    |

**Tabela 5** - Características dos pacientes HIV<sup>+</sup> (conclusão)

A idade e o tempo de infecção foram apresentados em anos. ART, terapia anti-retroviral; ZDV, zidovudina; 3TC, lamivudina; D4T, estavudina; LPV, lopinavir; RTV, ritonavir; NFV, nelfinavir; NVP, nevirapina; EFV, efavirenz; IDV, indinavir; ddl, didanosina; Carga Viral < 400 cópias/mL = indetectável; ND: dados não disponibilizados

## 4.2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup> E T CD8<sup>+</sup> *NAIVE* E DE MEMÓRIA

A Figura 6 apresenta uma análise comparativa das diferentes subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 6A) e T CD8<sup>+</sup> (Figura 6B). Foram incluídos nesta análise o grupo de indivíduos controles sadios e os seis grupos de pacientes HIV<sup>+</sup>: LTNP, AV-ART, VI-ART, VI sem ART, VI RI e CONTROLADOR. As quatro subpopulações de linfócitos T foram classificadas fenotipicamente com base na expressão das moléculas de superfície CCR7 e CD45RA. A nomenclatura utilizada foi: *naive* - N (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), memória central – TCM (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), memória efetora – TEM (CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>).

A análise do percentual das subpopulações de linfócitos T dos grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> foi realizada com base no grupo de indivíduos controles sadios. Para essa análise consideramos apenas a condição não-estimulada, isto é, o controle negativo do estudo (DMSO), para todos os indivíduos. Dessa forma, pudemos analisar a distribuição das subpopulações de linfócitos modulada apenas pela infecção do HIV nos diferentes grupos clínicos avaliados em relação aos indivíduos controles sadios não-infectados.

No compartimento T CD4<sup>+</sup>, para os indivíduos controles sadios e LTNP houve uma distribuição homogênea entre as subpopulações fenótipo *naive*,

TCM e TEM e TEMRA representou o menor subgrupo celular (Figura 6A). Para o grupo VI-ART a maior subpopulação foi a de células com fenótipo naive, seguida por TEM, TCM e TEMRA (Figura 6A). Os pacientes AV-ART e VI sem ART apresentaram um padrão distinto da distribuição dessas subpopulações celulares, contudo também para estes dois grupos, a exemplo dos grupos citados acima, TCM e TEMRA representaram os menores percentuais (Figura 6A). Os grupos de pacientes recém-infectados, isto é, VI-RI e CONTROLADOR possuíam uma distribuição percentual homogênea entre as subpopulações naive, TCM e TEM, sendo o percentual de TCM ligeiramente maior (Figura 6A). Para VI-RI e CONTROLADOR, assim como ocorreu com os demais grupos, as TEMRA constituíram a menor subpopulação (Figura 6A). É válido ressaltar que esses dois grupos de pacientes apresentavam as menores médias de tempo de infecção pelo HIV dentre todos os grupos infectados incluídos no estudo, sendo estas 0,2 ano (variando de 0,02 a 0,44 ano) e 1,06 anos (variando de 0,3 a 2,3 anos), respectivamente (Tabela 5). Portanto, estes dados são sugestivos de que no início da infecção pelo HIV ocorre uma maior diferenciação para células TCM e o aumento no percentual de TCM parece ser importante para o controle da infecção, embora esse percentual diminua na infecção crônica conforme se observa nos demais grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> do estudo, nos quais o percentual de TCM só é maior que o de TEMRA (Figura 6A).

Comparamos o percentual de cada subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre cada um dos grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> e o grupo de indivíduos controles sadios, visto que esses indivíduos apresentam a distribuição esperada dessas subpopulações de linfócitos T na ausência do vírus HIV. Em relação ao grupo de controles sadios, estavam estatisticamente aumentados o percentual de TCM CD4<sup>+</sup> nos grupos VI-RI (P = 0,036) e CONTROLADOR (P = 0,01), o percentual de TEM CD4<sup>+</sup> no grupo VI sem ART (P = 0,004) e o percentual de TEMRA nos LTNP (P = 0,025) e VI sem ART (P = 0,026) (Figura 6A). Por outro lado, estavam diminuídas a subpopulação *naive* T CD4<sup>+</sup> nos grupos VI sem ART (P = 0,008) e VI-RI (P = 0,044) e a subpopulação TCM CD4<sup>+</sup> nos VI sem ART (P = 0,008) (Figura 6A). É válido ressaltar que o grupo CONTROLADOR apresentou o maior percentual TCM CD4<sup>+</sup> dentre todos os grupos do estudo e, este percentual diferiu estatisticamente do percentual observado nos LTNP (P = 0,008), AV-ART (P = 0,022), VI-ART (P = 0,002), VI sem ART (P < 0,001), além dos controles sadios já mencionados acima (Figura 6A).

No compartimento celular T CD8<sup>+</sup>, as células *naive* são predominantes no grupo de indivíduos controles sadios, sendo seguidas em número percentual pelas TEM, TEMRA e TCM (Figura 6B). Para todos os grupos de pacientes HIV<sup>+</sup>, a maior subpopulação T CD8<sup>+</sup> foi TEM (34-48%). As TEM foram seguidas em número percentual: (1) pelas *naive*, TEMRA e TCM para os grupos LTNP e AV-ART; (2) pelas TEMRA, *naive* e TCM para os VI-ART; (3) pelas TCM, *naive* e TEMRA para os VI sem ART; (4) pelas TCM, TEMRA e *naive* para os VI-RI e (5) pelas TEMRA, TCM e *naive* para o grupo CONTROLADOR (Figura 6B).

No compartimento T CD8<sup>+</sup>, a maioria das diferenças estatísticas entre os grupos HIV<sup>+</sup> e os controles sadios foi observada dentro do compartimento

*naive* (Figura 6B). O percentual de células *naive* T CD8<sup>+</sup> estava significativamente diminuído em relação aos controles sadios em todos os grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> do presente estudo: LTNP (P = 0,002), AV-ART (P = 0,01), VI-ART (P = 0,003), VI sem ART (P = 0,001), VI-RI (P = 0,001) e CONTROLADOR (P < 0,001) (Figura 6B). Por outro lado a subpopulação TCM CD8<sup>+</sup> estava significativamente aumentada em relação aos indivíduos controles sadios nos grupos LTNP (P = 0,019), VI-RI (P = 0,01) e CONTROLADOR (P = 0,008) (Figura 6B), bem como a subpopulação TEM CD8<sup>+</sup> nos grupos VI-RI (P = 0,0277) e CONTROLADOR (P = 0,0346) e TEMRA CD8<sup>+</sup> no grupo CONTROLADOR (P = 0,039) quando comparado ao grupo de indivíduos controles sadios (Figura 6B).

De modo geral, no compartimento T CD8<sup>+</sup>, nos chamou a atenção o fato de termos observado uma diminuição da população *naive* nos grupos de pacientes infectados pelo HIV e, por outro lado, um aumento nas subpopulações de memória de alguns grupos de pacientes quando comparados aos controles sadios. Isso sugere uma necessidade de diferenciação das células *naive* em células de memória desencadeada pela infecção pelo HIV.





ART - pacientes HIV<sup>+</sup> virêmicos sob ART, VI sem ART - pacientes HIV<sup>+</sup> virêmicos virgens de terapia anti-retroviral, VI-RI - pacientes HIV<sup>+</sup> virêmicos recém-infectados e virgens de terapia anti-retroviral e CONTROLADOR - pacientes HIV<sup>+</sup> capazes de controlar a infecção e virgens de terapia anti-retroviral. Valores de P estatisticamente significantes são representados por (\*) para P < 0,05, por (\*\*) para P < 0,01 e (\*\*\*) para P < 0,001

## 4.3. ANÁLISE FUNCIONAL DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup> DE MEMÓRIA HIV-ESPECÍFICOS

Com o objetivo de investigar a capacidade funcional das subpopulações de memória TCM, TEM e TEMRA em produzir citocinas em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1 identificado pelo nosso grupo, células mononucleares do sangue periférico de pacientes HIV<sup>+</sup> foram estimuladas com o *pool* HIV e a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 foi detectada após 12 horas. A Figura 7 apresenta os resultados obtidos quanto à freqüência de linfócitos IFN- $\gamma^+$ , IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> e IL-2<sup>+</sup> em resposta ao estímulo com o *pool* de peptídeos do HIV-1 para cada subpopulação T CD4<sup>+</sup> de memória.

No compartimento T CD4<sup>+</sup> dos seis grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> a resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1 foi polifuncional, sendo possível observar os três padrões distintos de secreção de IFN- $\gamma$  e IL-2, de modo freqüente, em cada uma das subpopulações de memória avaliadas (Figura 7).

Em relação às TCM CD4<sup>+</sup> o que mais nos chamou a atenção foi o prejuízo da secreção de citocinas observado no grupo de pacientes VI-ART. Nestes pacientes as TCM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  estavam significativamente diminuídas em relação ao grupo CONTROLADOR (P = 0,024) (Figura 7A). Também estava diminuída, nos VI-ART, a freqüência de TCM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> em relação aos pacientes AV-ART (P = 0,045) e VI-RI (P = 0,001) (Figura 7B), bem como, a freqüência de TCM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> em relação aos LTNP (P = 0,004), AV-ART (P = 0,004), VI-RI (P = 0,003) e CONTROLADOR (P = 0,002) (Figura 7C). O grupo de pacientes VI-RI apresentou aumento significativo na freqüência de células TCM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> quando comparado aos grupos VI sem ART (P = 0,039) e CONTROLADOR (P = 0,025) (Figura 7B) e na frequência de células IL-2<sup>+</sup> em relação aos VI sem ART (P = 0,007) (Figura 7C).

No subcompartimento TEM CD4<sup>+</sup>, é interessante observar que os pacientes LTNP apresentaram um maior percentual de TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em relação aos AV-ART (P = 0,014), VI-ART (P = 0,026) e VI sem ART (P = 0,039) (Figura 7D). As TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> também estavam significativamente diminuídas em VI-ART (P = 0,014) e VI-RI (P = 0,022) comparados aos LTNP (Figura 7E). Além do prejuízo na freqüência de TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  e TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup>, os VI-ART apresentaram ainda prejuízo no percentual de TEM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> quando comparados ao grupo CONTROLADOR (P = 0,028) (Figura 7F).

Semelhante ao observado no compartimento TEM, os pacientes LTNP também apresentaram aumento significativo de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em relação a três dos demais grupos de indivíduos HIV<sup>+</sup> do estudo: AV-ART (P = 0,026), VI sem ART (P = 0,003) e VI-RI (P = 0,006) (Figura 7G). Em contraste, nos VI sem ART, a frequência de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ , além de

está diminuída em relação aos LTNP, estava diminuída também em relação aos AV-ART (P = 0,027), VI-ART (P = 0,011) e CONTROLADOR (P = 0,018) (Figura 7G). É interessante notar que, os VI-RI apresentaram diminuição nos percentuais de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em relação aos mesmos grupos que os VI sem ART: AV-ART (P = 0,032), VI-ART (P = 0,022) e CONTROLADOR (P = 0,016) (Figura 7G). É válido lembrar que os grupos VI sem ART e VI-RI são aqueles com as maiores cargas virais do HIV-1 no plasma (Tabela 5), o que sugere um possível papel das TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  no controle da replicação do HIV-1. Os VI sem ART apresentaram ainda uma redução estatisticamente significativa na frequência de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> quando comparados aos indivíduos VI-ART (P = 0,039) (Figura 7H). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> do estudo em relação à freqüência de TEMRA CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> (Figura 7I).







Figura 7: Freqüência de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> respondedores ao pool de peptídeos do HIV-1 em PBMC de pacientes **HIV<sup>+</sup>.** PBMC foram estimuladas com 5 µM do *pool* de peptídeos do HIV-1 e avaliadas por citometria de fluxo quanto a presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T  $CD8^+$  secretores de citocinas, sendo analisados 5 x 10<sup>5</sup> eventos. Os dados são expressos como % de subpopulações de linfócitos T. A mediana é mostrada como uma barra horizontal para cada conjunto de dados. Todos os valores de produção de citocinas de células estimuladas com pool de peptídeos HIV-1 foram descontados dos valores obtidos na presença de DMSO. LTNP – Long-term non-progressors (não-progressores), AV-ART – Avirêmicos-ART, VI-ART – Virêmicos-ART e VI sem ART – Virêmicos sem ART, VI-RI – Virêmicos-recém infectados e CONTROLADOR. Valores ≥ 0,01% são considerados positivos. **A**. TCM CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ ; **B**. TCM CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^*$ /IL-2<sup>+</sup>, **C**. TCM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>; **D**. TEM CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^*$ ; **E**. TEM CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^*$ /IL-2<sup>+</sup>; **F**. TEM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>; **G**. TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ ; **H**. TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup>; I. TEMRA CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>. Valores de P estatisticamente significantes são representados por (\*) para P < 0.05 e por (\*\*) para P < 0.01.

### 4.4. ANÁLISE FUNCIONAL DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD8<sup>+</sup> DE MEMÓRIA HIV-ESPECÍFICOS

Dentro do compartimento T CD8<sup>+</sup>, o principal perfil de secreção de citocinas apresentado pelas subpopulações de memória específicas para o *pool* de peptídeos do HIV-1 identificado pelo nosso grupo foi IFN- $\gamma^+$ , seguido pelo perfil IL-2<sup>+</sup> e por último pelo perfil IFN- $\gamma^+/IL-2^+$  (Figura 8).

Em relação à subpopulação TCM CD8<sup>+</sup>, os pacientes VI-ART apresentaram um maior percentual de TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  tanto em relação aos AV-ART (P = 0,007) quanto em relação aos VI sem ART (P = 0,022) e VI-RI (P = 0,012) (Figura 8A). Estes por sua vez, também tinham o percentual de TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  diminuído em relação a mais dois outros grupos: LTNP (P = 0,038) e CONTROLADOR (P = 0,035) (Figura 8A). Não houve diferença estatística entre os grupos HIV<sup>+</sup> quanto ao percentual de TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> (Figura 8B). É interessante observar que o grupo de pacientes em falha terapêutica (VI-ART) apresenta diminuição na frequência de células TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> em relação a outros três grupos HIV<sup>+</sup>: LTNP (P = 0,032), VI-RI (*P* = 0,026) e CONTROLADOR (*P* = 0,005) (Figura 8C). Portanto, a resposta HIV-específica das TCM CD8<sup>+</sup> dos VI-ART foi quase exclusivamente constituída por células secretoras de IFN- $\gamma$ , havendo apenas dois dos 10 pacientes com TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> e apenas um dos 10 pacientes com TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> e apenas um dos 10 pacientes com TCM CD8<sup>+</sup> IE-2<sup>+</sup>, ou seja, esses indivíduos apresentam deficiência na frequência de células TCM CD8<sup>+</sup> secretoras de IL-2 (Figura 8A-C).

Para o subgrupo de memória TEM CD8<sup>+</sup>, da mesma forma que para as TCM CD8<sup>+</sup> supracitadas, foi observada diferença estatística envolvendo os diferentes grupos HIV<sup>+</sup> apenas para as freqüências de TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  e TEM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> (Figura 8D-F). Os percentuais de TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  estavam diminuídos nos VI-RI quando comparados aos LTNP (P = 0,009) e VI-ART (P = 0,012) (Figura 8D). Para os VI-ART, semelhante ao que ocorreu para o subgrupo TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>, foi nítido o prejuízo na freqüência de células secretoras de IL-2 específicas para o *pool* de peptídeos do HIV-1 testado no nosso estudo dentro do subgrupo TEM (Figura 8F). Linfócitos TEM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> estavam significativamente reduzidos nos VI-ART em relação a dois outros grupos de pacientes HIV<sup>+</sup>: LTNP (P = 0,018) e CONTROLADOR (P = 0,04) (Figura 8F).

Dentro da subpopulação TEMRA CD8<sup>+</sup>, de maior relevância, observamos que os indivíduos LTNP possuíam um percentual

significativamente maior de TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em relação a quatro dos cinco demais grupos de indivíduos HIV<sup>+</sup>: AV-ART (P = 0,001), VI-ART (P = 0,002), VI sem ART (P < 0,001) e VI-RI (P < 0,001) (Figura 8G). Em oposição aos LTNP, os VI sem ART apresentaram freqüências de TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  reduzidas em relação aos grupos AV-ART (P = 0,033), VI-ART (P = 0,022) e CONTROLADOR (P = 0,014) além dos LTNP citados acima (Figura 8G). No grupo VI-RI o percentual de TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  estava diminuído em relação ao grupo CONTROLADOR (P = 0,037) (Figura 8G). Células TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> não diferiram estatisticamente entre os grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> (Figura 8H). Uma redução na freqüência de TEMRA CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> foi detectada apenas nos VI-ART em relação aos LTNP (P = 0,014) (Figura 8I).






< 0,001.

Figura 8: Fregüência de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> respondedores ao pool de peptídeos do HIV-1 em PBMC de pacientes **HIV<sup>+</sup>.** PBMC foram estimuladas com 5 µM do *pool* de peptídeos do HIV-1 e avaliadas por citometria de fluxo quanto a presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T  $CD8^+$  secretores de citocinas, sendo analisados 5 x 10<sup>5</sup> eventos. Os dados são expressos como % de subpopulações de linfócitos T. A mediana é mostrada como uma barra horizontal para cada conjunto de dados. Todos os valores de produção de citocinas de células estimuladas com pool de peptídeos HIV-1 foram descontados dos valores obtidos na presença de DMSO. LTNP – Long-term non-progressors (não-progressores), AV-ART – Avirêmicos-ART, VI-ART – Virêmicos-ART e VI sem ART – Virêmicos sem ART, VI-RI – Virêmicos-recém infectados e CONTROLADOR. Valores ≥ 0,01% são considerados positivos. **A**. TCM CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ ; **B**. TCM CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma^*$ /IL-2<sup>+</sup>, **C**. TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>; **D**. TEM CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma^*$ ; **E**. TEM CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma^*$ /IL- $2^+$ ; **F**. TEM CD8<sup>+</sup> IL- $2^+$ ; **G**. TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ ; **H**. TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ /IL- $2^+$ ; I. TEMRA CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>. Valores de *P* estatisticamente significantes são representados por (\*) para P < 0.05, por (\*\*) para P < 0.01 e por (\*\*\*) para P

### 4.5. CORRELAÇÃO ENTRE A FREQÜÊNCIA DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA SECRETORES DE CITOCINAS E A CARGA VIRAL DO HIV-1

Considerando que os linfócitos T de memória funcionais são importantes para a manutenção da imunidade do indivíduo, investigamos a existência de correlação entre a carga viral do HIV-1 e as freqüências de células de memória secretoras de citocinas. Para esta análise foram considerados cada um dos três perfis de secreção de citocinas, IFN- $\gamma^+$ , IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> e IL-2<sup>+</sup> isoladamente ou a produção total de IFN- $\gamma$  obtida pela soma das células IFN- $\gamma^+$  e IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup>, aqui denominadas IFN- $\gamma^+$  total, ou a produção total de IL-2 obtida pela soma das células IL-2<sup>+</sup> e IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup>, aqui denominadas IL-2<sup>+</sup> total. O grupo de pacientes AV-ART não foi incluído nesta análise pelo fato de que todos os indivíduos apresentavam carga viral indetectável (Tabela 5). Considerando os demais grupos HIV<sup>+</sup> isoladamente, em VI-ART, VI-RI e CONTROLADOR nenhum dos perfis de secreção de citocinas mencionados acima para as três subpopulações de memória TCM, TEM e TEMRA CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentaram correlação com a carga viral do HIV-1 destes pacientes. Contudo, de forma interessante, para o grupo LTNP a carga viral do HIV-1 se correlacionou negativamente com a freqüência de TCM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> (R = -0,8; P = 0,034) (Figura 9A). O mesmo ocorreu para o grupo VI sem ART, no que diz respeito à freqüência de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> (R = -0,7; P = 0,031) (Figura 9B) e de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  total (R = -0,7; P = 0,037) (Figura 9C).

Além de investigar a existência de correlação entre a carga viral do HIV-1 e as freqüências de subpopulações de memória HIV-específicas, dentro de cada grupo HIV<sup>+</sup> do estudo, foi também analisado a ocorrência dessa correlação quando consideramos todos os pacientes virêmicos em conjunto, totalizando 42 indivíduos. Estes pacientes virêmicos estavam distribuídos entre os grupos LTNP (n = 7), VI-ART (n = 10), VI sem ART (n = 9), VI-RI (n = 10) e CONTROLADOR (n = 6) (Tabela 5). De forma interessante, houve correlação negativa entre a carga viral do HIV-1 e a freqüência de células secretoras de citocinas em resposta ao *pool* HIV envolvendo as subpopulações TEMRA CD4<sup>+</sup>, TCM CD8<sup>+</sup>, TEM CD8<sup>+</sup> e TEMRA CD8<sup>+</sup>. Entretanto, para esta análise, optamos por excluir um dos 42 pacientes virêmicos, denominado CONTROLADOR 1123, pelo fato do mesmo possuir freqüências bem mais elevadas de TEMRA CD4<sup>+</sup>, TCM CD8<sup>+</sup>, TEM CD8<sup>+</sup> e TEMRA CD8<sup>+</sup> secretoras de IFN- $\gamma^+$ , que as freqüências observadas nos demais pacientes. Assim sendo, considerando os 41 pacientes virêmicos, as correlações envolvendo as subpopulações descritas acima foram mantidas, ou seja, correlacionaram-se negativamente com a carga viral do HIV-1 as freqüências de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (R = -0,5; P < 0,001) (Figura 10A) e TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  total (R = -0,5; P < 0,001) (Figura 10A) e TEMRA CD4<sup>+</sup> e, de TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (R = -0,3; P = 0,039) (Figura 10C), TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  total (R = -0,3; P = 0,038) (Figura 10D), TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (R = -0,3; P = 0,025) (Figura 10E), TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  total (R = -0,3; P = 0,003) (Figura 10G) no compartimento T CD8<sup>+</sup>.

É importante chamar a atenção para o fato de que as correlações obtidas envolvem os três subgrupos de memória TCM, TEM e TEMRA, sugerindo que cada uma destas três subpopulações desempenhe um papel no controle da replicação viral do HIV-1 (Figura 9 e 10).

É importante ressaltar que também foi nosso objetivo investigar, dentro dos compartimentos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, a correlação entre a freqüência de TCM, TEM e TEMRA secretoras de citocinas e o nadir de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Contudo, nenhuma correlação existiu entre esses parâmetros (dados não mostrados).



Figura 9. Correlação entre a freqüência (%) de subpopulações T de memória HIV-específicas e a carga viral do HIV-1 em pacientes LTNP e VI sem ART. Após o estímulo de 12 horas com 5  $\mu$ M do *pool* de peptídeos do HIV-1 foi realizada a reação de citometria de fluxo intracitoplasmática sendo determinada a freqüência das subpopulações de linfócitos T secretores de citocinas e a existência de correlação entre estas freqüências e a carga viral do HIV-1. **A.** TCM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> dos pacientes HIV<sup>+</sup> LTNP que apresentavam carga viral do HIV-1 detectável no plasma; **B**. TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> do grupo VI sem ART; **C**. TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  total do grupo VI sem ART.



Figura 10. Correlação entre a freqüência (%) de subpopulações T de memória HIV-específicas e a carga viral do HIV-1 de pacientes virêmicos. Após o estímulo de 12 horas com 5  $\mu$ M do *pool* de peptídeos do HIV-1 foi realizada a reação de citometria de fluxo intracitoplasmática sendo determinada a freqüência das subpopulações de linfócitos T secretores de citocinas e a existência de correlação entre estas freqüências e a carga viral do HIV-1. **A.** TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ ; **B**. TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  total; **C**. TCM

CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ ; **D.** TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  total; **E.** TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ ; **F.** TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  total; **G.** TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ .

#### 4.6. ANÁLISE FUNCIONAL DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup> DE MEMÓRIA CMV-ESPECÍFICOS

Com objetivo de investigar se o padrão de respostas de produção de IFN-γ e IL-2 pelas subpopulações de linfócitos T de memória era específico para o HIV, avaliamos a produção de citocinas dos linfócitos T de memória em resposta ao Citomegalovírus. Todos os pacientes infectados pelo HIV eram co-infectados pelo CMV.

Na resposta CMV-específica, em relação às TCM CD4<sup>+</sup> estavam presentes células IFN- $\gamma^+$  e células IL-2<sup>+</sup>, contudo células IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> estavam praticamente ausentes em todos os grupos HIV<sup>+</sup> avaliados (Figura 11). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os seis grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> no compartimento TCM CD4<sup>+</sup> (Figura 11A-C). Em relação às TEM CD4<sup>+</sup>, estavam presentes os três perfis de secreção de citocinas estudados. A freqüência de TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em resposta ao *pool* CMV estava aumentada no grupo VI-RI em relação aos grupos AV-ART (P = 0,032) e VI sem ART (P = 0,018) (Figura 11D). Por outro lado, observou-se uma diminuição na freqüência de TEM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> nos pacientes VI-ART em relação aos grupos LTNP (P = 0,026) e CONTROLADOR (P = 0,012) e nos pacientes AV-ART em relação ao grupo CONTROLADOR (P = 0,026) (Figura 11F). Nenhuma diferença estatística ocorreu quanto à freqüência de TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+/IL-2^+$  entre os grupos HIV<sup>+</sup> do estudo (Figura 11E). A

.

maioria das diferenças estatísticas observadas ocorreu no subgrupo TEMRA CD4<sup>+</sup>. Para os pacientes VI sem ART, a freqüência de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  estava diminuída em relação a outros quatro grupos HIV<sup>+</sup> do estudo: LTNP (P = 0,014), AV-ART (P = 0,007), VI-ART (P < 0,001) e VI-RI (P = 0,022) (Figura 11G). A freqüência de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  também estava diminuída nos AV-ART (P = 0,045) quando comparados aos VI-ART (Figura 11G). Os VI-ART, por sua vez apresentaram uma diminuição no percentual de TEMRA CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> (P = 0,006) em relação ao grupo CONTROLADOR (Figura 11I). Não houve diferença estatística quanto à freqüência de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> entre os grupos HIV<sup>+</sup> do estudo assim como ocorreu nos compartimentos TCM CD4<sup>+</sup> e TEM CD4<sup>+</sup> (Figura 11H).

Os dados acima mostraram que em resposta ao *pool* de peptídeos do CMV, as três subpopulações TCM, TEM e TEMRA CD4<sup>+</sup> de pacientes HIV<sup>+</sup> estavam funcionais, sendo capazes de produzir IFN-γ e IL-2.







Figura 11: Fregüência de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> respondedores ao pool de peptídeos do CMV em PBMC de pacientes **HIV<sup>+</sup>.** PBMC foram estimuladas com 5 µM do *pool* de peptídeos do CMV e avaliadas por citometria de fluxo quanto a presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> secretores de citocinas, sendo analisados 5 x 10<sup>5</sup> eventos. Os dados são expressos como % de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. A mediana é mostrada como uma barra horizontal para cada conjunto de dados. Todos os valores de produção de citocinas de células estimuladas com pool de peptídeos CMV foram descontados dos valores obtidos na presença de DMSO. LTNP – Long-term non-progressors (não-progressores), AV-ART – Avirêmicos-ART, VI-ART – Virêmicos-ART e VI sem ART – Virêmicos sem VI-RI – Virêmicos-recém ART. infectados e CONTROLADOR Controladores recém infectados. Valores  $\geq$  0.01% são considerados positivos. **A**. TCM CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ ; **B**. TCM CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup>, **C**. TCM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>; **D**. TEM CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ ; **E**. TEM CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup>; **F**. TEM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>; **G**. TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ ; **H**. TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup>; **I**. TEMRA CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>.

TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>; **H**. TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-2<sup>+</sup>; **I**. TEMRA CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>. Valores de P estatisticamente significantes são representados por (\*) para P < 0,05 e por (\*\*) para P < 0,01.

#### 4.7. ANÁLISE FUNCIONAL DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD8<sup>+</sup> DE MEMÓRIA CMV-ESPECÍFICOS

Quanto às células T CD8<sup>+</sup>, semelhante ao observado para a resposta HIV-específica, predominou a produção de IFN- $\gamma^+$  pelas subpopulações de memória respondedoras ao *pool* CMV, embora células secretoras de IL-2 também tenham sido freqüentemente detectadas (Figura 12). TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  estavam significativamente diminuídas nos VI sem ART quando comparados aos grupos LTNP (P = 0,009), AV-ART (P = 0,014), VI-RI (P = 0,011) e CONTROLADOR (P = 0,043) (Figura 12A). A freqüência destas células também estava diminuída no grupo VI-ART em relação ao grupo VI-RI (P = 0,045) (Figura 12A). Dentro do compartimento de memória TEM CD8<sup>+</sup>, a freqüência de células secretoras de IFN- $\gamma$  também estava diminuída nos VI sem ART em relação aos grupos LTNP (P = 0,039), VI-ART (P =

0,027) e VI-RI (P = 0,007). Além disso, TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  foram mais freqüentes no grupo VI-RI que em LTNP (P = 0,045) (Figura 12D). Os VI sem ART também apresentaram uma diminuição no percentual de TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em relação a todos os demais grupos HIV<sup>+</sup>: LTNP (P < 0.001), AV-ART (P = 0,007), VI-ART (P = 0,011), VI-RI (P = 0,005) e CONTROLADOR (P = 0,019) (Figura 12G). Em relação à secreção de IL-2 por subpopulações de memória T CD8<sup>+</sup> CMV-específicas, de forma interessante, TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> foram significativamente mais frequentes em LTNP em comparação a todos os demais grupos HIV<sup>+</sup>: AV-ART (P = 0,038), VI-ART (P = 0,003), VI sem ART (P = 0,033), VI-RI (P = 0,045) e CONTROLADOR (P = 0,024) (Figura 12C). TEM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> CMVespecíficas também estavam aumentadas em LTNP guando comparados aos VI-ART (P = 0,032) (Figura 12F). Da mesma forma, a frequência de TEMRA CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> encontrava-se aumentada nos grupos LTNP (P = 0.007) e CONTROLADOR (P = 0,027) quando comparados ao grupo AV-ART (Figura 12I). Semelhante ao observado para o compartimento T CD4<sup>+</sup>, as subpopulações TCM, TEM e TEMRA CD8<sup>+</sup> secretoras simultâneas de IFN-y e IL-2 não diferiram estatisticamente entre os grupos HIV<sup>+</sup> na resposta CMVespecífica (Figura 12B, 12E e 12H).

De modo geral, observamos escassez de células produtoras de IFN-γ<sup>+</sup> na resposta CMV-específica de VI sem ART dentro das três subpopulações de memória T CD8<sup>+</sup> investigadas quando comparados aos demais grupos HIV<sup>+</sup>.







Figura 12: Fregüência de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> respondedores ao pool de peptídeos do CMV em PBMC de pacientes **HIV<sup>+</sup>.** PBMC foram estimuladas com 5 µM do *pool* de peptídeos do CMV e avaliadas por citometria de fluxo quanto a presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> secretores de citocinas, sendo analisados 5 x 10<sup>5</sup> eventos. Os dados são expressos como % de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. A mediana é mostrada como uma barra horizontal para cada conjunto de dados. Todos os valores de produção de citocinas de células estimuladas com pool de peptídeos CMV foram descontados dos valores obtidos na presença de DMSO. LTNP – Long-term non-progressors (não-progressores), AV-ART – Avirêmicos-ART, VI-ART – Virêmicos-ART e VI sem ART – Virêmicos sem VI-RI – Virêmicos-recém infectados ART. e CONTROLADOR Controladores recém infectados. Valores  $\geq$  0,01% são considerados positivos. **A**. TCM CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ ; **B**. TCM CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup>, **C**. TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>; **D**. TEM CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ ; **E**. TEM CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup>; **F**. TEM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>; **G**. TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ ; **H**. TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup>; **I**. TEMRA CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>. Valores de P estatisticamente significantes são representados por (\*) para P < 0,05 e por (\*\*) para P < 0,01.

# 4.8. COMPARAÇÕES ENTRE AS RESPOSTAS DE SUBPOPULAÇÕES DE MEMÓRIA T CD4<sup>+</sup> E T CD8<sup>+</sup> ESPECÍFICAS PARA O *POOL* DE PEPTÍDEOS DO HIV-1 E PARA O *POOL* DE PEPTÍDEOS DO CMV

Comparamos a freqüência das subpopulações de linfócitos T de memória específicos para o *pool* de peptídeos do HIV-1 e específicos para o *pool* de peptídeos do CMV em cada grupo de pacientes HIV<sup>+</sup>. Esta análise nos permitiu averiguar se estas subpopulações de linfócitos T produziam IFN- $\gamma$  e IL-2 diferencialmente em resposta aos dois diferentes estímulos antigênicos testados (Figuras 13, 14 e 17).

No compartimento de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, quando somamos as freqüências de cada subpopulação de memória T CD4<sup>+</sup> secretora de IFN-γ

e/ou IL-2 específicas para o *pool* de peptídeos do HIV-1 e do CMV e calculamos o percentual destas células para cada perfil de secreção de citocinas, observamos que a freqüência de células produtoras de IFN-γ e IL-2 nas respostas HIV-específica e CMV-específica no compartimento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram semelhantes nos seis grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> (Figuras 13 e 14). Foi possível observar uma polifuncionalidade dos subgrupos de células de memória T CD4<sup>+</sup>, estando presentes células HIV-específicas e CMV-específicas comprometidas com os três diferentes perfis de secreção de IFN-γ e IL-2 (Figuras 13 e 14). Apenas em relação às TCM CD4<sup>+</sup> CMV-específicas do grupo VI-ART não se observou os três perfis de secreção de citocinas, estando completamente ausentes células IFN-γ<sup>+</sup>/IL-2<sup>+</sup> (Figuras 11B e 14). Em ambos os tipos de resposta antígeno-específica, células secretando simultaneamente IFN-γ e IL-2 apareceram menos freqüentemente do que células IFN-γ<sup>+</sup> e células IL-2<sup>+</sup> (Figuras 7, 11, 13 e 14).

Ainda em relação ao compartimento T CD4<sup>+</sup>, quando comparamos as respostas específicas para o *pool* HIV e *pool* CMV dentro de cada grupo de pacientes HIV<sup>+</sup> de nosso estudo, foram observadas diferenças estatísticas em relação à frequência de TCM CD4<sup>+</sup> produtoras de citocinas. As freqüências de TCM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> (P = 0,032) em LTNP (Figura 17A), de TCM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> (P = 0,016) em VI sem ART (Figura 17D), de TCM CD4<sup>+</sup> IL2<sup>+</sup> (P = 0,007) e TCM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> (P < 0,001) em VI-RI (Figura 17E) e de TCM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (P = 0,034) no grupo CONTROLADOR (Figura 17F) foram estatisticamente maiores na resposta HIV-específica que na resposta CMV-específica.

No compartimento de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, guando somamos as freqüências de cada subpopulação de memória T CD8<sup>+</sup> secretora de IFN-γ e/ou IL-2 específicas para o pool de peptídeos do HIV-1 e do CMV e calculamos o percentual destas células para cada perfil de secreção de citocinas, observamos um predomínio de células comprometidas com a produção de IFN- $\gamma$  (Figuras 15 e 16). Dentre todas as TCM CD8<sup>+</sup> secretoras de citocinas em resposta ao nosso *pool* HIV, as TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ correspondiam a 95% em LTNP, a 82% em AV-ART, a 98% em VI-ART, a 89% em VI sem ART, a 83% em VI-RI e finalmente, a 86% em CONTROLADOR (Figura 15). Apenas para o grupo VI sem ART, na resposta CMV-específica, as TCM CD8<sup>+</sup> e as TEMRA CD8<sup>+</sup> estavam mais comprometidas com a produção de  $IL-2^+$ , totalizando 55% e 58%, respectivamente, das células respondedoras ao pool CMV dentro destas subpopulações de memória (Figura 16). Tal fato não foi observado em nenhuma das subpopulações de memória T CD8<sup>+</sup> envolvidas com a resposta ao pool de peptídeos do HIV-1 (Figura 15).

Nossos dados mostraram que apenas para os grupos AV-ART (Figura 18B) e CONTROLADOR (Figura 18F) não houve diferença estatística entre a resposta HIV-específica e CMV-específica no que refere à freqüência de subpopulações de memória T CD8<sup>+</sup> secretoras de citocinas. As TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (P = 0,038) e TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (P = 0,018) em LTNP (Figura 18A), assim como as TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (P = 0,001) em VI-ART (Figura 18C) e as

TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (P = 0,020) em VI sem ART (Figura 18D) foram mais freqüentes na resposta ao *pool* HIV. Por outro lado, as TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> (P = 0,038) em LTNP (Figura 18A) e, as TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (P = 0,026) e TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (P = 0,022) em VI-RI (Figura 18E) foram mais freqüentes na resposta ao *pool* CMV (Figura 18).

Em 100% dos indivíduos HIV<sup>+</sup> integrantes do estudo, os *pools* de peptídeos do HIV-1 e do CMV foram capazes de ativar subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória funcionais no que se refere à produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 (Figuras 7 e 11). Contudo, considerando separadamente cada subpopulação de memória T CD4<sup>+</sup>, na resposta ao *pool* HIV, as TCM CD4<sup>+</sup>, as TEM CD4<sup>+</sup> e as TEMRA CD4<sup>+</sup> secretoras de citocinas estavam ausentes em 12%, 7% e 13%, respectivamente, dos 61 pacientes incluídos no estudo (Figura 7). Na resposta ao *pool* CMV estes percentuais foram de 20%, 10% e 12%, respectivamente (Figura 11). É relevante mencionar que quatro dos sete pacientes que não possuíam TCM CD4<sup>+</sup> secretoras de citocinas em resposta ao *pool* HIV, pertenciam ao grupo VI-ART, ou seja, eram pacientes em falha terapêutica. E, quatro dos oito pacientes sem TEMRA CD4<sup>+</sup> HIV-específicas eram do grupo VI-RI. Este grupo apresenta as maiores cargas virais do HIV-1 dentre todos os grupos HIV<sup>+</sup> estudados (Tabela 5).

No compartimento T CD8<sup>+</sup> o paciente A 57 não apresentou células HIV-específicas e os pacientes A 71 e A 74 não apresentaram células CMV-específicas dentro das três subpopulações de memória. Na resposta ao *pool* HIV as TCM CD8<sup>+</sup>, as TEM CD8<sup>+</sup> e as TEMRA CD8<sup>+</sup> secretoras de IFN- $\gamma$  e/ou IL-2 estavam ausentes em 12%, 7% e 16%, respectivamente, dos 61

104

pacientes incluídos no estudo (Figura 8). Na resposta ao *pool* CMV os percentuais destas mesmas subpopulações foram de 21%, 15% e 13%, respectivamente (Figura 12).

De modo geral, o padrão das respostas HIV-específicas e CMVespecíficas dos seis grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> foram semelhantes entre si conforme se observa nas Figuras 17 e 18.



Figura 13: Percentual das subpopulações de memória T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /IL-2, ou IL-2 respondedoras ao *pool* de peptídeos do HIV-1. As freqüências de células respondedoras aos *pools* de peptídeos do HIV-1, dentro de cada subpopulação de memória T CD4<sup>+</sup>, nos grupos de pacientes HIV<sup>+</sup>, foram somadas e então foi calculado o percentual destas células envolvido com os três diferentes perfis de secreção de IFN- $\gamma$ e IL-2.



Figura 14: Percentual das subpopulações de memória T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /IL-2, ou IL-2 respondedoras ao pool de peptídeos do CMV. As freqüências de células respondedoras ao pool de peptídeos do CMV, dentro de cada subpopulação de memória T CD4<sup>+</sup>, nos grupos de pacientes HIV<sup>+</sup>, foram somadas e então foi calculado o percentual destas células envolvido com os três diferentes perfis de secreção de IFN- $\gamma$ e IL-2.



Figura 15: Percentual das subpopulações de memória T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /IL-2, ou IL-2 respondedoras ao *pool* de peptídeos do HIV-1. As freqüências de células respondedoras aos *pools* de peptídeos do HIV-1, dentro de cada subpopulação de memória T CD8<sup>+</sup>, nos grupos de pacientes HIV<sup>+</sup>, foram somadas e então foi calculado o percentual destas células envolvido com os três diferentes perfis de secreção de IFN- $\gamma$ e IL-2.



Figura 16: Percentual das subpopulações de memória T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /IL-2, ou IL-2 respondedoras ao *pool* de peptídeos do CMV. As freqüências de células respondedoras ao *pool* de peptídeos do CMV, dentro de cada subpopulação de memória T CD8<sup>+</sup>, nos grupos de pacientes HIV<sup>+</sup>, foram somadas e então foi calculado o percentual destas células envolvido com os três diferentes perfis de secreção de IFN- $\gamma$ e IL-2.











Figura 17: Comparação entre as respostas das subpopulações de memória T CD4<sup>+</sup> HIV-específicas e CMV-específicas. As freqüências de células respondedoras aos *pools* de peptídeos do HIV-1 e do CMV, dentro de cada subpopulação de memória, nos grupos de pacientes  $HIV^+$ , foram comparadas entre si. Valores  $\ge 0,01\%$  são considerados positivos. **A**. LTNP; **B**. AV-ART, **C**. VI-ART; **D**. VI sem ART; **E**. VI-RI; **F**. CONTROLADOR. Valores de P estatisticamente significantes são representados por (\*) para P < 0,05, por (\*\*) para P < 0,01 e por (\*\*\*) para P < 0,001.











Figura 18: Comparação entre as respostas das subpopulações de memória T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas e CMV-específicas. As freqüências de células respondedoras aos *pools* de peptídeos do HIV-1 e do CMV, dentro de cada subpopulação de memória, nos grupos de pacientes  $HIV^+$ , foram comparadas entre si. Valores  $\ge 0,01\%$  são considerados positivos. **A**. LTNP; **B**. AV-ART, **C**. VI-ART; **D**. VI sem ART; **E**. VI-RI; **F**. CONTROLADOR. Valores de P estatisticamente significantes são representados por (\*) para P < 0,05 e por (\*\*) para P < 0,01

# 4.9. ANÁLISE FUNCIONAL DA CAPACIDADE DE PROLIFERAÇÃO ANTÍGENO-ESPECÍFICA DAS SUBPOPULAÇÕES *NAIVE* E DE MEMÓRIA DE LINFÓCITOS T ESTIMULADOS COM O POOL DE PEPTÍDEOS DO HIV-1 E DO CMV

Considerando que a capacidade proliferativa de linfócitos T está associada com fenótipo de células T de mémoria e que dados da literatura mostram que a presença de células T CD4<sup>+</sup> HIV-específicas capazes de proliferar em resposta a antígenos de HIV está associada ao controle da replicação do HIV-1 (Rosenberg et al., 1997; Rosenberg et al., 2000), investigamos a capacidade de proliferação das subpopulações de células T de memória de pacientes HIV<sup>+</sup> em resposta ao *pool* de peptídeos de HIV-1 e CMV. Para a avaliação da capacidade proliferativa, células do mononucleares de sangue periférico de seis pacientes HIV<sup>+</sup> (A7, A15, A24, A43, A28 e A54) e de um indivíduo controle sadio (CTR 1) foram marcadas com CFSE e em seguida, estimuladas com o pool de peptídeos do HIV-1 e pool de peptídeos do CMV por cinco dias. Células em presença apenas de DMSO e células estimuladas com SEB foram utilizadas como controle negativo e controle positivo da reação, respectivamente. As células que proliferaram foram então quantificadas e fenotipicamente caracterizadas por citometria de fluxo. A análise da proliferação por CFSE foi feita através do percentual de células divididas que corresponde à percentagem de células da amostra original que se dividiram. Para exemplificar, a Figura 19 mostra os percentuais de proliferação das subpopulações *naive* e de memória T CD4<sup>+</sup> (Figura 19A) e T CD8<sup>+</sup> (Figura 19B) obtidos para o paciente A7, quando as células deste indivíduo foram estimuladas com o *pool* de peptídeos do HIV-1.

Considerando todos os indivíduos incluídos neste ensaio, de modo geral, observamos a existência de um *background* variável na condição DMSO. (Tabelas 6).

Na Tabela 6 observamos o percentual de células divididas dentro do compartimento total T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 e do CMV. Em ambos os compartimentos celulares, para todos os pacientes HIV<sup>+</sup> observamos aumento no percentual das células divididas em resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 e do CMV em comparação à condição DMSO. Dentro dos compartimentos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> totais não houve diferença estatística entre o percentual de células divididas na condição DMSO e esse percentual na condição HIV ou CMV.

Analisamos as células T *naive* e as subpopulações de células T de memória que proliferaram em resposta aos *pools* de peptídeos. Especificamente, dentro do compartimento T CD4<sup>+</sup>, quando as células dos pacientes HIV<sup>+</sup> foram estimuladas com o *pool* de peptídeos do HIV-1, observamos um aumento no percentual de células divididas dentro das subpopulações *naive* e de memória em comparação à condição DMSO para todos os indivíduos (Anexo 13). O mesmo foi observado para o compartimento T CD8<sup>+</sup>, com exceção da subpopulação TEM do paciente

117

A28, para a qual não ocorreu aumento no percentual de células divididas na condição HIV versus DMSO (Anexo 13).

Em relação ao estímulo com o *pool* de peptídeos do CMV, no compartimento T CD4<sup>+</sup>, apenas para um de seis pacientes HIV<sup>+</sup> dentro das subpopulações TCM e TEM e para dois de seis pacientes HIV<sup>+</sup> dentro da subpopulação TEMRA, o percentual de células divididas foi menor que na condição DMSO. No compartimento T CD8<sup>+</sup>, tal fato também ocorreu para dois de seis pacientes HIV<sup>+</sup> dentro da subpopulação TEM (Anexo 13).

Para o indivíduo controle sadio, o percentual de células *naive* e de memória divididas na condição HIV foi menor que na condição DMSO ou este percentual foi baixo quando não houve células proliferantes na condição DMSO. Isso também ocorreu quando as células deste indivíduo foram estimuladas com o *pool* de peptídeos do CMV, exceto para a subpopulação TCM CD8<sup>+</sup>, dentro da qual o percentual de células proliferantes na condição CMV foi maior que na condição DMSO (Anexo 13).

É importante ressaltar que para os pacientes HIV<sup>+</sup> o percentual de células divididas em resposta ao *pool* HIV diferiu estatisticamente do controle DMSO nas subpopulações *naive* (P = 0,013) e TEMRA (P = 0,021) no compartimento T CD4<sup>+</sup> (Figura 20A), bem como em *naive* (P = 0,021) e TEM (P = 0,046) no compartimento T CD8<sup>+</sup> (Figura 20B). A resposta proliferativa CMV-específica foi estatisticamente significativa em relação ao controle DMSO apenas dentro da subpopulação *naive* T CD8<sup>+</sup> (P = 0,032) (Figura 20B).
Em nosso estudo, a marcação das moléculas de superfície CCR7 e CD45RA foi realizada após as células terem permanecido por um período de cinco dias em cultura sob estimulação antigênica, o que pode modificar a expressão dessas e de outras moléculas sobre as subpopulações de linfócitos T de forma dinâmica. Considerando as condições de nosso ensaio de proliferação por CFSE não podemos descartar a possibilidade de que essas células com fenótipo *naive* possam ter sido ativadas *in vitro* e correspondam a células efetoras. Portanto, ressaltamos que a nomenclatura "*naive*" aqui adotada diz respeito apenas à expressão concomitante de CD45RA e CCR7.

Em resumo, observamos que o *pool* de peptídeos do HIV-1 e *pool* de peptídeos do CMV identificados pelo nosso grupo são capazes de induzir proliferação de subpopulações de linfócitos T com fenótipo de células *naive* e de memória de pacientes progressores HIV<sup>+</sup>. É válido ressaltar que os pacientes cujas células foram incluídas nesse ensaio são de grupos clinicamente diferentes, sendo quatro pacientes AV-ART e dois pacientes VI sem ART. É nosso objetivo expandir esses dados pela inclusão de um número maior de indivíduos HIV<sup>+</sup> que nos permita confirmar o potencial de indução de proliferação de nossos peptídeos e comparar as respostas proliferativa entre os diferentes grupos clínicos.



 $T CD4^+$ 



Figura 19: Avaliação do percentual de proliferação antígeno-específica de subpopulações de linfócitos T do paciente A7. Aqui são mostrados os dados representativos da proliferação por CFSE das subpopulações *naive* e de memória de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (A) e T CD8<sup>+</sup> (B) do paciente A7 quando estimulados com o *pool* HIV, *pool* CMV ou SEB. Adicionou-se DMSO ao controle negativo. As PBMC do paciente A7 foram marcadas com CFSE (1,25  $\mu$ M) e estimuladas com peptídeos por 5 dias para análise da proliferação antígeno-específica. Posteriormente, as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD3 APC Cy7, anti-CD4 APC, anti-CD8 PE Cy5, anti-CCR7 PE Cy7 e anti-CD45RA PE. Os números em cada gráfico indicam o percentual de células divididas dentro de cada subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.

|       | TCD4+ |       |      |       |  | TCD8+ |       |       |       |
|-------|-------|-------|------|-------|--|-------|-------|-------|-------|
|       | DMSO  | HIV   | CMV  | SEB   |  | DMSO  | HIV   | CMV   | SEB   |
| CTR 1 | 2,22  | 1,36  | 0,84 | 36,51 |  | 0,84  | 0,53  | 0,91  | 38,55 |
| A7    | 6,68  | 9,51  | 7,08 | 52,88 |  | 6,27  | 7,35  | 6,33  | 34,63 |
| A28   | 6,75  | 10,16 | 9,26 | 30,13 |  | 7,35  | 11,39 | 9,88  | 25,08 |
| A15   | 2,57  | 5,68  | 4,64 | 19,68 |  | 1,87  | 4,77  | 3,22  | 21,11 |
| A24   | 2,76  | 5,49  | 3,22 | 14,04 |  | 2,68  | 5,93  | 3,39  | 12,23 |
| A43   | 4,89  | 7,64  | 6,60 | 21,75 |  | 3,94  | 8,80  | 6,96  | 22,42 |
| A54   | 6,43  | 14,70 | 9,03 | 47,22 |  | 7,08  | 13,96 | 10,35 | 17,71 |

**Tabela 6** - Proliferação por CFSE de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> totais de pacientes HIV+ e indivíduo controle sadio em resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 e do CMV.

Células dos pacientes HIV+ e controle sadio foram marcadas com CFSE (1,25  $\mu$ M) e estimuladas com o pool de peptídeos do HIV-1 (5  $\mu$ M), pool de peptídeos do CMV (5  $\mu$ M) ou SEB (2  $\mu$ g/mL) por 5 dias para análise da proliferação antígeno-específica. Adicionou-se DMSO ao controle negativo. Posteriormente, as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD3 APC Cy7, anti-CD4 APC, anti-CD8 PE Cy5, anti-CCR7 PE Cy7 e anti-CD45RA PE. Os números indicam o percentual de células divididas dentro dos compartimentos totais T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. As áreas em azul indicam as subpopulações onde o percentual de células divididas em resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1, do CMV ou ao SEB superou em pelo menos 2x o percentual de células divididas na condição DMSO.

В



Figura 20: Avaliação do percentual de proliferação de subpopulações de linfócitos T antígeno-específica em células de pacientes HIV+. Células dos pacientes HIV+ foram marcadas com CFSE (1,25  $\mu$ M) e estimuladas com o pool de peptídeos do HIV-1 (5  $\mu$ M) ou pool de peptídeos do CMV (5  $\mu$ M) por 5 dias para análise da proliferação antígeno-específica. Adicionou-se DMSO ao controle negativo para a caracterização fenotípica

das subpopulações *naive* e de memória. *NAIVE* (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>); TCM (CCR7<sup>+</sup>CD45RA-); TEM (CCR7-CD45RA); TEMRA (CCR7-CD45RA<sup>+</sup>). A barra horizontal indica a mediana. **A** - T CD4<sup>+</sup> e **B** - T CD8<sup>+</sup>.

## 5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar fenotípica e funcionalmente subpopulações de células T de memória central (TCM), efetora (TEM) e efetora altamente diferenciada (TEMRA) específicas para um conjunto de epitopos de células T CD4 derivados de següência do consenso B do HIV-1 previamente identificados pelo nosso grupo. Nossos resultados mostraram que esse conjunto de peptídeos do HIV-1 (Fonseca et al., 2006) foi freqüentemente reconhecido pelas subpopulações de memória TCM, TEM e TEMRA de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de pacientes HIV<sup>+</sup> de diferentes grupos clínicos. O conjunto de peptídeos do HIV-1 também foi capaz de induzir proliferação das diferentes subpopulações de linfócitos T de memória. Foram encontradas correlações negativas entre a carga viral do HIV-1 e a frequência das subpopulações de TCM e TEMRA CD4<sup>+</sup> e TCM, TEM e TEMRA CD8<sup>+</sup> secretoras de citocinas. No compartimento T CD4<sup>+</sup>, subpopulações funcionais de linfócitos de memória HIV-específicos, no que se refere à produção de IFN- $\gamma$  e IL-2, foram observadas em 100% dos pacientes HIV<sup>+</sup> estudados. No compartimento T CD8<sup>+</sup>, 60 dos 61 pacientes HIV<sup>+</sup> apresentaram células HIV-específicas. Em conjunto os resultados mostraram que o conjunto de peptídeos do HIV-1 induziu uma resposta de natureza polifuncional no compartimento T CD4<sup>+</sup>, enquanto no compartimento T CD8<sup>+</sup> predominou a secreção de IFN-y.

Em nosso estudo investigamos os percentuais das subpopulações de células T *naive* e de memória TCM, TEM e TEMRA de PBMC de indivíduos

controles sadios e pacientes infectados pelo HIV de diferentes grupos clínicos. No compartimento CD4<sup>+</sup>, observamos que para os indivíduos controles sadios, o maior subgrupo foi o de células com fenótipo naive (37,2%) seguido pelos subgrupos TEM (27,1%), TCM (23,7%) e TEMRA (3,4%). Nos grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> LTNP e VI-ART a distribuição do percentual das subpopulações T CD4<sup>+</sup> foi a mesma que a observada para os indivíduos controles sadios. Contudo, para os demais grupos HIV<sup>+</sup> houve uma distribuição diferente em relação ao tamanho destas subpopulações. Em indivíduos sadios, com base nos mesmos marcadores fenotípicos, Harari et al. (2004b) observaram maior percentagem média na subpopulação TCM (45%), seguida de naive (28%), TEM (24%) e TEMRA (3%). A variação entre os tamanhos das subpopulações nos dois trabalhos pode ser devida à diferença entre o número de indivíduos de cada estudo, uma vez que no trabalho de Harari et al. (2004b) foram inseridos 43 controles sadios, enquanto o nosso estudo incluiu 13 indivíduos. Contudo, existe um ponto em comum entre o trabalho de Harari et al. (2004b) e o nosso: dentre as subpopulações T CD4<sup>+</sup>, as TEMRA apresentaram o menor percentual. Em nosso estudo isso também foi observado para todos os grupos de indivíduos  $HIV^+$  avaliados: LTNP (Md = 5,5%), AV-ART (Md = 3,3%), VI-ART (Md = 5,9%), VI sem ART (Md = 8,3%), VI-RI (Md = 4,3%) e CONTROLADOR (Md = 3,4%). No estudo de Oswald-Ritcher et al. (2007), o percentual mediano de TEMRA CD4<sup>+</sup> foi de apenas 1% em indivíduos sadios (n = 30) e de 8% em pacientes  $HIV^+$  (n = 33). Também neste trabalho, estes percentuais foram os menores em relação às demais subpopulações T CD4<sup>+</sup>. Os autores

\_\_\_\_\_

supracitados destacam um aumento significativo na proporção de TEMRA  $CD4^+$  (P < 0,001) de indivíduos HIV<sup>+</sup> quando comparados aos controles sadios. Tomando todos os 61 pacientes HIV<sup>+</sup> de nosso estudo como um único grupo, a exemplo do observado por Oswald-Ritcher et al. (2007), a proporção de TEMRA CD4<sup>+</sup> estava aumentada de forma significativa em relação ao grupo de indivíduos não infectados pelo HIV (P = 0,037). Portanto, a infecção pelo HIV parece induzir a uma expansão desse subgrupo celular. É válido ressaltar que no trabalho de Oswald-Ritcher et al. (2007) o grupo de pacientes HIV<sup>+</sup> era bastante heterogêneo contendo pacientes sob HAART (79%) e pacientes virgens de terapia anti-retroviral bem como pacientes virêmicos (50%) e pacientes avirêmicos. No nosso estudo, os grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> avaliados foram bem delimitados de acordo com a presença ou não de viremia, se estavam ou não sob terapia anti-retroviral, sendo também considerados a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e o tempo de infecção pelo HIV-1 como descrito na seção 'Resultados'. Analisando os grupos HIV<sup>+</sup> de forma individual, nossos dados mostraram que, em comparação aos indivíduos sadios, as TEMRA CD4<sup>+</sup> estavam estatisticamente aumentadas nos grupos de pacientes LTNP (P = 0,025) e VI sem ART (P = 0,026). Quando dividimos os pacientes infectados pelo HIV de nosso estudo em dois grupos, virêmicos e avirêmicos, em comparação aos indivíduos sadios, o aumento no percentual de TEMRA CD4<sup>+</sup> é significativo apenas no grupo virêmico (n = 42) (P = 0.0261).

Comparando os grupos do estudo entre si o grupo CONTROLADOR apresentou o maior percentual de TCM CD4<sup>+</sup> (34,3%), o qual diferiu estatisticamente dos percentuais observados nos controles sadios (23,7%). LTNP (25,3%), AV-ART (23,3%), VI-ART (18%) e VI sem ART (12%). Isso é interessante, visto que, o grupo CONTROLADOR é constituído por indivíduos que pertencem a uma coorte privilegiada de pacientes recém infectados (tempo médio de infecção = 12,7 meses) capazes de controlar eficazmente a infecção mantendo a carga viral do HIV-1 muito baixa ou indetectável. Portanto, o maior percentual de TCM CD4<sup>+</sup> nos VI-RI e CONTROLADOR em relação aos controles sadios sugere que essa subpopulação é importante para o controle da infecção pelo HIV, provavelmente pela maior demanda de células de memória T CD4<sup>+</sup> logo após a infecção pelo HIV. Todavia, esse aumento parece não ser devidamente mantido nos estágios mais crônicos dessa infecção, conforme os percentuais mostrados acima. Fatores como a exaustão do sistema imune pode ser responsável pela falta de manutenção do tamanho adequado do pool de TCM CD4<sup>+</sup> nos indivíduos HIV<sup>+</sup>. É válido enfatizar que os grupos formados pelos pacientes virêmicos crônicos, ou seja, VI-ART e VI sem ART foram aqueles que apresentaram o menor percentual dessa

Em relação ao compartimento T CD8<sup>+</sup>, dentre as células dos indivíduos sadios, o maior percentual apresentava o fenótipo *naive* (34,1%). Dentre as subpopulações de memória, as TEM corresponderam a 32%, as TEMRA a 14,2% e as TCM a 12,3% dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> destes indivíduos. Nesta mesma linha, Campbell et al. (2001) baseando-se na expressão de CD45RA, CCR7 e CD27 também encontraram um predomínio de TEM

subpopulação celular (TCM CD4<sup>+</sup>).

dentre as células T CD8<sup>+</sup> de memória do sangue periférico de controles sadios, corroborando nossos achados. A literatura é escassa de dados que demonstrem os percentuais de TEM CD8<sup>+</sup> em PBMC de pacientes HIV<sup>+</sup>. Em nosso estudo, para todos os grupos de pacientes HIV<sup>+</sup>, a maior subpopulação T CD8<sup>+</sup> foi TEM (34-48%). Contudo, os grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> de nosso estudo seguiram diferentes padrões de distribuição das demais subpopulações T CD8<sup>+</sup>.

compartimento T CD8<sup>+</sup>, duas observações Dentro do são interessantes, sendo a primeira delas, o fato das TEM possuírem o maior percentual dentre todas as subpopulações T CD8<sup>+</sup> para todos os grupos de indivíduos do estudo e a segunda, o fato das *naive* estarem estatisticamente diminuídas em todos os grupos com infecção pelo HIV quando comparados com os indivíduos controles sadios, conforme mostrado na seção 'Resultados'. Estas duas observações possivelmente ocorreram como efeito da presença do vírus HIV no organismo exigindo a diferenciação das células com fenótipo naive em células de memória TCM e diferenciação destas em células de memória com fenótipo efetor. Essa explicação é fortalecida pelo modelo de diferenciação linear defendido por Sallusto et al. (1999) e Lanzavecchia e Sallusto (2000) para a geração e reabastecimento do compartimento de células T de memória. Ainda em relação ao compartimento T CD8<sup>+</sup> podemos ressaltar que as TEMRA respondem por uma fatia maior dentre as células dos indivíduos sadios e indivíduos HIV<sup>+</sup>, em contraste ao observado para as TEMRA CD4<sup>+</sup>, que constituíram a menor subpopulação T CD4<sup>+</sup> em todos os grupos do estudo. TEMRA CD8<sup>+</sup> foi o menor subgrupo, quando comparado às células *naive*, TCM e TEM, apenas no grupo VI sem ART (9,4%). Para os indivíduos controles sadios (14,2%), LTNP (18,8%), AV-ART (15%) e VI-RI (15,6%) a subpopulação de memória TEMRA CD8<sup>+</sup> foi a terceira subpopulação em tamanho, ao passo que para os VI-ART (18,9%) e CONTROLADOR (18,9%) as TEMRA foram a segunda maior subpopulação CD8<sup>+</sup>. Reforçando esses achados, Champagne et al. (2001) observaram em seus estudos que os percentuais de células TEM CD8<sup>+</sup> bem como de linfócitos T CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> estão aumentados durante a infecção pelo HIV-1.

De forma interessante, observamos que a infecção pelo HIV é capaz de induzir uma mudança na proporção das subpopulações de linfócitos T. No compartimento CD4<sup>+</sup>, essa modulação foi mais evidente nos grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> virgens de terapia anti-retroviral. Conforme mostrado nos nossos resultados, o grupo de pacientes VI sem ART apresentou alteração na proporção de todas as subpopulações T CD4<sup>+</sup> em relação aos indivíduos controles sadios, havendo diminuição das subpopulações *naive* e TCM CD4<sup>+</sup> e, por outro lado, aumento das subpopulações TEM e TEMRA CD4<sup>+</sup>. Também observamos no grupo VI-RI que três das quatro subpopulações T CD4<sup>+</sup> estavam moduladas em relação aos indivíduos sadios do estudo, sendo que a subpopulação *naive* T CD4<sup>+</sup> diminuiu significativamente, ao passo que as TCM e TEMRA aumentaram. Ainda em relação aos indivíduos controles sadios, o grupo CONTROLADOR apresentou aumento no percentual de TEMRA CD4<sup>+</sup>. Entretanto, nenhuma diferença ocorreu na

proporção das subpopulações T CD4<sup>+</sup> nos grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> sob terapia anti-retroviral (ART), ou seja, AV-ART e VI-ART em relação aos controles sadios. Nesse sentido, Perez-Patrigeon et al. (2009) também observaram modulação dos percentuais de subpopulações T CD4<sup>+</sup> oriundas de PBMC de grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> quando comparados a indivíduos não infectados pelo HIV. Avaliando o percentual de *naive*, TCM e TEM CD4<sup>+</sup> em 15 pacientes HIV<sup>+</sup> virêmicos virgens de terapia anti-retroviral (grupo 1) e em 12 pacientes HIV<sup>+</sup> avirêmicos sob HAART (grupo 2), Perez-Patrigeon et al. (2009) verificaram que as TCM CD4<sup>+</sup> do grupo 1 estavam diminuídas em relação aos voluntários sadios (P < 0,05). Os autores verificaram que essa modulação estendia-se ao compartimento CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>, que contém os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, quando avaliaram as subpopulações *naive*, TCM, TEM e TEMRA nos dois grupos de pacientes HIV<sup>+</sup>. Nesse compartimento CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>, tanto em virêmicos quanto em avirêmicos, a subpopulação naive estava diminuída em relação aos sadios (P < 0,001 e P < 0,005, respectivamente). Em nosso estudo, semelhante ao observado por Perez-Patrigeon et al. (2009), a subpopulação naive T CD8<sup>+</sup> também estava significativamente diminuída, em relação aos controles sadios, em todos os grupos HIV<sup>+</sup> avaliados, conforme mencionado anteriormente. Nossos dados mostraram ainda que também as subpopulações T CD8<sup>+</sup> de memória estavam moduladas positivamente em relação aos controles sadios nos grupos de pacientes LTNP, VI-RI e CONTROLADOR. Em LTNP observamos aumento das TCM CD8<sup>+</sup> (P = 0,019), em VI-RI estavam significativamente aumentadas as TCM CD8<sup>+</sup> (P = 0.010) e TEM CD8<sup>+</sup> (P = 0.004) e por fim. no grupo CONTROLADOR, as três subpopulações T CD8<sup>+</sup> de memória estavam aumentadas em relação aos voluntários sadios: TCM CD8<sup>+</sup> (P = 0,0078), TEM CD8<sup>+</sup> (P = 0,0036) e TEMRA CD8<sup>+</sup> (P = 0,0386). O trabalho de Perez-Patrigeon et al. (2009) não incluiu pacientes desses três grupos clínicos, contudo os resultados observados nos dois grupos de pacientes  $HIV^{+}$  do trabalho de Perez-Patrigeon et al. (2009) corroboram os resultados obtidos em nosso estudo, avaliando seis diferentes grupos HIV<sup>+</sup>, no sentido de que permitem afirmar que a infecção pelo HIV é capaz de alterar a proporção dos subgrupos de células T naive e de memória nos indivíduos infectados. O fato de termos observado que a subpopulação naive T CD4<sup>+</sup> estava estatisticamente diminuída nos VI sem ART e VI-RI em relação aos controles sadios pode indicar que está ocorrendo uma maior demanda de diferenciação das células naive em células de memória em decorrência das mais elevadas cargas virais do HIV-1 desses pacientes em relação aos demais pacientes do estudo. Portanto, esse resultado pode ter relação direta com a viremia do HIV nestes indivíduos.

Após analisarmos o fenótipo das subpopulações de linfócitos T, quanto à distribuição percentual, nos diferentes grupos HIV<sup>+</sup> de nosso trabalho, voltamos a nossa atenção para o estudo das subpopulações de memória no que diz respeito à secreção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2. Para essa análise, as células dos sujeitos da pesquisa foram estimuladas com o *pool* de peptídeos do HIV-1 identificados pelo nosso grupo (Fonseca et al., 2006). Primeiramente, observamos que o nosso *pool* de peptídeos do HIV-1 induziu a produção de IFN- $\gamma$  e/ou IL-2 pelas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória de todos os seis diferentes grupos clínicos infectados pelo HIV-1 que integram o presente estudo. Além disso, as respostas no compartimento T CD4<sup>+</sup> foram bem diversificadas, sendo identificados os três perfis de produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 possíveis: células produtoras únicas de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma^+$ ), células produtoras simultâneas de IFN- $\gamma$  e IL-2 (IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup>) e células produtoras únicas de IL-2 (IL-2<sup>+</sup>). Contudo, no compartimento CD4<sup>+</sup>, células IFN- $\gamma^+$  e IL-2<sup>+</sup> HIV-específicas foram, de modo geral, mais freqüentes que células IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> nos seis grupos de pacientes HIV<sup>+</sup>. No compartimento T CD8<sup>+</sup>, TCM, TEM e TEMRA, respondedoras ao nosso *pool* HIV, eram principalmente secretoras de IFN- $\gamma$ . Estes fenótipos de secreção de citocinas, descritos acima, já foram detectados na resposta HIVespecífica de subpopulações T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de memória de pacientes infectados pelo HIV como mostram diversos estudos (Younes et al., 2003; Harari et al., 2004a; Harari et al. 2004b; Harari et al. 2005; Zimmerli et al., 2005: Betts et al., 2006).

As TCM CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas vem sendo associadas com proteção após a depuração de antígenos virais ou imunização (Heller et al., 2007). Ou seja, a imunidade prolongada parece estar a cargo destas células, bem como, a tarefa intensa de reabastecimento contínuo do compartimento de memória (revisado por Lanzavecchia e Sallusto, 2000). Analisando individualmente as subpopulações T CD4<sup>+</sup> de memória, observamos secreção de IFN- $\gamma$  e/ou IL-2 pelas TCM, em resposta ao nosso *pool* de peptídeos do HIV-1, em todos os grupos HIV<sup>+</sup> do presente estudo. Contudo, nossos dados apontam para um prejuízo funcional destas células no grupo

VI-ART: (1) os indivíduos deste grupo apresentaram uma frequência estatisticamente diminuída de TCM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  quando comparados ao grupo CONTROLADOR; (2) os VI-ART também tiveram frequência diminuída de TCM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> em relação aos AV-ART, VI sem ART e VI-RI e, (3) TCM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> também apareceram menos freqüentemente em VI-ART do que em LTNP, AV-ART, VI-RI e CONTROLADOR. Utilizando os mesmos marcadores fenotípicos empregados em nosso estudo, Younes et al. (2003) observaram ausência de TCM CD4<sup>+</sup> em pacientes com o mesmo perfil clínico dos VI-ART de nosso estudo, quando as células desses indivíduos foram estimuladas com peptídeos derivados da proteína Gag do HIV-1. Portanto, aparentemente, independente do estímulo HIV-específico testado, em pacientes com falha terapêutica, como é o caso dos VI-ART, as TCM CD4<sup>+</sup> são incapazes de montar respostas satisfatórias contra o HIV no que diz respeito à produção de IFN- $\gamma$  e IL-2. Com base no exposto acima poderíamos supor ainda que esses pacientes em falha terapêutica não se beneficiariam de uma vacina anti-HIV eficaz, visto que as TCM CD4<sup>+</sup>, prováveis responsáveis pela imunidade protetora prolongada, parecem apresentar uma disfunção em relação à produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 nestes indivíduos. Todavia não podemos afirmar se a diminuição na fregüência de TCM CD4<sup>+</sup> HIV-específicas é causa ou consegüência do pior prognóstico clínico destes indivíduos em relação aos demais grupos HIV<sup>+</sup> de nosso estudo. Chamou-nos também a atenção o fato de termos encontrado uma correlação negativa entre as TCM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> e a carga viral do HIV-1 no grupo de pacientes LTNP (R = -0.8; P = 0.034). Dadas as características

clínicas peculiares e privilegiadas dos LTNP, os quais na ausência de tratamento anti-retroviral, permanecem com contagem de células T CD4<sup>+</sup> estável por vários anos e sem sinais de progressão imunológica para aids (Paroli et al., 2001; revisado por Burger e Poles, 2003), possivelmente as TCM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> podem ter relação ou ainda, contribuir com o controle imunológico da infecção pelo HIV-1 nestes pacientes. De acordo com nossos resultados, diferentemente do observado no compartimento T CD4<sup>+</sup>, ocorreu um aumento significativo na freqüência das TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  dos VI-ART específicas para o pool HIV de nosso estudo em relação aos AV-ART (P = 0,007), VI sem ART (P = 0,022) e VI-RI (P = 0,012). Entretanto, as TCM CD8<sup>+</sup> dos VI-ART, a exemplo do observado para as TCM CD4<sup>+</sup>, apresentaram um defeito funcional quanto à produção de IL-2 HIVespecífica, a qual estava diminuída com significância estatística em comparação a todos os demais grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> do trabalho. Isso ocorreu devido ao fato de que TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> HIV-específicas foram detectadas em apenas um paciente do grupo VI-ART. No geral, linfócitos TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  foram predominantes em todos os grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> avaliados, havendo praticamente inexistência de TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> nestes grupos e baixas freqüências de TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> em resposta ao pool HIV de nosso estudo. Dentre todas as TCM CD8<sup>+</sup> secretoras de citocinas em resposta ao nosso *pool* HIV, o percentual de TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ variou de 82% a 98% nos diferentes grupos HIV<sup>+</sup>. De forma interessante, considerando os pacientes virêmicos de nosso estudo em conjunto, a frequência das TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  se correlacionou negativamente com a carga viral do HIV-1 (R = -0.3; P = 0.039). Corroborando nossos resultados, outros autores também observaram uma baixa freqüência ou até mesmo ausência de células de memória produtoras de IL-2, em resposta a peptídeos do HIV, em pacientes HIV<sup>+</sup> progressores, os quais apresentavam maior freqüência de células produtoras de IFN- $\gamma$  (Zimmerli et al., 2005; Nomura et al., 2006). Estes trabalhos incluíram pacientes HIV<sup>+</sup> progressores independentes da carga viral e da presença ou ausência de tratamento, cujos dados foram analisados conjuntamente. Nesta mesma linha, Betts et al. (2006) observaram elevada produção de IFN- $\gamma$  e baixa produção de IL-2 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> HIV-específicos de 79 pacientes HIV<sup>+</sup> progressores e 9 LTNP, quando investigaram a multifuncionalidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, incluindo a investigação da presença de degranulação, através da mobilização de CD107a, o qual é uma glicoproteína lisossomal de membrana associada com a atividade lítica celular (Kannan et al., 1996) e da investigação da produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 e da produção da quimiocina MIP-1<sup>β</sup>. De acordo com os trabalhos mencionados, baixa produção de IL-2 em resposta a antígenos do HIV por linfócitos T CD8<sup>+</sup> ocorre inclusive em pacientes LTNP os quais são eficientes em montar respostas HIV-específicas efetivas (Zimmerli et al., 2005; Betts et al., 2006). Portanto, as menores freqüências das TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> comparadas às TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em resposta ao nosso *pool* HIV, parece ser devido à característica inerente dos linfócitos Т  $CD8^+$ de produzirem preferencialmente IFN-γ mais do que à ineficiência de nosso estímulo HIVespecífico em induzir altas freqüências de TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>. Contudo, é evidente a escassez de TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> nos VI-ART em relação aos demais grupos de indivíduos HIV<sup>+</sup> do estudo, confirmando um provável defeito funcional da resposta imunológica HIV-específica das TCM destes pacientes.

Em todos os grupos HIV<sup>+</sup> avaliados foi detectada a presença de TEM  $CD4^+$  HIV-específicas secretoras tanto de IFN- $\gamma$  quanto de IL-2 em resposta ao *pool* HIV, sendo que TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> foram menos freqüentes que TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  e TEM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>, semelhante ao observado para as TCM CD4<sup>+</sup>. De forma interessante, observamos que os LTNP apresentaram um aumento significativo de TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em relação aos grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> progressores de nosso estudo, isto é, AV-ART, VI-ART e VI sem ART. As TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> também foram mais freqüentes em LTNP que em VI-ART e VI-RI. Dentre todas as TEM CD4<sup>+</sup> que secretaram citocinas em resposta ao nosso pool HIV, TEM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> foram mais frequentes que TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em quatro dos seis grupos de pacientes HIV<sup>+</sup>: LTNP (47%), AV-ART (69%), VI-ART (59%) e VI-RI (54%). O oposto ocorreu nos VI sem ART e nos CONTROLADOR, nos quais prevaleceram TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  dentre as TEM CD4<sup>+</sup> respondedoras ao *pool* HIV, cujos percentuais foram de 72% e 69%, respectivamente. Nesta mesma linha, estudando a resposta antígeno-específica de células T CD4<sup>+</sup> em PBMC de seis indivíduos LTNP e oito indivíduos HIV<sup>+</sup> avirêmicos sob HAART, estimuladas com Gag p55 do HIV-1, Harari et al. (2005) detectaram linfócitos TEM CD4<sup>+</sup> capazes de secretar tanto IFN-γ quanto IL-2. Entretanto em 11 indivíduos com doença progressiva e virgens de terapia anti-retroviral, as TEM correspondiam a mais de 90% das células T CD4<sup>+</sup> de memória HIVespecíficas e secretavam apenas IFN- $\gamma$ . Portanto, diferentemente dos resultados obtidos por Harari et al. (2005) o pool de peptídeos do HIV-1 de nosso trabalho foi capaz de induzir freqüências detectáveis de células TEM  $CD4^+$  secretoras tanto de IFN- $\gamma$  guanto de IL-2 em todos os grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> do presente estudo, inclusive em pacientes progressores da infecção pelo HIV e virgens de terapia anti-retroviral, ou seja, em VI sem ART. Tal fato pode estar associado à maior diversidade do nosso estímulo antigênico que consistiu de um pool de 18 peptídeos do HIV-1 derivados de diferentes proteínas virais, comprovadamente ligadores de diferentes moléculas HLA-DR. Esse dado é interessante uma vez que a subpopulação TEM CD4<sup>+</sup> vem sendo associada com o desempenho de funções efetoras protetoras imediatas na resposta antígeno-específica (revisado por Lanzavecchia e Sallusto, 2000) e, após a depuração do antígeno, estas células persistem no organismo juntamente com as TCM CD4<sup>+</sup>, realizando vigilância imune sistêmica em órgãos linfóides e em tecidos periféricos nãolinfóides, sendo capazes de responder prontamente em casos de reencontros com o patógeno (revisado por Sallusto et al., 2004). É importante ressaltar que as TEM CD4<sup>+</sup> são apontadas como o primeiro alvo para a replicação do HIV-1 após a infecção por serem encontradas de forma abundante em tecidos de mucosa e possuírem elevada expressão do coreceptor CCR5 (Groot et al., 2006). Contudo, os resultados do trabalho de Heeregrave (2009) mostraram que et al. não existe nenhuma compartimentalização do vírus HIV-1 nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, podendo o HIV, residir tanto em células *naive* quanto em subpopulações de memória T CD4<sup>+</sup>. Contudo, segundo Chomont et al. (2009) em pacientes HIV<sup>+</sup> tratados satisfatoriamente com HAART, um reservatório viral estável é mantido em linfócitos TCM CD4<sup>+</sup> (CCR7<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>) e em células de memória transicionais (TTM; CCR7<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>) através de proliferação homeostática, induzida por IL-7, das células com infecção latente. Em relação às TEM CD8<sup>+</sup>, específicas para o nosso *pool* de peptídeos do HIV, em todos os grupos HIV<sup>+</sup> do estudo, houve secreção predominantemente de IFN-γ. Dentre todas as TEM CD8<sup>+</sup> HIV-específicas, o percentual de TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  variou de 91% a 99% nos grupos HIV<sup>+</sup>. Assim apenas um pequeno percentual das TEM CD8<sup>+</sup> estavam comprometidas com os outros dois perfis de secreção de citocinas avaliados. As TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> só foram observadas em 13% dos indivíduos do estudo e, em fregüências muito baixas. Entretanto, apesar dos baixos percentuais, TEM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>, em resposta ao *pool* HIV, estavam significativamente aumentadas nos grupos LTNP (P = 0,018) e CONTROLADOR (P = 0,04) em relação ao grupo VI-ART. Tal achado reforça os indícios de exaustão imune funcional dos VI-ART. No nosso estudo, as freqüências de TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (R = -0,3; P = 0,025) e TEM  $CD8^+$  IFN- $\gamma^+$  total (R = -0,3; P = 0,026) correlacionaram-se inversamente com a carga viral do HIV-1 em pacientes virêmicos (n = 41). Zimmerli et al. (2005), em seus estudos de caracterização fenotípica e funcional das respostas de linfócitos T CD8<sup>+</sup> HIV-específicos, incluindo 21 indivíduos com doença progressiva virgens de terapia anti-retroviral e cinco pacientes LTNP, observaram apenas TEM CD8<sup>+</sup> secretoras únicas de IFN- $\gamma$  no grupo de progressores, ao passo que em LTNP foi possível detectar TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ e TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> em resposta a diferentes *pools* de peptídeos derivados das proteínas Gag, Pol e Nef do HIV-1. Entretanto, no trabalho de Zimmerli et al. (2005) não foram detectadas TEM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> dentre as PBMC de nenhum dos pacientes HIV<sup>+</sup> avaliados, diferindo de nossos achados, onde estas células estavam presentes ainda que em baixas freqüências, o que pode ter ocorrido graças a constituição imunogênica de nosso estímulo HIV-específico que incluiu 18 peptídeos derivados de oito das nove proteínas do HIV-1 com uma ampla cobertura de ligação a diferentes moléculas HLA-DR (Fonseca et al., 2006).

No que se refere à análise das TEMRA respondedoras ao *pool* de peptídeos do HIV-1 de nosso estudo, no compartimento T CD4<sup>+</sup>, surpreendentemente, estas células estavam comprometidas tanto com a secreção de IFN- $\gamma$  quanto de IL-2 em todos os grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> avaliados, sendo que apenas no grupo de LTNP e CONTROLADOR, o percentual de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  foi maior que o percentual de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  foi maior que o percentual de TEMRA CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> (LTNP = 50% versus 48% e CONTROLADOR = 74% versus 23%, respectivamente). Nos demais grupos de pacientes HIV<sup>+</sup> do estudo, quantitativamente, houve mais TEMRA CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> em resposta ao *pool* HIV do que TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ . Nos grupos VI sem ART e VI-RI as freqüências de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  estavam estatisticamente diminuídas em relação aos outros quatro grupos HIV<sup>+</sup>. É válido ressaltar que, dentre os seis grupos HIV<sup>+</sup>, as cargas virais do HIV-1 mais elevadas estavam presentes

141

exatamente nos grupos VI sem ART. Estes achados indicam um possível papel para as TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  na resposta anti-HIV. Reforça essa idéia, o fato de que a carga viral do HIV-1 correlacionou-se negativamente com as freqüências de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (R = -0,5; P < 0,001) e TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^{+}$  total (R = -0.5; P < 0.001), guando consideramos todos os pacientes virêmicos de nosso estudo (n = 41). Adicionalmente, analisando de forma individual cada um dos grupos HIV<sup>+</sup> envolvidos no estudo, a correlação negativa com a carga viral do HIV-1 apareceu também dentro do grupo VI sem ART envolvendo as subpopulações TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> (R = -0,7; P = 0.031) e TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  total (R = -0,7; P = 0,037). Vale ressaltar que até o momento não foi encontrado nenhum relato na literatura sobre essas associações no compartimento T CD4<sup>+</sup>. A associação negativa das TEMRA T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  com a carga viral do HIV, observada em nosso estudo é, portanto um dado novo que reguer estudos mais detalhados desta subpopulação de memória no controle da replicação do HIV. No compartimento T CD8<sup>+</sup>, dentre as TEMRA comprometidas com o reconhecimento do nosso pool HIV, o maior percentual foi o de células secretoras únicas de IFN-γ, variando de 67% nos VI-RI a 98% nos VI-ART. A frequência de TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  estava estatisticamente aumentada em LTNP em relação a quatro dos cinco demais grupos HIV<sup>+</sup>: AV-ART, VI-ART, VI sem ART e VI-RI. Por outro lado, TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  apareceram menos frequentemente em VI sem ART em comparação aos AV-ART, VI-ART e CONTROLADOR, além dos LTNP já mencionados acima. Da mesma forma que para as TEMRA CD4<sup>+</sup>, estes resultados são sugestivos de que as

TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  também possam desempenhar um papel na resposta HIV-específica, podendo estar relacionadas inclusive ao estado de nãoprogressão dos LTNP. De forma interessante, as freqüências de TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  dos pacientes virêmicos do presente trabalho (n = 41) também se correlacionaram negativamente com a carga viral do HIV-1 (R = -0,45; P = 0,003). Corroboram esses achados, os resultados de um trabalho recente sugerindo que as TEMRA T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) são a principal subpopulação de memória com atividade antiviral na infecção pelo HIV, com base na observação de uma correlação positiva entre a frequência de TEMRA CD8<sup>+</sup> e o controle eficiente da infecção pelo HIV-1 (Northfield et al., 2007). É importante chamar atenção para o fato de que todos os grupos HIV<sup>+</sup> de nosso estudo continham pacientes com altas fregüências de TEMRA CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> bem como de TEMRA CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> específicas para o nosso pool de peptídeos do HIV-1, contrariando dados da literatura, que atribui um perfil predominantemente ou unicamente de secreção de IFN-y para esta subpopulação de memória (Sallusto et al., 1999; Harari et al., 2004b; Zimmerli et al., 2005). Portanto, embora no âmbito quantitativo as TEMRA constituam um pequeno subcompartimento de linfócitos T, principalmente dentre os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, estas células vêm despertando interesse no cenário científico internacional graças às suas propriedades gualitativas. Em 2007, Oswald-Ritcher et al. observaram que as TEMRA CD4<sup>+</sup> não apenas estão aumentadas em indivíduos HIV<sup>+</sup> conforme citado nos parágrafos anteriores, como também constituem a única subpopulação CD4<sup>+</sup> resistente à infecção pelo vírus HIV com tropismo para CCR5,

denominados vírus R5.HIV, apesar de expressar elevados níveis desse coreceptor na superfície celular, ao passo que altos percentuais de TCM e TEM CD4<sup>+</sup> são infectados. Vírus com tropismo para CCR5 são predominantes nas fases primária e assintomática da infecção pelo HIV como mostram os trabalhos de Connor et al. (1997) e Grivel et al. (1999). De acordo com Grivel et al. (1999), o rápido declínio da contagem de células T CD4<sup>+</sup> está frequentemente associado à mudança de tropismo de CCR5 para a molécula CXCR4. Oswald-Ritcher et al. (2007) demonstrou através de seus ensaios que as TEMRA CD4<sup>+</sup> são altamente susceptíveis à infecção pelo vírus HIV com tropismo para CXCR4, ditos vírus X4.HIV. Nesse contexto, também foi recentemente observado que em pacientes infectados pelo HIV e sob HAART, linfócitos T CD4<sup>+</sup> terminalmente diferenciados (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>) praticamente não apresentam DNA viral integrado, demonstrando que essas células não colaboram para o tamanho do reservatório viral em indivíduos infectados pelo HIV (Chomont et al., 2009).

Tomados em conjunto, estes achados são indícios de que tanto as TEMRA CD4<sup>+</sup> quanto as TEMRA CD8<sup>+</sup> possivelmente possuam um papel importante na proteção contra a progressão da infecção pelo HIV. Células T HIV-específicas provavelmente estão enriquecidas no subgrupo de memória TEMRA, visto que essas células não são alvos da infecção pelo HIV.

Ainda sobre as TEMRA, é válido mencionar que um trabalho recém publicado mostrou que, no contexto da infecção pelo HIV-1, dentro do compartimento T CD4<sup>+</sup>, ocorre um aumento da expressão da molécula PD1 (do inglês: *Programmed death 1*) em células *naive*, TCM e TEM de pacientes

HIV<sup>+</sup>, particularmente avirêmicos, levando consequentemente, à regulação negativa das atividades efetoras destas células. Este fenômeno não foi observado quando as TEMRA CD4<sup>+</sup> foram analisadas, ou seja, as TEMRA são capazes de manter suas atividades efetoras antivirais durante a infecção pelo HIV, enquanto as TCM e TEM têm suas atividades limitadas pelo aumento da expressão de PD1 (Rosignoli et al., 2009). O PD1 é um regulador induzível negativo da ativação do receptor de células T (TCR) expresso em linfócitos (Keir et al. 2008).

Com base no exposto acima, é interessante o fato de termos observado uma correlação negativa entre a frequência de TEMRA CD4<sup>+</sup> e TEMRA CD8<sup>+</sup> secretoras de citocinas e a carga viral do HIV-1. Nossos dados somados aos dados da literatura indicam que é de suma importância explorar a relação entre a subpopulação de memória TEMRA e a infecção pelo HIV. São requeridos estudos mais detalhados desta subpopulação de memória no controle da replicação viral e não progressão da doença do HIV. Segundo Oswald-Ritcher et al. (2007), a maior proporção de TEMRA dentro do subgrupo de células T efetoras pode inclusive identificar indivíduos com melhor preservação dos números de células T CD4<sup>+</sup> e, possivelmente, lenta progressão para AIDS.

Com a finalidade de comparar o padrão da resposta HIV-específica das subpopulações de linfócitos T de memória dos pacientes HIV<sup>+</sup> de nosso estudo com a reposta dessas subpopulações a outros patógenos virais, utilizamos um *pool* de peptídeos derivados do CMV, o qual representa um modelo de infecção viral crônica freqüente e controlada de forma satisfatória

145

em indivíduos imunocompetentes, além de ser também um agente oportunista da infecção pelo HIV. O pool de peptídeos do CMV empregado em nosso estudo incluiu peptídeos derivados das proteínas Glyp86 e pp65. Dentre as subpopulações de memória T CD4<sup>+</sup> respondedoras ao *pool* CMV, detectamos secreção de IFN- $\gamma$  e IL-2 por TCM, TEM e TEMRA CD4<sup>+</sup>. As citocinas células secretoras de ambas as apareceram menos frequentemente que as células secretoras únicas de IFN- $\gamma$  e as células secretoras únicas de IL-2, assim como foi observado na resposta HIVespecífica. Contudo, quando analisamos individualmente as subpopulações T CD4<sup>+</sup> de memória, a frequência de TCM CD4<sup>+</sup> foi equiparada entre os grupos HIV<sup>+</sup> para os três perfis de secreção de citocinas avaliados, não havendo diferença estatística entre os grupos. Este resultado diferiu dos resultados obtidos em resposta ao *pool* HIV, os quais apontaram para uma falha funcional das TCM CD4<sup>+</sup> dos VI-ART. Portanto, estes dados indicam que a falha imunológica dos VI-ART é restrita à resposta HIV-específica e não reflete um prejuízo generalizado do sistema imune destes indivíduos, visto que a resposta ao CMV está preservada. No que se refere às TEM CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ , estas foram mais freqüentes em VI-RI em relação aos AV-ART e VI sem ART ao passo as TEM CD4<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> foram menos frequentes nos VI-ART comparados aos grupos LTNP e CONTROLADOR e nos AV-ART em relação ao grupo CONTROLADOR. Quanto ao compartimento TEMRA CD4<sup>+</sup>, é interessante observar que assim como em resposta ao *pool* HIV, as TEMRA CD4<sup>+</sup> respondedoras ao pool CMV eram secretoras tanto de IFN-γ quanto de IL-2. A frequência de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  nos VI sem ART estava estatisticamente diminuída em relação a quatro dos cinco demais grupos HIV<sup>+</sup> do estudo, semelhante aos resultados obtidos para a resposta ao pool HIV. Fazendo um paralelo entre as responsividades ao pool HIV e ao *pool* CMV para cada grupo HIV<sup>+</sup> de nosso estudo, verificamos que as respostas foram essencialmente semelhantes em todos os grupos. É válido ressaltar que alguns trabalhos descreveram que na infecção crônica por CMV, as células de memória T CD4<sup>+</sup> secretoras de IL-2 foram fenotipicamente caracterizadas como TCM ou TEM enquanto que células secretoras de IFN- $\gamma$  eram TEM ou TEMRA (Harari et al., 2004b; Harari et al., 2005). Este dado é discordante dos nossos achados, uma vez que no nosso estudo houve uma participação equivalente das três subpopulações de memória T CD4<sup>+</sup> tanto em relação à produção de IFN-y quanto em relação à produção de IL-2 nos seis grupos HIV<sup>+</sup>. Portanto, nossos resultados sugerem que as subpopulações TCM, TEM e TEMRA CD4<sup>+</sup> têm potencial para secretar estas duas citocinas em resposta a diferentes estímulos antigênicos.

No compartimento T CD8<sup>+</sup>, na resposta CMV-específica, as freqüências de células IFN- $\gamma^+$  foram maiores que as freqüências de células IL-2<sup>+</sup> ou secretoras de ambas as citocinas nas três subpopulações de memória dos grupos HIV<sup>+</sup>, em conformidade com os resultados obtidos para o *pool* HIV. Considerando apenas as células que responderam ao *pool* CMV, com exceção do grupo VI sem ART, os quais apresentaram um prejuízo quanto à secreção de IFN- $\gamma$  dentro das três subpopulações de memória T CD8<sup>+</sup>, em todos os grupos HIV<sup>+</sup> avaliados, o número de TCM, TEM e TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  foi massivamente maior que o número de TCM, TEM e TEMRA CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> assim como aconteceu na resposta ao *pool* HIV.

Nossos resultados foram coerentes com os achados de Nomura et al. (2006), os quais também observaram maior freqüência de células secretoras de IFN- $\gamma$  que secretoras de IL-2 no compartimento T CD8<sup>+</sup> de pacientes HIV<sup>+</sup> em resposta a peptídeos do CMV. Segundo estes autores, a principal subpopulação de memória secretora de IFN-y na resposta CMV-específica é a TEMRA. O estudo das TEMRA no contexto de outras infecções microbianas vem favorecendo a idéia de um papel importante na imunidade protetora desempenhado por essa subpopulação de memória. De acordo com Bruns et al. (2009) a subpopulação TEMRA CD8<sup>+</sup> é necessária para a proteção ótima contra o Micobacterium tuberculosis em humanos. Os autores demonstraram que TEMRA  $CD8^+$  expressam fortemente as proteínas antimicrobianas perforina e granulisina, as quais são importantes para a eliminação do Micobacterium tuberculosis. Corroborando esses dados, Caccamo et al. (2006), avaliando crianças com positividade para o teste de sensibilidade de tuberculina (TST<sup>+</sup>), observaram que as células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas pertenciam principalmente à subpopulação TEMRA, ao passo que em pacientes que falharam em controlar o *Micobacterium tuberculosis*, as células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas eram predominantemente TCM. Em conjunto, esses achados favorecem a existência de um importante papel para as TEMRA CD8<sup>+</sup> na imunidade protetora à tuberculose humana. Linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória CCR7<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> são também os principais componentes do *pool* de células efetoras antígeno-específicas na infecção pelo vírus *Epstein barr* e Citomegalovírus (CMV), contribuindo significativamente para o controle satisfatório destes vírus (Champagne et al., 2001; Faint et al., 2001; Hohn et al., 2003). Segundo Champagne et al. (2001), defeitos na maturação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> pode representar um mecanismo de evasão da resposta imunológica induzida pelo HIV. No nosso estudo, detectamos TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em 48 dos 61 pacientes HIV<sup>+</sup>, entretanto também detectamos TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em 42 pacientes HIV<sup>+</sup> e TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em 48 destes indivíduos, o que sugere que além das TEMRA, as TCM e TEM também possuam um papel relevante na resposta T CD8<sup>+</sup> CMV-específica.

Comparando as respostas HIV e CMV-específicas para cada um dos grupos HIV<sup>+</sup> do estudo, algumas diferenças com relevância estatística foram observadas: (1) em LTNP, TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  e TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  foram mais freqüentes na resposta ao *pool* HIV ao passo que TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> foram mais freqüentes na resposta ao *pool* CMV; (2) em VI-ART, semelhante aos LTNP, as TCM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  apareceram mais frequentemente na resposta HIV-específica; (3) em VI sem ART as TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  foram mais freqüentes na resposta HIV-específica; (4) em VI-RI as TEM CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  e TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  (P = 0,0216) foram mais freqüentes na resposta ao *pool* CMV. Em AV-ART e CONTROLADOR não houve diferença entre a resposta HIV-específica e CMV-específica no que se refere à freqüência de subpopulações T CD8<sup>+</sup> de memória secretoras de IFN- $\gamma$  e/ou IL-2. Alguns trabalhos observaram maior freqüência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória

secretores de IL-2 na resposta CMV-específica que na resposta HIVespecífica (Zimmerli et al., 2005; Nomura et al., 2006; Betts et al., 2006). Contudo no nosso estudo, conforme mencionado acima, isso ocorreu apenas para as TCM CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> de LTNP, possivelmente demonstrando uma maior capacidade dos LTNP em relação aos outros pacientes em manter o controle da infecção do CMV perante o abalo imunológico provocado pela infecção do HIV.

Quanto à avaliação da proliferação celular por diluição de CFSE, no que se refere às subpopulações de memória, o estímulo com o pool de peptídeos do HIV-1 resultou em aumento no percentual de células divididas T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em todos os pacientes HIV<sup>+</sup>, exceto para a subpopulação TEM do paciente A28. O pool de peptídeos do CMV também induziu proliferação celular em quase todas as subpopulações T de memória dos pacientes HIV<sup>+</sup>. É interessante observar que os percentuais de TEMRA CD4+ e TEM CD8+ HIV-específicas que se dividiram, dos pacientes HIV<sup>+</sup>, estavam estatisticamente aumentadas em relação ao controle DMSO. Devemos ressaltar que, conforme mencionado anteriormente, a marcação das moléculas na superfície celular foi realizada após as células terem permanecido por um período de cinco dias em cultura sob estimulação antigênica o que pode ter modificado a expressão das moléculas sobre a superfície dos linfócitos T. Isso poderia explicar o fato de termos observados células naive que proliferaram na presença de antígeno e continuaram com fenótipo de naive. Também pode ter ocorrido uma proliferação induzida por citocinas in vitro produzidas por outras células, já que avaliamos células que

150

se dividiram e não células estritamente antígeno-específicas. Com base nestes dados podemos dizer que nosso conjunto de peptídeos do HIV-1 induziu uma resposta polifuncional das subpopulações de linfócitos T de memória, visto que além de induzirem secreção de citocinas, também induziram proliferação HIV-específica.

E importante dizer que os nossos ensaios para a caracterização fenotípica e funcional das subpopulações de memória dos linfócitos T foram realizados após estimulação celular in vitro de 12 horas e que isso pode modificar a expressão dos marcadores sobre as subpopulações de linfócitos T (Shankar et al., 2000; Halwani et al., 2006). Além disso, existe uma discussão sobre quais marcadores fenotípicos caracterizam estas subpopulações de memória. Provavelmente as diferenças entre os marcadores que caracterizam as células de memória entre os diferentes grupos de pesquisa resultam em resultados divergentes e dificultam a comparação funcional das mesmas. Recentemente, alguns autores sugeriram a padronização dos marcadores fenotípicos e funcionais de células de memória para que seja possível uma nomenclatura mais universal para essas subpopulações (Appay et al., 2008) É bastante provável que a expressão apenas de CD45RA e CCR7 não seja suficiente para identificar linfócitos T naive ou de memória de forma contundente. Como bem salientaram Sallusto e Lanzavecchia (2009) em uma revisão da literatura, pelo menos no que diz respeito aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, o padrão de secreção de citocinas ou ainda a expressão de diferentes receptores de migração na superfície dos linfócitos T de memória pode definir diferentes módulos funcionais da imunidade de células T. Assim, por exemplo, a expressão de CXCR3 e CCR5 sobre as TEM CD4<sup>+</sup>, pode definir primariamente células efetoras do tipo Th1, ao passo que, a expressão de CCR3, CCR4 ou CRTh2 define TEM CD4<sup>+</sup> do tipo Th2 (Sallusto et al., 1998) e TCM CXCR5<sup>+</sup> representam células de memória T CD4<sup>+</sup> não polarizadas (Rivino et al., 2004) (revisado por Sallusto e Lanzavecchia, 2009). Esta idéia é compartilhada por outros autores (Betts et al., 2006). Portanto, em conformidade com a literatura, os dados gerados no nosso estudo sugerem que as características fenotípicas não necessariamente predizem um dado perfil funcional para subpopulações de linfócitos T de memória, como foi o caso da constatação de secreção de IL-2 por células fenotipicamente caracterizadas como TEMRA, observada em nosso estudo.

A literatura ressalta que a terapia anti-retroviral é capaz de recuperar a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e reduzir a carga viral plasmática em pacientes HIV<sup>+</sup>, não sendo, entretanto capaz de restaurar as células T CD4<sup>+</sup> de memória central (Elrefaei et al., 2004). Isto poderia explicar em parte as baixas freqüências de TCM T CD4<sup>+</sup> nos pacientes do grupo VI-ART de nosso estudo. No entanto, no grupo AV-ART, no qual os pacientes também estavam sob terapia anti-retroviral, as TCM T CD4<sup>+</sup> HIV-específicas estavam preservadas. Por outro lado, Harari et al. (2004a) comparando a freqüência de TCM, TEM e TEMRA funcionais em pacientes HIV<sup>+</sup> progressores no período pré e 12 meses pós ART, concluíram que a terapia anti-retroviral é capaz de levar a um aumento das células IL-2<sup>+</sup>. Nesta mesma linha, diversos autores afirmam que a reconstituição imune, compreendendo linfócitos T

152

CD4<sup>+</sup> naive e de memória, é mais completa em indivíduos que receberam tratamento anti-retroviral durante a infecção primária pelo HIV do que em pacientes tratados apenas na fase crônica da infecção (Kaufmann et al., 2000; Younes et al., 2007). No nosso estudo, ambos os grupos de pacientes sob terapia anti-retroviral foram tratados na fase crônica da infecção após diminuição da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, entretanto estes responderam diferentemente ao estímulo antigênico específico, estando a resposta HIV-específica diminuição de produção de citocinas nos VI-ART é importante dizer que na resposta policional utilizando como estímulo o SEB (controle positivo) não foi observada diminuição de produção de citocinas nos VI-ART em relação aos outros grupos HIV<sup>+</sup>. Portanto, acreditamos que o fato dos linfócitos T de memória dos VI-ART terem apresentado resposta diminuída ao *pool* de peptídeos do HIV-1, comparada à resposta dos demais grupos HIV<sup>+</sup> do estudo, esteja relacionado a um provável defeito qualitativo e quantitativo de repertório de linfócitos T HIV-específicos destes indivíduos.

No geral, estes dados sugerem o envolvimento de outros fatores ligados ao hospedeiro ou ao vírus na recuperação das respostas HIV-específicas de memória por linfócitos T de pacientes HIV<sup>+</sup> progressores, além da terapia anti-retroviral.

Atualmente existe uma discussão na comunidade científica a respeito de quais respostas de linfócitos T constituem verdadeiramente respostas protetoras anti-HIV. Essa discussão se intensificou principalmente após a falha em 2008 da vacina anti-HIV Fase IIb ('STEP trial') desenvolvida pela MERCK em induzir proteção contra a infecção pelo vírus da aids em quase 3.000 voluntários sadios e não infectados. Aparentemente a imunidade prévia ao vetor utilizado na vacina, o adenovírus recombinante sorotipo 5 (rAD5) aumentou a suscetibilidade à infecção ao HIV em pessoas vacinadas, ou seja, indivíduos vacinados e tendo títulos de anticorpos contra adenovírus foram mais susceptíveis à infecção pelo HIV quando comparados com aqueles sem anticorpos anti-adenovírus (Sekaly, 2008). Outros vetores virais

foram mais susceptíveis à infecção pelo HIV quando comparados com aqueles sem anticorpos anti-adenovírus (Sekaly, 2008). Outros vetores virais alternativos têm sido propostos no desenvolvimento de vacinas anti-HIV, como é o caso do vírus Ankara modificado (MVA), o qual tem demonstrado resultados satisfatórios em estudos envolvendo macacos babuínos e humanos (Burgers et al., 2009; Winstone et al., 2009). Steers et al., (2009) observaram em seus estudos em modelo de camundongos que a imunização dos animais com antígenos do HIV incorporados em lipossomos contendo lipídeo A, foi capaz de induzir células T CD8<sup>+</sup> específicas para Gag p24 do HIV-1, células efetoras T CD4<sup>+</sup> e citocinas com perfil Th1. Hansen et al. (2009), com base em seus estudos envolvendo macacos rhesus, sugeriram uma vacina anti-SIV, baseada na replicação competente de citomegalovírus expressando as proteínas estruturais Gag, Pol e Env e uma proteína guimérica Rev-Tat-Nef. A vacina denominada 'RhCMV-SIV' foi capaz de prevenir a infecção por SIV em quatro dos 12 macacos vacinados. Hansen et al. (2009) sugeriram que tal proteção foi mediada por linfócitos TEM CD8<sup>+</sup> SIV-específicos. A vacina 'RhCMV-SIV' também induziu uma alta frequência de TEM CD4<sup>+</sup> SIV-específicos e levantou a questão sobre como induzir os tipos apropriados de células T de memória capazes de proteger contra a infecção pelo HIV. Portanto, ainda existem várias questões em
aberto a respeito de quais seriam os componentes da resposta imune desejáveis em uma vacina anti-HIV protetora.

Há uma década, um papel protetor para o IFN-γ no curso da infecção pelo HIV foi defendido no trabalho de Bailer et al. (1999), no gual foi visto que em pacientes HIV<sup>+</sup> com doença progressiva havia um declínio da secreção de IFN-y e também de IL-13 sugerindo um papel destas citocinas na falta de progressão da doença. Diversos outros trabalhos têm demonstrado que não é possível correlacionar o controle viral com a secreção de IFN- $\gamma$  na infecção crônica do HIV-1 (Addo et al., 2003; Masemola et al., 2004). No trabalho de Younes et al. (2003), focando o estudo da resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> contra o HIV, a produção de IFN- $\gamma$ , em resposta a um peptídeo da Gag do HIV-1, foi observada apenas por TEM CD4<sup>+</sup>, enguanto em nosso estudo tanto as TCM CD4<sup>+</sup> guanto as TEMRA CD4<sup>+</sup> também tiveram uma contribuição na produção desta citocina. Boaz et al. (2002) observaram que respostas de células T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ /IL-2<sup>+</sup> estavam associadas com a não-progressão da doença do HIV e diretamente relacionadas com a percentagem de células T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  específicas para Gag. Outros estudos também já correlacionaram a presença de células que produzem IFN-γ e IL-2 simultaneamente com evolução clínica favorável dos pacientes HIV<sup>+</sup> (Sousa et al., 2001; Sieg et al., 2001). Trabalhos mais atuais têm defendido a idéia da multifuncionalidade dos linfócitos de memória T  $CD4^+$  (produção de IFN- $\gamma$  e IL-2, capacidade de proliferar) e T  $CD8^+$ (degranulação, produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 e da quimiocina MIP-1β) HIV-específicos para que haja uma resposta efetiva contra o vírus HIV, visto que tais células multifuncionais são encontradas de forma abundante em pacientes HIV+ LTNP (Harari et al., 2004b; Betts et al., 2006; Migueles et al., 2008; Migueles et al., 2009). Embora, não tenhamos investigado outras citocinas além da IL-2 e IFN- $\gamma$  por subpopulações de células de memória em nosso trabalho, acreditamos que o controle da replicação do HIV e, consequentemente, a progressão favorável desta infecção deve incluir respostas multifuncionais e que tanto o IFN-y quanto a IL-2 tenham uma contribuição positiva na efetividade destas respostas. No entanto, a polifuncionalidade dessas células de memória induzidas pelo nosso conjunto de epitopos foi demonstrada recentemente pelo nosso grupo em um estudo em camundongos HLA-DR transgênicos, após imunização com uma vacina de DNA multiepitópica constituída por seqüências gênicas dos 18 peptídeos do HIV-1 (Ribeiro e Rosa et al, submetido 2009). Nesse trabalho foi observado que após a imunização com o plasmídio HIVBr18, células TCM e TEM CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dos camungondos HLA-DR transgênicos produziram *in vitro*, IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF $\alpha$ , além de serem capazes de proliferar, em reposta aos peptídeos. Em conjunto esses dados comprovam a capacidade desses peptídeos de induzir células T de memória polifuncionais. Esses dados também confirmam o potencial vacinal do nosso conjunto de peptídeos. A capacidade de indução de memória polifuncionais da vacina multiepitópica do nosso conjunto de peptídeos em camundongos HLA-DR humanizados somados aos nossos dados de indução de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de memória TCM e TEM e TEMRA capazes de produzir no mínimo IFN-γ e IL-2 fortalecem a possibilidade de uso desses peptídeos em uma formulação vacinal bem-sucedida em humanos.

No geral, os resultados apresentados mostraram que o conjunto de peptídeos do HIV-1 identificado pelo nosso grupo é capaz de ser reconhecido por diferentes subpopulações de linfócitos T de memória de pacientes HIV<sup>+</sup> de diferentes grupos clínicos. Além disso, nosso conjunto de peptídeos do HIV-1 induziu proliferação das subpopulações de linfócitos T de memória. Subpopulações de linfócitos T de memória funcionais persistentes são atributos altamente desejáveis em uma resposta vacinal anti-HIV, bem como o controle da replicação do HIV. Assim, o fato de termos observado correlações negativas com a carga viral do HIV-1 dentro das subpopulações TCM CD4<sup>+</sup>, TCM CD8<sup>+</sup>, TEM CD8<sup>+</sup>, TEMRA CD4<sup>+</sup> e TEMRA CD8<sup>+</sup> de pacientes LTNP e pacientes virêmicos de nosso estudo, possibilita a elaboração da hipótese de que essas subpopulações de memória funcionais estão envolvidas no controle da viremia.

## 6. CONCLUSÕES

1. No presente trabalho, a caracterização fenotípica de linfócitos T em pacientes infectados pelo HIV e em indivíduos controles sadios mostrou que as subpopulações *naive*, TCM, TEM e TEMRA CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> estão presentes em pacientes HIV<sup>+</sup> de diferentes estágios clínicos da infecção. Contudo a análise comparativa mostrou que a infecção pelo HIV foi capaz de modular a proporção destas subpopulações de linfócitos T nos indivíduos HIV<sup>+</sup> em relação aos indivíduos controles sadios. Foi interessante o achado de que no compartimento CD4<sup>+</sup>, os indivíduos LTNP mantiveram as proporções dessas subpopulações semelhante aos indivíduos sadios. Isto pode estar relacionado com a capacidade destes indivíduos de controlar eficazmente a infecção sem terapia anti-retroviral por longos períodos (> 7 anos).

2. A caracterização funcional das subpopulações de memória TCM, TEM e TEMRA CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> revelou que o conjunto de peptídeos do HIV-1 identificado pelo nosso grupo foi capaz de induzir produção de IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /IL-2 e IL-2, e linfoproliferação *in vitro* em pacientes infectados pelo HIV dos diferentes grupos clínicos avaliados. Entretanto pacientes em falha terapêutica (VI-ART) apresentaram prejuízo nas respostas anti-HIV em comparação aos demais grupos avaliados. Uma vez que esse prejuízo não foi observado em resposta ao *pool* de CMV testado em paralelo, esse achado é indicativo de um provável defeito no repertório de linfócitos T HIVespecíficos destes indivíduos.

3. O fato de termos encontrado correlações negativas entre a frequência de subpopulações T de memória secretoras de IFN- $\gamma$  e/ou IL-2 específicas para o *pool* de peptídeos do HIV-1 e a carga viral em pacientes virêmicos sugere o envolvimento destas subpopulações no controle imunológico da viremia em pacientes infectados. Considerando que os indivíduos LTNP apresentaram freqüências aumentadas de TEMRA CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em relação a três outros grupos HIV<sup>+</sup> e de TEMRA CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  em relação a outros quatro grupos HIV<sup>+</sup>, fortalece a hipótese de participação das células com fenótipo TEMRA no controle da viremia.

4. Em conjunto os achados deste trabalho sugerem que os peptídeos identificados pelo nosso grupo têm potencial para serem testados como epitopos vacin*ais* anti-HIV, visto que são capazes de ativar distintas subpopulações de memória funcionais em pacientes infectados, atributos altamente desejáveis em vacinas profiláticas ou terapêuticas anti-HIV. Uma vacina derivada destes peptídeos poderia abranger a disparidade HLA da população mundial, uma vez que estes peptídeos se ligam a múltiplas moléculas HLA-DR.

## 7. ANEXOS

| -        |          |              |      |      |      | LTN  | Ρ    |      |      |      |      |      |
|----------|----------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| -        | HIV      | - especifica | 004  | A6   | 600  | 014  | 001  | 010  | A1   | A2   | A5   | 017  |
|          | λ-       | ТСМ          | 0,25 | 0    | 0,29 | 0,02 | 0,01 | 0    | 0,05 | 0    | 0,22 | 0,04 |
|          | Ż        | TEM          | 0,26 | 0,08 | 0,19 | 0,03 | 0,02 | 0,04 | 0    | 0,09 | 0,06 | 0,08 |
|          | -        | TEMRA        | 0,29 | 0,6  | 0,37 | 0,13 | 0,65 | 0,04 | 0,26 | 0    | 1,21 | 0,06 |
| <b>4</b> | 2        | том          | 0    | 0.01 | 0.01 | 0    | 0.01 | 0    | 0.00 | 0    | 0.00 | 0.00 |
| 2        | Ж        |              | 0    | 0,01 | 0,01 | 0    | 0,01 | 0    | 0,00 | 0    | 0,23 | 0,02 |
| •        | Ž        | I EM         | 0    | 0,02 | 0,03 | 0    | 0,01 | 0,05 | 0,02 | 0    | 0,03 | 0,02 |
|          | <u>ш</u> | TEMRA        | 0    | 0,01 | 0    | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,07 | 0    | 0    | 0    |
|          |          | TCM          | 0    | 0    | 0,05 | 0,02 | 0,02 | 0,07 | 0,17 | 0,16 | 0,21 | 0,2  |
|          | IL2      | TEM          | 0    | 0,08 | 0,37 | 0,18 | 0,02 | 0,08 | 0,03 | 0,07 | 0,06 | 0,03 |
|          |          | TEMRA        | 0    | 0,33 | 1,67 | 0,89 | 0,01 | 0,39 | 0    | 0    | 0,18 | 0,05 |
|          |          |              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|          | ~        | TCM          | 0,02 | 0,06 | 0,5  | 0    | 0,08 | 0,87 | 0,28 | 0,43 | 0,34 | 0,58 |
|          | Ч        | TEM          | 0,07 | 0,11 | 0,65 | 0,01 | 0,08 | 1,31 | 0,15 | 0,95 | 0,32 | 0,68 |
|          | _        | TEMRA        | 0,28 | 0,21 | 0,13 | 0,09 | 0,33 | 2,24 | 0,28 | 0,98 | 0,54 | 0,48 |
|          | 0        |              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ±∞       |          | TCM          | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0    |
| С<br>С   | λ-7      | TEM          | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0    |
| F        | Ē        | TEMRA        | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0    |
|          |          |              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|          | $\sim$   | TCM          | 0,01 | 0,01 | 0,06 | 0    | 0    | 0    | 0,03 | 0,01 | 0,05 | 0    |
|          | Ľ        | TEM          | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0    | 0    | 0    | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0    |
|          |          | TEMRA        | 0    | 0,02 | 0,06 | 0    | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,15 | 0,03 | 0    |

Anexo 1: Freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN-γ e IL-2 de pacientes HIV<sup>+</sup> LTNP em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1

Anexo 2: Freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN-γ e IL-2 de pacientes HIV<sup>+</sup> AV-ART em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1

|          |       | •            |      |      |      | AV-AI | RT   |      |      |      |      |      |
|----------|-------|--------------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|
|          | HIV · | - especifica | A 7  | A 15 | A 32 | A 44  | A 52 | A 56 | A 57 | A 59 | A24  | A43  |
|          | D     | ТСМ          | 0,03 | 0,21 | 0    | 0,01  | 0    | 0,1  | 0,03 | 0,1  | 0,02 | 1,61 |
|          | Ż     | TEM          | 0,02 | 0,04 | 0,01 | 0     | 0,03 | 0,09 | 0    | 0,03 | 0,01 | 0,01 |
|          | _     | TEMRA        | 0,07 | 0,09 | 0,07 | 0,25  | 0    | 0,04 | 0,26 | 0,03 | 0,02 | 0,1  |
|          |       |              |      |      |      |       |      |      |      |      |      |      |
| <b>4</b> | /IL2  | TCM          | 0    | 0,05 | 0    | 0     | 0,04 | 0,04 | 0    | 0,01 | 0,04 | 0,64 |
| 00       | P-g   | TEM          | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0     | 0,01 | 0,04 | 0    | 0    | 0    | 0,02 |
| F        | 뜨     | TEMRA        | 0,05 | 0    | 0,03 | 0     | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0,16 | 0,25 |
|          |       |              |      |      |      |       |      |      |      |      |      |      |
|          | 01    | TCM          | 0    | 0,31 | 0,02 | 0,03  | 0    | 0,06 | 0,22 | 0,03 | 0,14 | 0,49 |
|          |       | TEM          | 0,01 | 0,18 | 0,02 | 0,08  | 0,01 | 0,1  | 0    | 0    | 0,08 | 0,31 |
|          |       | TEMRA        | 0    | 0,03 | 0    | 0,55  | 0    | 0,35 | 0    | 0    | 0,54 | 0,98 |
|          |       |              |      |      |      |       |      |      |      |      |      |      |
|          | D     | TCM          | 0,07 | 0,29 | 0,04 | 0     | 0,18 | 0,1  | 0    | 0,16 | 0,16 | 0,02 |
|          | Ż     | TEM          | 0,3  | 0,09 | 0,22 | 0,16  | 0,21 | 0,07 | 0    | 0,04 | 0,38 | 0,01 |
|          | _     | TEMRA        | 0,25 | 0,07 | 0,08 | 0     | 0,09 | 0,08 | 0    | 0,13 | 0,08 | 0,44 |
|          |       |              |      |      |      |       |      |      |      |      |      |      |
| ÷∞       | IL2   | TCM          | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| CD       | ∕-g∕  | TEM          | 0,01 | 0    | 0    | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Ĕ        | Ē     | TEMRA        | 0,01 | 0    | 0    | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|          |       |              |      |      |      |       |      |      |      |      |      |      |
|          |       | TCM          | 0    | 0,07 | 0,02 | 0     | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0,08 | 0,04 |
|          | IL2   | TEM          | 0    | 0,04 | 0    | 0     | 0,01 | 0    | 0    | 0,02 | 0,03 | 0,03 |
|          |       | TEMRA        | 0    | 0.07 | 0    | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0.17 | 0.04 |

Anexo 3: Freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN-γ e IL-2 de pacientes HIV<sup>+</sup> VI-ART em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1

|    |          |              |      |      |      | VI-AF | RT   |      |      |      |            |      |
|----|----------|--------------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------------|------|
|    | HIV      | - especifica | A 14 | A 18 | A 25 | A 38  | A 45 | A 63 | A 73 | A 75 | <b>A</b> 9 | A70  |
|    | Ý        | TCM          | 0,02 | 0    | 0    | 0     | 0    | 0,04 | 0,01 | 0    | 0,06       | 0,55 |
|    | Ļ        | TEM          | 0,01 | 0    | 0,02 | 0     | 0,02 | 0,05 | 0    | 0,03 | 0,09       | 0,07 |
|    | _        | TEMRA        | 0,04 | 0,08 | 0    | 0,03  | 0,17 | 0,11 | 0,24 | 0,04 | 0,25       | 0,46 |
|    |          |              |      |      |      |       |      |      |      |      |            |      |
| 4  | /IL2     | TCM          | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 0    | 0,01 | 0,01 | 0,01       | 0    |
| C  | ×-2<br>Z | TEM          | 0    | 0,01 | 0,01 | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0          | 0,01 |
| Ĕ  | Щ        | TEMRA        | 0,01 | 0,06 | 0,11 | 0     | 0    | 0,04 | 0    | 0    | 0,25       | 0,06 |
|    |          |              |      |      |      |       |      |      |      |      |            |      |
|    | ~        | TCM          | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 0    | 0,02 | 0,01 | 0,06       | 0,21 |
|    |          | TEM          | 0    | 0,01 | 0,02 | 0,01  | 0,02 | 0    | 0,06 | 0    | 0,09       | 0,25 |
|    |          | TEMRA        | 0    | 0    | 0    | 0,01  | 0,32 | 0    | 0,07 | 0    | 0,7        | 0,66 |
|    |          |              |      |      |      |       |      |      |      |      |            |      |
|    | ×        | TCM          | 0,32 | 0,01 | 0,47 | 0,03  | 0,41 | 0,35 | 0,26 | 0,23 | 0,36       | 0,22 |
|    | Ч<br>Ч   | TEM          | 0,76 | 0,01 | 0,51 | 0,05  | 0,33 | 1,19 | 0,08 | 0,29 | 0,52       | 0,13 |
|    | _        | TEMRA        | 0,18 | 0    | 0,07 | 0,08  | 0,07 | 0,24 | 0,03 | 0,05 | 0,38       | 0,17 |
|    |          |              |      |      |      |       |      |      |      |      |            |      |
| ÷∞ | IL2      | TCM          | 0,01 | 0    | 0,01 | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0          | 0    |
| C  | /√-N     | TEM          | 0,01 | 0    | 0,02 | 0     | 0    | 0,03 | 0    | 0    | 0          | 0    |
| Ĕ  | Ē        | TEMRA        | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0          | 0    |
|    |          |              |      |      |      |       |      |      |      |      |            |      |
|    |          | TCM          | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0          | 0,03 |
|    | IL2      | TEM          | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0          | 0    |
|    |          | TEMRA        | 0    | 0    | 0,01 | 0,01  | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0          | 0    |

Anexo 4: Freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN-γ e IL-2 de pacientes HIV<sup>+</sup> VI sem ART em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1

|             | HIV -  | - especifica | A 26 | A 28 | A 40 | A 54 | A 60 | A 64 | A 66 | A 71 | A 74 |  |  |  |
|-------------|--------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|--|--|
|             | ۲      | ТСМ          | 0    | 0,11 | 0,02 | 0,41 | 0,04 | 0,02 | 0,04 | 0    | 0    |  |  |  |
|             | Ч<br>Ч | TEM          | 0,02 | 0,02 | 0    | 2,01 | 0,01 | 0,02 | 0    | 0,01 | 0,08 |  |  |  |
|             | _      | TEMRA        | 0,02 | 0,09 | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,21 | 0,03 |  |  |  |
|             |        |              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |  |  |
| <b>4</b>    | 112    | TCM          | 0,01 | 0,01 | 0,03 | 0,02 | 0,01 | 0    | 0,02 | 0    | 0    |  |  |  |
| U<br>C<br>C | ν-γ.   | TEM          | 0,02 | 0,01 | 0    | 0,04 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,03 |  |  |  |
| F           | 뜨      | TEMRA        | 0,02 | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |  |  |  |
|             |        |              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |  |  |
|             | 2      | TCM          | 0,21 | 0,04 | 0,1  | 0,04 | 0,01 | 0,02 | 0,05 | 0    | 0    |  |  |  |
|             |        | TEM          | 0,2  | 0,05 | 0,03 | 0,17 | 0,01 | 0,03 | 0    | 0,04 | 0,22 |  |  |  |
|             |        | TEMRA        | 0,63 | 0,13 | 0,35 | 0,79 | 0    | 0,2  | 0    | 0    | 0,46 |  |  |  |
|             |        |              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |  |  |
|             |        |              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |  |  |
|             | ~      | TCM          | 0,02 | 0,03 | 0,06 | 0,24 | 0,15 | 0    | 0    | 0    | 0,73 |  |  |  |
|             | Ż      | TEM          | 0,09 | 0,05 | 0,01 | 0,6  | 0,03 | 0,11 | 0,01 | 0,08 | 1,07 |  |  |  |
|             |        | TEMRA        | 0,02 | 0,04 | 0    | 0,26 | 0,02 | 0,05 | 0    | 0    | 0,06 |  |  |  |
|             |        |              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |  |  |
| •           | /IL2   | TCM          | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,02 | 0    | 0    | 0    | 0,01 |  |  |  |
| U<br>C      | ν-γ.   | TEM          | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |  |  |  |
| F           | Щ      | TEMRA        | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |  |  |  |
|             |        |              | _    |      |      |      |      |      |      |      | _    |  |  |  |
|             | 2      | TCM          | 0    | 0,03 | 0,02 | 0    | 0,03 | 0,03 | 0,01 | 0    | 0    |  |  |  |
|             |        | TEM          | 0,02 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0    |  |  |  |
|             |        | TEMRA        | 0,04 | 0    | 0    | 0,07 | 0    | 0    | 0    | 0,02 | 0    |  |  |  |

Anexo 5: Freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN-γ e IL-2 de pacientes HIV<sup>+</sup> VI-RI em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1

|                         | HIV - especifica 4 8 9 9 9 4 4<br>VI-RI |            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |  |
|-------------------------|-----------------------------------------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|--|
|                         | HIV -                                   | especifica | 1043 | 1133 | 1145 | 2030 | 1052 | 1096 | 2016 | 1057 | 2046 | 1144 |  |  |
|                         | D                                       | TCM        | 0,28 | 0,01 | 0,48 | 0,13 | 0    | 0,23 | 0    | 0,18 | 0,51 | 0    |  |  |
|                         | -<br>L                                  | TEM        | 0    | 0    | 0,89 | 0    | 0,1  | 0,1  | 0,11 | 0,09 | 0,46 | 0    |  |  |
|                         | _                                       | TEMRA      | 0    | 0    | 0    | 0,05 | 0    | 0    | 0,87 | 0,12 | 0    | 0    |  |  |
| +<br>+                  | 12                                      | ТСМ        | 0,07 | 0,01 | 0,17 | 0,09 | 0    | 0,08 | 0,02 | 0,01 | 0,06 | 0,01 |  |  |
| à                       | l-g/l                                   | TEM        | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0,01 | 0    | 0    | 0,02 | 0    |  |  |
| Ĕ                       | Ц<br>Ц                                  | TEMRA      | 0    | 0,05 | 0    | 0,07 | 0    | 0    | 0    | 0,02 | 0    | 0    |  |  |
|                         |                                         |            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |  |
|                         | 0                                       | TCM        | 0,16 | 0,14 | 0,43 | 0,16 | 0,09 | 0,16 | 0    | 0,08 | 0,44 | 0    |  |  |
|                         | Ë                                       | TEM        | 0,11 | 0,06 | 0,63 | 0    | 0    | 0,07 | 0    | 0,42 | 0,71 | 0,07 |  |  |
|                         |                                         | TEMRA      | 0,08 | 0    | 1,15 | 0    | 0    | 0    | 1,13 | 0,53 | 0    | 0    |  |  |
|                         |                                         |            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |  |
|                         | D                                       | ТСМ        | 0    | 0,1  | 0    | 0,53 | 0,09 | 0    | 0    | 0,16 | 0,04 | 0,04 |  |  |
|                         | Ļ<br>T                                  | TEM        | 0,01 | 0,18 | 0    | 0,56 | 0,28 | 0    | 0,03 | 0,06 | 0,04 | 0,00 |  |  |
|                         | -                                       | TEMRA      | 0    | 0,25 | 0    | 0,04 | 0,26 | 0,09 | 0    | 0,18 | 0    | 0,00 |  |  |
|                         | ~                                       |            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |  |
| <b>1</b> 8 <sup>+</sup> | ///73                                   | TCM        | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |  |  |
| <u>5</u>                | 2-0<br>2                                | TEM        | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |  |  |
| F                       | Щ                                       | TEMRA      | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |  |  |
|                         |                                         |            | 0.02 | 0    | 0.02 | 0.02 | 0.05 | 0    | 0    | 0.02 | 0.04 | 0    |  |  |
|                         | η                                       |            | 0,03 | 0    | 0,02 | 0,03 | 0,05 | 0.04 | 0    | 0,03 | 0,04 | 0    |  |  |
|                         | ⊒                                       |            | U    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0,04 | 0    |  |  |
|                         |                                         | IEMRA      | U    | 0,01 | 0,01 | U    | U    | 0,03 | U    | 0,02 | 0,33 | . 0  |  |  |

Anexo 6: Freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN-γ e IL-2 de pacientes HIV<sup>+</sup> Controladores em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1

|        |          |            |      |      | C    | ONT  | ROL  | ADO  | R    |      |      |      |      |      |
|--------|----------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|        | HIV -    | especifica | 1022 | 1041 | 1089 | 1060 | 1068 | 1034 | 2044 | 1123 | 1122 | 2017 | 1098 | 1138 |
|        | ð        | ТСМ        | 0,16 | 0    | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 2,25 | 0,88 | 0,12 | 0,08 | 0,25 | 0,28 |
|        | Ч<br>Ч   | TEM        | 0    | 0,05 | 0,01 | 0,04 | 0    | 0,11 | 0,58 | 2,82 | 0,1  | 0    | 0    | 0    |
|        | _        | TEMRA      | 0,25 | 0,07 | 0,04 | 0    | 0,14 | 0,12 | 0,22 | 6,46 | 0,17 | 0,12 | 0,06 | 0    |
| 4<br>+ | 112      | ТСМ        | 0    | 0    | 0    | 0,05 | 0    | 0    | 0,2  | 0,01 | 0    | 0    | 0,01 | 0,07 |
| B      | б-<br>Z  | TEM        | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,27 | 0,09 | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Ĕ      | Ē        | TEMRA      | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,02 | 0,02 | 0    | 0,13 | 0,01 | 0,02 | 0,06 | 0    |
|        |          | тсм        | 0.02 | 0    | 0.25 | 0.04 | 0.16 | 0.02 | 0.08 | 0.26 | 0    | 0.06 | 0.04 | 0.16 |
|        | L2       | TEM        | 0    | 0    | 0.16 | 0.1  | 0.07 | 0.05 | 0.23 | 0.33 | 0.1  | 0.09 | 0.07 | 0.11 |
|        | _        | TEMRA      | 0,03 | 0    | 0,23 | 0,3  | 0,67 | 0,06 | 0,25 | 0,41 | 0,27 | 0,11 | 0    | 0,08 |
|        |          |            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|        | <u>p</u> | ТСМ        | 0,19 | 0,05 | 0,12 | 0,12 | 0,17 | 0,13 | 1,19 | 2,35 | 0,07 | 0    | 1,07 | 0    |
|        | μ        | TEM        | 0,17 | 0,05 | 0,06 | 0,03 | 0,31 | 0,22 | 1,01 | 2,02 | 0    | 0    | 2,1  | 0,01 |
|        |          | TEMRA      | 0,27 | 0,08 | 0,04 | 0,09 | 0,19 | 0,09 | 1,19 | 3,69 | 0    | 1,23 | 1,13 | 0    |
| #      | IL2      | ТСМ        | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0,04 | 0    |
| õ      | ۲-g/     | TEM        | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0,01 | 0    |
| Ĕ      |          | TEMRA      | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,03 | 0    |
|        |          | ТСМ        | 0    | 0    | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,23 | 0,31 | 0,04 | 0    | 0,14 | 0,03 |
|        | IL2      | TEM        | 0    | 0    | 0,04 | 0    | 0,01 | 0,08 | 0,08 | 0,07 | 0    | 0    | 0,08 | 0    |
|        |          | TEMRA      | 0    | 0    | 0,03 | 0    | 0,06 | 0,01 | 0,09 | 0,12 | 0    | 0    | 0,06 | 0    |

| -        | u            |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----------|--------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| _        |              |       |      |      |      | LTN  | IP   |      |      |      |      |      |
|          | es           | CMV - | 004  | A6   | 600  | 014  | 001  | 010  | A1   | A2   | A5   | 017  |
| -        | γ-           | ТСМ   | 0    | 0,11 | 0,08 | 0    | 0,04 | 0    | 0,05 | 0    | 0,01 | 0,01 |
|          | Ż            | TEM   | 0,03 | 0,95 | 0    | 0,03 | 0,15 | 0    | 0    | 0,05 | 0,3  | 0,01 |
|          | _            | TEMRA | 0,07 | 1,37 | 0,08 | 0    | 0,14 | 0,05 | 0,02 | 0    | 0,35 | 0,03 |
| <b>⁺</b> |              |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Ö        | IL2          | ТСМ   | 0    | 0,02 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    |
| Ĕ        | /λ- <b>7</b> | TEM   | 0,01 | 0,12 | 0    | 0    | 0,04 | 0,02 | 0    | 0    | 0,09 | 0,01 |
|          | Ē            | TEMRA | 0    | 0,03 | 0    | 0    | 0,03 | 0,01 | 0    | 0,05 | 0,04 | 0    |
|          |              |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|          |              | ТСМ   | 0,01 | 0,01 | 0,04 | 0,01 | 0    | 0,02 | 0,06 | 0,04 | 0    | 0    |
|          | 12           | TEM   | 0,02 | 0,04 | 0,04 | 0,05 | 0,02 | 0,09 | 0,03 | 0,19 | 0,02 | 0    |
|          |              | TEMRA |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |

Anexo 7: Freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN-γ e IL-2 de pacientes HIV<sup>+</sup> LTNP em resposta ao *pool* de peptídeos do CMV

|        | -4         | TCM   | 0,01 | 0,55 | 0,02 | 0,01 | 0,04 | 0,03 | 0,08 | 0,11 | 0,01 | 0,06 |
|--------|------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|        | Ż          | TEM   | 0,18 | 1,26 | 0,04 | 0    | 0,07 | 0    | 0,07 | 0,32 | 0,06 | 0,12 |
|        | _          | TEMRA | 0,15 | 4,28 | 0,02 | 0,05 | 0,15 | 0,01 | 0,15 | 0,2  | 0,24 | 0,1  |
|        |            |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ÷<br>œ | IL2        | TCM   | 0    | 0,02 | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0,01 |
| õ      | <u>η-γ</u> | TEM   | 0    | 0,02 | 0    | 0    | 0,01 | 0,01 | 0    | 0,01 | 0    | 0    |
| Ĕ      | Ē          | TEMRA | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0    |
|        |            |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|        |            | ТСМ   | 0,05 | 0,02 | 0,04 | 0,01 | 0,04 | 0,01 | 0,06 | 0,11 | 0,07 | 0    |
|        | IL2        | TEM   | 0,01 | 0    | 0,02 | 0    | 0,05 | 0,02 | 0,04 | 0,11 | 0,02 | 0    |
|        |            | TEMRA | 0    | 0,02 | 0,03 | 0,01 | 0,01 | 0    | 0,04 | 0,24 | 0,05 | 0,01 |

Anexo 8: Freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN-γ e IL-2 de pacientes HIV<sup>+</sup> AV-ART em resposta ao *pool* de peptídeos do CMV

|          |             |                   |      |      |      | AV-A | RT   |      |      |      |      |      |
|----------|-------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|          | es          | CMV -<br>pecifica | A 7  | A 15 | A 32 | A 44 | A 52 | A 56 | A 57 | A 59 | A24  | A43  |
|          | b           | ТСМ               | 0    | 0    | 0,06 | 0,03 | 0,01 | 0,02 | 0,17 | 0    | 0    | 0,06 |
|          | -<br>L<br>L | TEM               | 0    | 0,03 | 0,04 | 0    | 0,04 | 0,07 | 0    | 0,06 | 0,28 | 0,02 |
|          | _           | TEMRA             | 0,14 | 0,26 | 0,17 | 0,3  | 0    | 0,07 | 0,21 | 0,08 | 0    | 0,03 |
|          |             |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <b>4</b> | ///2        | TCM               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0,02 | 0    | 0    | 0,01 |
| C<br>C   | Б-О         | TEM               | 0,01 | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0,04 | 0    | 0,01 | 0,03 | 0    |
| ⊢        | Ē           | TEMRA             | 0,41 | 0    | 0    | 0,02 | 0    | 0,02 | 0    | 0    | 0    | 0,1  |
|          |             |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|          | ~           | TCM               | 0,04 | 0    | 0,07 | 0,03 | 0,04 | 0,02 | 0    | 0,02 | 0,02 | 0,15 |
|          |             | TEM               | 0,07 | 0    | 0,01 | 0,09 | 0,02 | 0    | 0    | 0    | 0,07 | 0,11 |
|          |             | TEMRA             | 0    | 0    | 0,03 | 0,08 | 0    | 0,23 | 0,13 | 0    | 0    | 1,92 |
|          |             |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|          | D           | TCM               | 0    | 0,01 | 0,24 | 1,81 | 0,08 | 0,03 | 0    | 0,05 | 0,22 | 0,07 |
|          | Ż           | TEM               | 0    | 0,04 | 0,81 | 0,45 | 0,09 | 0,04 | 0    | 0,12 | 0,84 | 0,07 |
|          | =           | TEMRA             | 0,14 | 0,1  | 1,77 | 0    | 0,11 | 0,02 | 0    | 0,08 | 2,92 | 0,16 |
|          |             |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ÷<br>80  | IL2         | TCM               | 0    | 0    | 0,05 | 0    | 0,04 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Õ        | ۲-g/        | TEM               | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0,01 | 0    | 0,01 | 0    | 0,03 | 0    |
| Ĕ        | Ē           | TEMRA             | 0,01 | 0    | 0,07 | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|          |             |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|          |             | ТСМ               | 0,08 | 0,03 | 0,03 | 0    | 0,04 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 |
|          | IL2         | TEM               | 0    | 0,01 | 0,03 | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,02 |
|          |             | TEMRA             | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0,03 |

Anexo 9: Freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN-γ e IL-2 de pacientes HIV<sup>+</sup> VI-ART em resposta ao *pool* de peptídeos do CMV

| -        |               |                   |      |      |      | VI-A | RT   |      |      |      |      |      |
|----------|---------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|          | es            | CMV -<br>pecifica | A 14 | A 18 | A 25 | A 38 | A 45 | A 63 | A 73 | A 75 | A9   | A70  |
|          | γ             | ТСМ               | 0,06 | 0    | 0,06 | 0    | 0    | 0,28 | 0    | 0,03 | 0    | 0,02 |
|          | Ż             | TEM               | 0,03 | 0    | 0,04 | 0,26 | 0    | 0,33 | 0    | 0,06 | 0,04 | 0,06 |
|          | _             | TEMRA             | 0,15 | 0,02 | 0,02 | 0,28 | 0,28 | 0,32 | 0,5  | 0,39 | 0,29 | 0,16 |
|          |               |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <b>4</b> | 112           | TCM               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| С<br>С   | بر-۲<br>Z     | TEM               | 0    | 0    | 0    | 0,02 | 0    | 0,02 | 0    | 0,01 | 0    | 0,01 |
| Ĕ        | Щ             | TEMRA             | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0,18 | 0,08 | 0    | 0    | 0    |
|          |               |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|          | 01            | TCM               | 0    | 0    | 0,08 | 0    | 0,02 | 0    | 0,01 | 0    | 0,01 | 0,05 |
|          |               | TEM               | 0    | 0,02 | 0,07 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0,01 | 0,11 |
|          |               | TEMRA             | 0    | 0    | 0,09 | 0,08 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|          |               |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|          | 7             | ТСМ               | 0,11 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,18 | 0    | 0,03 | 0,31 | 0,01 |
|          | Ż             | TEM               | 0,18 | 0,11 | 0,19 | 0,46 | 0,33 | 0    | 0,01 | 0,08 | 0,56 | 0,02 |
|          | =             | TEMRA             | 0,21 | 0    | 0,01 | 0,44 | 0,08 | 0,01 | 0,1  | 0,03 | 1,31 | 0,03 |
|          |               |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ÷        | Γ2            | ТСМ               | 0,02 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,03 | 0    |
| ğ        | <b>۱</b> -γ/Ι | TEM               | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    |
| Ĕ        | Ξ             | TEMRA             | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|          |               |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|          |               | ТСМ               | 0,03 | 0,01 | 0,03 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 |
|          | IL2           | TEM               | 0,01 | 0    | 0,01 | 0,02 | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    |
|          |               | TEMRA             | 0.01 | 0    | 0    | 0.03 | 0    | 0.03 | 0.03 | 0    | 0    | 0    |

Anexo 10: Freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN-γ e IL-2 de pacientes HIV<sup>+</sup> VI sem ART em resposta ao *pool* de peptídeos do CMV

|          |         |                   |      |      | VI s | em AR | RT . |      |      |      |      |
|----------|---------|-------------------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|
|          | es      | CMV -<br>pecifica | A 26 | A 28 | A 40 | A 54  | A 60 | A 64 | A 66 | A 71 | A 74 |
| -        | Y       | ТСМ               | 0    | 0    | 0    | 0,12  | 0    | 0,02 | 0,06 | 0    | 0    |
|          | Ļ       | TEM               | 0    | 0    | 0,01 | 0,33  | 0    | 0,22 | 0,01 | 0    | 0,02 |
|          | _       | TEMRA             | 0    | 0    | 0    | 0     | 0,05 | 0    | 0,09 | 0    | 0    |
|          | •       |                   |      |      |      |       |      |      |      |      |      |
| <b>4</b> | 112     | TCM               | 0    | 0    | 0    | 0,01  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| C        | ہٰ<br>Z | TEM               | 0,03 | 0,02 | 0,01 | 0,08  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,03 |
| F        | Ш       | TEMRA             | 0    | 0    | 0    | 0     | 0,02 | 0,04 | 0    | 0    | 0    |
|          |         |                   |      |      |      |       |      |      |      |      |      |
|          | 01      | TCM               | 0,1  | 0,01 | 0    | 0     | 0    | 0,06 | 0,01 | 0,08 | 0    |
|          |         | TEM               | 0,12 | 0,05 | 0    | 0,14  | 0,01 | 0,06 | 0    | 0    | 0,07 |
|          |         | TEMRA             | 0,13 | 0,02 | 0,08 | 0,23  | 0    | 0    | 0,15 | 0    | 0    |
|          |         |                   |      |      |      |       |      |      |      |      |      |
|          |         |                   |      |      |      |       |      |      |      |      |      |
|          |         | том               | 0    | 0.00 | 0    | 0.04  | 0    | 0.07 | 0    | 0    | 0    |
|          | ∠-7     | TCM               | 0    | 0,02 | 0    | 0,04  | 0    | 0,07 | 0    | 0    | 0    |
|          | Ē       | I EM              | 0,04 | 0    | 0    | 0,06  | 0,01 | 1,01 | 0,01 | 0    | 0    |
|          |         | IEMRA             | 0,04 | 0,02 | 0    | 0,01  | 0    | 0,06 | 0    | 0    | 0    |
|          |         |                   | -    |      |      |       |      | -    | -    | -    |      |
| •4       | , IL    | TCM               | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| U<br>U   | -<br>Z  | TEM               | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| F        | Щ       | TEMRA             | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|          |         |                   |      |      |      |       |      |      |      |      |      |
|          |         | TCM               | 0,08 | 0,03 | 0    | 0     | 0    | 0,05 | 0    | 0    | 0    |
|          |         | TEM               | 0,03 | 0,02 | 0    | 0     | 0,01 | 0,01 | 0    | 0    | 0    |
|          |         | TEMRA             | 0,09 | 0    | 0,03 | 0,03  | 0,02 | 0    | 0,01 | 0    | 0    |

**Anexo 11** : Freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN-γ e IL-2 de pacientes HIV<sup>+</sup> VI-RI em resposta ao *pool* de peptídeos do CMV

|          |             |                   |      |      |      | VI-F | રા   |      |      |      |      |      |
|----------|-------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|          | es          | CMV -<br>pecifica | 1043 | 1133 | 1145 | 2030 | 1052 | 1096 | 2016 | 1057 | 2046 | 1144 |
|          | D           | ТСМ               | 0,02 | 0,09 | 0,62 | 0    | 0    | 0    | 0,17 | 0,15 | 0,05 | 0    |
|          | ЧЧ<br>Ч     | TEM               | 0,02 | 0,28 | 1,36 | 0    | 0,25 | 0,42 | 0,15 | 0,07 | 0,03 | 0,14 |
|          | _           | TEMRA             | 0,14 | 0,02 | 1,67 | 0,05 | 0    | 0,39 | 2,18 | 0,17 | 0    | 0    |
|          |             |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <b>4</b> | ///2        | TCM               | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0    |
| C<br>C   | Б-О         | TEM               | 0    | 0,04 | 0    | 0    | 0,03 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0    | 0,01 |
| ⊢        | Ē           | TEMRA             | 0    | 0,08 | 0    | 0    | 0,04 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|          |             |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|          | 0           | TCM               | 0,02 | 0,15 | 0    | 0    | 0    | 0,08 | 0    | 0,02 | 0,02 | 0    |
|          | Ë           | TEM               | 0    | 0,18 | 0,04 | 0    | 0    | 0,06 | 0    | 0,25 | 0    | 0,07 |
|          |             | TEMRA             | 0    | 0,38 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,7  | 0,08 | 0    | 0,03 |
|          |             |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|          | D           | ТСМ               | 0    | 0,13 | 0,34 | 0,06 | 0,65 | 0,46 | 0,01 | 1,91 | 0    | 0,05 |
|          | Z           | TEM               | 0    | 0,32 | 0,16 | 0,45 | 1,37 | 0,25 | 0,08 | 0,46 | 0,25 | 0,08 |
|          | <u> </u>    | TEMRA             | 0    | 0,48 | 0    | 0,54 | 0,88 | 0,55 | 0,04 | 0,51 | 0,07 | 0,32 |
|          |             |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ÷        | IL2         | ТСМ               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| õ        | <u>ا-g/</u> | TEM               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Ĕ        | Ē           | TEMRA             | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0    |
|          |             |                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|          |             | ТСМ               | 0    | 0,04 | 0,01 | 0,01 | 0,12 | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0,03 |
|          | IL2         | TEM               | 0    | 0,03 | 0    | 0,03 | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0,01 | 0,23 |
|          |             | TEMRA             | 0    | 0,06 | 0,01 | 0    | 0,03 | 0    | 0    | 0,04 | 0,18 | 0    |

Anexo 12: Freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN-γ e IL-2 de pacientes HIV<sup>+</sup> Controladores em resposta ao pool de peptídeos do CMV

|       | CONTROLADOR         |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------|---------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|       | CMV -<br>especifica |       | 1022 | 1041 | 1089 | 1060 | 1068 | 1034 | 2044 | 1123 | 1122 | 2017 | 1098 | 1138 |
| TCD4+ | IFN-g               | ТСМ   | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0,01 | 0,12 | 0,11 | 0,06 | 0,1  | 0,06 | 0,02 |
|       |                     | TEM   | 0    | 0,01 | 0,01 | 0,29 | 0,02 | 0,12 | 0    | 0,37 | 0,08 | 0    | 0,08 | 0,02 |
|       |                     | TEMRA | 0    | 0    | 0,12 | 0    | 0,09 | 0,75 | 0    | 0    | 0,4  | 0    | 0,54 | 0,14 |
|       | ~                   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|       | IFN-g/IL2           | TCM   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0,03 | 0    |
|       |                     | TEM   | 0    | 0    | 0    | 0,05 | 0,05 | 0,03 | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    |
|       |                     | TEMRA | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,12 | 0,24 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,02 | 0    |
|       |                     |       | -    | -    |      |      |      |      |      |      |      |      | -    |      |
|       | 2                   | ICM   | 0    | 0    | 0,09 | 0    | 0,02 | 0,07 | 0,12 | 0,22 | 0    | 0,07 | 0    | 0,02 |
|       | 4                   | TEM   | 0    | 0    | 0,15 | 0,12 | 0,12 | 0,13 | 0,16 | 0,61 | 0,03 | 0,19 | 0,08 | 0    |
|       |                     | TEMRA | 0,28 | 0    | 0,04 | 0,19 | 0,79 | 0,31 | 0    | 0,59 | 0,01 | 2,22 | 0,18 | 0    |
|       |                     |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|       |                     |       |      |      |      |      | _    |      |      |      |      |      |      | _    |
| TCD8+ | IFN-g               | ТСМ   | 0,34 | 0,24 | 0,02 | 0    | 0    | 0,01 | 0,17 | 0    | 0,64 | 0,21 | 0,08 | 0    |
|       |                     | TEM   | 0,45 | 0,33 | 0,02 | 0    | 0,29 | 0,1  | 0,15 | 0    | 0,1  | 0,34 | 0,54 | 0    |
|       |                     | TEMRA | 0,04 | 0,35 | 0,03 | 0    | 0,11 | 0,21 | 0,06 | 0    | 0,05 | 0,66 | 0,39 | 0    |
|       | 2                   | TOM   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0.04 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|       | IFN-g/IL            |       | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|       |                     | I EM  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0,01 | 0    | 0    | 0    | 0,01 | 0,03 | 0    |
|       |                     | TEMRA | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0,02 | 0,02 | 0    |
|       |                     | тсм   | 0.01 | 0    | 0.01 | 0.01 | 0    | 0    | 0 15 | 0    | 0.05 | 0    | 0.03 | 0    |
|       | IL2                 |       | 0,01 | 0    | 0,01 | 0,01 | 0.01 | 0.00 | 0,13 | 0    | 0,00 | 0.06 | 0,03 | 0    |
|       |                     |       | U    | U    | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | U    | U    | 0,06 | 0,01 | U    |
|       |                     | TEMRA | 0,07 | 0    | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,07 | 0    | 0,02 | 0,05 | 0    | 0    |

|            | T CD8+        |                |               |                |      |              |               |               |                |  |  |
|------------|---------------|----------------|---------------|----------------|------|--------------|---------------|---------------|----------------|--|--|
|            |               | 1 000:         |               |                |      |              |               |               |                |  |  |
|            | DMSO          | HIV            | CMV           | SEB            |      | DMSO         | HIV           | CMV           | SEB            |  |  |
| CTR 1      | 1,01          | 0,99           | 0,47          | 43,69          |      | 0,00         | 1,15          | 0,07          | 42,63          |  |  |
| A7         | 5,24          | 10,59          | 6,47          | 54,63          |      | 5,72         | 6,34          | 5,97          | 51,81          |  |  |
| A15<br>A24 | 0,82<br>2,53  | 5,12<br>7,37   | 4,29<br>3,14  | 33,58<br>12,40 |      | 2,04<br>1,75 | 2,71<br>5,34  | 2,19<br>2,28  | 19,31<br>11,49 |  |  |
| A43        | 1,79          | 2,84           | 3,26          | 34,33          |      | 3,16         | 6,57          | 6,76          | 19,76          |  |  |
| A28<br>A54 | 3,63<br>3,66  | 6,61<br>9,76   | 4,79<br>5,23  | 29,40<br>30,48 |      | 1,71<br>5,58 | 6,06<br>12,58 | 6,98<br>7,30  | 26,31<br>24,34 |  |  |
|            | ТСМ           |                |               |                |      |              |               |               |                |  |  |
| CTR 1      | 2,75          | 1,80           | 1,46          | 37,12          |      | 0,96         | 0,00          | 1,94          | 52,96          |  |  |
| A7<br>A15  | 8,76<br>2,42  | 12,21<br>5,93  | 8,77<br>4,04  | 53,86<br>21,94 |      | 3,64<br>3,00 | 6,08<br>6,15  | 9,78<br>4,21  | 42,03<br>23,76 |  |  |
| A24        | 3,33          | 8,06           | 4,86          | 15,83          |      | 1,43         | 2,97          | 3,23          | 15,30          |  |  |
| A43        | 3,39          | 8,39           | 6,32          | 24,34          |      | 2,19         | 4,90          | 5,34          | 17,65          |  |  |
| A28<br>A54 | 8,31<br>11,60 | 13,53<br>20,76 | 6,85<br>14,36 | 37,09<br>45,93 |      | 6,84<br>9,24 | 13,50<br>9,57 | 7,62<br>10,67 | 33,53<br>16,47 |  |  |
|            | ТЕМ           |                |               |                |      |              |               |               |                |  |  |
| CTR 1      | 2,44          | 1,54           | 0,84          | 30,07          |      | 0,00         | 0,08          | 0,59          | 21,43          |  |  |
| A7<br>A15  | 6,31<br>3,83  | 9,70<br>6,41   | 12,75<br>4,80 | 41,56<br>12,13 |      | 7,22<br>1,70 | 9,22<br>7,13  | 4,54<br>5,39  | 28,84<br>14,69 |  |  |
| A24        | 10,51         | 11,04          | 9,58          | 25,22          |      | 4,35         | 8,83          | 8,22          | 12,59          |  |  |
| A43        | 3,65          | 7,44           | 7,71          | 17,61          |      | 2,05         | 8,07          | 6,92          | 16,98          |  |  |
| A28        | 6,63          | 8,92           | 11,41         | 27,96          |      | 7,37         | 6,65          | 10,01         | 17,74          |  |  |
| A54        | 10,28         | 13,95          | 14,41         | 24,27          |      | 8,71         | 12,90         | 8,57          | 10,81          |  |  |
| CTR 1      | 3,71          | 3,33           | 2,20          | 22,08          | MINA | 0,47         | 0,00          | 0,00          | 18,53          |  |  |
| A7         | 5,00          | 14,95          | 3,50          | 20,05          |      | 7,99         | 8,24          | 9,54          | 15,93          |  |  |
| A15        | 3,56          | 6,91           | 6,34          | 12,05          |      | 2,55         | 5,24          | 5,83          | 17,32          |  |  |
| A24        | 5,00          | 10,54          | 10,19         | 13,03          |      | 5,02         | 8,85          | 6,96          | 9,34           |  |  |
| A43        | 4,93          | 7,61           | 13,31         | 21,66          |      | 5,83         | 7,94          | 10,80         | 14,28          |  |  |
| A28        | 4,21          | 7,15           | 8,74          | 15,34          |      | 12,72        | 13,63         | 14,15         | 21,88          |  |  |
| A54        | 23 60         | 30.66          | 21 79         | 44 00          |      | 5 87         | 10 79         | 6 94          | 21.26          |  |  |

Anexo 13 - Proliferação por CFSE de células T naive e de memória de pacientes HIV+ e indivíduo controle sadio aos pools de peptídeos do HIV-1 e do CMV.

Células dos pacientes HIV<sup>+</sup> e controle sadio foram marcadas com CFSE (1,25  $\mu$ M) e estimuladas com o *pool* de peptídeos do HIV-1 (5  $\mu$ M), pool de peptídeos do CMV (5  $\mu$ M) ou SEB (2  $\mu$ g/mL) por 5 dias para análise da proliferação antígeno-específica. Adicionou-se DMSO ao controle negativo. Posteriormente, as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD3 APC Cy7, anti-CD4 APC, anti-CD8 PE Cy5, anti-CCR7 PE Cy7 e anti-CD45RA PE para a caracterização fenotípica das subpopulações *naive* (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), TCM (células de memória central) (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>); TEM (células de memória efetora) (CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>).

## 8. REFERÊNCIAS

Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, Johnston MN, Corcoran C, Wurcel AG, Fitzpatrick CA, Feeney ME, Rodriguez WR, Basgoz N, Draenert R, Stone DR, Brander C, Goulder PJ, Rosenberg ES, Altfeld M, Walker BD. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol*. 2003;77(3):2081-92.

Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*. 1996;272(5258):54-60. Review.

Appay V, Papagno L, Spina CA, Hansasuta P, King A, Jones L, Ogg GS, Little S, McMichael AJ, Richman DD, Rowland-Jones SL. Dynamics of T cell responses in HIV infection. *J Immunol*. 2002;168(7):3660-6.

Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008;73(11):975-83. Review

Atherton E, Sheppard RC. Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. Oxford: *IRL Press*;1989.

Bahbouhi B, Landay A, Al-Harthi L. Dynamics of cytokine expression in HIV productively infected primary CD4+ T cells. *Blood*. 2004;103(12):4581-7

Bailer RT, Holloway A, Sun J, Margolick JB, Martin M, Kostman J, Montaner LJ. IL-13 and IFN-gamma secretion by activated T cells in HIV-1 infection associated with viral suppression and a lack of disease progression. *J Immunol.* 1999;162(12):7534-42.

Baron V, Bouneaud C, Cumano A, Lim A, Arstila TP, Kourilsky P, Ferradini L, Pannetier C. The repertoires of circulating human CD8(+) central and effector memory T cell subsets are largely distinct. Immunity. 2003;18(2):193-204.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):868-71.

Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*. 2006;107(12):4781-9

Boaz MJ, Waters A, Murad S, Easterbrook PJ, Vyakarnam A. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol*. 2002;169(11):6376-85

Boletim Epidemiológico DST/AIDS. Programa Nacional de DST/AIDS. Ministério da Saúde. Brasilia 2007.

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 1994;68(9):6103-10.

Bourgeois C, Tanchot C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. Eur *J Immunol*. 2003; 33(12): 3225-31. Review.

Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. Expression of D57 defines replicative senescence and antigeninduced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*. 2003;101(7):2711-20.

Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Price DA, Guenaga FJ, Casazza JP, Kuruppu J, Yazdani J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol*. 2004;78(3):1160-8.

Bruns H, Meinken C, Schauenberg P, Härter G, Kern P, Modlin RL, Antoni C, Stenger S. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in humans. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1167-77

Burger S, Poles MA. Natural History and Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Seminar in Liver Disease*. 2003;23(2):115-24. Review.

Burgers WA, Chege GK, Müller TL, van Harmelen JH, Khoury G, Shephard EG, Gray CM, Williamson C, Williamson AL. Broad, high-magnitude and multifunctional CD4+ and CD8+ T-cell responses elicited by a DNA and modified vaccinia Ankara vaccine containing human immunodeficiency virus type 1 subtype C genes in baboons. *J Gen Virol*. 2009;90(Pt 2):468-80

Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996;272(5258):60-6. Review.

Bruns H, Meinken C, Schauenberg P, Härter G, Kern P, Modlin RL, Antoni C, Stenger S. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in humans. . 2009;119(5):1167-77

Caccamo N, Meraviglia S, La Mendola C, Guggino G, Dieli F, Salerno A. Phenotypical and functional analysis of memory and effector human CD8 T cells specific for mycobacterial antigens. J Immunol. 2006;177(3):1780-5

Campbell JJ, Bowman EP, Murphy K, Youngman KR, Siani MA, Thompson DA, Wu L, Zlotnik A, Butcher EC. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J Cell Biol*. 1998;141(4):1053-9.

Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, Boisvert J, Greenberg HB, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC,

Wardlaw AJ, Butcher EC, WuL. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol*. 2001;166(2):877-84.

Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virological and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995;332:201–208.

Carotenuto P, Looij D, Keldermans L, de Wolf F, Goudsmit J. Neutralizing antibodies are positively associated with CD4R T-cell counts and T-cell function in long-term AIDS-free infection. *AIDS* 1998;12:1591–1600.

Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, Rizzardi GP, Fleury S, Lipp M, Forster R, Rowland-Jones S, Sekaly RP, McMichael AJ, Pantaleo G. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature*. 2001;410(6824):106-11.

Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, Schambach F, Intlekofer AM, Banerjee A, Longworth SA, Vinup KE, Mrass P, Oliaro J, Killeen N, Orange JS, Russell SM, Weninger W, Reiner SL. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science*. 2007;315(5819):1687-91.

Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel MR, Ghattas G, Brenchley JM, Schacker TW, Hill BJ, Douek DC, Routy JP, Haddad EK, Sékaly RP. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*. 2009;15(8):893-900

Choudhary SK, Vrisekoop N, Jansen CA, Otto SA, Schuitemaker H, Miedema F, Camerini D. Low immune activation despite high levels of pathogenic human immunodeficiency virus type 1 results in long-term asymptomatic disease. *J Virol.* 2007;81(16):8838-42.

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995;270:1811-15.

Collin M, Illei P, James W, Gordon S. Definition of the range and distribution of human immunodeficiency virus macrophage tropism using PCR-based infectivity measurements. *J. Gen. Virol.* 1994;75 (Pt. 7):1597–1603.

Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med*. 1997;17;185(4):621-8

Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312(5996):763-7.

Day CL, Kiepiela P, Leslie AJ, van der Stok M, Nair K, Ismail N, Honeyborne I, Crawford H, Coovadia HM, Goulder PJ, Walker BD, Klenerman P. Proliferative capacity of epitope-specific CD8 T-cell responses is inversely related to viral load in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2007;81(1):434-8.

de Martinez AM, Barbosa EF, Ferreira PC, Cardoso FA, Silveira J, Sassi G, da Silva CM, Mendonca-Signorini V, Antunes CM. Molecular epidemiology of HIV-1 in Rio Grande, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(5):471-6.

Demoustier A, Gubler B, Lambotte O, de Goer MG, Wallon C, Goujard C, Delfraissy JF, Taoufik Y. In patients on prolonged HAART, a significant *pool* of HIV infected CD4 T cells are HIV-specific. *AIDS*. 2002;16(13):1749-54.

Dewhurst S, Whetter L. Pathogenesis and treatment of HIV-1 infection: recent developments. *Front Biosci*. 1997;2:147-59. Review.

Dockrell DH, Badley AD, Algeciras-Schimnich A, Simpson M, Schut R, Lynch DH, Paya CV. Activation-induced CD4+ T cell death in HIV-positive individuals correlates with Fas susceptibility, CD4+ T cell count, and HIV plasma viral copy number. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999;15(17):1509-18.

Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417(6884):95-8.

Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:201-23. Review.

Elrefaei M, McElroy MD, Preas CP, Hoh R, Deeks S, Martin J, Cao H. Central memory CD4+ T cell responses in chronic HIV infection are not restored by antiretroviral therapy. *J Immunol*. 2004;173(3):2184-9.

Faint JM, Annels NE, Curnow SJ, Shields P, Pilling D, Hislop AD, Wu L, Akbar AN, Buckley CD, Moss PA, Adams DH, Rickinson AB, Salmon M. Memory T cells constitute a subset of the human CD8+CD45RA+ pool with distinct phenotypic and migratory characteristics. *J Immunol*. 2001;167(1):212-20

Fonseca SG, Coutinho-Silva A, Fonseca LA, Segurado AC, Moraes SL, Rodrigues H, Hammer J, Kallas EG, Sidney J, Sette A, Kalil J, Cunha-Neto E. Identification of novel consensus CD4 T-cell epitopes from clade B HIV-1 whole genome that are frequently recognized by HIV-1 infected patients. *AIDS*. 2006;20(18):2263-73.

Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 1999;99(1):23-33.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science. 1984;224(4648):500-3.

Gandhi RT, Chen BK, Straus SE, Dale JK, Lenardo MJ, Baltimore D. HIV-1 directly kills CD4+ T cells by a Fas-independent mechanism. *J Exp Med*. 1998;187(7):1113-22.

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature*. 1999;397(6718):436-41.

Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, Moser JM, Mehta RS, Drake DR 3rd, Castro E, Akondy R, Rinfret A, Yassine-Diab B, Said EA, Chouikh Y, Cameron MJ, Clum R, Kelvin D, Somogyi R, Greller LD, BalderasRS, Wilkinson P, Pantaleo G, Tartaglia J, Haddad EK, Sékaly RP. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med*. 2008;205(13):3119-31

Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med*. 2001;194(12):1711-9.

Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*. 2003;101(11):4260-6.

Greenough TC, Brettler DB, Somasundaran M, Panicali DL, Sullivan JL. Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL), virus load, and CD4 T cell loss: evidence supporting a protective role for CTL in vivo. *J Infect Dis.* 1997;176(1):118-25.

Grivel JC, Margolis LB. CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1 are equally cytopathic for their T-cell targets in human lymphoid tissue. *Nat Med*. 1999;5(3):344-6

Groot F, van Capel TM, Schuitemaker J, Berkhout B, de Jong EC. Differential susceptibility of naïve, central memory and effector memory T cells to dendritic cell-mediated HIV-1 transmission. *Retrovirology*. 2006 17;3:52

Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med.* 2002;8(4):319-23.

Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med*. 2006;12(3):289-95.

Hammer J, Belunis C, Bolin D, Papadopoulos J, Walsky R, Higelin J, Danho W, Sinigaglia F, Nagy ZA. High-affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proc Natl Acad Sci* U S A. 1994;91(10):4456-60.

Halwani R, Doroudchi M, Yassine-Diab B, Janbazian L, Shi Y, Said EA, Haddad EK, Sekaly RP. Generation and maintenance of human memory cells during viral infection. *Springer Semin Immunopathol*. 2006;28(3):197-208.

Hansen SG, Vieville C, Whizin N, Coyne-Johnson L, Siess DC, Drummond DD, Legasse AW, Axthelm MK, Oswald K, Trubey CM, Piatak M Jr, Lifson JD, Nelson JA, Jarvis MA, Picker LJ. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat Med.* 2009;15(3):293-9

Harari A, Rizzardi GP, Ellefsen K, Ciuffreda D, Champagne P, Bart PA, Kaufmann D, Telenti A, Sahli R, Tambussi G, Kaiser L, Lazzarin A, Perrin L, Pantaleo G. Analysis of HIV-1- and CMV-specific memory CD4 T-cell responses during primary and chronic infection. *Blood*. 2002;100(4):1381-7.

Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood*. 2004b;103(3):966-72.

Harari A, Vallelian F, Pantaleo G. Phenotypic heterogeneity of antigenspecific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. Eur *J Immunol*. 2004a;34(12):3525-33.

Harari A, Vallelian F, Meylan PR, Pantaleo G. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol*. 2005;174(2):1037-45.

Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, Miedema F, Hamann D. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood*. 2000;95(1):249-55.

Heeregrave EJ, Geels MJ, Brenchley JM, Baan E, Ambrozak DR, van der Sluis RM, Bennemeer R, Douek DC, Goudsmit J, Pollakis G, Koup RA, Paxton WA. Lack of invivo compartmentalization among HIV-1 infected naïve and memory CD4+ T cell subsets. *Virology*. 2009;10;393(1):24-32

Heller KN, Upshaw J, Seyoum B, Zebroski H, Münz C. Distinct memory CD4+ T-cell subsets mediate immune recognition of Epstein Barr virus nuclear antigen 1 in healthy virus carriers. *Blood*. 2007;109(3):1138-46.

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995;373(6510):123-6.

Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: cellular and humoral immune responses. Ann Intern Med. 2001;134(9 Pt 1):761-76. Review.

Höhn H, Jülch M, Pilch H, Kortsik C, Tully G, Neukirch C, Freitag K, Maeurer M. Definition of the HLA-A2 restricted peptides recognized by human CD8+ effector T cells by flow-assisted sorting of the CD8+ CD45RA+ CD28- T cell subpopulation. *Clin Exp Immunol*. 2003;131(1):102-10.

Iwai LK, Yoshida M, Sidney J, Shikanai-Yasuda MA, Goldberg AC, Juliano MA,Hammer J, Juliano L, Sette A, Kalil J, Travassos LR, Cunha-Neto E. In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of Paracoccidioides brasiliensis frequently recognized in primary peripheral *Blood* mononuclear cell responses from sensitized individuals. *Mol Med*. 2003;9(9-12):209-19.

Janssens W, Heyndrickx L, Fransen K, Temmerman M, Leonaers A, Ivens T, Motte J, Piot P, Van der Groen G. Genetic variability of HIV type 1 in Kenya. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10(11):1577-9.

Joint United Programme on HIV/AIDS. 2008 report on the global AIDS epidemic: Executive summary. Genebra UNAIDS 2008. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1191-8.

Kannan K, Stewart RM, Bounds W, Carlsson SR, Fukuda M, Betzing KW, Holcombe RF. Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cell Immunol*. 1996;10;171(1):10-9

Kaufmann GR, Zaunders JJ, Cunningham P, Kelleher AD, Grey P, Smith D, Carr A, Cooper DA. Rapid restoration of CD4 T cell subsets in subjects receiving antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection. *AIDS*. 2000;14(17):2643-51.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in toleranceand immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704. Review

Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho DD. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol.* 1995;69(10):6122-30.

Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*. 1994;68(7):4650-5.

Labrijn AF, Poignard P, Raja A, Zwick MB, Delgado K, Franti M, Binley J, Vivona V, Grundner C, Huang CC, Venturi M, Petropoulos CJ, Wrin T, Dimitrov DS, Robinson J, Kwong PD, Wyatt RT, Sodroski J, Burton DR Access of antibody molecules to the conserved coreceptor binding site on glycoprotein gp120 is sterically restricted on primary human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2003;77:10557–10565.

Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science*. 2000;290(5489):92-7. Review.

Leitner T, Alaeus A, Marquina S, Lilja E, Lidman K, Albert J. Yet another subtype of HIV type 1? *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1995;11(8):995-7.

Lemey P, Pybus OG, Rambaut A, Drummond AJ, Robertson DL, Roques P, Worobey M, Vandamme AM. The molecular population genetics of HIV-1 group O. *Genetics*. 2004;167(3):1059-68.

Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci* U S A. 2003;100(11):6588-92.

Leng Q, Borkow G, Weisman Z, Stein M, Kalinkovich A, Bentwich Z. Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001;27(4):389-97.

Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M, Brennan TP, Sanders-Buell E, Eddy GA, van der Groen G, Fransen K, Gershy-Damet GM, Deleys R, et al. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS*. 1993;7(6):769-80.

Louwagie J, Janssens W, Mascola J, Heyndrickx L, Hegerich P, van der Groen G, McCutchan FE, Burke DS. Genetic diversity of the envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of African origin. *J Virol*. 1995;69(1):263-71.

Markovitz DM. Infection with the human immunodeficiency virus type 2. *Ann Intern Med.* 1993;118(3):211-8. Review.

Masemola A, Mashishi T, Khoury G, Mohube P, Mokgotho P, Vardas E, Colvin M, Zijenah L, Katzenstein D, Musonda R, Allen S, Kumwenda N, Taha T, Gray G, McIntyre J, Karim SA, Sheppard HW, Gray CM; HIVNET 028 Study Team. Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8+ T cells: correlation with viral load. *J Virol*. 2004;78(7):3233-43

McCune JM. The dynamics of CD4\_ T-cell depletion in HIV disease. *Nature*. 2001;410:974–979. Review.

McIlroy D, Autran B, Cheynier R, Wain-Hobson S, Clauvel JP, Oksenhendler E, Debre P, Hosmalin A. Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol*. 1995;69(8):4737-45.

Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 1996;272(5265):1167-70.

Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverley PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*. 1992;360(6401):264-5.

Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, Rood JE, Berkley AM, Sacha JB, Cogliano-Shutta NA, Lloyd M, Roby G, Kwan R, McLaughlin M, Stallings S, Rehm C, O'Shea MA, Mican J, Packard BZ, Komoriya A, Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Coffin JM, Mellors JW, Hallahan CW, Follman DA, Connors M. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*. 2008;29(6):1009-21.

Migueles SA, Weeks KA, Nou E, Berkley AM, Rood JE, Osborne CM, Hallahan CW ,Cogliano-Shutta NA, Metcalf JA, McLaughlin M, Kwan R, Mican JM, Davey RT Jr, Connors M. Defective Human Immunodeficiency Virus-Specific CD8+ T-Cell Polyfunctionality, Proliferation, and Cytotoxicity Are Not Restored by Antiretroviral Therapy. *J Virol.* 2009;83(22):11876-89.

Musey LK, Krieger JN, Hughes JP, Schacker TW, Corey L, McElrath MJ. Early and persistent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T helper dysfunction in *Blood* and lymph nodes following acute HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 1999;180(2):278-84.

Nomura LE, Emu B, Hoh R, Haaland P, Deeks SG, Martin JN, McCune JM, Nixon DF, Maecker HT. IL-2 production correlates with effector cell differentiation in HIV-specific CD8+ T cells. *AIDS Res Ther*. 2006;3:18.

Northfield JW, Loo CP, Barbour JD, Spotts G, Hecht FM, Klenerman P, Nixon DF, Michaëlsson J. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8+ T(EMRA) cells in early infection are linked to control of HIV-1 viremia and predict the subsequent viral load set point. *J Virol*. 2007;81(11):5759-65.

Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, Nixon DF, McMichael AJ. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science*. 1998;279(5359):2103-6.

Okoye A, Meier-Schellersheim M, Brenchley JM, Hagen SI, Walker JM, Rohankhedkar M, Lum R, Edgar JB, Planer SL, Legasse A, Sylwester AW, Piatak M Jr, Lifson JD, Maino VC, Sodora DL, Douek DC, Axthelm MK, Grossman Z, Picker LJ. Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. J Exp Med. 2007;204(9):2171-85. Erratum in: *J Exp Med*. 2007;204(10):2493.

Organização Mundial de Saúde. *World health report:* reducing risks, promoting healthy life. Genebra: OMS; 2002.

Oswald-Richter K, Grill SM, Leelawong M, Tseng M, Kalams SA, Hulgan T, Haas DW, Unutmaz D. Identification of a CCR5-expressing T cell subset that is resistant to R5-tropic HIV infection. *PLoS Pathog*. 2007;3(4):e58

Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, Borrow P, Saag MS, Shaw GM, Sekaly RP, et al.. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature*. 1994;370(6489):463-7.

Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol*. 1999;77(6):499-508. Review.

Paroli M, Propato A, Accapezzato D, Francavilla V, Schiaffella E, Barnaba V. The immunology of HIV-infected long-term non-progressors--a current view. *Immunol Lett.* 2001;79(1-2):127-9.

Perez-Patrigeon S, Vingert B, Lambotte O, Viard JP, Delfraissy JF, Thèze J,Chakrabarti LA. HIV infection impairs CCR7-dependent T-cell chemotaxisindependent of CCR7 expression. *AIDS*. 2009;19;23(10):1197-207

Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Zhou JY, Zhou JT, Bolognesi DP, Fauci AS, Montefiori DC Neutralizing antibody reponses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-non progressive infection. *J Infect Dis* 1997;176:924–932.

Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, van Griensven F, Hu D, Tappero JW, Choopanya K; Bangkok Vaccine Evaluation Group.

Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis*. 2006;194(12):1661-71

Plata F, Autran B, Martins LP, Wain-Hobson S, Raphael M, Mayaud C, Denis M, Guillon JM, Debre P. AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature*. 1987;328(6128):348-51.

Pontesilli O, Carotenuto P, Kerkhof-Garde SR, Roos MT, Keet IP, Coutinho RA, Goudsmit J, Miedema F. Lymphoproliferative response to HIV type 1 p24 in long-term survivors of HIV type 1 infection is predictive of persistent AIDS-free infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999;15(11):973-81.

Potter SJ, Chew CB, Steain M, Dwyer DE, Saksena NK. Obstacles to successful antiretroviral treatment of HIV-1 infection: problems & perspectives. Indian *J Med Res*. 2004;119(6):217-237. Review.

Ribeiro RM, Mohri H, Ho DD, Perelson AS. In vivo dynamics of T cell activation, proliferation, and death in HIV-1 infection: why are CD4+ but not CD8+ T cells depleted? *Proc Natl Acad Sci* U S A. 2002;99(24):15572-7.

Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med*. 2004;200(6):725-35

Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4\_ T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 1997;278:1447-1450.

Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, et al. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature*. 2000;407:523-526.
Rosignoli G, Lim CH, Bower M, Gotch F, Imami N. Programmed death (PD)-1 molecule and its ligand PD-L1 distribution among memory CD4 and CD8 T cell subsets in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Clin Exp Immunol*. 2009;157(1):90-7

Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors inT-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today*. 1998;19(12):568-74. Review

Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63. Review.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*. 2009;39(8):2076-82. Review

Schellens IM, Borghans JA, Jansen CA, De Cuyper IM, Geskus RB, van Baarle D, Miedema F. Abundance of early functional HIV-specific CD8+ T cells does not predict AIDS-free survival time. PLoS ONE. 2008;3(7):e2745.

Schenal M, Lo Caputo S, Fasano F, Vichi F, Saresella M, Pierotti P, Villa ML, Mazzotta F, Trabattoni D, Clerici M. Distinct patterns of HIV-specific memory T lymphocytes in HIV-exposed uninfected individuals and in HIV-infected patients. *AIDS*. 2005;19(7):653-61.

Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghrayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*. 1999;283(5403):857-60.

Sekaly RP. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med*. 2008;21;205(1):7-12.

Shankar P, Russo M, Harnisch B, Patterson M, Skolnik P, Lieberman J. Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 2000;96(9):3094-101.

Sieg SF, Bazdar DA, Harding CV, Lederman MM. Differential expression of interleukin-2 and gamma interferon in human immunodeficiency virus disease. *J Virol*. 2001;75(20):9983-5.

Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, McClure HM, Staprans SI, Feinberg MB. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity*. 2003;18(3):441-52.

Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol*. 2002;169(6):3400-6.

Steers NJ, Peachman KK, McClain S, Alving CR, Rao M. Liposomeencapsulated HIV-1 Gag p24 containing lipid A induces effector CD4+ Tcells, memory CD8+ T-cells, and pro-inflammatory cytokines. *Vaccine*. 2009;11

Steinbrook R. One step forward, two steps back--will there ever be an AIDS vaccine? N Engl J Med. 2007;357(26):2653-5

Sturniolo T, Bono E, Ding J, Raddrizzani L, Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J. Generation of tissuespecific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol*. 1999;17(6):555-61. Takahashi H. Antigen presentation in vaccine development.Comp Immunol *Microbiol Infect Dis.* 2003;26(5-6):309-28. Review.

Terai C, Kornbluth RS, Pauza CD, Richman DD, Carson DA. Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J Clin Invest*. 1991;87(5):1710-5.

Tomiyama H, Matsuda T, Takiguchi M. Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J Immunol*. 2002;168(11):5538-50.

Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:85-116. Review.

Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, Blumberg RS, Kaplan JC, Hirsch MS, Schooley RT. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature*. 1987;328(6128):345-8.

Walker BD, Burton DR. Toward an AIDS vaccine. *Science*. 2008;320(5877):760-4. Review

Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, von Andrian UH, Ahmed R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol*. 2003;4(3):225-34.

Wilson JD, Imami N, Watkins A, Gill J, Hay P, Gazzard B, Westby M, Gotch FM. Loss of CD4+ T cell proliferative ability but not loss of human immunodeficiency virus type 1 specificity equates with progression to disease. *J Infect Dis.* 2000;182(3):792-8.

Winstone N, Guimarães-Walker A, Roberts J, Brown D, Loach V, Goonetilleke N, Hanke T, McMichael AJ. Increased detection of proliferating, polyfunctional, HIV-1-specific T cells in DNA-modified vaccinia virus Ankara-

vaccinated human volunteers by cultured IFN-gamma ELISPOT assay. *Eur J Immunol*. 2009;39(4):975-85.

Yates A, Stark J, Klein N, Antia R, Callard R. Understanding the slow depletion of memory CD4+ T cells in HIV infection. *Plos Med*. 2007; 4(5): e177.

Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, Routy JP, Sekaly RP. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med*. 2003;198(12):1909-22.

Younes SA, Trautmann L, Yassine-Diab B, Kalfayan LH, Kernaleguen AE, Cameron TO, Boulassel R, Stern LJ, Routy JP, Grossman Z, Dumont AR, Sekaly RP. The duration of exposure to HIV modulates the breadth and the magnitude of HIV-specific memory CD4+ T cells. *J Immunol.* 2007

Zimmerli SC, Harari A, Cellerai C, Vallelian F, Bart PA, Pantaleo G. HIV-1specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(20):7239-44.